

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ประสิทธิภาพของสารสกัดเห็ดรา *Trichoderma* spp. ต่อการยับยั้งการ
เจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา
Aspergillus flavus IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสง

EFFICACY OF CRUDE EXTRACT OF *Trichoderma* spp. ON GROWTH
INHIBITION AND AFLATOXIN PRODUCTION OF *Aspergillus flavus* IMI
242684 IN PEANUT GRAINS



กพ.
๑๒๔๖
๒๕๕๓

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน... 110612
วัน,เดือน,ปี... - ๑ 11 ๒๕ ๕๓

b... 12255713
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. ๒๕๕๓

KMITL-2010-SC-M-020-019

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**EFFICACY OF CRUDE EXTRACT OF *Trichoderma* spp. ON GROWTH
INHIBITION AND AFLATOXIN PRODUCTION OF *Aspergillus flavus* IMI
242684 IN PEANUT GRAINS**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE MASTER DEGREE OF
SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2010

KMITL-2010-SC-M-020-019

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2010

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือนำไปใช้ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งการเจริญ ในขณะที่หูดควบคุม มีปริมาณสปอร์ 1.84×10^{11} สปอร์ต่อกรัม และมีปริมาณสารพิษ
อะฟลาทอกซิน B_1 , B_2 และอะฟลาทอกซินรวม (B_1+B_2) เท่ากับ 284.61, 163.43 และ 448.04
ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ หลังการเพาะเลี้ยงในเมล็ดถั่วลิสงเป็นเวลา 28 วัน

คำสำคัญ: อะฟลาทอกซิน, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma* spp., ถั่วลิสง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา II และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|-----------------------|---|
| Thesis Title | Efficacy of crude extract of <i>Trichoderma</i> spp. on growth inhibition and aflatoxin production of <i>Aspergillus flavus</i> IMI 242684 in peanut grains |
| Student | Miss Jantamas Jantarach |
| Student ID | 49068354 |
| Degree | Master of Science |
| Year | 2010 |
| Thesis Advisor | Assoc. Prof. Dr. Dusanee Thanaboripat |

Abstract

Four strains of *Trichoderma* spp., i.e. isolate 3167, KMC 5, SRS 4 and SCP III were tested on their efficiencies on inhibiting the growth, overgrowing, coiling and producing antifungal properties against *Aspergillus flavus* IMI 242684 on plate assays using potato dextrose agar (PDA) at ambient temperature. All strains inhibited the growth of *A. flavus* IMI 242684 with the percentage of inhibition of 55.63, 53.31, 52.51 and 49.03, respectively. For overgrown on *A. flavus* IMI 242684 mycelia, the percentages of inhibition were 55.00, 54.00, 54.00 and 24.00, respectively. For antifungal properties using dialysis membrane technique the results showed that mycelial growth of *A. flavus* IMI 242684 was inhibited with the percentage of inhibition at 55.00, 54.00, 54.00 and 24.00, respectively. *Trichoderma* spp. isolates TISTR 3167, KMC 5, SRS 4 coiled the mycelia of *A. flavus* IMI 242684 except for *Trichoderma* spp. isolate SCP III. Antifungal metabolites from *Trichoderma* spp. TISTR 3167, KMC 5, SRS 4 and SCP III were extracted from pellet cell by methanol and culture filtrate by three different solvents, i.e. hexane, ethyl acetate and n-butanol and tested for growth inhibition and aflatoxin production of *A. flavus* IMI 242684 by paper disc diffusion method on potato dextrose agar and in peanut grains. The results showed that ethyl acetate was the best solvent. Ethyl acetate extracts from culture filtrate of *Trichoderma* spp. TISTR 3167, KMC 5 and SRS 4 at 50 mg/mL could inhibit the growth of *A. flavus* IMI 242684 with the inhibition zones of 31.58, 31.12 and 30.82 mm, respectively. *Trichoderma* spp. SCP III did not show any inhibitory effect. When ethyl acetate extracts of *Trichoderma* spp. TISTR 3167, KMC 5 and SRS 4 at 50 mg/mL were further applied in peanut grains, the growths of *A. flavus* IMI 242684 were 1.60×10^3 , 1.88×10^3 and 3.17×10^3 CFU/g, respectively and the amounts of aflatoxin B₁ were 0.09, 0.23 and 0.29 µg/g, B₂ were 0.22, 0.10 and 0.17 µg/g, respectively and total aflatoxins (B₁+B₂) were 0.31, 0.33 and

0.46 µg/g, respectively, whereas the control was 1.84×10^{11} CFU/g and the amount of aflatoxin B₁, B₂ and total aflatoxins (B₁+B₂) were 284.61, 163.43 and 448.04 µg/g, respectively when peanut grains were incubated for 28 days at room temperature. The potential of three crude extracts from *Trichoderma* spp. TISTR 3167, KMC 5 and SRS 4 with ethyl acetate were not significant ($P \leq 0.05$).

Keywords: aflatoxin, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma* spp., peanut



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา **IV** และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. คุณณี ฐนะบริพัฒน์ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้ข้อเสนอแนะ ตลอดจนแนวทางในการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการค้นคว้าการวิจัย รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. อุ่นเรือน เพชรวัลย์, รศ.ดร. นवलพรรณ ฌ ระนอง และ รศ. อรไท สุขเจริญ ที่กรุณาให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ ตลอดจนแนวทางในการแก้ปัญหา รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นที่อนุเคราะห์ให้วัสดุส่ง สายพันธุ์ขอนแก่น 6 เพื่อใช้ในการวิจัย

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมี รวมทั้งอำนวยความสะดวกต่างๆระหว่างทำการวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ความสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ นักศึกษาปริญญาโทและเอกทุกท่าน ที่คอยเป็นกำลังใจและช่วยแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการวิจัย

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

จันทมาส จันทราช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา V และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

| | |
|--------------------------|-----|
| บทคัดย่อภาษาไทย | I |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | III |
| กิตติกรรมประกาศ | V |
| สารบัญ | VI |
| สารบัญตาราง | XI |
| สารบัญภาพ | XII |

บทที่ 1 บทนำ

| | |
|-------------------------------------|---|
| 1.1 ความเป็นมาของปัญหา | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ | 2 |
| 1.3 ขอบเขตการวิจัย | 2 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 2 |

บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

| | |
|--|----|
| 2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. | 3 |
| 2.2 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. และเชื้อสาเหตุโรคพืช | 4 |
| 2.2.1 การเป็นปรสิตและการผลิตเอนไซม์ | 5 |
| 2.2.2 การผลิตสารปฏิชีวนะและสารทุติยภูมิของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. | 7 |
| 2.2.3 การเจริญแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคพืชและจุลินทรีย์ในดินของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. | 9 |
| 2.3 สารพิษอะฟลาทอกซิน | 12 |
| 2.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน | 13 |
| 2.5 ชนิดและคุณสมบัติของอะฟลาทอกซิน | 13 |
| 2.6 อันตรายจากสารพิษอะฟลาทอกซิน | 15 |
| 2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา | 16 |
| 2.7.1 ชนิดของเชื้อรา | 16 |
| 2.7.2 แหล่งอาหาร | 17 |
| 2.7.3 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ | 17 |
| 2.7.4 ความชื้นและความชื้นสัมพัทธ์ | 18 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา VI ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|---|------|
| 2.7.5 อุณหภูมิและระยะเวลา | 18 |
| 2.7.6 ปัจจัยอื่นๆ..... | 18 |
| 2.8 วิธีการควบคุมการปนเปื้อนและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา | 19 |
| 2.8.1 วิธีทางกายภาพ..... | 19 |
| 2.8.2 วิธีทางชีวภาพ | 20 |
| 2.8.3 วิธีทางเคมี..... | 23 |
| 2.9 การสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง..... | 24 |
| 2.9.1 ระยะก่อนการเก็บเกี่ยว..... | 25 |
| 2.9.2 ระยะหลังการเก็บเกี่ยว..... | 26 |
| 2.9.3 ระยะการเก็บรักษา..... | 26 |
| 2.10 กลไกการต้านทานต่อเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง..... | 27 |
| 2.10.1 การต้านทานเนื่องมาจากสารเคมี | 27 |
| 2.10.2 การต้านทานเชิงกล..... | 27 |
| บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย | |
| 3.1 เชื้อรา..... | 28 |
| 3.2 ถั่วลิสง | 28 |
| 3.3 อุปกรณ์และสารเคมี | 28 |
| 3.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 และเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. โดย slide culture | 30 |
| 3.5 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ | 30 |
| 3.5.1 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญแบบแข่งขันกับเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 | 30 |
| 3.5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ต่อการเจริญคลุ่มทับเส้นใยเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 | 31 |
| 3.5.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ในการพันรัดเส้นใยเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 | 31 |
| 3.5.4 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา VII ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

| | |
|---|----|
| <i>Trichoderma</i> spp. ต่อเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 โดยวิธี Dialysis Membrane Technique | 32 |
| 3.6 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ในอาหารเหลวพีดีบี..... | 32 |
| 3.7 การสกัดสารจากเส้นใยราและน้ำหมักจากเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. | 33 |
| 3.8 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684..... | 34 |
| 3.9 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 โดยวิธี Paper Disc Diffusion..... | 34 |
| 3.10 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 โดยวิธี Paper Disc Diffusion | 35 |
| 3.11 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสง | 36 |
| 3.11.1 การนับจำนวนเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสงด้วยเทคนิค spread plate | 36 |
| 3.11.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน | 36 |
| 3.11.2.1 การสกัดอะฟลาทอกซิน | 36 |
| 3.11.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซิน | 37 |
| 3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ | 37 |

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์

| | |
|---|----|
| 4.1 ผลการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 และเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. โดยการทำให้ slide culture | 38 |
| 4.1.1 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 | 38 |
| 4.1.2 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไโอโซเลต TISTR 3167 | 39 |
| 4.1.3 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไโอโซเลต KMC 5 | 40 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา VIII จะต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

| | |
|---|-----------|
| 4.1.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลต SRS 4 | 41 |
| 4.1.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลต SCP III | 42 |
| 4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญ ของเชื้อรา <i>A. flavus</i> . IMI 242684 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ | 43 |
| 4.2.1 ประสิทธิภาพในการเจริญแบบแข่งขันของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. กับเชื้อรา <i>A. flavus</i> . IMI 242684..... | 43 |
| 4.2.2 ประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ในการเจริญคลุมทับเส้นใย เชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684..... | 46 |
| 4.2.3 ประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ในการพันรัดเส้นใย เชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 | 48 |
| 4.2.4 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ต่อเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 โดย Dialysis Membrane Technique | 49 |
| 4.3 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ในอาหารเหลวพีดีบี | 52 |
| 4.4 ผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ต่อการยับยั้งการเจริญของ เชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 โดยวิธี Paper Disc Diffusion..... | 54 |
| 4.5 ผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ระดับ ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ | 56 |
| 4.6 ผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ในชั้นเอทิลอะซิเตตต่อการ ยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ด ถั่วลิสง | 57 |
| 4.6.1 การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ด ถั่วลิสง | 57 |
| 4.6.2 การยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสง..... | 59 |
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ | 62 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา IX และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|-----------------------|------|
| บรรณานุกรม | 64 |
| ภาคผนวก | |
| ภาคผนวก ก | 80 |
| ภาคผนวก ข | 81 |
| ภาคผนวก ค | 82 |
| ภาคผนวก ง | 83 |
| ภาคผนวก จ | 84 |
| ภาคผนวก ฉ | 87 |
| ภาคผนวก ช | 92 |
| ประวัติผู้เขียน | 101 |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา X ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|----------|--|
| 2.1 | แสดงคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของอะฟลาทอกซินชนิดต่างๆ15 |
| 2.2 | แสดงส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญของถั่วลิสง25 |
| 4.1 | แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 อายุ 7 วัน ในการทดสอบการเจริญแบบแข่งขันกับเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ45 |
| 4.2 | แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในการทดสอบการเจริญคลุมทับเส้นใยโดยเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ48 |
| 4.3 | แสดงผลการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ ในการควบคุมการเจริญเชื้อราของ <i>A. flavus</i> IMI 242684 อายุ 4 วัน50 |
| 4.4 | แสดงลักษณะและน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ที่สกัดจากเส้นใยและน้ำหมักด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน 4 ชนิด.....53 |
| 4.5 | แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. จากตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 บนอาหารพีดีเอ เป็นเวลา 5 วัน55 |
| 4.6 | แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 บนอาหารพีดีเอ เป็นเวลา 5 วัน57 |
| 4.7 | แสดงจำนวนเฉลี่ยสปอร์ต่อกรัมของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสงที่แช่สารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆจากเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ58 |
| 4.8 | แสดงผลของสารสกัดหยาบ (50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)จาก <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ ในชั้นเอทิลอะซิเตตต่อการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสง60 |

สารบัญรูป

| รูปที่ | หน้า |
|---|------|
| 2.1 แสดงการเจริญของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ | 3 |
| 2.2 แสดงลักษณะ conidiophore ของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. | 4 |
| 2.3 แสดงลักษณะ conidiophore ของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า | 4 |
| 2.4 แสดงการเป็นปรสิตของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. | 6 |
| 2.5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารทุติยภูมิที่ผลิตจากเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. | 9 |
| 2.6 แสดงลักษณะของเชื้อรา <i>A. flavus</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ | 13 |
| 2.7 แสดงโครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินชนิดต่างๆ | 14 |
| 2.8 แสดงการรวมตัวกันของอะฟลาทอกซิน B ₁ และ guanine residue ของดีเอ็นเอ | 15 |
| 3.1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ | 33 |
| 4.1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 | 39 |
| 4.2 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลต TISTR 3167 | 40 |
| 4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลต KMC 5 | 41 |
| 4.4 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลต SRS 4 | 42 |
| 4.5 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลต SCP III | 43 |
| 4.6 แสดงการเจริญแบบแข่งขันของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. กับเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 | 45 |
| 4.7 แสดงลักษณะการเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 โดยเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. | 47 |
| 4.8 แสดงลักษณะของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ในการพันรัดเส้นใยเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 | 49 |
| 4.9 แสดงการสร้างสารยับยั้งโดยเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ | 51 |
| 4.10 แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอเป็นเวลา 5 วัน โดยสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. จากตัวทำละลายต่างๆ | 54 |
| 4.11 แสดงบริเวณยับยั้งของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอเป็นเวลา 5 วัน | 56 |

สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่ | หน้า |
|--------|--|
| 4.12 | กราฟแสดงการสร้างสปอร์ของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสง59 |
| 4.13 | กราฟแสดงปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน B ₁ , B ₂ และ B ₁ +B ₂ ของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสงที่แช่สารสกัดยับยั้งจากเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ61 |



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของปัญหา

ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.) เป็นอาหารที่ให้พลังงานสูง เนื่องจากมีปริมาณไขมัน (42-56 เปอร์เซ็นต์) โปรตีน (25-30 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) และกากใยสูง (Gachomo และคณะ, 2004) รวมถึงไนอะซิน วิตามินบี แคลเซียม เหล็ก โพแทสเซียม และฟอสฟอรัส (McWatters และคณะ, 1995) ด้วยลักษณะดังกล่าวทำให้พบการปนเปื้อนจากเชื้อราทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวทำให้เมล็ดถั่วลิสงเสียหาย เชื้อราที่มักพบปนเปื้อน ได้แก่ *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* และ *Alternaria* เชื้อราในสกุล *Aspergillus* spp. สามารถผลิตสารพิษได้หลายชนิด เช่น อะฟลาทอกซิน (aflatoxin), โอคราท็อกซิน (ochratoxin), สเตอริกมาโตซิสติน (sterigmatocystin), กรดไซโครพิอะโซนิก (cyclopiazonic acid) และ พาทูลิน (patulin) อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่มีความรุนแรงก่อให้เกิดโรคทั้งในมนุษย์และสัตว์ โดยเฉพาะอะฟลาทอกซิน B₁ พบว่ามีความรุนแรงมากที่สุดและจัดเป็นสารก่อมะเร็ง กลุ่มที่ 1 ตามที่ International Agency for Research on Cancer หรือ IARC กำหนด (IARC, 1993) โดยมีผลต่อตับเป็น hepatotoxic, ก่อให้เกิดการผิดปกติของพัฒนาการทางร่างกายของทารก (teratogenic) และเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลาย (mutagenic) อาการที่พบคือ โรคตับอักเสบ (hepatitis), การตกเลือด (hemorrhage), ภาวะบวมน้ำ (edema), การกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppression) และมะเร็งตับ (hepatic carcinoma) (Santos และคณะ, 2001) จึงทำให้มีการศึกษาวิจัยถึงวิธีการต่างๆ เพื่อใช้ในการควบคุมการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ทั้งวิธีการทางกายภาพ ทางเคมีและทางชีวภาพ ซึ่งวิธีการทางเคมีและกายภาพจะต้องอาศัยเครื่องมือที่ทันสมัยและสารเคมีที่ใช้มีราคาแพง และก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เป็นพิษต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค ดังนั้นวิธีชีวภาพหรือชีววิธี (biological control หรือ biocontrol) ซึ่งมีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ รวมถึงสารผลิตภัณฑ์จากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จึงเป็นที่สนใจและยอมรับของผู้บริโภค โดยเฉพาะการใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. และสารผลิตภัณฑ์ในกลุ่มต่อต้านเชื้อรา ซึ่งเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคพืช เนื่องจากมีศักยภาพในการเป็นเชื้อปรสิต เชื้อปฏิปักษ์ ผลิตสารทุติยภูมิ เช่น สารปฏิชีวนะ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค ช่วยป้องกันการเกิดโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโตให้แก่พืช (Harman และคณะ, 2000) ทำให้มีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชหลายชนิด (Intana, 2003)

การทดลองนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ต่อการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอและในเมล็ดถั่วลิสง

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษากลไกการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ บนอาหารพีดีเอ

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลตต่างๆ ต่อการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารพีดีเอและในเมล็ดถั่วลิสง

1.3 ขอบเขตการวิจัย

เป็นการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารพีดีเอและในเมล็ดถั่วลิสง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารพีดีเอและในเมล็ดถั่วลิสง

1.4.2 ทราบแนวทางในการพัฒนาเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ทดแทนการใช้สารเคมี

บทที่ 2

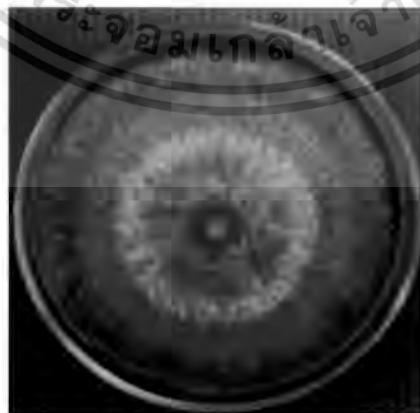
ตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

อนุกรมวิธานของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

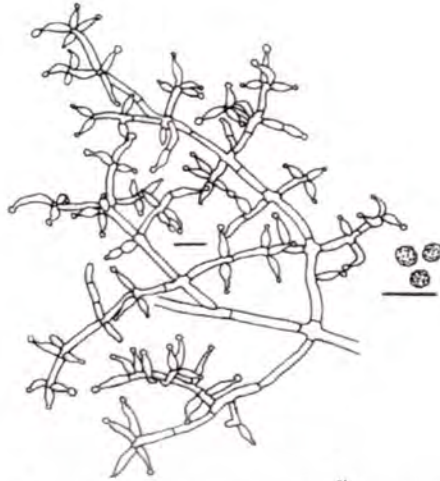
| | |
|---------|--------------------|
| Kingdom | Fungi |
| Phylum | Ascomycota |
| Class | Euascomycetes |
| Order | Hypocreales |
| Family | Hypocreaceae |
| Genus | <i>Trichoderma</i> |

เชื้อรา *Trichoderma* spp. จัดเป็นเชื้อราในกลุ่ม Deuteromycetes ซึ่งเป็นระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อราในสกุล *Hypocrea* (teleomorph) เจริญได้ดีในดิน ลักษณะทาง anamorph (imperfect stage) ของเชื้อราชนิดนี้ คือลักษณะของเส้นใยเริ่มแรกจะมีสีขาว เมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม conidiophore มีสีจาง หรือไม่มีสี แตกแขนงมาก พบ phialide เกิดเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม conidia (phialospore) เป็นเซลล์เดี่ยวรูปไข่ ไม่มีสี เกิดเป็นกลุ่มเล็กๆ ที่ปลาย phialide สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (รูปที่ 2.1-2.3) (Homer และคณะ, 1972) *Trichoderma* ที่พบทั่วไปในดินสามารถเจริญแข่งขันกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 15-21 องศาเซลเซียส และสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในที่มีอุณหภูมิเย็นจัดประมาณ 10-12 องศาเซลเซียส (Johnson และคณะ, 1987)



รูปที่ 2.1 แสดงการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะ conidiophore ของเชื้อรา *Trichoderma* spp.
ที่มา: Samuels (1996)

รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะ conidiophore ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
กำลังขยาย 400 เท่า

2.2 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อสาเหตุโรคพืช

เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีลักษณะเป็นเชื้อฉวยโอกาส ไม่ก่อโรครุนแรงในพืช มีความสามารถในการเป็นปรสิตและเชื้อปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืช ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นที่ยอมรับในการนำมาใช้ในการควบคุมทางชีวภาพกันอย่างกว้างขวาง รวมถึงมีการศึกษาพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์เพื่อง่ายต่อการใช้งานทางด้านเกษตรกรรม เช่น สารกำจัดแมลงและวัชพืช บำรุงชีวภาพและใช้ในการปรับสภาพดิน (Harman และคณะ, 2000; Harman และคณะ, 2004; Lorito และคณะ, 2004) ซึ่งข้อดีของการใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทางด้านเกษตรกรรม คือมีศักยภาพในการเข้ายึดครองพื้นที่บริเวณรากเมื่อใช้ในการควบคุมทางชีวภาพ (rhizosphere competence) มีความสามารถในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช ทั้งในทางแข่งขันและกำจัดเชื้อสาเหตุโรคพืช

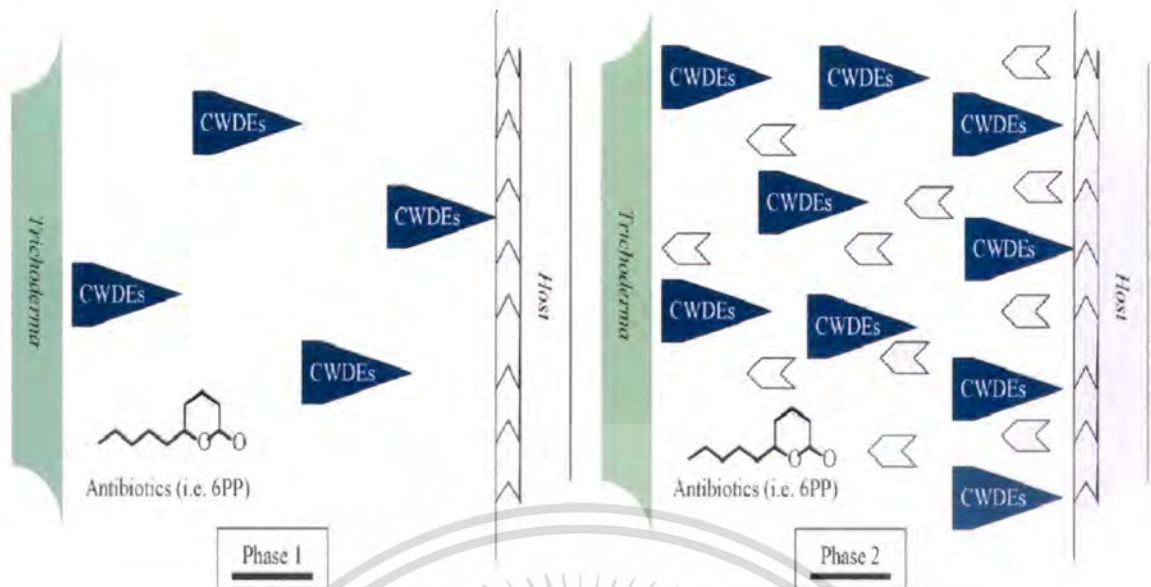
ส่งเสริมให้พืชมีความแข็งแรงกระตุ้นการเจริญของรากพืชเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลไกที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมโรคพืชของเชื้อรา *Trichoderma* spp. รวมถึงการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ การเป็นปรสิตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (mycoparasitism) การแข่งขัน การใช้อาหารและการครอบครองพื้นที่กับเชื้อราสาเหตุโรคพืช การสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช (antibiosis) การส่งเสริมให้พืชทนต่อสภาพเครียด การช่วยละลายธาตุอาหารให้อยู่ในรูปที่พืชใช้ประโยชน์ได้ และการชักนำความต้านทานในพืช (induced resistance) รวมทั้งการส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตของพืช (plant growth promoting) (Harman และคณะ, 2000)

Trichoderma spp. สามารถผลิตสารทุติยภูมิซึ่งชนิดของสารที่ผลิตขึ้นอยู่กับเชื้อที่มารุกราน มีการเจริญที่รวดเร็ว สปอร์มีความแข็งแรง สร้างสารปฏิชีวนะและผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายผนังเซลล์ได้ เช่น เอนไซม์ cellulase, chitinase และ glucanase สายพันธุ์ส่วนใหญ่ในเชื้อราสกุลนี้มีคุณสมบัติในการเข้ายึดครองพื้นที่บริเวณราก และสามารถย่อยสลายสารประกอบกลุ่ม hydrocarbon, chlorophenolic compound, polysaccharide และ xenobiotic pesticide (Harman และ Kubicek, 1998; Harman และคณะ, 2004) ซึ่งกลไกหลักที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ใช้ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช คือการเป็นปรสิตและการผลิตสารปฏิชีวนะ

2.2.1 การเป็นปรสิตและการผลิตเอนไซม์

Trichoderma spp. หลายสปีชีส์ที่แยกได้จากดินพบว่าเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราทั้งภายใต้สภาพเรือนทคลองและแปลงปลูก (Chet และ Inbar, 1994) กลไกในการเป็นปรสิตของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เริ่มจากการจำเซลล์เจ้าบ้าน (ราก่อโรคพืช) การเจริญพันธุ์เส้นใยของเชื้อราก่อโรคพืชแล้วย่อยสลายผนังเซลล์ เพื่อเจริญเข้าไปใช้อาหารภายใน ซึ่งกลไกนี้เป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์ที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. สร้างขึ้น เช่น chitinase หรือ chitinolytic enzyme, β -1,3-glucanase, β -1,6-glucanase, peptaibol antibiotics (Harman และคณะ, 2000; Howell, 2003) เพื่อช่วยในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราก่อโรคพืช ขณะเดียวกันเชื้อสาเหตุโรคพืช จะปล่อยสารประกอบกลุ่ม oligomer ซึ่งมีผลในการกระตุ้นการเป็นปรสิตของเชื้อรา *Trichoderma* spp. (รูปที่ 2.4)



รูปที่ 2.4 แสดงการเป็นปรสิตของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

Phase 1: *Trichoderma* spp. จะปล่อยสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลสูงไปยังเชื้อเจ้าบ้าน (ราก่อโรค)

Phase 2: เชื้อเจ้าบ้าน (ราก่อโรค) จะปล่อยสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำจากผนังเซลล์ไปยังเชื้อรา *Trichoderma* spp. และกระตุ้นให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเป็นปรสิตมีการแสดงออก

ที่มา: Woo และ Lorito (2007)

จากการศึกษาของ Mach และคณะ (1999) และ Woo และคณะ (2004) พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของการเป็นปรสิตของเชื้อรา *T. atroviride* ไอโซเลต P1 สายพันธุ์กลายคือ green fluorescent protein (*gfp*) หรือ glucose oxidase (*gox*) gene ขึ้นอยู่กับ promoter gene ที่กระตุ้น (เช่น *exochitinase nag1* gene หรือ *endochitinase ech 42* gene) และการแสดงออกของยีนเหล่านี้ถูกกระตุ้นจาก oligosaccharide จากเชื้อราก่อโรค

มีการศึกษาโดยการนำเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายผนังเซลล์ที่สร้างขึ้นโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ต่างๆ นำมาทำให้บริสุทธิ์และทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช พบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งแบบกว้างต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Ustilago*, *Venturia* และ *Colletotrichum* รวมถึงเชื้อราในชั้น Oomycetes เช่น *Pythium* และ *Phytophthora* (Tronsmo, 1991; Lorito และคณะ, 1994, 1996a, 1996b) นอกจากนี้ยังมีการนำสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. มาใช้ทดแทนตัวเซลล์ที่มีชีวิต เนื่องจากเป็นที่ยอมรับของคนส่วนใหญ่ ซึ่งการผลิตนั้นจะต้องมีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม เช่น ชนิด

ของอาหาร อุณหภูมิในการบ่มและค่าความเป็นกรดเป็นด่าง เป็นต้น (Woo และ Lorito, 2007) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตเห็นาไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน (monosaccharide, polysaccharide, colloidal chitin หรือเนื้อเยื่อจาก เชื้อรา) มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายผนังเซลล์ (Mach และคณะ, 1999)

Maria และคณะ (2003) พบว่า *Trichoderma asperellum* สามารถสร้างเอนไซม์ β -1,3-glucanase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย β -1,3-Glucan ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์รา และได้ทำการศึกษาลักษณะและทำให้บริสุทธิ์ โดยการใช้ SDS-electrophoresis slab gel 12 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร)

Nallathambi และคณะ (2009) ได้ทำการคัดแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินบริเวณที่มีความแห้งแล้งในประเทศอินเดีย ทำการทดสอบความสามารถในการกำจัดเชื้อราเพื่อใช้ในการป้องกันการเน่าของผลพุทรา (*Ziziphus mauritiana* Lamk) หลังการเก็บเกี่ยว พบว่า *Trichoderma* spp. 16 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria alternata* Fr. Keissler ได้มากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการทดสอบโดยวิธี dual culture พบว่า *Trichoderma koningii*-T.k-CIAH176, *T. citrinoviride*-T.c-CIAH224, *Trichoderma viride*-T.v-CIAH181 และ T.v-CIAH240 มีประสิทธิภาพที่ค่อนข้างสูงอีกทั้งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. alternate* โดยที่ *T. viride*-T.v-CIAH 240 มีประสิทธิภาพเหนือกว่า *Trichoderma* sp. ไอโซเลตอื่นๆ นั่นคือสามารถยับยั้งได้สูงถึง 71 เปอร์เซ็นต์

2.2.2 การผลิตสารปฏิชีวนะและสารทุติยภูมิของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีประสิทธิภาพในการผลิตสารทุติยภูมิซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Ghisalberti และ Sivasithamparam, 1991; Sivasithamparam และ Ghisalberti, 1998) เชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่างสายพันธุ์ จะผลิตสารทุติยภูมิที่มีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน Ghisalberti และ Sivasithamparam (1991) ได้จำแนกสารทุติยภูมิที่ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

(1) สารปฏิชีวนะที่ระเหยได้ง่าย (volatile antibiotic) เช่น 6-pentyl- α -pyrone (6PP) และอนุพันธ์ของ isocyanide

(2) สารปฏิชีวนะที่ละลายน้ำ (water-soluble antibiotic) เช่น heptelidic acid หรือ koningic acid

(3) สารปฏิชีวนะกลุ่ม peptaibol เป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีของ α -aminoisobutyric acid ที่ประกอบด้วย oligopeptide ที่มีกรดอะมิโน 12-20 ตัว โดยที่ acetyl อยู่ที่ตำแหน่ง N-terminus ขณะที่ตำแหน่ง C-terminus จะมีสารกลุ่ม hydroxy-amino acid (Phenol หรือ Trpol) (Le Doan และคณะ, 1986; Rebuffat และคณะ, 1989)

สารปฏิชีวนะที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ผลิตขึ้น (รูปที่ 2.5) มีลักษณะเป็นสารที่มีโมเลกุลต่ำ ไม่มีขั้ว และเป็นสารที่ระเหยได้ง่าย เช่น 6-n-pentyl-6H-pyran-2-one (6PP) เป็นสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์สูง และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ในบริเวณกว้าง ขณะที่สารปฏิชีวนะที่มีขั้วและสารปฏิชีวนะในกลุ่ม peptaibol มีฤทธิ์ในการยับยั้งในบริเวณแคบ Lorito และคณะ (1996b) พบว่า peptaibol มีผลต่อการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ β -glucan ซึ่งเป็นสารประกอบของผนังเซลล์เชื้อราก่อโรค โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์ β -glucanases ที่ *T. harzianum* ผลิตขึ้น การทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์และสารปฏิชีวนะที่มีขั้วจะทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเพิ่มขึ้น (Schirmböck และคณะ, 1994; Lorito และคณะ, 1996a, 1996b; Fogliano และคณะ, 2002)

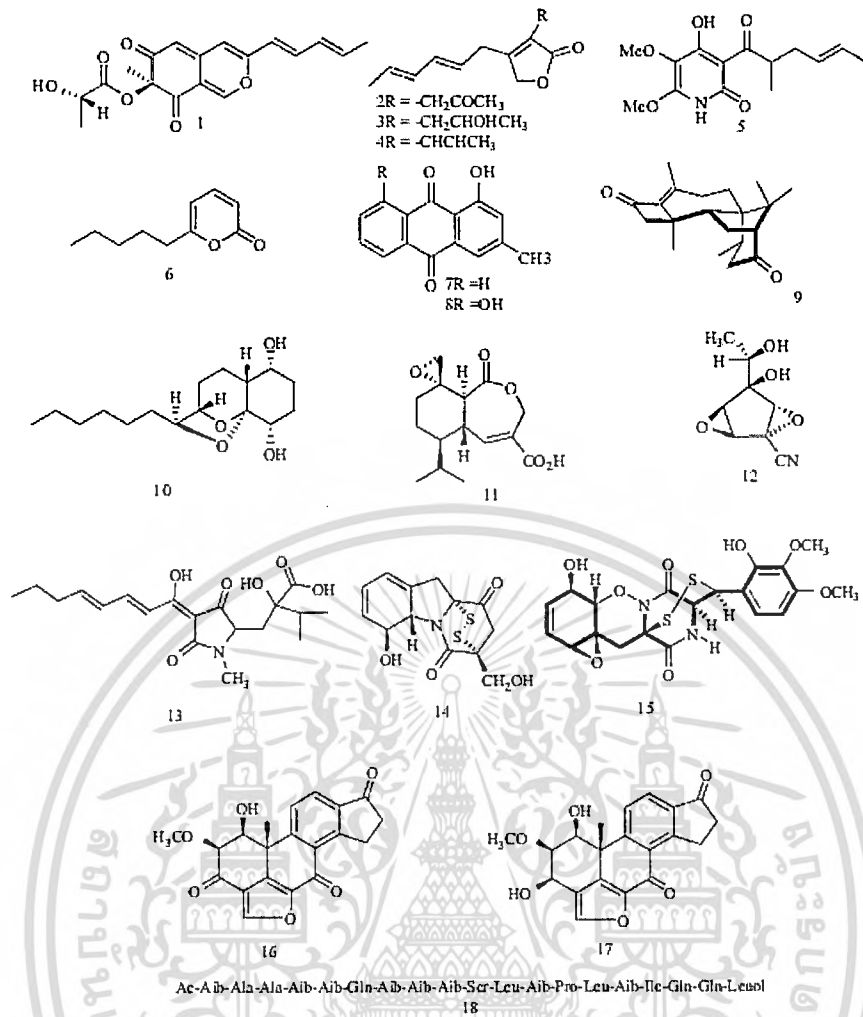
Lin (1994) พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างสารปฏิชีวนะอีกมาก เช่น สารไตรโคลิน (Tricholin) ที่ผลิตโดยเชื้อรา *T. viride* ซึ่งมีผลยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani*

Correa (1995) พบว่า *T. harzianum* มีการสร้างสาร ไตรโคซิเนียนิน (Trichozinianine) ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

Sivasithamparam และคณะ (1998); Vey และคณะ (2001); Reino และคณะ (2008) พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างสารทุติยภูมิ 6-n-pentyl-6H-pyran-2-one (6PP), gliotoxin, viridin, harzianopyridone, harziandione และ peptaibols ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช

Ghisalberti และคณะ (1990) พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* สามารถผลิตสาร pyrone ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

Howell และ Puckhaber (2005) จัดกลุ่ม *T. virens* ออกเป็น 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ "Q" ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสาร gliotoxin และสายพันธุ์ "P" ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีผลิตสาร gliovirin แทนการผลิต gliotoxin (Howell และ Stipanovic, 1983-รูปที่ 2.5 หมายเลข 14 และ 15) Gliotoxin มีฤทธิ์ในการเป็นสารปฏิชีวนะแบบกว้าง ขณะที่ gliovirin มีฤทธิ์ในการเป็นสารปฏิชีวนะแบบแคบกล่าวคือ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเฉพาะเชื้อรา oomycetes (Chet และคณะ, 1997; Howell, 1998) เมื่อนำ *T. virens* สายพันธุ์ "Q" และ "P" มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนสูง พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ จะมีการผลิตสาร viridiodiol ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับสาร viridian (รูปที่ 2.5 หมายเลข 16 และ 17)



รูปที่ 2.5 แสดง โครงสร้างทางเคมีของสารทุติยภูมิที่ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma* spp.

- | | | |
|-------------------------------------|---|-------------------------------|
| 1: T22azaphilone | 2: T39butenolide | 3: harzianolide |
| 4: dehydroharzianolide | 5: harzianopyridone; | 6: 6-pentyl- α -pyrone |
| 7: 1-hydroxy-3-methyl-anthraquinone | 8: 1, 8-dihydroxy-3-methy anthraquinone | |
| 9: harziandione | 10: koniginin A | 11: heptelidic acid; |
| 12: trichoviridin; | 13: harzianic acid; | 14: gliotoxin; |
| 15: gliovirin; | 16: viridin; | 17: viridiol; |
| 18: trichorzianines | | |

ที่มา: Vinale และคณะ (2008)

2.2.3 การเจริญแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคพืชและจุลินทรีย์ในดินของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

การเจริญแบบแข่งขันเกิดขึ้นเนื่องจากการแข่งขันการใช้อาหารและการครอบครองพื้นที่ระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* spp. กับเชื้อสาเหตุโรคพืช เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. สร้างเส้นใยได้รวดเร็ว และสามารถสร้างสปอร์ได้ในปริมาณสูงมาก โดยอาศัยอาหารจากเศษวัสดุต่างๆ จึงเอกลสารนี้เป็นเอกลสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกลสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช่วยให้เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคพืชหรือจุลินทรีย์ที่อยู่ในบริเวณเดียวกันได้ เช่น ในกรณีที่เชื้อรา *T. koningii* สามารถเจริญครอบครองรากหอม และทำลายเชื้อสาเหตุโรค คือ เชื้อรา *Sclerotium cepivorum* ได้ (Danielson และ Davey, 1973; Howell, 2003)

Sunil และคณะ (2007) ทำการคัดแยกเชื้อ *Trichoderma* spp. จากดินแหล่งต่างๆ ในประเทศอินเดีย จำนวน 10 ไอโซเลต ซึ่งอยู่ในสปีชีส์ *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, และ *T. virens* เพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของการเกิดโรคแห้งเฉาในถั่ว ซึ่งคัดแยกมาจากดินในธรรมชาติ 4 แห่งในประเทศอินเดีย ได้แก่ Dharwad (race 1), Kanpur (race 2), Ludhiana (race 3), และ Delhi (race 4) โดยอาศัยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ dual culture รวมถึงทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะที่ระเหยได้ง่าย และสารปฏิชีวนะที่ไม่ระเหย (volatile and non-volatile inhibitor) จากการทดลองพบว่า *T. viride* ที่คัดแยกได้จากเมือง Ranchi ตามด้วย *T. harzianum* ที่คัดแยกได้จากเมือง Ranchi และ *T. viride* ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากเมือง Delhi สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* ได้ดีที่สุด และเมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งร่วมกับยาฆ่าแมลง carboxin ต่อการยับยั้ง *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* ในช่วงการเพาะปลูกปี 2002-2003, 2003-2004 และ 2004-2005 พบว่าเมื่อนำ *T. harzianum* (10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรต่อ 10 กรัม) ผสมกับ carboxin (2 กรัมต่อถั่ว 1 กิโลกรัม) ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ดีที่สุด นำไปปลูกกับเมล็ดถั่ว พบว่าช่วยลดการเกิดโรคแห้งเฉาได้ถึง 44.1-60.3 เปอร์เซ็นต์

Ruano และ López (2009) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* CH 101, CH 273, CH 303, CH 304.1 และ CH 314 ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรครากเน่าในต้นอะโวคาโด (*Persea americana* Mill.) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Rosellinia necatrix* พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคและช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. necatrix* บริเวณรากต้นอะโวคาโด โดยทำการทดสอบทั้งการควบคุมแบบลำพังและการควบคุมร่วม พบว่าการควบคุมร่วมระหว่าง *Trichoderma* CH 303 และ CH 304.1 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในระดับที่ดีที่สุด

Rossi และ Patteri (2009) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการยับยั้งเชื้อ *Stemphylium vesicarium* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคจุดน้ำตาบนผลลูกแพร์ ทำการทดสอบบริเวณทุ่งหญ้า โดยนำไปต้นแพร์ปูให้ทั่วบริเวณเพื่อให้เป็นตัวแทนของสวนแพร์ ทำการฉีดสปอร์เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ลงบนพื้นที่มีใบแพร์คลุม ทำการปลูกเชื้อ *S. vesicarium* ทำการทดลองในช่วงฤดูใบไม้ผลิ ในช่วงปี ค.ศ. 2004 และ 2005 ระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม ของปี จากการทดลองพบว่า *Trichoderma* spp. สามารถลดปริมาณเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยการปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp. หรือ *S. vesicarium* ก่อน หรือทั้ง 2 เชื้อพร้อมกันบนใบแพร์และหญ้าแพรกที่ตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้ว เป็นเวลา 6 สัปดาห์ หลังการเพาะเลี้ยงพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถลดปริมาณเชื้อ *S. vesicarium* ได้สูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์

Thangavelu และคณะ (2004) ได้ทำการคัดแยกเชื้อ *Trichoderma* spp. จากบริเวณรากของ ต้นกล้วย (*Musa* sp.) ที่แตกต่างกัน จากเมือง ทามิล นาฑู (Tamil Nadu) ประเทศอินเดีย เพื่อนำมา ทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Fusarium oxysporum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรค เหี่ยวเฉาในต้นกล้วย จากการทดลองพบว่า เชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลต Th-10 มีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ในระดับห้องปฏิบัติการ และเมื่อนำเชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลต Th-10 มาเพาะเลี้ยงบนวัสดุค้ำจุนที่แตกต่างกัน 5 ชนิด (รำข้าว แกลบ ดิน บริเวณที่ทำการปลูกกล้วย กาบกล้วย และใบกล้วยแห้ง) พบว่าใบกล้วยแห้งเป็นวัสดุค้ำจุนที่ เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *T. harzianum* ไอโซเลต Th-10 มากที่สุด โดยนับจำนวนสปอร์ได้ 4.6×10^{12} โคลนีต่อกรัม (ใบ) เมื่อมีการใส่น้ำตาลทรายแดง (jaggery) 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อ ปริมาตร) ลงบนใบกล้วยแห้งจะช่วยทำให้เชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลต Th-10 มีชีวิตอยู่ได้นาน มากกว่า 6 เดือน เมื่อนำเชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลต Th-10 ที่เจริญบนใบกล้วยแห้งมาทดสอบ ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวเฉาในต้นกล้วยในแปลงทดลอง พบว่ามีประสิทธิภาพเท่า เทียบกับการใช้สารเคมี carbendazim

Sahebani และ Hadavi (2008) ทำการศึกษาการควบคุมทางชีวภาพของ *T. harzianum* BI ต่อ *Meloidogyne javanica* (กลุ่มหนอนตัวกลม) ซึ่งทำให้เกิดโรครากปมของพืช ทำการทดสอบใน เรือนเพาะปลูกและในระดับห้องปฏิบัติการ จากการทดลองพบว่าเชื้อรา *T. harzianum* BI ช่วยลด การเข้าทำลายของ *M. javanica* เนื่องจาก *T. harzianum* BI สามารถทำลายไข่และลดการวางไข่ของ *M. javanica* โดยอาศัยเอนไซม์ chitinase และช่วยกระตุ้นให้พืชมีการสร้างเอนไซม์ peroxidase (POX), polyphenol oxidase (PPO) และ phenylalanine ammonia lyase (PAL) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้ พืชมีความต้านทานต่อการเกิดโรครากปมขึ้น

Rojo และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาการยับยั้งเชื้อ *Fusarium solani* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุ โรครากเน่าสีน้ำตาลในถั่วลิสงภายใต้สภาวะในแปลงปลูก ในช่วงปี 2003-2004 โดยใช้เชื้อรา *T. harzianum* ITEM 3636 และ *T. longibrachiatum* ITEM 3635 แบ่งการทดลองออกเป็น 2 วิธี วิธี แรกเคลือบเมล็ดถั่วลิสงด้วยโคมิเดียของเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยใช้ carboxymethylcellulose (CMC) วิธีที่สอง เคลือบเมล็ดถั่วลิสงด้วยเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยใช้ Biodac particles พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* ITEM 3636 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. solani* ได้ดีกว่า *T. longibrachiatum* ITEM 3635 อีกทั้งช่วยให้พืชมีความแข็งแรงและผลผลิตเพิ่มขึ้น

Batta (2004) ศึกษาการควบคุมทางชีวภาพของเชื้อรา *T. harzianum* Rifai ที่อยู่ในรูป อินเวิร์ท อิมัลชัน (invert emulsion (water-in-oil)) ต่อเชื้อ *Botrytis cinerea* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรค

แอปเปิ้ลเทศา ซึ่งอินเวิร์ท อิมัลชันที่ใช้ในการทดลอง คือ น้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่ว (อิมัลชันที่ใช้มีค่าคงตัวอยู่ที่ 93 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร) มีความหนืดต่ำ ซึ่งเหมาะสมต่อเชื้อรา *T. harzianum* Rifai จากนั้นนำมาทดสอบหาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *B. cinerea* บนผลแอปเปิ้ล จากการทดลองพบว่า โคนิเดียของเชื้อรา *T. harzianum* Rifai ที่อยู่ในรูปอิมัลชัน ช่วยลดความเสียหายที่เกิดขึ้นจากเชื้อ *B. cinerea* บนผลแอปเปิ้ลได้นานกว่า 2 เดือน

Rabeendran และคณะ (2006) ทำการศึกษาการควบคุมเชื้อ *Sclerotinia minor* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อโรคนิพคากาดหอม โดยนำเชื้อรา *Trichoderma hamatum* LU595, LU593, LU592, *T. virens* LU555, LU556 และ *T. rossicum* LU596 มาคลุกกับเมล็ดนิพคากาดหอมแล้วจึงทำการปลูกเชื้อ *S. minor* ลงไป นำไปปลูกในกระถาง หลังการเก็บเกี่ยวพบว่า *T. hamatum* LU595, LU593 และ *T. virens* LU555 สามารถลดการเกิดโรคได้ถึง 30-50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุมสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คลุกรวมกับ maizemeal-perlite soil สามารถลดการเกิดโรคจากเชื้อ *S. minor* ได้ถึง 29-91 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลการยับยั้งดีกว่าการใช้สารเคมี carbendazim

Perazzolli และคณะ (2008) ทำการศึกษาผลของ *Trichoderma harzianum* T39 และ benzothiadiazole (BTH) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Plasmopara viticola* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้าง (downy mildew) ในต้นองุ่น โดยทำการใส่ BTH ก่อนทำการปลูกเชื้อ *P. viticola* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดการเกิดโรคได้ถึง 83 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการปลูกเชื้อ *T. harzianum* เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ก่อนทำการปลูกเชื้อ *P. viticola* สามารถลดการเกิดโรคได้ 63 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดสอบโดยการปลูกเชื้อ *T. harzianum* และ BTH ไว้ด้านหนึ่งของใบ ส่วนอีกด้านหนึ่งเป็นวิธีควบคุม พบว่าใบด้านที่มีการปลูกเชื้อ *T. harzianum* และ BTH สามารถลดการเกิดโรคได้ถึง 60 และ 56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.3 สารพิษอะฟลาทอกซิน

สารพิษอะฟลาทอกซิน พบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2503 เนื่องจากการตายโดยไม่ทราบสาเหตุของไก่วงประมาณ 100,000 ตัว จึงได้ให้ชื่อขณะนั้นว่าโรค "Turkey X" (Blount, 1961) นอกจากนี้ ยังพบการเกิดโรคระบาดเช่นนี้ในประเทศเคนยาและยูกันดา (Asplin และ Carnaghan, 1961) สำหรับประเทศไทยในปี พ.ศ. 2515 พบว่าเด็กที่จังหวัดอุดรธานี มีอาการตัวร้อน ปวดท้อง ท้องอืด อาเจียน ไม่รู้สึกตัว ชักหมดสติและอาจเสียชีวิตภายใน 24-48 ชั่วโมง อาการของเด็กคล้ายโรค Rye's syndrome จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการ พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดอยู่ในระดับต่ำกว่าปกติ มีระดับแอมโมเนียในเลือดสูงและตรวจพบอะฟลาทอกซินชนิด B₁ ในกระเพาะอาหาร ถ้าใส่เล็ก ปัสสาวะ อุจจาระและน้ำดีของผู้ป่วย จากการสืบประวัติพบว่าเด็กเหล่านี้รับประทานแต่เพียงข้าวเหนียวอย่างเดียวเป็นเวลา 2 วัน จึงมีการตรวจสอบเชื้อราที่เจริญบนข้าวเหนียวและพบเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3 ชนิด ที่สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ (กวินดา และคณะ, 2538) ตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) กำหนดให้มีอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในอาหารไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (อรุณศรี, 2542)

2.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

เชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้แก่ *A. flavus* Link, *A. parasiticus* Speare, *A. nomius*, *A. tamari* (Kurtzman และคณะ, 1987; Goto และคณะ, 1997), *A. bombycis* (Peterson และคณะ, 2001) นอกจากนี้ Ito และคณะ (2001) พบว่าเชื้อรา *A. pseudotamarii* สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางพันธุกรรม รวมถึงลักษณะการสร้างสารพิษของเชื้อรา พบว่ามีความแตกต่างจากเชื้อรา *A. tamarii* จึงถือว่าเชื้อรา *A. pseudotamarii* เป็นเชื้อราชนิดใหม่ที่สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้

เชื้อรา *A. flavus* (รูปที่ 2.6) ทัวไปมี 2 สายพันธุ์ คือ S และ L การแยกเชื้อรา 2 สายพันธุ์ออกจากกันสังเกตจากลักษณะสัณฐานวิทยาของสปอร์ สายพันธุ์ที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ S ซึ่งสามารถสร้างอะฟลาทอกซินและปรับค่าในเมล็ดฝ้ายได้ดีกว่าสายพันธุ์ L จากการทดลองเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ในเมล็ดฝ้าย พบว่าสายพันธุ์ S สร้างอะฟลาทอกซินได้น้อยลง เพราะสายพันธุ์ S และ L มีการเจริญแบบแข่งขัน และทำให้ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินจากสายพันธุ์ S ลดลง (Garber และ Cotty, 1997)



รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อฟีดโอ

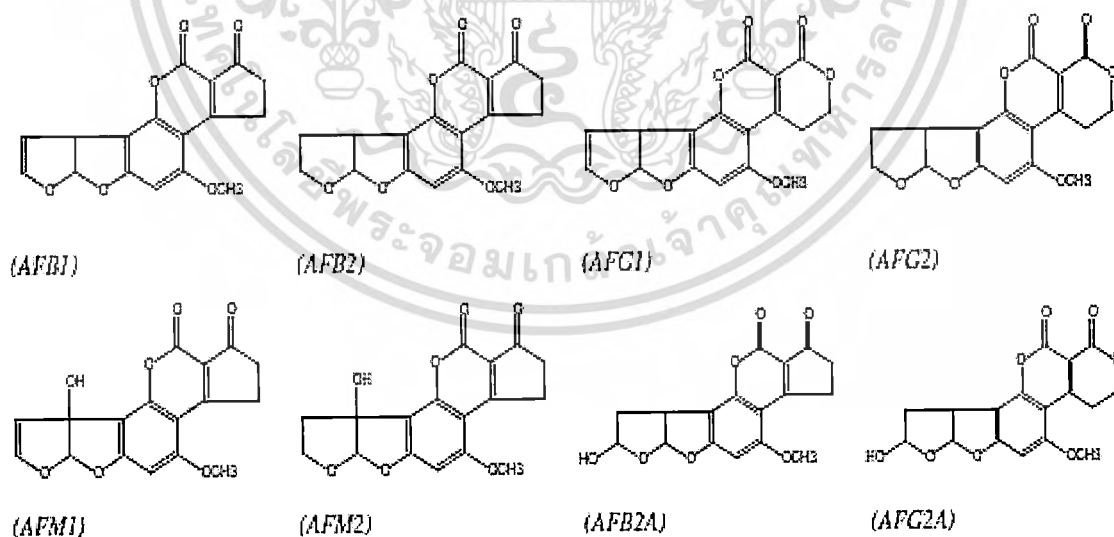
2.5 ชนิดและคุณสมบัติของอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินเป็นสารเคมีพวกบิสฟูราโนคิมาริน(bisfuranocoumarin) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นdifurocoumaro-cyclopentenone ได้แก่ B_1 , B_2 , B_{2A} , M_1 , M_2 , M_{2A} และ aflatoxicol และกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นdifurocoumarolactone ได้แก่ G_1 , G_2 , G_{2A} , G_{M1} , G_{M2} , G_{M2A} และ B_3 (Rita และ Leif, 2006) (รูปที่ 2.7) มีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2.1) โดยทั่วไปอะฟลาทอกซินที่พบในอาหารมี 4 ชนิด ได้แก่ B_1 , B_2 , G_1 และ G_2 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะฟลาทอกซินอีกหลายชนิดที่พบในปริมาณน้อย ได้แก่ M_1 , M_2 , B_{2a} และ G_{2a} อะฟลาทอกซินที่มีความสำคัญและพบมากที่สุดคืออะฟลาทอกซินชนิด B_1 (นงนุช, 2540)

ชื่อชนิดของสารพิษอะฟลาทอกซินตั้งขึ้นตามคุณสมบัติการเรืองแสงบนแผ่นโครมาโตกราฟีฝิวบาง (Thin-layer chromatographic (TLC) plate) ภายใตแสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 365-366 นาโนเมตร ซึ่งแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างทางโครงสร้างเพียงเล็กน้อยโดยอะฟลาทอกซิน B_1 และ B_2 เรืองแสงสีน้ำเงิน (Blue) และอะฟลาทอกซิน G_1 และ G_2 เรืองแสงสีเขียว (Green) (Hartley, 1963)

โครงสร้างอะฟลาทอกซิน B_1 และ B_2 ประกอบด้วย coumarin, bisfuran และ cyclopentanone ring แต่อะฟลาทอกซิน B_1 จะแตกต่างจาก B_2 ตรงที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 8-9 ใน bisfuran ring เพราะ B_1 แสดงพันธะทางเคมีที่ไม่อิ่มตัว แต่ B_2 มีพันธะทางเคมีที่อิ่มตัว ชนิด B_1 จะเหมือนกับ G_1 คือจะมีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 8-9 ใน bisfuran ring แต่จะแตกต่างกันตรงวงที่ 5 เพราะ B_1 เป็น cyclopentanone ring แต่ G_1 มี lactone ring ความเหมือนและความแตกต่างของโครงสร้างเพียงเล็กน้อยมีความสำคัญในการแสดงความเป็นพิษ โดยพิจารณาจากพันธะคู่และ lactone ring สารใดที่มีพันธะคู่จะมีความเป็นพิษมากกว่าไม่มี ดังนั้น อะฟลาทอกซิน B_1 และ G_1 จึงมีความเป็นพิษมากกว่า B_2 และ G_2 ส่วน lactone ring นั้นจะถูกสลายได้ง่ายกว่า ความเป็นพิษย่อมน้อยกว่า เพราะ โครงสร้างถูกเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับความเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน B_1 มีความเป็นพิษมากกว่า G_1 , B_2 และ G_2 ตามลำดับ (วรนนท์, 2538)



รูปที่ 2.7 แสดง โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินชนิดต่างๆ

ที่มา: Rita และ Leif (2006)

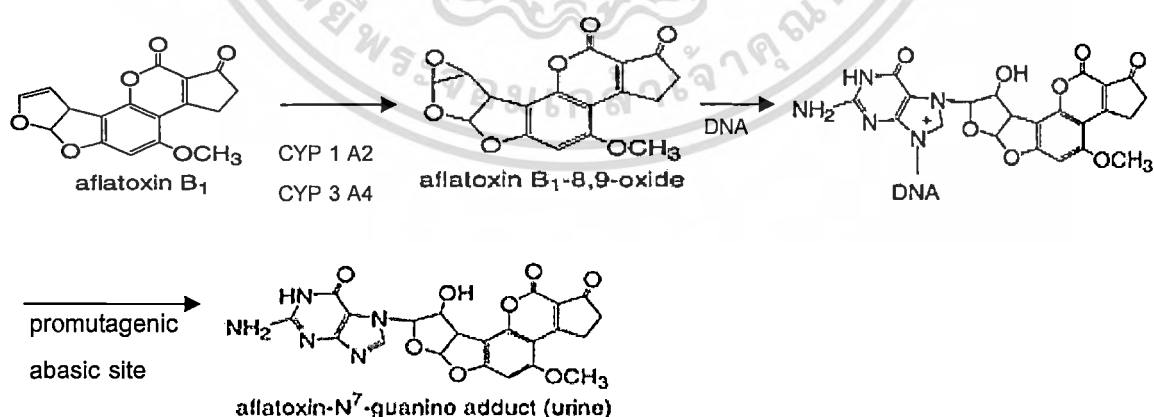
ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของอะฟลาทอกซินชนิดต่างๆ

| ชนิดของอะฟลาทอกซิน | โครงสร้างโมเลกุล | มวลโมเลกุล | จุดหลอมเหลว |
|--------------------|--|------------|-------------|
| B ₁ | C ₁₇ H ₁₂ O ₆ | 312 | 268-269 |
| B ₂ | C ₁₇ H ₁₄ O ₆ | 314 | 286-289 |
| G ₁ | C ₁₇ H ₁₂ O ₇ | 328 | 244-266 |
| G ₂ | C ₁₇ H ₁₄ O ₇ | 330 | 237-240 |
| M ₁ | C ₁₇ H ₁₂ O ₇ | 328 | 299 |
| M ₂ | C ₁₇ H ₁₄ O ₇ | 330 | 293 |
| B _{2A} | C ₁₇ H ₁₄ O ₆ | 330 | 240 |
| G _{2A} | C ₁₇ H ₁₄ O ₈ | 346 | 190 |

ที่มา: Reddy และ Farid (2000)

2.6 อันตรายจากสารพิษอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซิน B₁ จะถูกเปลี่ยนให้เป็นสารพิษที่ตับเมื่ออะฟลาทอกซินเคลื่อนย้ายมาสู่ตับ และอวัยวะอื่นๆ โดยจะเปลี่ยนเป็นอีพอกไซด์ (Epoxide) และรวมตัวกับดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) และโปรตีน โดยรวมกับ guanine residue ของดีเอ็นเอ ได้เป็น aflatoxin-N⁷-guanine adduct (รูปที่ 2.8) ทำให้ดีเอ็นเอเสียหาย เอนไซม์โพลีเมอเรส (Polymerase) ไม่สามารถทำงานได้ ทำให้การสร้างดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอลดลง (มาลินี, 2527) อะฟลาทอกซินจะมีผลทำให้จำนวนไรโบโซม (Ribosome) ลดลงและมีลักษณะผิดปกติ ไมโทคอนเดรียเสื่อมสลาย ทำให้การขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์สูญหายไป (ศศิธร, 2528)



รูปที่ 2.8 แสดงการรวมตัวกันของอะฟลาทอกซิน B₁ และ guanine residue ของดีเอ็นเอ

ที่มา: Egner และคณะ (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พิษของสารอะฟลาทอกซินแบบเฉียบพลันมักเกิดในเด็กมากกว่าผู้ใหญ่ อาการที่เกิดจาก สารพิษอะฟลาทอกซินในเด็ก คล้ายคลึงกับอาการของเด็กที่เป็น Reye's syndrome คือ มีอาการชักและหมดสติ เนื่องจากมีความผิดปกติของตับและสมอง น้ำตาลในเลือดลดลง สมองบวม มีการคั่งของไขมันในอวัยวะภายใน เช่น ตับ ไต หัวใจ และปอด บางครั้งมีการตรวจพบสารอะฟลาทอกซินในตับผู้ป่วย สำหรับในผู้ใหญ่หากได้รับสารพิษชนิดนี้เข้าไปเป็นจำนวนมาก หรือแม้เป็นจำนวนน้อย แต่ถ้าได้รับเป็นประจำ อาจเกิดการสะสมจนทำให้เกิดอาการชัก หายใจลำบาก ตับถูกทำลาย หัวใจและสมองบวม นอกจากนั้นการที่ร่างกายได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินเป็นประจำยังเป็นสาเหตุของโรคมะเร็งตับ การเกิดไขมันมากในตับ และพังพืดในตับ

สำหรับอาการที่แสดงออกของสัตว์ต่างๆ เช่น ไก่ หมู วัว ได้รับอะฟลาทอกซิน คือ เบื่ออาหาร น้ำหนักลด มีน้ำไหลออกจากจมูก ดีซ่าน ตกเลือดตาย อาการและลักษณะของสัตว์ที่ได้รับอะฟลาทอกซิน เช่น ในไก่จะแสดงอาการซึม ท้องร่วง เบื่ออาหาร โลหิตจาง และตายในที่สุด ถ้าเกิดโรคแบบเฉียบพลันอาจตายได้ใน 2-3 วัน ในสุกรจะมีอาการชูกหมอม ขนหยาบกร้าน อุจจาระร่วง มีสีเหลืองจัด บางตัวอาจท้องผูก ขาหลังไม่มีกำลัง ยืนตัวโก่ง มีอาการดีซ่าน โลหิตจาง อาจตายได้ใน 1-5 วัน (กวินดา, 2538; คำรง, 2519)

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา

การเจริญและการสร้างสารพิษของเชื้อราขึ้นอยู่กับ สารอาหาร ความชื้น อุณหภูมิ ระยะเวลา ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง อากาศ และการแข่งขันกับจุลินทรีย์เจ้าถิ่น ดังนั้นการเจริญและการสร้างสารพิษของเชื้อราจึงเป็นสิ่งที่ไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนอยู่แล้วตามธรรมชาติ (Gourama และ Bullerman, 1995a)

2.7.1 ชนิดของเชื้อรา

เชื้อราต่างชนิดกันจะสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินต่างกัน ทั้งชนิดและปริมาณ Pitt (1989) พบว่า *A. parasiticus* ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน B และ G ส่วน *A. flavus* จะผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน B เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้การที่พบเชื้อราบางชนิดเจริญอยู่บนอาหาร ไม่จำเป็นว่าจะต้องมีอะฟลาทอกซินปนอยู่ เพราะเชื้อราบางสายพันธุ์ไม่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในทางกลับกันการที่ไม่พบเชื้อราเจริญอยู่บนอาหารไม่ได้หมายความว่าอาหารนั้นปลอดภัยจากอะฟลาทอกซิน เพราะแม้เชื้อราจะถูกทำลายหรือตายไปแล้ว แต่สารพิษอะฟลาทอกซินยังคงอยู่ในอาหารนั้น (ปริศนา, 2534)

Criseo (2001) ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) พบว่า *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินกับสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินจะให้แถบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Suman และคณะ (1999) ศึกษาสารพิษอะฟลาทอกซินที่สร้างจากเชื้อราต่างชนิดกัน โดยหาคะพลาทอกซินที่สร้างโดยเชื้อราชนิดต่างๆ บนแผ่นดิสก์ (disc) 5 ไมโครลิตรต่อแผ่นดิสก์ และนำไปยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus brevis* NCIM 2534 บนข้าว เป็นเวลา 5-13 วัน พบว่า อะฟลาทอกซินที่ได้จาก *A. parasiticus* NRRL-2999 ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งต่อเชื้อ *B. brevis* NCIM 2534 สูงที่สุด คือ 0.8-19.0 เซนติเมตร รองลงมา คืออะฟลาทอกซินที่ได้จาก *A. flavus* NCIM 538 และ *A. flavus* SK 57 ทำให้เกิดบริเวณยับยั้ง 0.7-12.0 และ 5.0-15.0 เซนติเมตร ตามลำดับ จึงกล่าวได้ว่าอะฟลาทอกซินที่สร้างจากเชื้อราแต่ละชนิดจะมีความเป็นพิษมากน้อยแตกต่างกัน

2.7.2 แหล่งอาหาร

ในการสังเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซินแหล่งอาหารที่สำคัญคือแหล่งคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลซูโครส และกลูโคส ซึ่งจะช่วยให้เชื้อมีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในปริมาณสูง ขณะที่ น้ำตาลฟรักโทส ราฟฟิโนส แมนนิทอลและกาแล็กโทส จะทำให้เชื้อรามีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในปริมาณที่ไม่สูงมากนัก ขณะที่แหล่งไนโตรเจนที่สำคัญ ได้แก่ โซเดียมกลูตาเมต (sodium glutamate), ไกลซีน (glycine), แอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3), ยูเรีย (urea), แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl), โซเดียมไนเตรด (NaNO_3) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) และเปปโตน (pepton) ในอาหารจะทำให้เชื้อมีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในปริมาณที่สูงกว่าอาหารที่มีกรดอะมิโนแอสพาเทต (aspartate), ไกลซีน (glycine), กลูตามีน (glutamine), กลูตาเมต (glutamate), แอสพาราจีน (asparagine), อะลานีน (alanine), เมไทโอนีน (methionine), วาลีน (valine), ลิวซีน (leucine), โพแทสเซียมไนเตรด (KNO_3) และ โซเดียมไนเตรด (NaNO_3) (Davis และคณะ, 1967) สำหรับแร่ธาตุสำคัญที่ช่วยให้เชื้อราสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ดี คือ สังกะสี ถ้าปริมาณเกลือแร่นี้ลดลงปริมาณของอะฟลาทอกซินก็จะลดลงด้วย (สุกัญญา และคณะ, 2540)

Awuah และ Kpodo (1996) ทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ด้วยอบเชย และ พริกไทย โดยเลี้ยงเชื้อราในอาหารพีดีเอ พบว่าสมุนไพรรเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญและสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในอาหารพีดีเอ แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหาร yeast extracts sucrose พบว่าเชื้อราสามารถเจริญและสร้างอะฟลาทอกซินได้

2.7.3 ปฏิกริยาระหว่างเชื้อจุลินทรีย์

อาหาร โดยทั่วไปมักพบเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดขึ้นปนเป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน จุลินทรีย์เหล่านี้มีผลต่อการเจริญและสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* sp.

คุชณี และคณะ (2539) ทดสอบการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* ในระหว่างการผลิตนมเป็ดด้วยเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* พบว่าถั่วเหลืองหนึ่งทีเดิมสปอร์ของเชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. parasiticus* ลงไปพร้อมกัน จะไม่มีการสร้างสารพิษ

อะฟลาทอกซิน ในขณะที่ถั่วเหลืองหนึ่งที่เติมเฉพาะสปอร์ของเชื้อรา *A. parasiticus* เพียงชนิดเดียว จะมีการสร้างอะฟลาทอกซิน

Ramakrishna และคณะ (1996) ศึกษาลักษณะโคโลนี และการสร้างอะฟลาทอกซิน เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* ร่วมกับเชื้อ *Penicillium verrucosum*, *Hyphopichia burtonii* และ *Fusarium sporotrichioides* สามารถลดปริมาณการสร้างอะฟลาทอกซินได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเลี้ยงเฉพาะเชื้อรา *A. flavus*

2.7.4 ความชื้นและความชื้นสัมพัทธ์

ความชื้นเป็นปัจจัยที่สำคัญมากต่อการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ผลผลิตทางการเกษตรที่มีความชื้นสูงมักจะพบเชื้อราปนเปื้อนเสมอ

รณภพ (2530) ศึกษาการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* โดยใช้ข้าวโพดที่มีความชื้นในเมล็ดต่างกัน 3 ระดับ คือ 18.8, 21.4 และ 22.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อรามีการเจริญและสร้างอะฟลาทอกซินได้สูงสุดในวันที่ 8 ปริมาณอะฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างได้ คือ 740, 550 และ 500 พีพีบี ตามลำดับ

Samapundo และคณะ (2007) พบว่าค่า water activity (a_w) ที่ 0.822 ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* บนเมล็ดข้าวโพด

2.7.5 อุณหภูมิและระยะเวลา

เชื้อรา *A. flavus* สามารถเจริญและสร้างอะฟลาทอกซินได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 11-37 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25-30 องศาเซลเซียส เชื้อราจะสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินภายใน 48 ชั่วโมง อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อราสามารถเจริญได้ คือ 44-55 องศาเซลเซียส (ปริศนา, 2534) ดังนั้นการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิต่ำ จึงเป็นการป้องกันการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อราได้อีกทางหนึ่ง (Northolt และ Bullerman, 1982)

Kurtzman และคณะ (1987) พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. สามารถเจริญและสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างมาก อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อรา *A. pseudotamarii* และ *A. tamarii* สามารถเจริญและสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้คือ 37 องศาเซลเซียส ส่วนเชื้อรา *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *A. nomius* อยู่ที่ 32 องศาเซลเซียส

Samapundo และคณะ (2007) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* บนเมล็ดข้าวโพด อยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส

2.7.6 ปัจจัยอื่นๆ

นอกจากปัจจัยต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา เช่น ความเสียหายของเมล็ดธัญพืช ปริมาณออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์

Northolt และ Bullerman (1982) กล่าวว่าคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจน มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารพิษของเชื้อรา การเพิ่มปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์ และลดปริมาณออกซิเจนในอากาศเหลือ 10 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน หากระดับออกซิเจนน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์จะยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์

Line และคณะ (1994) พบว่าการเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์ในอาหารเหลวเป็นเวลานานๆ จะทำให้สปอร์ของเชื้อราที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเหลวไม่สามารถเจริญได้หรือไม่เกิดกระบวนการเมแทบอลิซึม

Awuah และ Kpodo (1996) ศึกษาการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินของเมล็ดธัญพืชในประเทศการ์นา พบว่าเมล็ดที่ได้รับความเสียหาย แดกหัก จะมีปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินปนเปื้อนอยู่ในระดับ 57-22,168 พีพีบี ส่วนเมล็ดที่ไม่ได้รับความเสียหาย พบว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จะตรวจไม่พบอะฟลาทอกซิน ในส่วนที่ตรวจพบจะมีปริมาณสารพิษเพียงเล็กน้อย คือ 0.1-12.2 พีพีบี

Campbell และคณะ (1997) ศึกษาพันธุ์ข้าวโพดโดยผสมพันธุ์กันระหว่างสายพันธุ์ B37 กับ สายพันธุ์ LB31 ซึ่งผ่านการคัดเลือกว่ามีถิ่นที่สามารถต้านทานต่ออะฟลาทอกซินอยู่ พบว่าข้าวโพดพันธุ์ใหม่ที่เกิดขึ้นสามารถต้านทานการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ได้

2.8 วิธีการควบคุมการปนเปื้อนและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา

วิธีการการป้องกันกำจัดเชื้อราและสารพิษอะฟลาทอกซิน แบ่งเป็น 3 วิธี คือ วิธีทางกายภาพ วิธีทางชีวภาพ และวิธีทางเคมี

2.8.1 วิธีทางกายภาพ

การฉายรังสี การใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต สามารถทำลายสารพิษอะฟลาทอกซินได้ นอกจากนี้การใช้สารที่มีคุณสมบัติในการดูดซับ (Non-nutritive sorptive material) เช่น สารประกอบประเภทอะลูมิโนซิลิเกต (inert aluminosilicate compound) ซึ่งเป็นสารที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นผลึกประกอบด้วยโพรงจำนวนมากกระจายอยู่ระหว่างโมเลกุล ผสมลงในวัตถุดิบอาหาร มีความสามารถดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซินเอาไว้ในโครงสร้าง และการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ เช่น อะซิโตน แอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม เบนซีน เฮกเซน และ ไอโซโพรพานอลในรูปสารบริสุทธิ์และสารผสม สามารถสกัดอะฟลาทอกซินออกจากผลิตภัณฑ์การเกษตรได้ (กนกรัตน์, 2540)

ไพโรจน์ (2536) ศึกษาการอบแห้งเมล็ดข้าวโพดในถังเก็บภายใต้สภาวะอากาศร้อนชื้น โดยอบเมล็ดข้าวโพดในถังอบแห้ง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.75 เมตร สูง 2.75 เมตร และเป่าอากาศที่อัตราการไหล 1.5-4.5 ลูกบาศก์เมตรต่อนาทีต่อลูกบาศก์เมตรข้าวโพด โดยเป่าอากาศแบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อเนื่องและไม่ต่อเนื่อง พบว่าเทคนิคนี้จะได้เมล็ดข้าวโพดหลังการอบแห้งอยู่ในเกณฑ์ดี ปริมาณการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในเมล็ดข้าวโพดหลังการอบแห้งจะต่ำกว่าในเมล็ดข้าวโพดก่อนการอบแห้ง

Inan และคณะ (2007) ศึกษาผลของความเข้มข้นของก๊าซโอโซน (ozone) และเวลาการให้ก๊าซต่อการลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน B_1 ในพริกไทยแดงบดละเอียดและพริกไทยแดงสับ พบว่าความเข้มข้นของโอโซนที่ 80 และ 93 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 นาที ช่วยลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน B_1 ในพริกไทยแดงบดละเอียดและพริกไทยแดง

Giorni และคณะ (2008) พบว่าที่ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ และที่ค่า a_w 0.95 และ 0.92 สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์และบนเมล็ดข้าวโพด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

2.8.2 วิธีทางชีวภาพ

การควบคุมการกำจัดเชื้อราและอะฟลาทอกซินโดยวิธีทางชีวภาพ เป็นการนำเอาจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ รา แอคติโนมัยซีท และอื่นๆ มาทดสอบความสามารถในการควบคุมและกำจัดเชื้อราและสารพิษอะฟลาทอกซิน หรือเปลี่ยนรูปโครงสร้างของอะฟลาทอกซินเพื่อทำให้ความเป็นพิษลดลง หรือไม่เกิดความเป็นพิษต่อสัตว์

Gourama และ Bullerman (1995b) นำเชื้อ *Lactobacillus* สายพันธุ์ผสมทางการค้า ทดสอบการยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* subsp. *parasiticus* ในอาหารเหลวที่มีความเป็นกรดเป็นด่าง 4.0 พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ แต่ไม่สามารถทำลายการมีชีวิตรอดของสปอร์ได้ เมื่อทดสอบการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินโดยเลี้ยงในถุง dialysis โดยให้เชื้อ *Lactobacillus* สายพันธุ์ผสมเจริญในถุง dialysis และให้เชื้อรา *A. flavus* subsp. *parasiticus* เจริญนอกถุง dialysis พบว่าเมื่อใช้ถุง dialysis ที่มีขนาด molecular weight cut off เท่ากับ 1,000 จะยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินได้เล็กน้อย แต่เมื่อใช้ถุง dialysis ที่มีขนาด molecular weight cut off เท่ากับ 6,000, 8000 และ 12,000 ถึง 14,000 จะสามารถยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินได้มากขึ้น เมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้เชื้อ *Lactobacillus* สายพันธุ์เดี่ยว (monoculture) โดยพบว่าไม่สามารถยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

Line และ Brackett (1995) ศึกษาผลของเชื้อ *Flavobacterium aurantiacum* ต่อการกำจัดพิษของอะฟลาทอกซิน พบว่าจุลินทรีย์นี้สามารถกำจัดอะฟลาทอกซินได้ โดยไม่ต้องการแหล่งพลังงานจากอาหาร แต่กลับสามารถใช้สารพิษอะฟลาทอกซินเป็นแหล่งคาร์บอนแทน ทำให้สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซิน

Paster และคณะ (1995) ทดลองนำน้ำมันหอมระเหยจากออริกาโน (oregano) และ ไทม์ (thyme) (ซึ่งมีองค์ประกอบของ carvacol และ thymol ตามลำดับ) ไปอบหรือรมควันเมล็ด ัญพืช ในระหว่างการเก็บรักษา พบว่าสามารถต้านทานเชื้อราได้ ซึ่งเป็นวิธีการอย่างหนึ่งที่นิยม ใช้กันมากในปัจจุบัน

Calistru และคณะ (1997) รายงานว่า 4 ใน 9 ไอโซเลต ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ แยกได้จากธรรมชาติ 2 สายพันธุ์ คือ *T. harzianum* และ *T. viride* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *F. moniliforme* ได้

Thanaboripat และคณะ (1997a) พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus lactis* ร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* โดยการใส่เชื้อพร้อมกัน และการใส่เชื้อ *S. lactis* หลังจากที *A. parasiticus* เจริญแล้วเป็นเวลา 3 วัน พบว่าในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงสารพิษอะฟลาทอกซิน ลดลงจาก 108.33 เป็น 94.18 และ 31.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยง *S. lactis* เป็น เวลา 3 วัน ก่อนทำการ ใส่สปอร์ *A. parasiticus* พบว่า *A. parasiticus* สามารถผลิตอะฟลาทอกซิน ได้เพียง 58.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Thanaboripat และคณะ (1997b) ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากกระเทียม กานพลู และแครอทที่ระดับความเข้มข้น 20,000, 40,000, 60,000, 80,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ต่อการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* 102566 บนเมล็ดข้าว พบว่า สารสกัดหยาบจากกระเทียมและกานพลูที่ความเข้มข้น 100,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถ ลดระดับสารพิษอะฟลาทอกซินได้จาก 5.94 เป็น 0.15 และ 0.06 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ สาร สกัดหยาบจากแครอทความเข้มข้น 20,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดปริมาณสารพิษ อะฟลาทอกซินได้จาก 5.94 เป็น 0.03 ไมโครกรัมต่อกรัม

Gelestin และ Bullerman (1998) พบว่าการเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* ร่วมกับ *A. niger* จะมึ การสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินน้อยกว่าการเลี้ยงเชื้อแยกกัน เนื่องจากการอยู่ร่วมกันของเชื้อรา หลายชนิดในเมล็ดธัญพืช มีการเจริญแบบแข่งขัน นอกจากนี้ยังพบจุลินทรีย์อื่นๆ ที่มีการเจริญแบบ แข่งขันกับเชื้อรา *A. flavus* เช่น *Rhizopus nigricans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Brevibacterium linens* และ lactic acid bacteria บางชนิด เชื้อเหล่านี้สามารถลดการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของ เชื้อรา *A. parasiticus*

Thanaboripat และคณะ (2002) ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) บน เมล็ดข้าวฟ่างเป็นเวลา 3 วันหรือมากกว่า ก่อนทำการปลูกเชื้อ *A. parasiticus* IMI 20256 พบว่า เส้นใยของเห็ดสามารถยับยั้งการเจริญและสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อราได้

Thanaboripat และคณะ (2004) ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการยับยั้ง การเจริญและสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และ *A. parasiticus* IMI

20256 พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ ขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนเมล็ดข้าวโพด

Thanaboripat และคณะ (2007) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 16 ชนิด ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ จากการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi*) มีประสิทธิภาพดีที่สุด รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย (*Cinnamomum cassia*) และลาเวนเดอร์ (*Lavandula officinalis*) ตามลำดับ โดยใช้ความเข้มข้นที่ต่างกัน น้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาวใช้ที่ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อบเชยและลาเวนเดอร์ใช้ที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาวที่ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ได้อย่างสมบูรณ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ เป็นเวลา 28 วัน

Chinaphuti และ Aukkasarakul (2008) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพร ต่อการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* โดยนำสมุนไพรที่ปลูกในประเทศไทยจำนวน 15 ชนิดมาทำการสกัดและเตรียมให้มีความเข้มข้นที่ระดับ 1:0, 1:1, 1:2 และ 1:4 พบว่าสารสกัดจากสมุนไพร 7 ใน 15 ชนิด สามารถยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้แก่ สารสกัดจากสมุนไพร *Syzygium aromaticum*, *Ocimum tenuiflorum*, *Allium sativum*, *Cymbopogon citrates*, *Cissus quadrangularis*, *Allium ascalonicum* และ *Ocimum basilicum* ซึ่งยับยั้งได้ถึง 50-100 เปอร์เซ็นต์

Dikbas และคณะ (2008) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก *Satureja hortensis* มีคุณสมบัติการเป็นสารต่อต้านเชื้อรา เมื่อทำการทดสอบบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี Disc Diffusion พบว่าทำให้เกิดบริเวณยับยั้งต่อเชื้อรา *A. flavus* อีกทั้งยังมีผลต่อน้ำหนักเส้นใยเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยจาก *S. hortensis* ที่ระดับความเข้มข้น 25, 12.5, 6.25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มาคลุกกับผลเลนก่อนการปลูกเชื้อรา *A. flavus* ลงไปเป็นเวลา 7 วัน ก่อนเก็บรักษาพบว่าสามารถยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์

Bluma และคณะ (2008) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพร 96 ชนิดต่อการยับยั้งการเจริญและสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก clove, mountain thyme, menta poleo และ eucalyptus มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต่อต้านเชื้อราที่ดีที่สุด พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ อัตราการเจริญของเส้นใย อัตราการเจริญและการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน

Bluma และ Etcheverry (2008) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* บนเมล็ดข้าวโพด โดยนำน้ำมันหอมระเหยจากโป๊ยกั๊ก (*Pimpinella anisum* L.), ใบลิ้ว (*Peumus boldus* Mol), โหระพา (*Hedeoma multiflora* Benth) และ กานพลู (*Syzygium aromaticum* L) มาคลุกกับเมล็ดข้าวโพดปลอดเชื้อที่มีค่า a_w ที่ต่างกัน (0.982, 0.955, และ 0.90) พบว่าน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* โดยน้ำมันหอมระเหยจากใบลิ้ว และโหระพา ที่ระดับความเข้มข้น 2000 และ 3000 ไมโครกรัมต่อกรัม สามารถยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์

Tatsadjieu และคณะ (2009) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Lippia rugosa* ในประเทศคาเมรูน ด้วยเครื่อง chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบว่าสารประกอบหลัก คือ Geraniol (51.5 เปอร์เซ็นต์), nerol (18.6 เปอร์เซ็นต์) และ geranial (10.4 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการสร้างสารอะฟลาทอกซิน B_1 ของเชื้อรา *A. flavus* Link ex. Fries ได้ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน

Gandomi และคณะ (2009) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก *Zataria multiflora* Boiss ที่ระดับความเข้มข้น 400 พีพีเอ็ม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ การสร้างสปอร์และการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ATCC 15546 บนอาหารแข็งพีดีเอได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่ในอาหาร Iranian ultra-filtered white cheese พบว่าไม่มีความเข้มข้นใดที่สามารถยับยั้งได้

Kye และคณะ (2009) พบว่า *Bacillus pumilus* สายพันธุ์ HY1 ที่แยกได้จากซอสถั่วเหลืองเกาหลี (kanjang) มีประสิทธิภาพในการผลิตสาร Iturin ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus*

2.8.3 วิธีทางเคมี

มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาถึงการใส่สารเคมีต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน เช่น

Thanaboripat และคณะ (1993) พบว่าความเข้มข้นของเกลือที่ 80, 120 และ 160 มิลลิกรัมต่อกรัม สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ขณะที่เกลือความเข้มข้นต่ำมีผลไปกระตุ้นให้เชื้อรามีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินมากขึ้น

Thanaboripat และคณะ (1996) ศึกษาประสิทธิภาพของสารถนอมอาหาร benzoic acid, sodium benzoate และ potassium metaspulphite ที่ระดับความเข้มข้น 2.0, 6.0, และ 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* โดยทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการกวน เป็นเวลา 6 วัน จากการทดลองพบว่า sodium benzoate ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดการเจริญและการสร้างสารพิษ อะฟลาทอกซินได้ 13 เปอร์เซ็นต์ และ 35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ benzoic acid ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ 72 เปอร์เซ็นต์ และ 87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 6.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่ potassium metasulphite ที่ความเข้มข้น 2.0, 6.0, และ 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ได้อย่างสมบูรณ์

Paster และคณะ (1999) ศึกษาผลของไนซินและกรดโพรพิโอนิกในการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน การเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *A. parasiticus*, *A. ochraceus* และ *Fusarium moniliforme* ในเมล็ดข้าวโพด พบว่ากรดโพรพิโอนิก 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ ไนซินความเข้มข้น 500 และ 1,000 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. ochraceus* โดยกรดโพรพิโอนิก 0.1 เปอร์เซ็นต์ และไนซินความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. ochraceus* และ *F. moniliforme* ได้อย่างสมบูรณ์ การใช้สารเคมี 2 ชนิดร่วมกันให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งดีกว่าใช้สารเคมีตัวเดียว อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน B₁ และ G₁

Hasan (1999) ได้ศึกษาผลของยาฆ่าแมลง 9 ชนิดในการยับยั้งการสังเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* พบว่าอนุพันธ์ของกรดฟอสโฟริก (profenfos) ยับยั้งการสร้างสารพิษ aflatoxin, verticolarin A, versiconal, hemiacetate และอนุพันธ์ของ phenylurea (linuron และ pencycuron) ที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 1,000 พีพีเอ็ม

Reddy และคณะ (2009) พบว่า Benzoic acid ความเข้มข้น 4 กรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ได้ถึง 72 เปอร์เซ็นต์ รวมถึง *A. ochraceus* ขณะที่ความเข้มข้นที่มากกว่า 1 กรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. niger* vanillin ความเข้มข้น 4 กรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน B₁ บนเมล็ดข้าวได้อย่างสมบูรณ์

2.9 การสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง

ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.) เป็นพืชน้ำมันที่ใช้เป็นอาหาร มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย แต่พบว่าถั่วลิสงมีการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซินมากที่สุด (อมรา, 2547) การปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินสามารถเกิดได้ตั้งแต่การปลูก การดูแลรักษา การเก็บเกี่ยว การปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยว การเก็บรักษา และการขนส่ง (สุกัญญา และคณะ, 2540)

ถั่วลิสงที่กะเทาะเปลือกมีโอกาสนี้เสื่อมคุณภาพและเสี่ยงต่อการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซินสูงกว่าถั่วลิสงที่ยังไม่กะเทาะเปลือก (ปริศนา และศุภรัตน์, 2532)

ลำดับอนุกรมวิธานของถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.)

Kingdom: Plantae

Division: Tracheophyta

Class: Magnoliophyta

Order: Fabales

Family: Fabaceae

Subfamily: Faboideae

Tribe: Aeschynomeneae

Genus: *Arachis*

Species: *hypogaea*

ถั่วลิสงมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากประกอบด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน รวมทั้งแร่ธาตุต่างๆ และเส้นใยอาหาร (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญของถั่วลิสง

| ส่วนประกอบทางเคมี | ปริมาณ |
|---------------------------------------|---------|
| โปรตีน(%) | 26 |
| คาร์โบไฮเดรต(%) | 23 |
| ไขมัน (%) | 45-50 |
| แคลเซียม (มิลลิกรัม) | 52 |
| เหล็ก (มิลลิกรัม) | 1.9 |
| เส้นใยอาหาร(%) | 1.9-3.0 |
| ถั่วลิสง 100 กรัม ให้พลังงาน (แคลอรี) | 546 |

ที่มา: ภูวนาด (2531)

การเข้าทำลายและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* แบ่งเป็น 3 ระยะดังนี้

2.9.1 ระยะก่อนการเก็บเกี่ยว

การเข้าทำลายถั่วลิสงของเชื้อรา *A. flavus* ในระยะนี้ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อราในดินในพื้นที่ที่ปลูกถั่วลิสงติดต่อกันนาน โดยพบว่าพื้นที่ที่ไม่ปลูกพืชอื่นหมุนเวียนจะมีปริมาณเชื้อราในดินมากกว่าในพื้นที่ที่ปลูกพืชอื่นหมุนเวียน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Petit และ Taber (1968) รายงานว่าการปลูกถั่วลิสงเพียงอย่างเดียว จะพบการเข้าทำลาย และการปนเปื้อน (contamination) สารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* มากกว่าพื้นที่ที่ปลูก ข้าวไรย์ ข้าวโอ๊ต เมล่อน และมันฝรั่ง ตามลำดับ

Mixon และคณะ (1984) รายงานว่าการใส่ปุ๋ยลงไปในแปลงปลูกถั่วลิสงมีผลในการลดการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และไม่พบสารพิษอะฟลาทอกซินในแปลงที่ใส่ปุ๋ย ถั่วลิสงที่ประสบกับสภาพแห้งแล้ง (drought stress) ทั้งพันธุ์ต้านทานและต้านทานปานกลางจะมีระดับสารพิษอะฟลาทอกซินสูง โดยระดับการเข้าทำลายของเชื้อ *A. flavus* และการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซินสัมพันธ์กับความแห้งแล้งในระหว่างเมล็ดกำลังสุกแก่ (Davidson และคณะ, 1983; Anderson และคณะ, 1995)

2.9.2 ระยะเวลาหลังการเก็บเกี่ยว

การเข้าทำลายของเชื้อราในระยะหลังการเก็บเกี่ยวเป็นสาเหตุสำคัญในการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซินในช่วงระหว่างการตากและการเก็บรักษา ถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา เช่น ความชื้นในขณะเก็บเกี่ยวที่มีค่าสูงประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เมล็ดถั่วลิสงอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของ *A. flavus* แต่เมล็ดที่มีความชื้นประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ จะมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายมากขึ้น นอกจากนี้ระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้ฝักแห้งก็มีผลต่อปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน โดยฝักที่มีการทำให้แห้งภายใน 4-6 วันจะไม่พบสารพิษอะฟลาทอกซิน แต่ฝักที่มีการทำให้แห้งในเวลา 8-12 วัน จะพบสารพิษอะฟลาทอกซิน (25-500 พีพีเอ็ม) การเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* และการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในฝักที่แห้งช้าจะสูงกว่าในฝักที่แห้งเร็ว ดังนั้นการทำให้ถั่วลิสงแห้งเร็วที่สุดสามารถช่วยลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน และการเข้าทำลายของ *A. flavus* (McDonald และ Brook, 1963)

2.9.3 ระยะเวลาเก็บรักษา

ถั่วลิสงจะไม่ถูกทำลายจากเชื้อรา *A. flavus* เมื่อเมล็ดมีความชื้นไม่เกิน 7 ในพันธุ์ต้านทาน (PI 337409 และ PI 337394F) พบว่าเชื้อราเจริญได้ดีขึ้น และพบว่าเชื้อรามีการเข้าทำลายเมล็ดมากขึ้นเมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 9-10 วัน เมื่อถั่วลิสงมีความชื้นประมาณ 87-95 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 23-26 องศาเซลเซียส (Wilson, 1997)

ณพรัตน์ (2530) รายงานว่าการงอกของเมล็ดถั่วลิสงพันธุ์สุโขทัย 38 ไทนาน 9 และ PI 337394F จะลดลงเมื่อทำการเก็บรักษาไว้ตั้งแต่ 6 เดือนขึ้นไปและพบเชื้อรา *A. flavus* และสารพิษอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงพันธุ์สุโขทัย 38 และไทนาน 9 มากกว่า นอกจากนี้การเก็บรักษาในสถานะที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้น (ambient) มีการปรากฏของเชื้อราและสารพิษอะฟลาทอกซินสูงกว่าเมล็ดที่เก็บรักษาในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความชื้น

สัมพัทธ์ 65 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในพันธุ์สุโขทัย 38 และ PI 337409 ไม่มีความแตกต่าง นอกจากนี้ยังพบว่าเมล็ดถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 และ PI 337394F ที่ยังอ่อนอยู่มีเชื้อรามากกว่าเมล็ดที่แก่

2.10 กลไกการต้านทานต่อเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง

2.10.1 การต้านทานเนื่องมาจากสารเคมี

Carter (1973) พบว่าเมล็ดถั่วลิสงที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายและสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงกว่าเมล็ดที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว

จินตนา (2530) รายงานว่าถั่วลิสงพันธุ์ KUP-615, NC 2 และ Shulamit มีปริมาณแทนนินในเยื่อหุ้มเมล็ด 19.53, 17.54 และ 16.97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์แทนนินที่พบในถั่วลิสงทั้ง 3 พันธุ์อยู่ในระดับสูง นอกจากนี้เมื่อผสมแทนนินที่สกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อฟีดบี ในปริมาณ 7.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรากฏว่ามีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์

Sanders (1977) พบว่าค่าสหสัมพันธ์ระหว่างแทนนินในเมล็ดกับการสุกแก่ จะส่งผลให้เปอร์เซ็นต์น้ำหนักสด เปอร์เซ็นต์แทนนินในเยื่อหุ้มเมล็ดและเปลือกจะมีค่าสูงขึ้นในเมล็ดที่แก่ Sanders และ Mixon (1997) พบว่าเปอร์เซ็นต์ของปริมาณแทนนินที่สกัดจากเมล็ดและที่สกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดจะเพิ่มขึ้นในระยะสุกแก่ โดยที่ปริมาณมิลลิกรัมแทนนินต่อส่วนของเมล็ดและเปลือกถั่ว เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ระยะนี้ แต่ทว่า หลังระยะสุกแก่นี้ ปริมาณแทนนินที่เยื่อหุ้มเมล็ดจะลดลง ส่วนปริมาณแทนนินที่เมล็ดไม่เปลี่ยนแปลง

2.10.2 การต้านทานเชิงกล

เมล็ดถั่วลิสงที่ต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* จะมีลักษณะของไฮลัม (hilum) ปิด มีขนาดเล็ก ที่ผิวของเนื้อเยื่อเมล็ดมีขี้ผึ้งเคลือบปกคลุมหนาแน่น มีการสะสมแทนนินมาก เซลล์พาราเรนไคมา (parenchyma) จัดเรียงตัวแน่น มีการสะสมลิกนินที่เยื่อชั้นกลาง มีส่วนสเกลอริด (sclereid) อัดตัวกันแน่น และเนื้อเยื่อพาลิเสดหนา (palisade-like) (Mixon และ Rogers, 1975)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อรา

Aspergillus flavus IMI 242684 จาก International Mycological Institute ประเทศอังกฤษ

Trichoderma sp. TISTR 3167 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

Trichoderma sp. KMC 5 จากแปลงปลูกข้าวโพดทดลอง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Trichoderma sp. SRS 4 จากแปลงสับปะรด อำเภอเขาสก จังหวัดสุราษฎร์ธานี

Trichoderma sp. SCP III จากไร่บัวสวรรค์ อำเภอดอนเจดีย์ จังหวัดสุพรรณบุรี

เชื้อราทั้งหมดถูกเก็บรักษาด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization)

3.2 ถั่วลิสง

ถั่วลิสงสายพันธุ์ขอนแก่น 6 จากศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

3.3 อุปกรณ์และสารเคมี

3.3.1 อุปกรณ์

3.3.1.2 กรวยบุชเนอร์ (buchner funnel)

3.3.1.3 ฟลากลบบุชเนอร์ (buchner flask) จากบริษัท Duran ประเทศอังกฤษ

3.3.1.4 ขวดเก็บตัวอย่างขนาดเล็ก (vial) จากบริษัท อาศรม จำกัด ประเทศไทย

3.3.1.5 กรวยแยก (separatory funnel) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร จากบริษัท Pyrex ประเทศเยอรมันนี

3.3.1.6 สไลด์นับเซลล์ (haemocytometer) จากบริษัท Boeco ประเทศเยอรมันนี

3.3.1.7 กระดาษกรองวัทแมนเบอร์ 1 และเบอร์ 4 จากบริษัท Whatman ประเทศอังกฤษ

3.3.1.8 เวอร์เนีย ดิจิตอล (vernier digital) จากบริษัท BEC ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.1.9 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) จากบริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น

3.3.1.10 ไมโครปิเปตต์ (micro pipett) ขนาด 50-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร จากบริษัท Gilson ประเทศอเมริกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.1.11 เครื่องปั่น (blender) จากบริษัท National ประเทศญี่ปุ่น
- 3.3.1.12 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (balance) รุ่น AR2140 จากบริษัท Ohaus ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.1.13 เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) รุ่น LABORATA-4001 ของบริษัท Heidolph ประเทศอังกฤษ
- 3.3.1.14 LiChrolut Column Manifold ของบริษัท MERCK ประเทศเยอรมันนี
- 3.3.1.15 เครื่องเขย่า (shaker) จากบริษัท Gallenkamp ประเทศอังกฤษ
- 3.3.1.16 ตู้ปลอดเชื้อเชื้อ (larmina air flow) รุ่น ISSCO BTV 123 จากบริษัท International Scientific Supply Co., Ltd. จำกัด ประเทศไทย
- 3.3.1.17 หม้อนึ่งความดัน (autoclave) รุ่น HA-300 HIV จากบริษัท Hirayama ประเทศญี่ปุ่น
- 3.3.1.18 ตู้อบ (oven) รุ่น WTB binder FD 53 จากบริษัท MG Scientific ประเทศเยอรมันนี
- 3.3.1.19 High performance liquid chromatography (HPLC) รุ่น SPD-20A จากบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
- 3.3.2 สารเคมี
 - 3.3.2.1 เมทานอล เกรดวิเคราะห์ จากบริษัท MERCK ประเทศเยอรมันนี
 - 3.3.2.2 เอทิลอะซิเตตเกรดวิเคราะห์ จากบริษัท MERCK ประเทศเยอรมันนี
 - 3.3.2.3 บิวทานอล เกรดวิเคราะห์ จากบริษัท MERCK ประเทศเยอรมันนี
 - 3.3.2.3 เฮกเซน เกรดวิเคราะห์ จากบริษัท MERCK ประเทศเยอรมันนี
 - 3.3.2.4 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide; DMSO) เกรดวิเคราะห์ จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - 3.3.2.5 แอมโมเนียมซัลเฟต เกรดวิเคราะห์ จากบริษัท Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย
 - 3.3.2.6 กลอโรฟอร์ม เกรดวิเคราะห์ จากบริษัท CARLO ERBA ประเทศอิตาลี
 - 3.3.2.7 เบนซีน เกรดวิเคราะห์ จากบริษัท Panreac ประเทศสเปน
 - 3.3.2.8 กรดแอสติก เกรดวิเคราะห์ จากบริษัท J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - 3.3.2.9 เอทิลอีเทอร์ เกรดวิเคราะห์ จากบริษัท VWR International Ltd. ประเทศอังกฤษ
 - 3.3.2.10 ไดคลอโรมีเทน เกรดวิเคราะห์ จากบริษัท Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.11 อะซีโตน เกรดวิเคราะห์ จากบริษัท VWR International Ltd. ประเทศ
อังกฤษ

3.3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.3.1 Potato Dextrose Agar (พีดีเอ) จากบริษัท HIMEDIA ประเทศอินเดีย

3.3.3.2 Potato Dextrose Broth (พีดีบี) จากบริษัท HIMEDIA ประเทศอินเดีย

3.3.3.3 Peptone จากบริษัท HIMEDIA จากประเทศอินเดีย

3.3.4 ยาปฏิชีวนะ

3.3.4.1 นิสตาติน (Nystatin) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และ เชื้อรา

Trichoderma spp. โดย slide culture

เลี้ยงเชื้อราบนอาหารพีดีเอ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน นำ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใย โดยวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน อีกส่วนนำไปทำ slide culture (Harris, 1986) เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตลักษณะเส้นใย สีของเส้นใย สปอร์ และขนาด phialide

3.5 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของ

เชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ

3.5.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเจริญแบบแข่งขันกับเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

นำเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ มาทดสอบประสิทธิภาพในการเจริญแบบแข่งขันกับเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ด้วยวิธี dual culture test (Intana และคณะ, 2005) โดยวาง mycelial disc เชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ อายุ 7 วัน เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร ให้ห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 1.0 เซนติเมตร วาง mycelial disc ขนาด 0.5 มิลลิตร ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เลี้ยงบนอาหารพีดีเอ อายุ 2-4 วัน ไว้ตรงข้ามในจานเพาะเชื้อเดียวกัน ให้ระยะห่างของราทั้งสองเท่ากับ 6 เซนติเมตร บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราเป็นมิลลิเมตร เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และ *Trichoderma* spp. เพียงลำพัง นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 (percent inhibition of radial growth (PIRG) โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = [(R_c - R_t) / R_c] \times 100$$

เมื่อ R_c = เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่เจริญเพียงลำพัง (มิลลิเมตร)

R_t = เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่เจริญพร้อมกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ (มิลลิเมตร)

3.5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการเจริญคลุมทับเส้นใย

เชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

ทดสอบความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยวิธี dual culture test (Intana และคณะ, 2005) เช่นเดียวกับข้อ 3.5.1 โดยวาง mycelial disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และเชื้อรา *Trichoderma* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ ให้ระยะห่างของราทั้งสองเท่ากับ 6 เซนติเมตร บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง หลังจากเส้นใยของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และ *Trichoderma* spp. เจริญมาสัมผัสกัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นมิลลิเมตร ให้เป็นวันเริ่มทำการศึกษา บ่มต่อเป็นเวลา 4 วัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* spp. อีกครั้ง คำนวณประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการคลุมทับเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 (percent overgrow-POG) โดยใช้สูตรการคำนวณ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การคลุมทับเส้นใย} = [(C_1 - C_2) / D] \times 100$$

เมื่อ C_1 = คือ ค่าเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คลุมทับเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในวันที่ทำการศึกษา (มิลลิเมตร)

C_2 = คือ ค่าเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คลุมทับเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในวันก่อนทำการศึกษา (มิลลิเมตร)

D = คือ ช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษามีหน่วยเป็นวัน

3.5.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการพันรัดเส้นใยเชื้อรา

A. flavus IMI 242684

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5.2 มาทดสอบความสามารถในการพันรัดเส้นใย (coiling) เชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. และ *A. flavus* IMI 242684 ไว้ตรงข้ามกันบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ (Kexiang และคณะ, 2002) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราทั้งสองเจริญสัมผัสกัน ใช้เข็มเย็บเชื้อ (needle) ตัดชิ้นวุ้นอาหารตรงบริเวณที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีปลายของเส้นใยของเชื้อราทั้งสองชนิดเจริญสัมพันธ์กันให้มีขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร นำไปวางบนสไลด์แผ่นใหม่ ย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue ปิดทับด้วย cover slip นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตลักษณะการพันรัดเส้นใยของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด

3.5.4 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อรา

A. flavus IMI 242684 โดยวิธี Dialysis Membrane Technique

ดัดแปลงจากวิธี Dialysis Membrane Technique (Gibb, 1967; Whipps, 1987; Simon และคณะ, 1988) โดยนำกระดาษแก้วที่ตัดเป็นชิ้นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปูทับบนผิวหน้าอาหารฟีดในจานเพาะเชื้อ ก่อนวาง mycelial disc ของเชื้อรา *Trichoderma* spp ขนาด 8 มิลลิเมตร ตรงกึ่งกลางจาน บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นลอกกระดาษแก้วพร้อม โคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ออก นำ mycelial disc ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ขนาด 8 มิลลิเมตร วางลงบนอาหารวุ้นในตำแหน่งกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นตำแหน่งเดิมที่เคยวาง mycelial disc ของ *Trichoderma* spp. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใช้เชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 วางบนกระดาษแก้วแทนเชื้อรา *Trichoderma* spp. กำหนดหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยดัดแปลงจากสูตรของ Royse และ Ries (1978)

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

เมื่อ D_1 = ขนาดโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 อายุ 4 วัน ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เคยมีเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 เจริญอยู่ก่อน 48 ชั่วโมง (จานเพาะเชื้อควบคุม) ลบด้วยขนาด mycelial disc ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่ใช้ในการทดลอง

D_2 = ขนาดโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 อายุ 4 วัน ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เคยมีเชื้อรา *Trichoderma* spp. เจริญอยู่ก่อน 48 ชั่วโมง ลบด้วยขนาด mycelial disc ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่ใช้ในการทดลอง

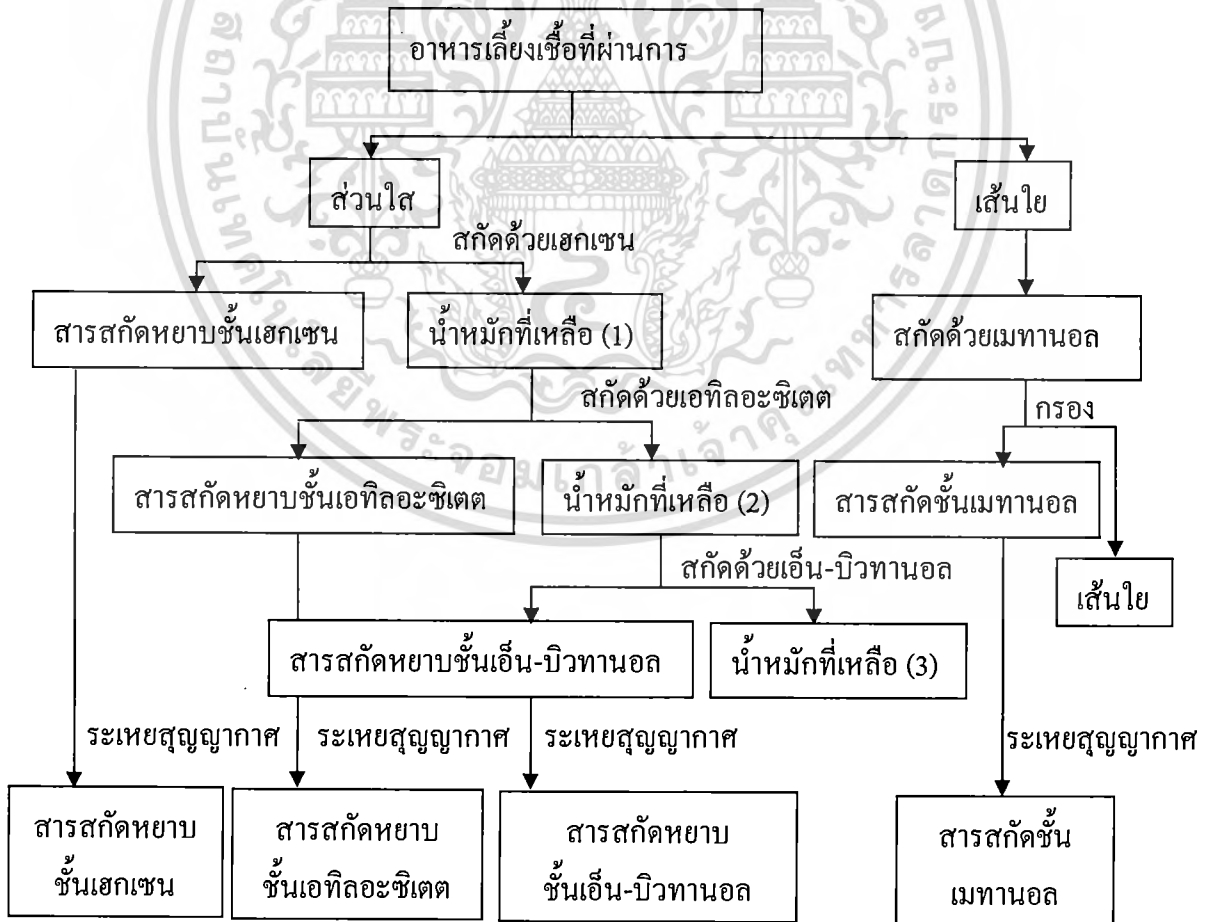
3.6 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในอาหารเหลวฟีดบี (PDB)

นำ mycelial disc ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร ใส่ลงในฟลasks ปริมาตร 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวฟีดบี (PDB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และใส่ลงในฟลasks ปริมาตร 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารฟีดบีเจือจาง 1/5 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่ทำให้เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีการสร้างสารทุติยภูมิในปริมาณสูง บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 28 วัน เมื่อครบเวลาการบ่มทำเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การกรองน้ำหมักเชื้อราด้วยกระดาษกรองวัทแมนเบอร์ 4 เพื่อแยกส่วนที่เป็นน้ำหมักกับเส้นใย เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทำการสกัด (Vinale และคณะ, 2006)

3.7 การสกัดสารจากเส้นใยราและน้ำหมักจากเชื้อรา *Trichoderma spp.*

นำเส้นใยราที่ได้จากข้อ 3.6 ไปบดด้วยไนโตรเจนเหลว สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที (Vizcaino และคณะ, 2005) กรองผ่านกระดาษกรองวัทแมนเบอร์ 1 ก่อนนำไปประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สำหรับส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.6 นำไปสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเอ็น-บิวทานอล (รูปที่ 3.1) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (น้ำหมักต่อตัวทำละลาย) จำนวน 3 ครั้ง ก่อนนำไปประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยเช่นกัน บันทึกน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบ (crude extract) จากเส้นใยราและน้ำหมัก เก็บสารสกัดหยาบในโถดูดความชื้น (desiccator) จนแห้งและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำออกมาทดสอบในขั้นต่อไป (ดัดแปลงจากวิธีการของ Se-Gul และคณะ, 2009)



รูปที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

เชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อฟิตีเอผิวหน้าเอียงให้เชื้อมีการเจริญ 10-14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ทำสารละลายสปอร์โดยใส่ 10 มิลลิลิตรของสารละลาย tween 80 0.05 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นใช้หลอดเขี่ยเชื้อเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วกรองสารละลายที่ได้ผ่านชุดกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทำการนับสารละลายสปอร์โดยใช้สไลด์นับเซลล์ (haemocytometer) ให้มีความเข้มข้นของสปอร์ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (Nguefack และคณะ, 2004) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.9 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยวิธี Paper Disc Diffusion

นำสารละลายสปอร์ที่มีความเข้มข้นของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมในอาหารฟิตีเอ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส เทลงในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 เซนติเมตร ที่มีอาหารฟิตีเอ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรซึ่งแข็งตัวแล้ว เมื่ออาหารผสมเชื้อราที่เททับลงไปแข็งตัว นำไปผึ่งให้ผิวหน้าอาหารแห้ง นำสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากตัวทำลาย ชนิดต่างๆ เตรียมให้มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ไคเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์ นำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยวิธี Paper Disc Diffusion ดัดแปลงจากวิธีการของ ปิยะวดี (2550) โดยหยดสารสกัดหยาบในแต่ละตัวทำลายลงบนแผ่นดิสก์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ทิ้งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นใช้ปากคีบ คีบแผ่นดิสก์วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เตรียมไว้ข้างต้น สำหรับชุดควบคุมเชิงลบ คือแผ่นดิสก์ที่หยดไคเมทิลซัลฟอกไซด์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ชุดควบคุมเชิงบวก คือแผ่นดิสก์ที่หยดนิสตาติน (Nystatin) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยชุดควบคุมเชิงบวก และชุดควบคุมเชิงลบอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-20 นาที เพื่อให้เกิดการแพร่กระจายของสารไปสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญ (clear zone) ที่เกิดขึ้น โดยวัดผ่านแผ่นดิสก์ ด้วยเวอร์เนียร์คิเจอร์ ซึ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญจะต้องมากกว่า 10 มิลลิเมตร จึงจะถือว่าสารนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งโดยอิงจากวิธีการของ NCCLS (2002)

3.10 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma spp.*

ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยวิธี Paper Disc

Diffusion

คัดแปลงจากวิธีการของ ปิยะวดี (2550) เตรียมสารทดสอบจากสารสกัดหยาบโดยทำการเจือจางด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ นำมาคำนวณความเข้มข้นสาร ดังสมการ

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

กำหนดให้ C_1 เป็นความเข้มข้นของสารตั้งต้น

V_1 เป็นปริมาณของสารตั้งต้น

C_2 เป็นความเข้มข้นสารที่ต้องการนำไปใช้

V_2 เป็นปริมาณสารที่ต้องการนำไปใช้

วางแผนการทดลองแบบกลุ่มสมบูรณ์ ทรีทเมนต์ คือความเข้มข้นระดับต่างๆ ของสารสกัดหยาบ ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.10 ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ โดยทดลอง 5 จานต่อ 1 ซ้ำ นำสารละลายสปอร์ที่มีความเข้มข้นของเชื้อราเป็น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมในอาหารพีดีเอ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 เซนติเมตร ที่มีอาหารพีดีเอ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรซึ่งแข็งตัวแล้ว เมื่ออาหารผสมเชื้อราที่เททับลงไปแข็งตัว นำไปผึ่งให้ผิวหน้าอาหารแห้งในตู้เย็นเชื้อ จากนั้นใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จาก ข้อ 3.10 ให้มีความเข้มข้น 1, 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดสารสกัดหยาบปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นดิสก์ กำจัดตัวทำละลายโดยนำไปประเหยในตู้ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้แผ่นดิสก์แห้ง จากนั้นใช้ปากคีบ คีบแผ่นดิสก์วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เตรียมไว้ข้างต้น ชุดควบคุมเชิงลบ คือแผ่นดิสก์ที่หยดไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ชุดควบคุมเชิงบวก คือแผ่นดิสก์ซึ่งหยดนิสตาติน (Nystatin) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยชุดควบคุมเชิงบวกและชุดควบคุมเชิงลบอยู่ในจานอาหารเดียวกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-20 นาที เพื่อให้เกิดการแพร่กระจายของสารไปสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเวลานำมาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญ ที่เกิดขึ้น โดยวัดผ่านแผ่นดิสก์ ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ เพื่อเลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์การต้านเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในระดับความเข้มข้นที่ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.11 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสง

คัดแปลงจากวิธีการของ Sánchez และคณะ (2005) โดยนำเมล็ดถั่วลิสง 60 กรัม มาทำการฆ่าเชื้อ โดยแช่คลอโรกซ์ (clorox) 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งในตู้เขี่ยเชื้อเป็นเวลา 10 นาที นำถั่วลิสงแช่ในสารสกัดหยาบความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที ผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 10 นาที นำไปคลุกกับสารละลายสปอร์เชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร กรรมวิธีควบคุม คือถั่วลิสงที่ใส่เฉพาะสารละลายสปอร์เชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 แต่ไม่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบ บ่มเมล็ดถั่วลิสงในพลาสติกปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 เพื่อวิเคราะห์ถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญโดยการนับปริมาณของเชื้อด้วยวิธี spread plate รวมถึงวิเคราะห์ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินโดยใช้เครื่อง HPLC

3.11.1 การนับจำนวนเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสงด้วยเทคนิค

spread plate

ใส่ลงในพลาสติกปลอดเชื้อ เติมน้ำไปจนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสม tween 80 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที (Passone และคณะ, 2008) กรองผ่านชุดกรองสำลีปลอดเชื้อ นำสารละลายสปอร์ที่ได้มาทำการเจือจางลงระดับละ 10 เท่าจน ถึงระดับที่เหมาะสม ทำการตรวจนับสปอร์จากตัวอย่างที่มีระดับการเจือจางเหมาะสม ด้วยเทคนิค spread plate บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ นับจำนวนโคโลนีในจานอาหารที่มีจำนวนเซลล์ 30-300 โคโลนี คำนวณค่าโคโลนีของเชื้อในตัวอย่าง 1 กรัม โดยมีหน่วยเป็นโคโลนีต่อกรัม (CFU/g; Colony Forming Unit/g) (Pitt และ Hocking, 1989)

3.11.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน

3.11.2.1 การสกัดอะฟลาทอกซิน

คัดแปลงจากวิธี Sep Pak Method และวิธี Rapid Method (Seitz และ Mohr, 1974) โดยนำตัวอย่างถั่วลิสงจากการทดลองข้อ 3.11 จำนวน 50 กรัม ใส่ลงในเครื่องปั่น เติมน้ำเมทานอล 100 มิลลิลิตรปั่นเป็นเวลา 1-2 นาที กรองผ่านกระดาษกรองวัทแมน เบอร์ 1 แบ่งสารละลายเมทานอลที่มีอะฟลาทอกซินละลายอยู่มา 40 มิลลิลิตร ใส่ลงในกรวยแยก เติมน้ำแอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร (อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส) เติมน้ำเฮกเซน 40 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยกชั้นเฮกเซนออกจากสารละลายเมทานอล และแอมโมเนียมซัลเฟต เติมน้ำคลอโรฟอร์มลงไป ในสารละลายที่เหลือ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้ากัน แยกชั้นคลอโรฟอร์มออก (เติมคลอโรฟอร์มลงไปแล้วทำซ้ำอีกครั้ง) นำสารละลายชั้นคลอโรฟอร์มมาระเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ เติมส่วนผสมของคลอโรฟอร์มกับเฮกเซน ในอัตราส่วน 3 ต่อ 7 ลงไป 10 มิลลิลิตรลงในส่วนที่ทำการระเหยแห้งแล้ว นำสารละลายที่ได้มาผ่าน Lichrolut Column Chromatography ล้างคอลัมน์ด้วยเฮกเซน 10 มิลลิลิตร แล้วใช้ส่วนผสมของเบนซีนกับกรดแอสติก ในอัตราส่วน 95.5 ต่อ 4.5 ลงไป 10 มิลลิลิตร ล้างผ่านครั้งสุดท้ายด้วยส่วนผสมของเอทิลอีเทอร์กับเฮกเซน ในอัตราส่วน 60 ต่อ 40 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นชะล้างอะฟลาทอกซินออกจากคอลัมน์ โดยใช้ไดคลอโรมีเทนกับอะซีโตน ในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 ลงไป 15 มิลลิลิตร นำสารที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจนแห้ง และนำไปวิเคราะห์อะฟลาทอกซินต่อไป

3.11.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซิน

นำเมทานอล 1 มิลลิลิตร ละลายอะฟลาทอกซินที่อยู่ในขวดเก็บตัวอย่าง นำมากรองผ่าน membrane filter (millipore) 0.45 ไมครอน เก็บไว้ในขวดเก็บตัวอย่างขนาดเล็ก (vial) นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้ UV spectrophotometric detector เป็นเครื่องวัดสัญญาณที่มีความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ใช้คอลัมน์ชนิด reverse phase C_{18} ขนาด 4.9x25 เซนติเมตร เฟสเคลื่อนที่ คือ เมทานอล:น้ำ:กรดแอสติก (30:63:7) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ฉีดสารครั้งละ 10 ไมโครลิตร (Thanaboripat, 1997b) บันทึกโครมาโทแกรม (chromatogram) ของอะฟลาทอกซินในเมตริกซ์ตัวอย่าง โดยนำค่าพื้นที่พีค (peak area) และค่า retention time ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก จ)

3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองที่ 3.5.1, 3.5.2, 3.5.4, 3.9 และ 3.10 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ขณะที่การทดลองที่ 3.11.1 และ 3.11.2 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ในบล็อก (Randomized Complete Block Design, RCBD) โดยบล็อกคือระยะเวลาการบ่มเชื้อ นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของดันแคน (Duncan's new multiple range test, DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P \leq 0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 14 (Dikbas และคณะ, 2008)

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

การทดลองนี้ได้นำเอาเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ที่คัดแยกได้จากดินตามธรรมชาติในประเทศไทย 5 แห่ง จำนวนดิน 20 ตัวอย่าง จำนวน 3 ไอโซเลต จากทั้งหมด 20 ไอโซเลต ซึ่งถูกคัดแยกโดย กานต์ และคณะ (2548) ได้แก่

Trichoderma sp. KMC 5 จากแปลงปลูกข้าวโพดทดลอง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Trichoderma sp. SRS 4 จากแปลงสัปปะรด อำเภอเขาตอก จังหวัดสุราษฎร์ธานี

Trichoderma sp. SCP III จากไร่บัวสวรรค์ อำเภอดอนเจดีย์ จังหวัดสุพรรณบุรี

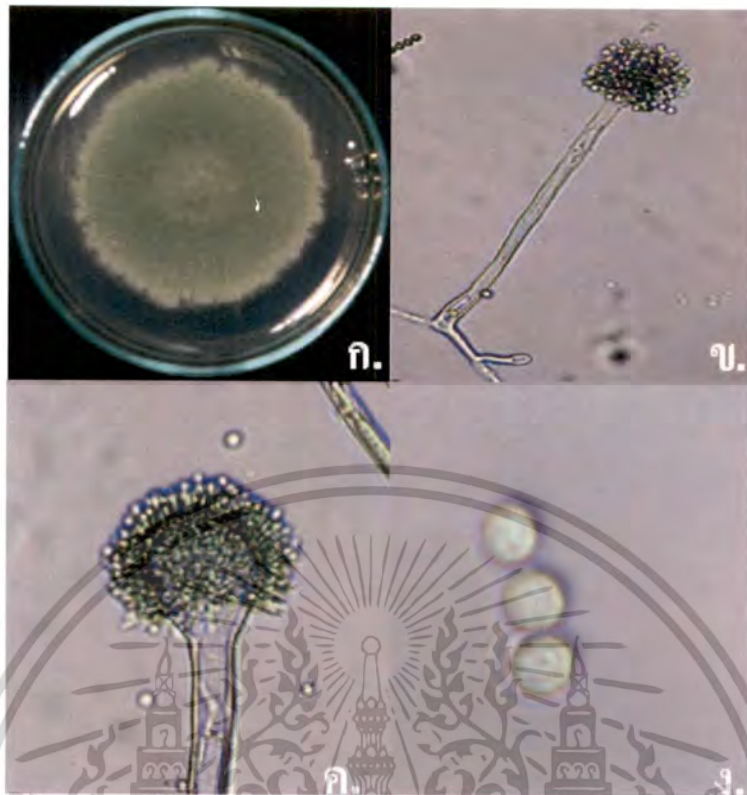
กานต์ และคณะ (2548) ได้ทำการศึกษาเบื้องต้นถึงความสามารถในการเจริญแบบแข่งขัน การเป็นไมโคพาราสิต และการสร้างสารปฏิชีวนะต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และ *A. parasiticus* IMI 102566 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ จากการทดลองพบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตข้างต้น มีประสิทธิภาพสูงในการเป็นเชื้อปฏิชีวนะต่อเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และ *A. parasiticus* IMI 102566 โดยเฉพาะการสร้างสารปฏิชีวนะหรือสารต่อต้านเชื้อราของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต KMC 5, SRS 4 และ SCP III ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกเชื้อราดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสง

4.1 ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และ เชื้อรา

Trichoderma spp. โดยการทำ slide culture

4.1.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ลักษณะสำคัญของเชื้อเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอคือ เส้นใยมีสีขาว มีการสร้างสปอร์สีเขียว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า มีการสร้าง foot cell ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของเชื้อราสกุลนี้ conidiophore ยาวประมาณ 400-800 ไมครอน ไม่แตกแขนง บน conidiophore มี vesicle เป็นกระเปาะบวมกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-65 ไมครอน ส่วนปลายของ vesicle มี phialide (หรือ sterigmata) งอกออกมาเต็ม และส่วนปลายของ vesicle มี conidia งอกออกมารูปรางกลม (รูปที่ 4.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

ก. โคลนินของเชื้อที่เจริญบนอาหารพีดีเอ อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

ข. conidiophore กำลังขยาย 100 เท่า

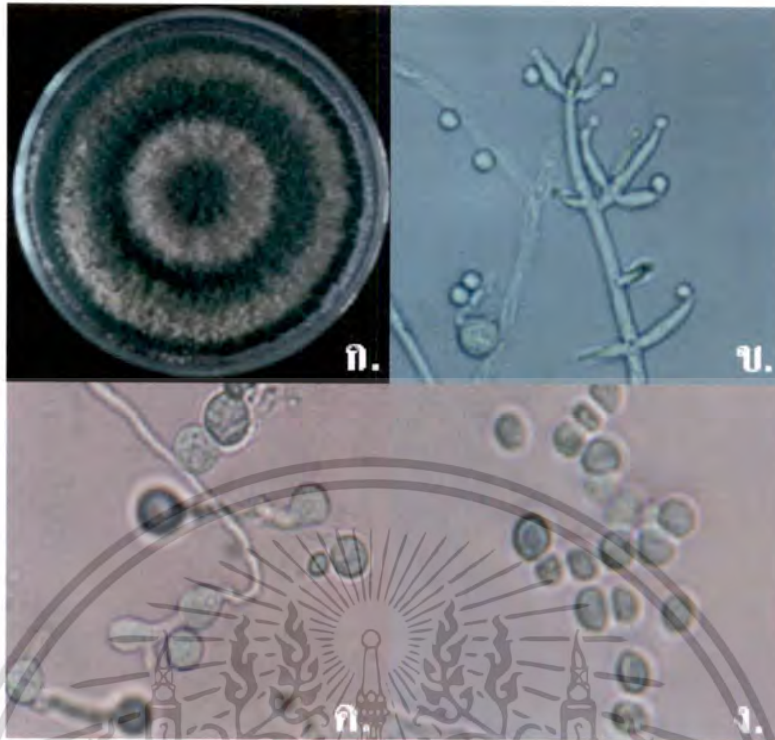
ค. phialide กำลังขยาย 400 เท่า

ง. conidia กำลังขยาย 1000 เท่า

4.1.2 ลักษณะลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167

ลักษณะสำคัญของไอโซเลตนี้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอคือ มีการเจริญและสร้างสปอร์อย่างรวดเร็ว ลักษณะของเส้นใยมีสีเขียว มีการสร้างสปอร์สีเขียวเข้ม เส้นใยจะแผ่ปกคลุมอย่างหนาแน่นทั่วผิวหน้าอาหาร โคลนินมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 9 เซนติเมตร หลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 4 วัน เส้นใยเจริญในลักษณะวงแหวนชัดเจน ก้านชูสปอร์แตกกิ่งก้านเป็นช่อ สปอร์มีสีเขียวรูปไข่ ผิวเรียบ เจริญออกมาจากส่วนปลายของเส้นใย มีขนาดเฉลี่ย 3.2×2.7 ไมครอน สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว chamydospore มีผนังหนา เจริญระหว่างหรือส่วนปลายของเส้นใย มีลักษณะกลมใสเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 6.9 ไมครอน (รูปที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

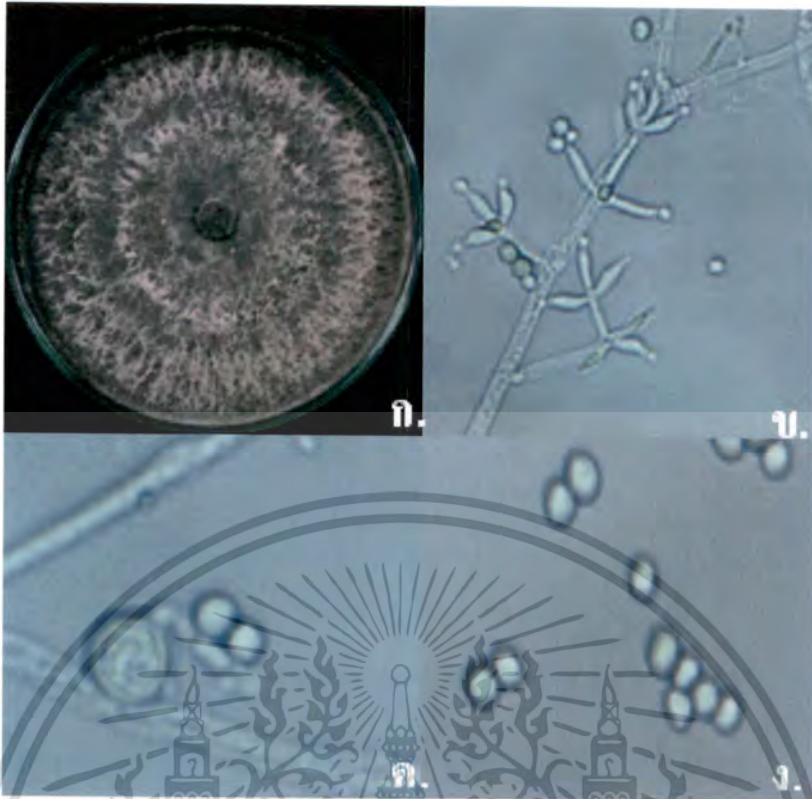


รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167
 ก. โคลนินของเชื้อที่เจริญบนอาหารพีดีเอ อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง
 ข. conidiophore และ phialide กำลังขยาย 400 เท่า
 ค. chlamydo-spore กำลังขยาย 1000 เท่า
 ง. conidia กำลังขยาย 1000 เท่า

4.1.3 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต KMC 5

ลักษณะสำคัญของ ไอโซเลตนี้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอคือ มีการเจริญและสร้างสปอร์อย่างรวดเร็ว การเจริญช่วงแรกเส้นใยจะมีสีขาว จากนั้นจะมีการสร้างสปอร์อย่างรวดเร็ว เส้นใยแผ่ปกคลุมอย่างหนาแน่นทั่วผิวหน้าอาหาร โคลนินสีเขียวเข้ม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 9 เซนติเมตร หลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 4 วัน เส้นใยเจริญในลักษณะวงแหวน conidiophore มีการแตกกิ่งก้านเป็นช่อ 1-3 อัน และที่ปลายสุดของ conidiophore มีการสร้าง conidia มีลักษณะกลม ขนาดประมาณ 3.72 ไมครอน chamydo-spore ผันงหนา ลักษณะกลม ขนาดประมาณ 9.23 ไมครอน (รูปที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

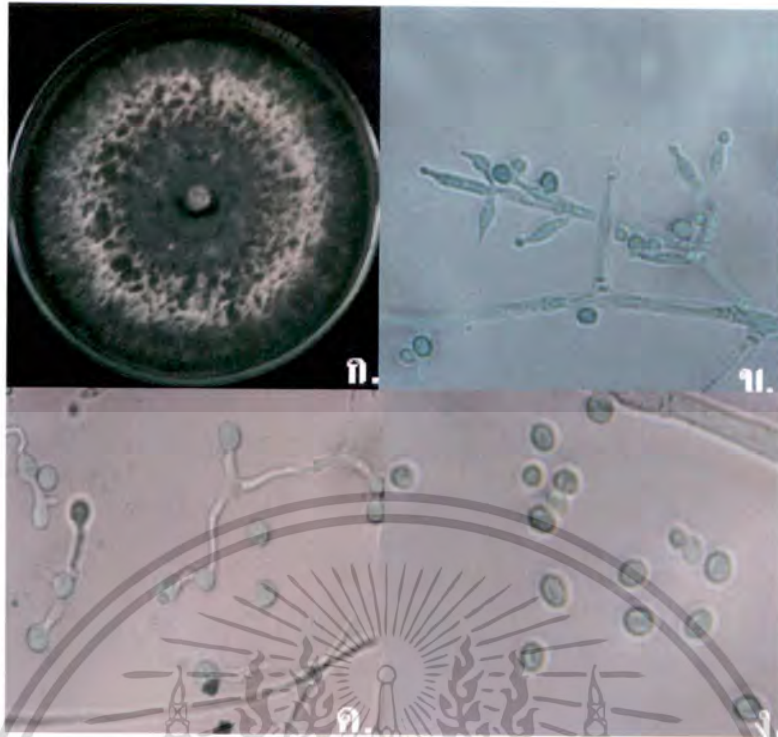


รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต KMC 5
 ก. โคลนินของเชื้อที่เจริญบนอาหารพีดีเอ อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง
 ข. conidiophore และ phialide กำลังขยาย 100 เท่า
 ค. chlamydospore กำลังขยาย 1000 เท่า
 ง. conidia กำลังขยาย 1000 เท่า

4.1.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต SRS 4

ลักษณะสำคัญของไอโซเลตนี้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอคือ มีการเจริญและสร้างสปอร์อย่างรวดเร็ว ในการเจริญช่วงแรกเส้นใยมีสีขาว จากนั้นจะมีการสร้างสปอร์อย่างรวดเร็ว เส้นใยแผ่ปกคลุมอย่างหนาแน่นทั่วผิวน้ำอาหาร โคลนีสีเขียวเข้ม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 9 เซนติเมตร หลังการบ่มเป็นเวลา 4 วัน เส้นใยเจริญในลักษณะวงแหวน conidiophore แตกกิ่งก้านเป็นช่อ 1-2 อัน ที่ปลายสุดของ conidiophore มีการสร้าง conidia ลักษณะกลม ขนาดประมาณ 3.03 ไมครอน chamydospore ผ้นงหนา ลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 7.98 ไมครอน (รูปที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต SRS 4

ก. โคลนีสของเชื้อที่เจริญบนอาหารพีดีเอ อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

ข. conidiophore และ phialide กำลังขยาย 100 เท่า

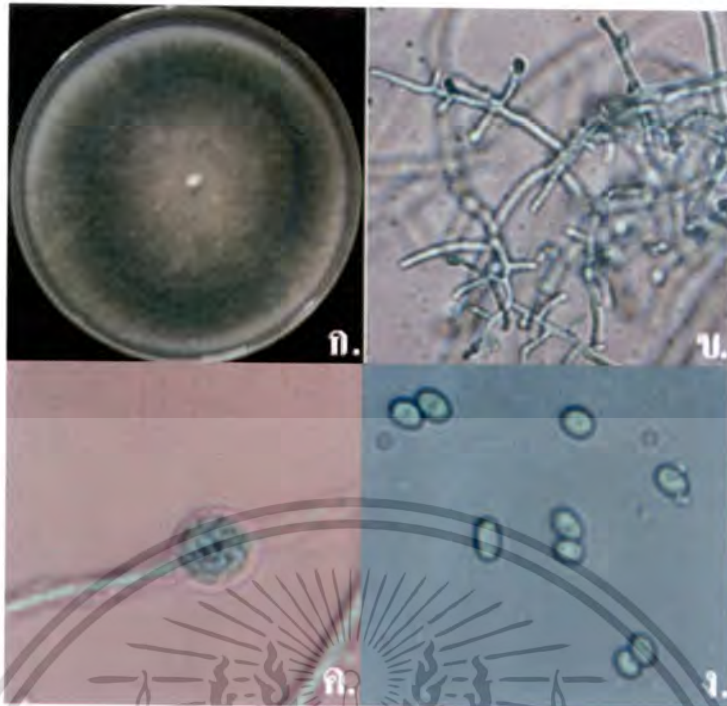
ค. chlamydospore กำลังขยาย 1000 เท่า

ง. conidia กำลังขยาย 1000 เท่า

4.1.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต SCP III

ลักษณะสำคัญของไอโซเลตนี้คือ มีการเจริญและสร้างสปอร์อย่างรวดเร็ว โคลนีสสีขาว เมื่อสร้างสปอร์ จะมีสีเขียวปนขาว และเปลี่ยนเป็นสีเขียวในที่สุด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 9 เซนติเมตร หลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 4 วัน มีการสร้างเม็ดสี (สีเหลือง) บนอาหารพีดีเอ เส้นใยเจริญในลักษณะวงแหวน conidiophore มีลักษณะพอมยาวและโค้งงอ มีการแตกกิ่งก้านด้านข้างเล็กน้อย 1-2 กิ่ง conidia มีสีเขียวรูปไข่ มีขนาดประมาณ 2.64 ไมโครเมตร chamydospore มีผนังหนา ลักษณะกลม ขนาดประมาณ 9.16 ไมครอน (รูปที่ 4.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต SCP III

ก. โคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารพีดีเอ อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

ข. conidiophore และ phialide กำลังขยาย 100 เท่า

ค. chlamydospore กำลังขยาย 1000 เท่า

ง. conidia กำลังขยาย 1000 เท่า

4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ

4.2.1 ประสิทธิภาพในการเจริญแบบแข่งขันของเชื้อรา *Trichoderma* spp. กับเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5, SRS 4 และ SCP III กับเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 (รูปที่ 4.6)

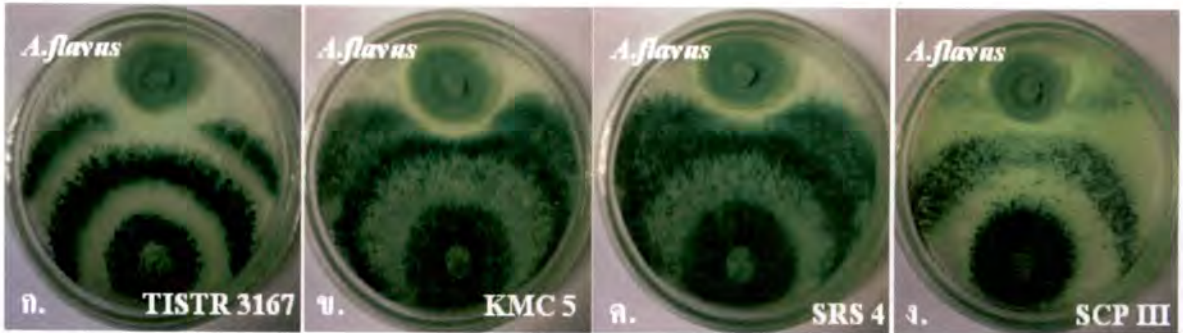
เชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่มีการเพาะเลี้ยงพร้อมกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในชุดทดสอบ พบว่ามีการเจริญน้อยกว่าเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่เจริญตามลำพังในชุดควบคุม ซึ่งแสดงว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ได้ดีที่สุด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเจริญแบบแข่งขันได้เป็น 55.63 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Trichoderma* spp. ไอโซเลต KMC 5 และ SRS 4 ที่สามารถยับยั้งได้ 53.31 และ 52.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน *Trichoderma* sp. ไอโซเลต SCP III สามารถยับยั้งได้น้อยที่สุด คิดเป็น 49.03 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดย Duncan's multiple range พบว่าประสิทธิภาพของเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลตมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.1) โดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ดีที่สุด

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ บรรเจิด และจิระเดช (2529) ที่พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* ทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ได้ โดยเฉพาะสายพันธุ์กลาย T-35-co4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากที่สุดคือ 82.20 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือสายพันธุ์กลาย T-35-co5, สายพันธุ์ดั้งเดิม T-35-wt และ T-CB-Pin-01 ที่ยับยั้งได้ 80.50, 75.60 และ 57.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และงานวิจัยของ Intana และคณะ (2005) ที่พบว่า *T. harzianum*, *T. virens* และ *T. hamatum* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อทำการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ Intana และ Chamswarnng (2007) พบว่าเชื้อรา *T. virens* จำนวน 7 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากดินปลูกคะน้าจังหวัดนครศรีธรรมราช มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* โดยเฉพาะสายพันธุ์ T-NST-01, T-NST-05 และ T-NST-07 มีประสิทธิภาพที่ 85.5, 82.5 และ 78.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รวมถึงงานวิจัยของ Rajendiran และคณะ (2010) ที่พบว่าเชื้อรา *T. viride* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Fusarium* sp. และ *Penicillium* sp. ได้ถึง 55, 51, 52, 64 และ 54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโดยวิธี dual culture



รูปที่ 4.6 แสดงการเจริญแบบแข่งขันของเชื้อรา *Trichoderma* spp. กับเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

- ก. ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่ถูกยับยั้งการเจริญโดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167
- ข. ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่ถูกยับยั้งการเจริญโดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต KMC 5
- ค. ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่ถูกยับยั้งการเจริญโดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต SRS 4
- ง. ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่ถูกยับยั้งการเจริญโดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต SCP III

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 อายุ 7 วัน ในการทดสอบการเจริญแบบแข่งขันกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ

| เชื้อรา | ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของ <i>A. flavus</i> IMI 242684 (มิลลิเมตร) | ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การแข่งขัน* |
|---|---|---------------------------------|
| <i>Trichoderma</i> sp. TISTR 3167 | 22.80 | 55.63±1.70 ^a |
| <i>Trichoderma</i> sp. KMC 5 | 24.00 | 53.31±0.88 ^b |
| <i>Trichoderma</i> sp. SRS 4 | 24.40 | 52.51±1.61 ^b |
| <i>Trichoderma</i> sp. SCP III | 26.20 | 49.03±0.96 ^c |
| <i>A. flavus</i> IMI 242684 (งานควบคุม) | 51.40 | 00.00±0.00 ^d |

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันที่แตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ (P≤ 0.05)

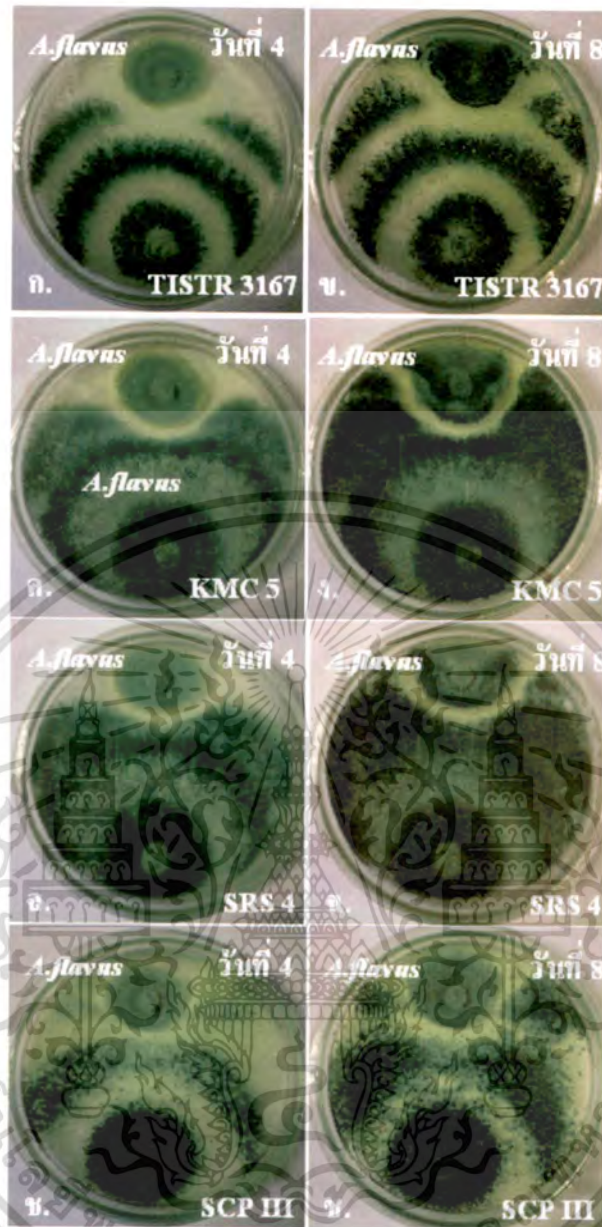
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการการเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

จากผลการทดสอบการเจริญคลุมทับเส้นใยระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5, SRS 4 และ SCP III กับเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารพีดีเอ พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. 3 ไอโซเลตสามารถเจริญคลุมทับเส้นใย *A. flavus* IMI 242684 โดยไอโซเลต TISTR 3167 มีประสิทธิภาพในการคลุมทับเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การคลุมทับเส้นใยเท่ากับ 55.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ไอโซเลต SRS 4 และ KMC 5 ที่สามารถยับยั้งได้เท่ากันที่ 54.00 และ 54.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ยกเว้น ไอโซเลต SCP III ที่ไม่สามารถเจริญคลุมทับเส้นใย *A. flavus* IMI 242684 ได้ แต่สามารถยับยั้งการเจริญ โดยคิดเป็น 24.00 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.7)

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดย Duncan's multiple range พบว่าประสิทธิภาพของเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลตมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.2) โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 มีประสิทธิภาพในการเจริญคลุมทับเส้นใยของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่แตกต่างกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต SCP III อย่างมีนัยสำคัญ

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ วารินและคณะ (2550) ที่พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* ทุกสายพันธุ์ที่ทำการศึกษา มีความสามารถในการเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อรา *Phytophthora palmivora* โดยเฉพาะสายพันธุ์กลาย T-35-co4 และ T-35-co5 ที่มีเปอร์เซ็นต์การคลุมทับสูงเท่ากัน คือ ที่ 52.50 ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิม T-35-wt และ T-CB-Pin-01 มีเปอร์เซ็นต์การคลุมทับที่ 36.25 และ 34.50 ตามลำดับ Intana และ Chamswang (2007) ที่พบว่าเชื้อรา *T. virens* จำนวน 7 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากดินปลูกคะน้าจังหวัดนครศรีธรรมราช มีประสิทธิภาพในการคลุมทับเส้นใยเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* โดยเฉพาะสายพันธุ์ T-NST-05, T-NST-07 และ T-NST-01 ประสิทธิภาพคลุมทับที่ 48.3, 47.0 และ 46.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และงานวิจัยของ Rini (2007) ที่พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* TR20 and *T. pseudokoningii* TR17 มีความสามารถในการเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ขณะที่เชื้อรา *T. viride* TR19 and TR22 มีความสามารถในการเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* โดยสามารถยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 7 วัน รวมถึงงานวิจัยของ Gachomo และ Kotchoni (2008) ที่พบว่า *T. harzianum* TH1 มีความสามารถในการเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อรา *Aspergillus ochraceus* และ *A. niger*



รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp.

ก.,ข. ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่ถูกเชื้อรา *Trichoderma* sp.

ไอโซเลต TISTR 3167 เจริญปกคลุมและยับยั้งการเจริญในวันที่ 4 และ 8

ค.,ง. ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่ถูกเชื้อรา *Trichoderma* sp.

ไอโซเลต KMC 5 เจริญปกคลุมและยับยั้งการเจริญในวันที่ 4 และ 8

จ.,ฉ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่ถูกเชื้อรา *Trichoderma* sp.

ไอโซเลต SRS 4 เจริญปกคลุมและยับยั้งการเจริญในวันที่ 4 และ 8

ช.,ซ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่ถูกเชื้อรา *Trichoderma* sp.

ไอโซเลต SCP III ที่ไม่มีการเจริญปกคลุมเส้นใยในวันที่ 4 และ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในการทดสอบการเจริญ
 กลุ่มทับเส้นใยโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ

| เชื้อรา | ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ โคโลนีของ <i>Trichoderma</i> spp. (มิลลิเมตร) | | ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ การคลุมทับเส้นใย* |
|---|---|----------|---|
| | วันที่ 4 | วันที่ 8 | |
| <i>Trichoderma</i> sp. TISTR 3167 | 63.0 | 85.0 | 55.00±5.59 ^a |
| <i>Trichoderma</i> sp. KMC 5 | 61.2 | 82.8 | 54.00±4.54 ^a |
| <i>Trichoderma</i> sp. SRS 4 | 62.2 | 83.8 | 54.00±3.80 ^a |
| <i>Trichoderma</i> sp. SCP III | 60.8 | 70.8 | 24.00±2.24 ^b |
| <i>A. flavus</i> IMI 242684 (จานควบคุม) | 33.6 | 54.6 | 00.00±0.00 ^d |

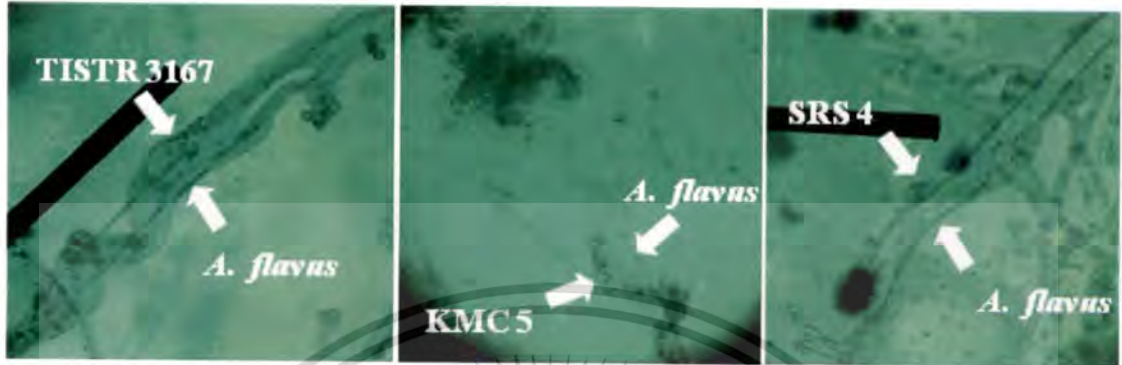
* ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันที่แตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น
 ที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$)

4.2.3 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการพันรัดเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

จากการนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 3 ไอโซเลต ซึ่งได้แก่ ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 ซึ่งมีความสามารถในการเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อรา มาตรวจดูความสามารถในการพันรัดเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลตมีความสามารถในการพันรัดเส้นใย โดยเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จะเจริญขนานไปกับเส้นใยของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และมีการแตกแขนงเป็นช่วงๆ เป็นแขนงสั้นๆ ออกมาพันรัดเส้นใย (รูปที่ 4.8) ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ จิระเดช และวรรณวิไล (2542) ที่รายงานว่า *T. harzianum* สามารถเป็นปรสิตกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *Pythium* sp., *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotium* sp., *Fusarium* sp., *Macrophomina* sp., *Cylindrocladium* sp., *Sclerotinia* sp., *Thielaviopsis* sp., *Verticillium* sp., *Botrytis cinerea* และ *Botryodiplodia* sp. โดยกลไกในการเป็นปรสิตของเชื้อรา *T. harzianum* คือการใช้เส้นใยเข้าพันรัดเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช และมีการสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา เช่น ไคตินเอส เซลลูเลส และเบต้ากลูคาเนส เป็นต้น (Lorito และคณะ, 1994) แล้วแทงผ่านเข้าภายในเส้นใยราสาเหตุโรคพืช เพื่อใช้อาหารทำให้เกิดการฉีกขาดและสลายในส่วนของผนังเซลล์ และตายในที่สุด (Benhamou, 1990) และการทดลองของ Nallathambi และคณะ (2009) ที่พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่แยกได้จากดินบริเวณที่มีความแห้งแล้งในประเทศอินเดีย จำนวน 16 ไอโซเลต มีความสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการพันธุวิศวกรรมเชื้อรา *Alternaria alternata* Fr. Keissler ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุการเน่าของผลพุทรา (*Ziziphus mauritiana* Lamk) หลังการเก็บเกี่ยวได้มากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture



(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการพันธุวิศวกรรมเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

- (ก) การพันธุวิศวกรรมเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167
- (ข) การพันธุวิศวกรรมเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต KMC 5
- (ค) การพันธุวิศวกรรมเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต SRS 4

4.2.4 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดย Dialysis Membrane Technique

จากการทดลองนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5, SRS 4 และ SCP III มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ให้เจริญบนกระดาษแก้วที่คลุมทับบนอาหารแข็งพีดีเอเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนลอกกระดาษแก้วออก และเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 เป็นเวลา 4 วัน พบว่าเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการสร้างสารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดย ไอโซเลต TISTR 3167 มีประสิทธิภาพในการสร้างสารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 78.57 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ไอโซเลต KMC 5 และ SRS 4 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 70.30 และ 69.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไอโซเลต SCP III ยับยั้งได้น้อยที่สุด คิดเป็น 57.89 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

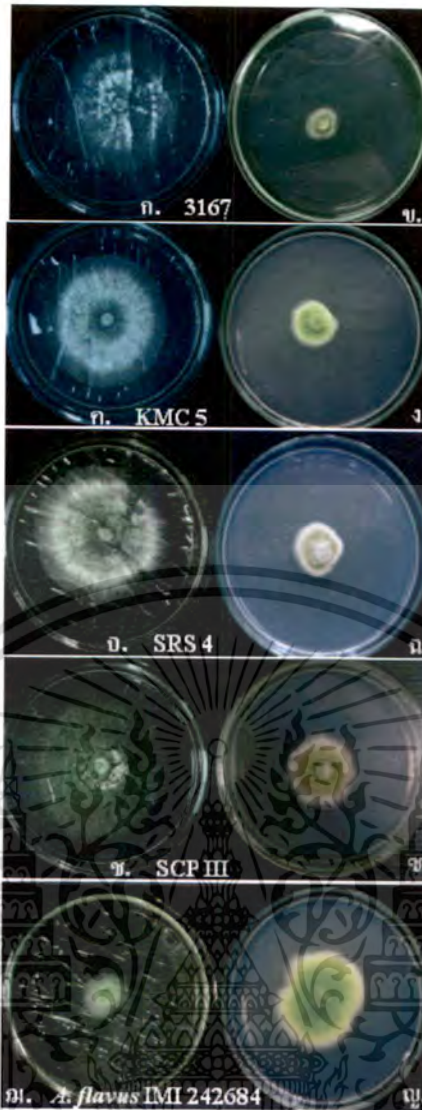
เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดย Duncan's multiple range พบว่าประสิทธิภาพของราทั้ง 4 ไชเลตมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.3) โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไชเลต TISTR 3167 มีประสิทธิภาพในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไชเลตอื่น กล่าวคือมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Intana (2005) ที่พบว่าเชื้อรา *T. virens* สายพันธุ์ T-St-01 และ T-NST-01 สามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อรา (antifungal) ต่อเชื้อรา *Alternaria brassicicola* บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ และงานวิจัยของ Boué และคณะ (2005) ที่พบว่าเอนไซม์ lipoxygenase จากถั่วเหลือง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้เมื่อใช้วิธีการทดสอบเดียวกับการทดลองนี้ รวมถึงงานวิจัยของ Worasatit และคณะ (1994) และ Intana (2003) ที่พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* สามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อรายับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นได้จากการศึกษาโดยวิธี Dialysis Membrane Technique

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไชเลตต่างๆ ในการควบคุมการเจริญเชื้อราของ *A. flavus* IMI 242684 อายุ 4 วัน

| เชื้อรา | ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของ <i>A. flavus</i> IMI 242684 (มิลลิเมตร) | ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง* |
|---|---|---------------------------------|
| <i>Trichoderma</i> sp. TISTR 3167 | 11.40 | 78.56±1.85 ^a |
| <i>Trichoderma</i> sp. KMC 5 | 15.80 | 70.30±1.60 ^b |
| <i>Trichoderma</i> sp. SRS 4 | 16.20 | 69.53±1.97 ^b |
| <i>Trichoderma</i> sp. SCP III | 21.20 | 60.13±1.94 ^c |
| <i>A. flavus</i> IMI 242684 (จานควบคุม) | 53.20 | 00.00±0.00 ^d |

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันที่แตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$)



รูปที่ 4.9 แสดงการสร้างสารยับยั้งโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ

- ก. ไอโซเลต TISTR 3167 ที่เจริญบนกระดาษแก้ว
- ข. *A. flavus* IMI 242684 ที่เจริญบนสารยับยั้งของ ไอโซเลต TISTR 3167
- ค. ไอโซเลต KMC 5 ที่เจริญบนกระดาษแก้ว เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- ง. *A. flavus* IMI 242684 ที่เจริญบนสารยับยั้งของไอโซเลต KMC 5
- จ. ไอโซเลต SRS 4 ที่เจริญบนกระดาษแก้วเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- ฉ. *A. flavus* IMI 242684 ที่เจริญบนสารยับยั้งของไอโซเลต SRS 4
- ช. ไอโซเลต SCP III ที่เจริญบนกระดาษแก้วเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- ซ. *A. flavus* IMI 242684 ที่เจริญบนสารยับยั้งของไอโซเลต SCP III
- ฅ. *A. flavus* IMI 242684 III ที่เจริญบนกระดาษแก้วเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (จานควบคุม)
- ญ. *A. flavus* IMI 242684 ที่เจริญบนสารยับยั้งของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 (จานควบคุม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในอาหารเหลวพีดีบี

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5, SRS 4 และ SCP III ในอาหารเหลวพีดีบี และอาหารเหลว พีดีบีเจือจาง 1/5 เท่า ปริมาตร 1 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 28 วัน พบว่าทุกไอโซเลตมีการสร้างเส้นใยเกาะกันเป็นแผ่นบางๆ เจริญบนผิวหน้าอาหาร และมีการสร้างสปอร์สีเขียวเข้มเป็นจำนวนมากอยู่บนแผ่นเส้นใย ลักษณะของสารสกัดหยาบในแต่ละตัวทำละลายไม่ต่างกันคือมีสีน้ำตาลเข้มเหนียวหนืด ยกเว้นในชั้นของเฮกเซนที่สารสกัดหยาบที่ได้มีสีเหลืองอ่อน และพบว่าน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบจากเส้นใยในชั้นเมทานอลที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีบีมีให้ปริมาณสารสกัดหยาบมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเจือจาง 1/5 เท่า เนื่องจากเชื้อมีการเจริญและสร้างเส้นใยมากกว่า ขณะที่สารสกัดหยาบจากน้ำหมักในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเอ็น-บิวทานอลจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเจือจาง 1/5 เท่า มีปริมาณมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวพีดีบี โดยเฉพาะในชั้นเอทิลอะซิเตต (ตารางที่ 4.4 และ 4.5)

จากการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ในอาหารเหลว พีดีบีเจือจาง 1/5 เท่า จะให้ปริมาณสารสกัดหยาบที่มากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวพีดีบี อาจเนื่องมาจาก สารต่อต้านเชื้อราที่อยู่ในสารสกัดหยาบจัดเป็นสารในกลุ่มทุติยภูมิ ซึ่งจะถูกสร้างขึ้นในสภาวะเครียดหรือสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ เมื่อนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. เลี้ยงในอาหารเหลวพีดีบีเจือจาง 1/5 เท่า จึงทำให้เกิดภาวะที่ไม่เหมาะสม เชื้อจึงมีการสร้างสารต่อต้านเชื้อรามากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวพีดีบีปกติ (Todar, 2008) ดังนั้นอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อให้มีการสร้างสารต่อต้านเชื้อราในปริมาณที่สูงขึ้นคืออาหารพีดีบีเจือจาง 1/5 เท่า ซึ่งเป็นอาหารที่มีความสมบูรณ์ของสารอาหารน้อย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Intana (2003) ที่รายงานว่าสามารถสกัดสารต่อต้านเชื้อรา คือ pentyl, pyrone, oxazole, harzianic acid และ harzianic acid isomer จากเชื้อรา *T.harzianum* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวพีดีบีความเข้มข้น 1/5 เท่า ในปริมาณสูงเช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลต ที่ทำการศึกษาสามารถเพิ่มปริมาณและสร้างสารต่อต้านเชื้อราในอาหารเหลวพีดีบี ความเข้มข้น 1/5 เท่า ที่อุณหภูมิห้องได้ดี

ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะและน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่สกัดจากเส้นใยและน้ำหมักด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน 4 ชนิด

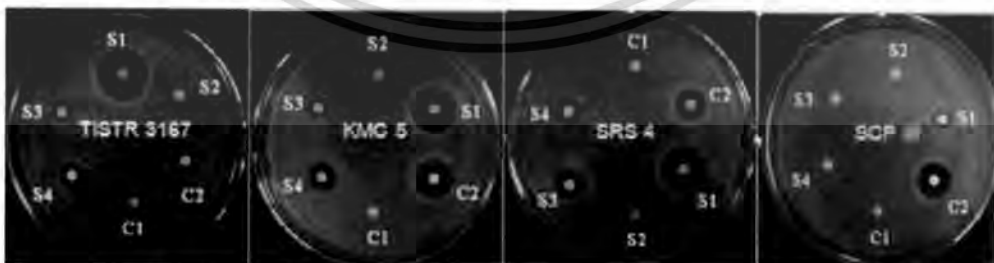
| ไอโซเลต | ตัวทำละลาย | พีคิปี | | 1/5 เท่า พีคิปี | |
|------------|--------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| | | ลักษณะ สารสกัดหยาบ | น้ำหนัก (กรัมต่อลิตร) | ลักษณะ สารสกัดหยาบ | น้ำหนัก (กรัมต่อลิตร) |
| TISTR 3167 | เมทานอล | สีน้ำตาลแดง เหนียวหนืด | 0.1283 | สีน้ำตาลแดงเข้ม เหนียวหนืด | 0.1239 |
| | เฮกเซน | สีเหลืองอ่อน | 0.0030 | สีเหลืองอ่อน | 0.0035 |
| | เอทิลอะซิเตต | สีน้ำตาลแดง เหนียวหนืด | 0.6201 | สีน้ำตาลแดง เหนียวหนืด | 0.865 |
| | บิวทานอล | สีน้ำตาลแดงเข้ม | 0.0657 | สีน้ำตาลแดงเข้ม | 0.0668 |
| SCP III | เมทานอล | สีน้ำตาลแดง เหนียวหนืด | 0.0154 | สีน้ำตาลเข้ม เหนียวหนืด | 0.0149 |
| | เฮกเซน | สีเหลืองอ่อน | 0.0024 | สีเหลืองอ่อน | 0.0021 |
| | เอทิลอะซิเตต | สีน้ำตาลแดง เหนียวหนืด | 0.0443 | สีน้ำตาลแดง เหนียวหนืด | 0.0528 |
| | บิวทานอล | สีน้ำตาลแดงเข้ม | 0.0341 | สีน้ำตาลแดงเข้ม | 0.0367 |
| SRS 4 | เมทานอล | สีน้ำตาลแดง เหนียวหนืด | 0.1237 | สีน้ำตาลแดงเข้ม เหนียวหนืด | 0.1154 |
| | เฮกเซน | สีเหลืองอ่อน | 0.0040 | สีเหลืองอ่อน | 0.0035 |
| | เอทิลอะซิเตต | สีน้ำตาลแดง เหนียวหนืด | 0.1002 | สีน้ำตาลแดง เหนียวหนืด | 0.1107 |
| | บิวทานอล | สีน้ำตาลแดงเข้ม | 0.0205 | สีน้ำตาลแดงเข้ม | 0.0267 |
| KMC 5 | เมทานอล | สีน้ำตาลแดง เหนียวหนืด | 0.1552 | สีน้ำตาลแดงเข้ม เหนียวหนืด | 0.1434 |
| | เฮกเซน | สีเหลืองอ่อน | 0.0032 | สีเหลืองอ่อน | 0.0041 |
| | เอทิลอะซิเตต | สีน้ำตาลแดง เหนียวหนืด | 0.1124 | สีน้ำตาลแดง เหนียวหนืด | 0.1253 |
| | บิวทานอล | สีน้ำตาลแดงเข้ม | 0.0519 | สีน้ำตาลแดงเข้ม | 0.5222 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

A. flavus IMI 242684 โดยวิธี Paper Disc Diffusion

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยที่สกัดด้วยเมทานอล และสารสกัดหยาบจากน้ำหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตด และบิวทานอล พบว่าสารสกัดหยาบจากน้ำหมักในชั้นเอทิลอะซิเตดของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุด รองลงมาคือ KMC 5, SRS 4 และ SCP III โดยวัดค่าเฉลี่ยความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งได้ 37.16, 36.80, 34.60 และ 7.60 มิลลิเมตร ตามลำดับ รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากเส้นใยในชั้นเมทานอล ของไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 โดยวัดค่าเฉลี่ยความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งได้เท่ากับ 13.62, 14.12 และ 15.04 มิลลิเมตร ตามลำดับ ยกเว้นสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอลของไอโซเลต SCP III ที่ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง ขณะที่สารสกัดหยาบในชั้นบิวทานอลและชั้นเฮกเซนไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ (ตารางที่ 4.5 และ รูปที่ 4.10) ซึ่งกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบจากน้ำหมักในชั้นเอทิลอะซิเตดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากเส้นใยที่สกัดด้วยเมทานอล แสดงว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลตที่ทำการศึกษามีการสร้างสารต่อต้านเชื้อราและปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ อีกทั้งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มที่มีขั้วปานกลาง เนื่องจากถูกสกัดออกมาได้ดีด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตดที่มีความเป็นขั้วปานกลางเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลอง Phupiewkham และ คณะ (2010) ที่พบว่าสารสกัดจาก culture supernatant ของเชื้อรา *T. harzianum* isolate T9 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 10 ชนิด ได้ดีกว่าสารสกัดจาก pellet cell รวมถึงงานวิจัยของ Rajendiran และคณะ (2010) ที่พบว่า culture filtrate จากเชื้อรา *T. viride* ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* (64 เปอร์เซ็นต์), *A. fumigatus* (50 เปอร์เซ็นต์) และ *A. flavus* (48 เปอร์เซ็นต์)



รูปที่ 4.10 แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอเป็นเวลา 5 วัน โดยสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากตัวทำละลายต่างๆ

(C1) กรรมวิธีควบคุมเชิงลบ (DMSO) (C2) กรรมวิธีควบคุมเชิงบวก (nystatin)

(S1) สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตด (S2) สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน

(S3) สารสกัดหยาบชั้นบิวทานอล

(S4) สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับ (S1) สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตด (S2) สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน (S3) สารสกัดหยาบชั้นบิวทานอล (S4) สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดเห็ดจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารพีดีเอ เป็นเวลา 5 วัน

| ตัวทำละลาย | สารสกัดเห็ดจากเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. | ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) * |
|-----------------------|---|---|
| เฮกเซน | TISTR 3167 | 00.00±0.00 ^h |
| | KMC 5 | 00.00±0.00 ^h |
| | SRS 4 | 00.00±0.00 ^h |
| | SCP III | 00.00±0.00 ^h |
| เอทิลอะซิเตต | TISTR 3167 | 37.00±1.87 ^a |
| | KMC 5 | 36.80±0.84 ^a |
| | SRS 4 | 34.60±1.34 ^b |
| | SCP III | 07.60±0.55 ^b |
| เอ็น-บิวทานอล | TISTR 3167 | 09.20±0.83 ^f |
| | KMC 5 | 09.40±0.54 ^f |
| | SRS 4 | 08.80±0.83 ^f |
| | SCP III | 00.00±0.00 ^h |
| เมทานอล | TISTR 3167 | 15.00±0.00 ^d |
| | KMC 5 | 14.00±0.00 ^c |
| | SRS 4 | 13.80±0.45 ^c |
| | SCP III | 00.00±0.00 ^h |
| กรรมวิธีควบคุมเชิงบวก | Nystatin (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | 20.60±1.14 ^c |
| กรรมวิธีควบคุมเชิงลบ | DMSO | 00.00±0.00 ^h |

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ ($P \leq 0.05$)

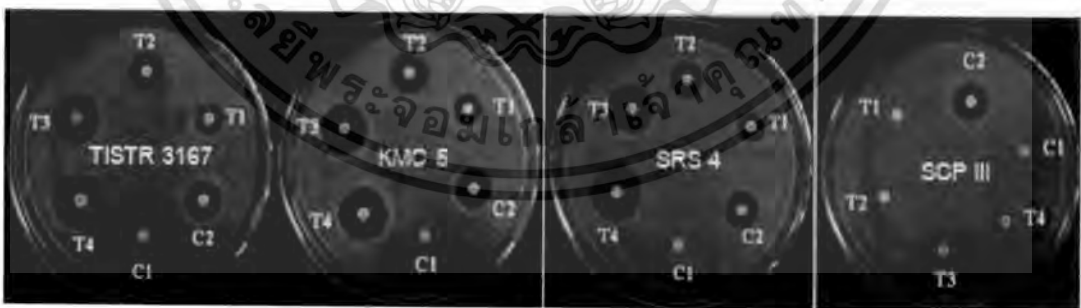
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ

เมื่อนำสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ TISTR 3167, KMC 5, SRS 4 และ SCP III ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุด โดยวัดค่าเฉลี่ยความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งได้ 31.78, 31.52 และ 31.30 มิลลิเมตร รองลงมาคือความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวัดค่าเฉลี่ยความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งได้ 31.58, 31.12 และ 30.82 มิลลิเมตร ตามลำดับ รองลงมาคือ ความเข้มข้น 25 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ยกเว้น ไอโซเลต SCP III ที่ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดย Duncan's multiple range พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 ที่ความเข้มข้น 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.11) ขณะที่สารสกัดหยาบจากสายพันธุ์ SCP III ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งทุกระดับความเข้มข้น

การทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ วาริน และคณะ (2548) ที่กล่าวว่าความเข้มข้นของสารต่อต้านเชื้อราที่สูงขึ้นจะแปรผันตรงกับประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช



รูปที่ 4.11 แสดงบริเวณยับยั้งของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารพีดีเอ เป็นเวลา 5 วัน

(C1) กรรมวิธีควบคุมเชิงลบ (DMSO) (C2) กรรมวิธีควบคุมเชิงบวก (nystatin)

(T1) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (T2) ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

(T3) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (T4) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในชั้นเอทิลอะซิเตต ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารพีดีเอ เป็นเวลา 5 วัน

| สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตต | ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)* |
|-------------------------------|-------------------------------------|--|
| TISTR 3167 | 1 | 13.80±0.44 ^f |
| | 25 | 25.00±0.00 ^d |
| | 50 | 31.60±0.54 ^{ab} |
| | 100 | 31.80±0.44 ^a |
| KMC 5 | 1 | 13.40±0.54 ^{fg} |
| | 25 | 25.20±0.44 ^d |
| | 50 | 31.00±0.00 ^{bc} |
| | 100 | 31.60±0.54 ^{ab} |
| SRS 4 | 1 | 13.00±0.00 ^e |
| | 25 | 24.60±0.54 ^d |
| | 50 | 30.80±0.83 ^c |
| | 100 | 31.60±0.54 ^{ab} |
| SCP III | 1 | 00.00±0.00 ⁱ |
| | 25 | 00.00±0.00 ⁱ |
| | 50 | 00.00±0.00 ⁱ |
| | 100 | 08.00±0.00 ^h |
| กรรมวิธีควบคุมเชิงบวก | Nystatin (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | 21.00±1.00 ^c |
| กรรมวิธีควบคุมเชิงลบ | DMSO | 00.00±0.00 ⁱ |

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันที่แตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ ($P \leq 0.05$)

4.6 ผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในชั้นเอทิลอะซิเตตต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสง

4.6.1 การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสง

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต TISTR

3167, KMC 5 และ SRS 4 ในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการเขียนเพื่อวัตถุประสงค์อื่นใด ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสร้างสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสง บ่มเชื้อ 28 วัน ทำการนับจำนวนสปอร์โดยวิธี spread plate ในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 ปรากฏผลการทดลองดังตารางที่ 4.8 โดยสารสกัดยับยั้งจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS4 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ได้อย่างสมบูรณ์จนถึงวันที่ 21 ของการบ่มเชื้อ วันที่ 28 จะพบการเจริญของเชื้อราเล็กน้อย โดยนับจำนวนเฉลี่ยสปอร์ได้ 1.60×10^3 , 1.88×10^3 และ 3.17×10^3 สปอร์ต่อกรัม ตามลำดับ ชุดควบคุมสามารถนับจำนวนเฉลี่ยสปอร์ในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 ของการบ่มเชื้อ ได้ 3.69×10^9 , 1.17×10^{10} , 9.48×10^{10} และ 1.84×10^{11} สปอร์ต่อกรัม ตามลำดับ (รูปที่ 4.12)

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดย Duncan's multiple range พบว่าสารสกัดยับยั้งจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสงได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.7)

การทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างสารปฏิชีวนะหลายชนิดในการต่อสู้กับเชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น pentyl pyrone (Intana, 2003), harzianopyridone (Dickinson และคณะ, 1989), Koninginin G (Cutler และคณะ, 1999), Viridepyronone (Evidente และคณะ, 2003) และ atroviridins A, B และ C (Oh และคณะ, 2000) เป็นต้น

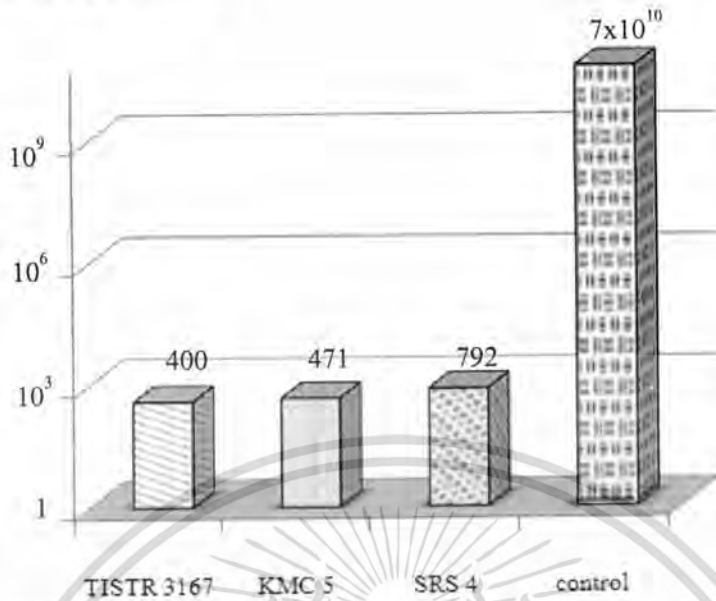
ตารางที่ 4.7 แสดงจำนวนเฉลี่ยสปอร์ต่อกรัมของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสงที่แช่สารสกัดยับยั้งที่ระดับความเข้มข้นต่างๆจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ

| สารสกัดยับยั้ง | ระยะเวลาการบ่ม (วัน) | | | | ค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ (สปอร์ต่อกรัม) ^a |
|----------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| | 7 | 14 | 21 | 28 | |
| TISTR 3167 | NG | NG | NG | 1.60×10^3 | $4.00 \times 10^2 \pm 0.23^b$ |
| KMC 5 | NG | NG | NG | 1.88×10^3 | $4.71 \times 10^2 \pm 0.12^b$ |
| SRS 4 | NG | NG | NG | 3.17×10^3 | $7.92 \times 10^2 \pm 0.31^b$ |
| ควบคุม | 3.69×10^9 | 1.17×10^{10} | 9.48×10^{10} | 1.84×10^{11} | $7.00 \times 10^{10} \pm 0.03^a$ |

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันที่แตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ ($P \leq 0.05$)

NG = No Growth (ไม่มีการเจริญ)

ค่าเฉลี่ยสปอร์ต่อกรัม



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวลิสง

4.6.2 การยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวลิสง

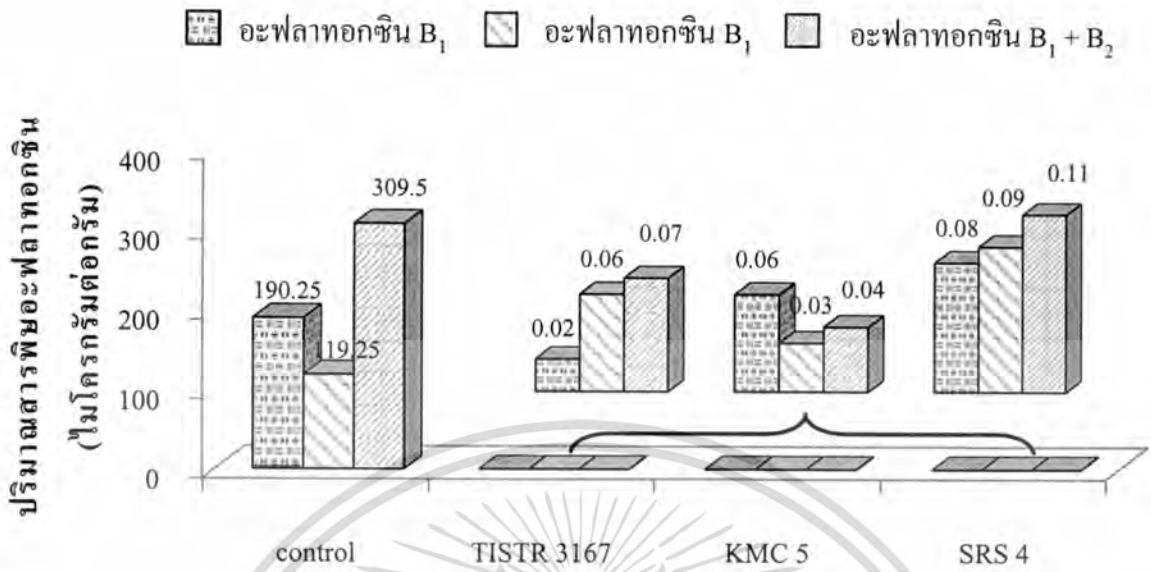
เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 ในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวลิสง โดยบ่มเชื้อเป็นเวลา 28 วัน นำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในเมล็ดข้าวลิสงโดย HPLC ในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 วัน ปรากฏผลการทดลองดังตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.13 พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์จนถึงวันที่ 21 ของการบ่มเชื้อ ในวันที่ 28 วัดปริมาณอะฟลาทอกซิน B₁ ได้ 0.08, 0.23 และ 0.29 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และอะฟลาทอกซิน B₂ เท่ากับ 0.21, 0.10 และ 0.17 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ สำหรับชุดควบคุมพบว่ามีปริมาณอะฟลาทอกซิน B₁ และ B₂ ภายหลังการบ่มเป็นเวลา 28 วัน ปริมาณ 284.62 และ 163.76 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดย Duncan's multiple range พบว่าประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลตไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.8) ซึ่งแสดงว่าทั้ง 3 ไอโซเลตมีประสิทธิภาพเท่าเทียมกัน

ตารางที่ 4.8 แสดงผลของสารสกัดหยาบ (50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ในชั้นเอทิลอะซิเตตต่อการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสง

| สารสกัด | ค่าเฉลี่ยปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน (ไมโครกรัมต่อกรัม) | | | | | | | | | | | | ค่าเฉลี่ยปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน เป็นเวลา 28 วัน (ไมโครกรัมต่อกรัม) | | |
|-----------|---|----------------|--------------------------------|----------------|----------------|--------------------------------|----------------|----------------|--------------------------------|----------------|----------------|--------------------------------|---|--------------------------|------------------------------------|
| | วันที่ 7 | | | วันที่ 14 | | | วันที่ 21 | | | วันที่ 28 | | | AFB ₁ | AFB ₂ | AFB ₁ +AFB ₂ |
| | B ₁ | B ₂ | B ₁ +B ₂ | B ₁ | B ₂ | B ₁ +B ₂ | B ₁ | B ₂ | B ₁ +B ₂ | B ₁ | B ₂ | B ₁ +B ₂ | | | |
| ชุดควบคุม | 107.97 | 65.59 | 173.56 | 147.89 | 108.10 | 255.99 | 220.52 | 139.87 | 360.40 | 284.61 | 163.43 | 448.04 | 190.25±0.81 ^a | 119.25±0.31 ^a | 309.50±0.45 ^a |
| TISTR3167 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.09 | 0.22 | 0.32 | 0.02±0.04 ^b | 0.06±0.10 ^b | 0.08±0.14 ^b |
| KMC 5 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.23 | 0.10 | 0.34 | 0.06±0.10 ^b | 0.03±0.05 ^b | 0.09±0.15 ^b |
| SRS 4 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.29 | 0.17 | 0.46 | 0.07±0.13 ^b | 0.04±0.08 ^b | 0.11±0.20 ^b |

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันที่แตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ (P≤0.05)



รูปที่ 4.13 กราฟแสดงปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน B₁, B₂ และ B₁+B₂ ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสงที่เชื้อสารสกัดยับยั้งจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จุดมุ่งหมายของการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เพื่อศึกษาและคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. 4 ไอโซเลต (TISTR 3167, KMC 5, SRS 4 และ SCP III) ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ และการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 มีศักยภาพในการเจริญแบบแข่งขัน การคลุมทับเส้นใย การพันรัดเส้นใยและการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารเลี้ยงเชื้อฟิციเอ ยกเว้น ไอโซเลต SCP III ที่มีประสิทธิภาพในการเจริญแบบ แข่งขันและการสร้างสารยับยั้งการเจริญ แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการคลุมทับเส้นใยและพันรัด เส้นใย

การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลต ในอาหารเหลวฟิციเอเจือจาง 1/5 เท่า จะให้ปริมาณสารสกัดในตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเอ็น-บิวทานอล ที่มากกว่าการ เพาะเลี้ยงในอาหารฟิციเอ เนื่องจากอาหารเหลวฟิციเอเจือจาง 1/5 มีความสมบูรณ์ของสารอาหารต่ำ จึงไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จึงทำให้เชื้อมีการสร้างสารทุติยภูมิที่มี ฤทธิ์ในการเป็นสารต่อต้านเชื้อรา ซึ่งจะถูกสร้างขึ้นในสภาวะที่ไม่เหมาะสม ยกเว้นสารสกัดในตัว ทำละลายเมทานอลพบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวฟิციเอเจือจาง 1/5 เท่า จะให้ปริมาณสารมากกว่าการเพาะ เลี้ยงในอาหารเหลวฟิციเอเจือจาง 1/5 เท่า

เมื่อนำสารสกัดหยาบในแต่ละตัวทำละลายมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ เชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารฟิციเอ ด้วยวิธี Paper Disc Diffusion พบว่าสารสกัดหยาบใน ชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อรา *Trichoderma* spp. TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI ยกเว้นสารสกัด หยาบจากสายพันธุ์ SCP III ที่ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 มาทดสอบความสามารถยับยั้งใน การเจริญของ *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสง พบว่าสามารถลดปริมาณสปอร์ลงได้โดยมี ปริมาณสปอร์เท่ากับ 1.60×10^2 , 1.89×10^2 และ 3.17×10^2 สปอร์ต่อกรัม ตามลำดับ และปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะ ฟลาทอกซิน B_1 เท่ากับ 0.09, 0.23 และ 0.29 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ อะฟลาทอกซิน B_2 เท่ากับ 0.22, 0.10 และ 0.17 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และมีปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินรวม (B_1+B_2) เท่ากับ 0.31, 0.33 และ 0.46 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ กรรมวิธีควบคุม มีปริมาณสปอร์ 1.84×10^{11} สปอร์ต่อกรัม มีปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน B_1 , B_2 และอะฟลาทอกซินรวม (B_1+B_2) เท่ากับ 284.61, 163.43 และ 448.04 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ หลังการเพาะเลี้ยงในเมล็ดถั่วลิสงเป็นเวลา 28 วัน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาหาสภาพที่เหมาะสมในการสร้างสารปฏิชีวนะจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 เพื่อให้ได้สารปฏิชีวนะที่มีปริมาณมากขึ้น
2. ควรทำการศึกษาถึงองค์ประกอบของสารในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4
3. ควรทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทางด้านอื่นๆ เช่น การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสายพันธุ์อื่นๆ เชลล์มะเร็ง เชลล์แบคทีเรีย และเชลล์ยีสต์ เป็นต้น

บรรณานุกรม

- กานต์ วงศาริยา, สุเมธ ฤกษ์ทวารวณ และสุวัฒน์ สังวรวรรณ. 2548. “การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน” โครงการพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- กนกรัตน์ ป้องประทุม. 2540. “การควบคุมการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* 102566 ในเมล็ดข้าวโพดโดยใช้สารเคมีบางชนิด.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- กวินดา ตั้งกิจวานิชย์, ขจรเกียรติ ศิริเชษฐ์ และวรพจน์ แก้วมะเร็ง. 2538. “การตรวจหาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในกระเทียม หัวหอม และกุ้งแห้ง จากตลาดในเขตเทศบาลเมืองขอนแก่น จ.ขอนแก่น.” ปัญหาพิเศษปริญญาเกษตรศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- จินตนา อุบัติสกุศล. 2530. “ปริมาณแทนนินในเนื้อเยื่อเมล็ดถั่วลิสงต่างๆ กับการต้านทานสารพิษอะฟลาทอกซิน”. รายงานสัมมนาเรื่องงานวิจัยถั่วลิสง ครั้งที่ 6. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ.สงขลา และอุทยานแห่งชาติทะเลบัน จ. สตูล. หน้า 670-673.
- จิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล อินทนู. 2542. “การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืช.” โครงการ เกษตรก้าวหน้า มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ. หน้า 90.
- คำรง พฤกษราช. 2519. เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- คุณฉวี ธนะบริพัฒน์, พะนอ รวยสูงเนิน, สายชล นุชน้อย และเหมือนหมาย จันทราพันธุกุล. 2539. “การยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในระหว่างการผลิตเทมเป้.” วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 12(2): 8-14.
- ณพรัตน์ ภูโพธิพันธ์. 2530. “อิทธิพลของความสุกแก่และการเก็บรักษาต่อความงอกและการทำให้เกิดเชื้อรา *Aspergillus flavus* ของเมล็ดถั่วลิสง 4 พันธุ์”. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- นงนุช วนิตย์ธนาคม. 2540. วิทยาเชื้อราการแพทย์. คณะแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- บรรเจิด อินหว่าง และจิระเดช แจ่มสว่าง. 2529. “การควบคุมโรครากเน่าของมะเขือเทศ (*Rhizoctonia solani* Kuenhn.) โดยจุลินทรีย์ดินเกษตรกรรม.” หน้า. 173-175. รายงานการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ประชุมทางวิชาการ สาขาพืช ครั้งที่ 24. 24-29 มกราคม 2529. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ปิยะวดี เจริญวัฒนา. 2550. “ประสิทธิภาพของสารสกัดพลูในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus*” วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร. 38(6): 50-53.
- ปริศนา สิริอาชา และ สุภัตน์ โนมิตเจริญกุล. 2532. “วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อป้องกันอะฟลาทอกซิน.” เทคโนโลยีการผลิตถั่วลิสง. กองส่งเสริมพืชพันธุ์ กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ. หน้า 109-115.
- ปริศนา สิริอาชา. 2534. “อะฟลาทอกซินในข้าวโพด” การสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่องวิธีการตรวจสอบอะฟลาทอกซิน. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- ไพโรจน์ วงศ์วิโรจน์นา. 2536. “การอบแห้งเมล็ดข้าวโพดแบบในถังเก็บภายใต้สภาวะอากาศร้อนชื้น.” วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- ภูวนาด นนทรี. 2531. ถั่วลิสง. สำนักพิมพ์เอดิชั่นเพรส โปรดักส์ กรุงเทพฯ.
- มาลินี ลิ้มโกคา. 2527. พืชวิทยาและปัญหาที่พบในสัตว์. แพร์พิทยา. กรุงเทพฯ.
- รณภพ บรรเจิดเชิดชู. 2530. “เชื้อราในโรงเก็บ สารพิษอะฟลาทอกซินและการควบคุมด้วยสารเคมีบนเมล็ดข้าวโพด.” วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- วรนนท์ ศุภพิพัฒน์. 2538. โภชนาการและสารเคมี. แสงการพิมพ์. กรุงเทพฯ.
- วาริน อินทนา, มนต์รี อิศร ไกรศีล, ปัญญาพร เลิศรัตน์ และ ประคอง เย็นจิตต์. 2548. “การควบคุมโรคผลเน่าของเงาะที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* โดยใช้สารต่อต้านเชื้อราจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum*.” วิทยาศาสตร์เกษตร 36: 171-178.
- ศศิธร ถิ่นนคร. 2528. “สารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxins) ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ในเขตร้อน.” รายงานเสนอในวิชาโภชนาศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี. 2553. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.fisheries.go.th/cf-chan> (วันที่ค้นข้อมูล: 19 มีนาคม 2553).
- สุกัญญา กองเงิน, นันทวรรณ สโรบล, ชูทิพย์ ชนะเสนีย์ และสมศักดิ์ สุริโย. 2540. “อะฟลาทอกซินในถั่วลิสง.” กลุ่มพืชน้ำมัน กองส่งเสริมพืชไร่ กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- อรุณศรี วงศ์อุไร. 2540. “อันตรายจากเชื้อราในถั่วลิสง.” ข่าวสารและจุลชีววิทยา 9(2): 5-7.
- อมรา ชินภูติ. 2547. “ปัญหาสารพิษ Aflatoxin ในถั่วลิสงและการวิเคราะห์สารพิษ Aflatoxin ในถั่วลิสง.” เอกสารประกอบการฝึกอบรมการถ่ายทอดเทคโนโลยีการแปรรูปถั่วลิสงปลอดสารพิษ Aflatoxin. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 14-31.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Anderson, W.F., Holbrook, C.C., Wilson, D.M. and Matheron, M.E. 1995. "Evaluation of preharvest aflatoxin contamination in several potentially resistance peanut genotypes." **Peanut Science**. 22: 29-32.
- Asplin, F.D. and Carnaghan, R.B.A. 1961. "The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on duckling and chickens." **Veterinary Record**. 73: 1215-1218.
- Awuah, R.T. and Kpodo, K.A. 1996. "High incidence of *Aspergillus flavus* and aflatoxin in stored groundnut in Ghana and the use of a microbial assay to assess the inhibitory effect of plant extracts on aflatoxin synthesis." **Mycopathologia**. 134(2): 109-114.
- Batta, Y.A. 2004. "Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion" **Crop Protection**. 23: 19-26.
- Benhamou, N. and Cherif, M. 1990. "Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* sp. *radicis-lycopersici*." **Phytopathology**. 80:1406-1414.
- Blount, W.P. 1961. "Turkey-X disease." **Journal of British Turkey Federation**. 9: 52.
- Bluma, R., Amaiden, M.R. and Etcheverry, M. 2008. "Screening of Argentine plant extracts: Impact on growth parameters and aflatoxin B₁ accumulation by *Aspergillus* section *Flavi*". **International Journal of Food Microbiology**. 122: 114-125.
- Bluma, R.V. and Etcheverry, M.G. 2008. "Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation". **Food Microbiology**. 25: 324-334.
- Boué, S.M., Shin, B.Y., Carter, W.C.H. and Cleveland, T.E. 2005. "Effect of soybean lipoxygenase on volatile generation and inhibition of *Aspergillus flavus* mycelial growth" **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53: 4778-4783.
- Calistru, C., McLean, M. and Berjak, P. 1997. "In vitro studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species." **Mycopathologia**. 139: 115-121.
- Campbell, K.W., Hamblin, A.M. and White, D.G. 1997. "Inheritance of resistance to aflatoxin production on cross between inbreds B73 and LB31." **The American Phytopathological Society**. 87(11): 144-146.

- Carter, J.B.H. 1973. "The influence of the testa, damage and seed dressing on the emergence of groundnut (*Arachis hypogaea*)." **Annals of Applied Biology**. 74: 315-323.
- Chet, I. and Inbar, J. 1994. "Biological control of fungus pathogens." **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 48 (1): 37-43.
- Chet, I., Inbar, J. And Hadar, I., 1997. "Fungal antagonists and mycoparasites." In: **The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships**, pp. 165–184. (Wicklow, D.T. and Soderstrom, B., eds.), Springer, Berlin.
- Chinaphuti, A. and Aukkasarakul, S. 2008. "Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production using herbal extracts." **Journal of Biotechnology**. 136: 751-759.
- Correa, A. 1995. "In vitro inhibitory activity of trichozinianines on *Sclerotium rolfsii* Sacc." **Cryptogamine Mycologia**. 16(3): 185-190.
- Criseo, G. 2001. "Differentiation of aflatoxin producing and non-producing strain of *Aspergillus flavus* group." **Letter in Applied Microbiology**. 33: 291-295.
- Cutler, H.G., Cutler, S.J., Ross, S.A., Sayed, K.E., Dugan, F.M., Bartlett, M.G., Hill, A.A., Hill, R.A. and Parker, S.R. 1999. "Koninginin G, a new metabolite from *Trichoderma aureoviride*." **Journal of Natural Products**. 62: 137-139.
- Danielson, R.M. and Davey, C.B. 1973. "Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma* sp.". **Soil Biology and Biochemistry**. 5(5): 505-515.
- Davidson, J.I., Hill, R.A., Cole, R.J., Mixon, A.C. and Henning, R.J. 1983. "Field performance of two peanut cultivars relative to aflatoxin contamination." **Peanut Science**. 10: 43-47.
- Davis, N.D., Diener, U.L. and Agnihotri, V.P. 1967 "Production of aflatoxins B₁ and G₁ in chemically defined medium. In: **Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus***. Vol.48. pp.71–80. (Klich, M.A., eds.) Mycoscience.
- Dickinson, J.M., Hanson, J.R., Hitchcock, P.B. and Claydon, N. 1989. "Structure and biosynthesis of harzianopyridone, an antifungal metabolite of *Trichoderma harzianum*." **Journal of Chemical Society. Perkin Transaction**. 1: 1885-1887.
- Dikbas, N., Kotan, R., Dadasoglu, F. and Sahin, F. 2008. "Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*." **International Journal of Food Microbiology**. 124: 179–182.

- Egner, P.A., Wang, J.B., Zhu, Y.R., Zhang, B.C., Qian, G.S., Kuang, S.Y., Gange, S.J., Jacobson, L.P., Helzlsouer, K.J., Bailey, G.S., Groopman, J.D. and Kensler, T.W. 2001. "Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer." **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State of America**. 98(25): 14601–14606.
- Evidente, A., Cabras, A., Maddau, L., Serra, S., Andolfi, A. and Motta, A. 2003. "Viridepyronone, a new antifungal 6-substituted 2H-pyran-2-one produce by *Trichoderma viridae*." **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51: 6957-6960.
- Fogliano, V., Ballio, A., Gallo, M., Woo, S.L., Scala, F. and Lorito, M. 2002. "*Pseudomonas lipodepsipeptides* and fungal cell wall-degrading enzymes act synergistically in biological control." **Molecular Plant–Microbe Interaction**. 15: 323–333.
- Gachomo, E.W. and Kotchoni, S.O 2008. "The use of *Trichoderma harzianum* and *T. viride* as potential biocontrol agent against peanut microflora and their effectiveness in reducing aflatoxin contamination of infected kernels." **Biotechnology**. 7(3): 439-447.
- Gachomo, E.W., Mutitu, E.W. and Kotchoni, S.O. 2004. "Diversity of fungal species associated with peanuts in storage and the levels of aflatoxins in infected samples." **International Journal of Agricultural Biological**. 6(6): 955 959.
- Gandomi, H., Misaghi, A., Basti, A.A, Bokaei, S., Khosravi, A., Abbasifar, A. and Javan, A.J. 2009. "Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* in culture media and cheese." **Food and Chemical Toxicology**. 2397–2400.
- Garber, R.K. and Cotty, P.J. 1997. "Formation of sclerotia and aflatoxin in developing cotton bolls infected by the S strain of *Aspergillus flavus* and potential for biocontrol with an atoxigenic strain." **Phytopathology**. 87: 940-945.
- Gelestin, M. and Bullerman, L. 1998. "Inhibition of aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by *Bacillus pumilis*." **Mycopatologia**. 40: 163-169.
- Ghisalberti, E.L., Narbey, M.J., Dewan, M.M. and Sivasithamparam, K. 1990. Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. **Plant and Soil**. 121 :287–291.
- Ghisalberti, E.L. and Sivasithamparam, K. 1991. "Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp." **Soil Biology and Biochemistry**. 23: 1011–1020.

- Gibbs, J.N. 1967. "A study of the epiphytic growth habit of *Fomes annosus*." **Annals of Botany**. 31: 755-774.
- Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A. and Magan, N. 2008. "Effect of a_w and CO_2 level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post harvest" **International Journal of Food Microbiology**. 122: 109–113.
- Goto, T., Ito, Y., Peterson, S.W. and Wicklow, D.T. 1997. "Mycotoxin production ability of *Aspergillus tamari*." **Mycotoxins**. 44: 17-20.
- Gourama, H. and Bullerman, L. 1995a. "*Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* aflatoxigenic fungi of concern in food and feeds." **Journal of Food Protection**. 58(12): 1395-1404.
- Gourama, H. and Bullerman, L. 1995b. "Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacilli* species." **Journal of Food Protection**. 58: 1249–1256.
- Harman, G.E. and Kubicek, C.P., 1998. ***Trichoderma and Gliocladium***. Taylor and Francis, London. 278.
- Harman, G. E., Chet, I. and Baker, R. 2000. "Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22." **Plant Disease**. 84: 377-393.
- Harman, C., Howell, R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004. "*Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts." **Nature Reviews and Microbiology** 2: 43-56.
- Harris, J.L. 1986. "Modified method for fungal slide culture." **Journal of Clinical Microbiology**. 24(3): 460-461.
- Hartly, R.D. 1963. "Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*." **Nature (London)**. 198: 1056-1058.
- Hasan, H.A. 1999. "Mode of action of pesticides on aflatoxin biosynthesis and oxidase system activity." **Microbiological Research**. 154(1): 95-102.
- Homer, D.W., Bell, D.K. and Jaworki, C.A. 1972. "Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfii*." **Phytopathology**. 62: 442-447.
- Howell, C.R. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. In: ***Trichoderma and Gliocladium***. Enzymes, Biological Control and Commercial Application. Vol. 2: pp.173–183. (Harman, G.E. and Kubicek, C.P., eds.). Taylor and Francis Ltd., London.
- Howell, C.R. 2003. "Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts." **Plant Disease**. 87: 4-10.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอญญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Howell, C.R. and Puckhaber, L.S. 2005. "A study of the characteristics of "P" and "Q" strains of *Trichoderma virens* to account for differences in biological control efficacy against cotton seedling diseases." **Biological Control**. 33: 217–222.
- Howell, C.R. and Stipanovic, R.D. 1983. "Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens*, and its role in the biological control of *Pythium ultimum*." **Canadian Journal of Microbiology**. 29: 321–324.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1993. "Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to human." Lyon, France. 56: 257–263.
- Inan, F., Pala, M. and Doymaz, I. 2007. "Use of ozone in detoxification of aflatoxin B₁ in red pepper." **Journal of Stored Products Research**. 43: 425–429.
- Intana, W. 2003. "Selection and development of *Trichoderma* spp. for high glucanase, antifungal metabolite producing and plant growth promoting isolates for biological control of cucumber damping-off caused by *Pythium* spp." Master's thesis, Faculty Agricultural Technology, Walailak University, Thasala, Nakhon Si Thammarat, Thailand.
- Intana, W. and Chamswarn, C. 2007. "Control of Chinese-kale damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*." **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. 29 (4): 919-927.
- Intana, W., Suwanno, T., and Chamswarn, C. 2005. "Use of antifungal metabolite from *Trichoderma virens* for controlling chinese kale leaf spots caused by *Alternaria brassicicola*." **Walailak Journal of Science and Technology**. 2(1):1-9.
- Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T. and Goto, T. 2001. "*Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*." **Mycological Research**. 105(2): 233-239.
- Johnson, L.E., Bernard, E.C. and Qian, P. 1987. "Isolate of *Trichoderma* spp. at low temperature from Tennessee and Alaska soil." **Plant Disease**. 71: 137-140.
- Kexiang, G., Xiaoguang, L., Yonghong, L., Tianbo, Z. and Shuliang, W. 2002. "Potential of *Trichoderma harzianum* and *T. atroviride* to control *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *Piricola*, the cause of apple ring rot." **Journal of Phytopathology**. 150(4–5): 271–276.
- Kurtzman, C.P., Horn, B.W. and Hesseltine, C.W. 1987. "*Aspergillus nominus*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*." **Antonie van Leeuwenhoek**. 53: 147-158.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kye, M.C., Renukaradhya, K.M., Su, Y.H., Shah, M.D., Islam, A., Devaiah, K.M., Ji, J.C., Myoung, G.Y., Jong, M.K. and Han, D.Y. 2009. "Iturin produced by *Bacillus pumilus* HY1 from Korean soybean sauce (kanjang) inhibits growth of aflatoxin producing fungi." **Food Control**. 20: 402–406.
- Le Doan, T., El-Hajji, M., Rebuffat, S., Rajeswari, M.R. and Bodo, B. 1986. "Fluorescence studies of the interaction of trichorzianine A IIIc with model membranes." **Biochimica et Biophysica Acta**. 858: 1–5.
- Lin, A. 1994. "Trichodermin a new antifungal agent from *Trichoderma viride* and its action in biological control of *Rhizoctonia solani*." **Journal of Antibiotic**. 47: 799-805.
- Line, J.E. and Brackett, R.E. 1995. "Role of toxin concentration and second carbon source in microbial transformation of aflatoxin B₁ by *Flavobacterium auranticum*." **Journal of Food Protection**. 58(9): 1042-1044.
- Line, J.E., Brackett, R.E. and Wilkinson, R.E. 1994. "Evidence for degradation of aflatoxin B₁ by *Flavobacterium auranticum*." **Journal of Food Protection**. 57: 788-791.
- Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B. and Kubicek, C.P. 1996b. "Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*." **Journal of Bacteriology**. 178: 6382–6385.
- Lorito, M., Woo, S.L. and Scala, F. 2004. "Le biotecnologie utili alla difesa sostenibile delle piante." **i funghi. Agroindustria**. 3: 181–195.
- Lorito, M., Hayes, C.K., Peterbauer, C. and Harman, G.E. 1994. "Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination." **Microbiology**. 140: 623-629.
- Lorito, M., Woo, S.L., D'Ambrosio, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Kubicek, C.P. and Scala, F. 1996a. "Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds." **Molecular Plant–Microbe Interaction**. 9: 206–213.
- Mach, R.L., Peterbauer, C.K., Payer, K., Jaksits, S., Woo, S.L., Zeilinger, S., Kullnig, C.M., Lorito, M. and Kubicek, C.P. 1999. "Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals." **Applied Environmental Microbiology**. 65:1858–1863.

- Maria, T., Bara, F., Adilson, L.L. and Cirano, J.U. 2003. "Purification and characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*." **FEMS Microbiology Letters**. 219: 81-85.
- McDonald, D. and Brook, J.A. 1963. "Growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin in groundnuts." **Journal of Tropical Science**. 5: 208-214.
- McWatters, K.H., Resurreccion, A.V., Beuchat, L.R. and Phillips, R.D. 1995. "Use of peanut and cowpea in wheat-based containing composite flours." **Plant Foods for Human Nutrition**. 47(1): 71-87.
- Mixon, A.C., Bell, D.K. and Wilson, D.M. 1984. "Effect of chemical and biological agents on incidence of *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination of peanut seeds." **Phytopathology**. 74: 1440-1444.
- Mixon, A.C. and Rogers, K.M. 1975. "Factor affecting *Aspergillus flavus* Lk. Ex.Fr. colonization of resistant and susceptible genotypes of *Arachis hypogaea* L." **Peanut Science**. 2: 18-22.
- Nallathambi, P., Umamaheswari, C., Thakore, B.B.L. and More, T.A. 2009. "Post-harvest management of ber (*Ziziphus mauritiana* Lamk) fruit rot (*Alternaria alternata* Fr. Keissler) using *Trichoderma* species, fungicides and their combinations." **Crop Protection**. 28: 525-532.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard. NCCLS document M38-A. CLSI.
- Nguefack, J., Leth, V., Zollo, A.P.H. and Mathur, S.B. 2004. "Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi." **International Journal of Food Microbiol**. 94: 329-334.
- Northolt, D.M. and Bullerman, B.L. 1982. "Prevention of mold growth and toxin production through control of environment condition." **Journal of food Protection**. 45(6):519-526.
- Oh, S.U., Lee, S.J, Kim, J.H. and Yoo, I.D., 2000. "Structural elucidation of new antibiotic peptides, atroviridins A, B, and C from *Trichoderma atroviride*." **Tetrahedron Letters**. 41: 61-64.
- Paster, N., Lecong, Z., Menashrov, M. and Shapira, R. 1999. "Possible synergistic effect of nisin and propionic acid on the growth of mycotoxigenic fungi *Aspergillus parasiticus*,

- Aspergillus ochraceus* and *Fusarium moniliforme*.” **Journal of Food Protection**. 62(10): 1223-1227.
- Paster, N., Menassherov, M., Ravid, V. and Juven, B. 1995. “Antifungal activity of oregano and thyme essential oil applied as fumigants against fungi attacking store grain.” **Journal of food Protection**. 58: 81-85.
- Passone, A.M., Resnik, S. And Etcheverry, G.M. 2008. “The potential of food grade antioxidants in the control of *Aspergillus* section *Flavi*, interrelated mycoflora and aflatoxin B₁ accumulation on peanut grains.” **Food Control**. 19: 364–371.
- Perazzolli, M., Dagostin, S., Ferrari, A., Elad, Y. and Pertot, I. 2008. “Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole.” **Biological Control**. 47: 228–234.
- Peterson, S.W., Ilo, Y., Horn, B.W. and Goto, T. 2001. “*Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*.” **Mycologia**. 93: 689-703.
- Petit, R.E. and Taber, R.A. 1968. “Factor affecting aflatoxin accumulation in peanut kernels and associated mycoflora.” **Applied Microbiology**. 16: 1230-1234.
- Phupiewkham, W., Sirithorn, P., Saksirirat, V. and Thammasirirak, S. 2010. “Study of biological activity of *Trichoderma harzianum* isolate T9.” The 11th Graduate Research Conference, Khonkean University, Thailand.
- Pitt, J.J. 1989. “Field Studies on *Aspergillus flavus* and aflatoxins in Australian groundnuts.” In **Aflatoxin Contamination of Groundnuts**. (McDonald, D. and Mehan, eds). International Crops research Institute for the Semi Arid Tropics (ICRISAT). Patancheru, India.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. 1989. “*Aspergillus* and related telemorphs.” **Fungi and Food Spoilage**. Third Edition. London, England.
- Pomeranz, Y. and Meloan, C.E. 1996. **Food Analysis: Theory and Practice**, Third Edition, CBS Publishers and Distributors, New Delhi.
- Rabeendran, N., Jones, E.E., Moot, D.J. and Stewart, A. 2006. “Biocontrol of *Sclerotinia* lettuce drop by *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma hamatum*.” **Biological Control** 39: 352–362.

- Rajendiran, R., Jegadeeshkumar, D., Sureshkumar, B.T. and Nisha, T. 2010. "In vitro assessment of antagonistic activity of *Trichoderma viride* against post harvest pathogens." **Journal of Agricultural Technology**. 6(1): 31-35.
- Ramakrishna, N., Lacey, J. and Smith, J.E. 1996. "*Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin B₁ formation in barley grain during interaction with other fungi." **Mycopathologia**. 136:53-63.
- Rebuffat, S., Hajji, E., Hennig, M., Davoust, P. and Bodo, B. 1989. "Isolation, sequence and conformation of seven trichorzianines B from *Trichoderma harzianum*." **International Journal of Peptide and Protein Research**. 34: 200–210.
- Reddy, S.V and Farid, W. 2000. "Properties of aflatoxin and it producing fungi". [Online]. Available :<http://www.wikipedia.com>. 2006.
- Reddy, K.R.N., Reddy, C.S. and Muralidharan, K. 2009. "Efficacy of certain agrochemicals on *Aspergillus* spp. and subsequent aflatoxin production in rice." **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 93: 53–57.
- Reino, J.L., Guerriero, R.F., Herna`ndez-Gala`, R. and Collado, I.G. 2008. "Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*." **Phytochemistry Review**. 7:89–123.
- Rini, C.R. and Sulochana, K.K. 2007. "Usefulness of *Trichoderma* and *Pseudomonas* against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* infecting tomato." **Journal of Tropical Agriculture** 45 (1-2): 21–28.
- Rita, C.G. and Leif, A.E. 2006. "Theoretical characterization of aflatoxins and their phototoxic reactions" **Chemical Physics Letters**. 422: 328–333.
- Rojo, F.G., Reynoso, M.M., Ferez, M., Sofia, Chulze, S.N. and Torres, A.M. 2007. "Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions." **Crop Protection**. 26: 549–555.
- Rossi, V. and Patteri, E. 2009. "Inoculum reduction of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, through application of *Trichoderma*-based products." **Biological Control**. 49: 52–57.
- Royse, D.J. and Ries, S.M. 1978. "The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cinota*." **Phytopathology**. 68: 603-607.
- Ruano, D.R. and López, C.J.H. 2009. "Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents against avocado white root rot." **Biological Control**. 51: 66–71.

- Sahebani, N. and Hadavi, N. 2008. "Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*." **Soil Biology and Biochemistry**. 40: 2016–2020.
- Samapundo, S., Devlieghere, F., Geeraerd, A.H, De Meulenaer, B., Van Impe, J.F. and Debevere, J. 2007. "Modelling of the individual and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on corn." **Food Microbiology**. 24:517–529.
- Samuels, G.J. 1996. "*Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus." **Mycological Research**. 100(8): 923-935.
- Sánchez, E., Heredia, N. and García, S. 2005 "Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of *Agave* species." **International Journal of Food Microbiology**. 98: 271– 279.
- Sanders, H.T. 1977. "Changes in tannin-like compounds of peanut fruit parts during maturation." **Peanut Science**. 4: 51-53.
- Sanders, H.T. and Mixon, A.C. 1978. "Effect of peanut tannin on percent seed colonization and in vitro growth by *Aspergillus parasiticus*." **Mycophotologia**. 66(3): 169-173.
- Santos, C.C.M., Lopes, M.R.V., and Kosseki, S.Y. 2001. "Ocorrência de aflatoxinas em amendoime produtos de amendoim comercializados na região de São José de Rio Preto/SP." **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. 60(2): 153–157.
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y.L., Hayes, C.K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E., and Kubicek, C.P. 1994. "Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi." **Applied and Environmental Microbiology**. 60: 4364–4370.
- Se-Gul, J., Kyung-Su, J., Eun-Hee, L., Won-Sik, K. and Jae-Yong, C. 2009. "Isolation of 1',3'-Dilinolenoyl-2'-Linoleoylglycerol with tyrosinase inhibitory activity from *Flammulina velutipes*." **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 19(7): 681-684.
- Seitz, L. M. and Mohr, H.E. 1974. "A new method for quantitation of aflatoxin in corn." **Cereal Chemistry**. 54: 179-183.
- 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.

- Sivasithamparam, K. and Ghisalberti, E.L. 1998. "Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*." In: *Trichoderma and Gliocladium*, Vol.1: pp.139–191. (Kubicek, C.P. and Harman, G.E., eds). Taylor and Francis, London.
- Suman, M., Mamta, D., Kishan, S., Dihiya, M. and Singh, K. 1999. "Studies on aflatoxin produce by *Aspergillus* species in khoa." *Indian Journal of Dairy-Science*. 52(3): 149-151.
- Sunil, C.D., Suresh, M. and Singh, B. 2007. "Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt." *Biological Control*. 40: 118–127.
- Tatsadjieu, N.L., Jazet, D.P.M., Ngassoum, M.B., Etoa, F-X. and Mbofung, C.M.F. 2009. "Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries." *Food Control*. 20:161–166.
- Thanaboripat, D., Chitaree, K., Kiatsompob, T. and Oanchang, W. 1993. "Effect of salt concentration on aflatoxin in peanut by *Aspergillus flavus*." *Journal of Kasetsart*. 27: 354-367.
- Thanaboripat, D., Im-erb, A. and Ruangrattanametee, V. 2002. "Effect of Ling Zhi mushroom on aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*." In: *Biological Control and Biotechnology*. pp. 22-30. Heilongjiang Science and Technology Press, China.
- Thanaboripat, D., Kraipeerapun, K., Pattanaphongsak, C., Srisana, S. and Nanasombat, S. 1997a. "Detoxification of aflatoxin by *Streptococcus lactis* and lactic acid bacteria in commercial yoghurt." *Kasetsart Journal (Natural Science)*. 31: 117-123.
- Thanaboripat, D., Mongkontanawut, N., Suvathi, Y. and Ruangrattanametee, V., 2004. "Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by citronella oil." *KMITL Science Journal*. 4(1): 1-8.
- Thanaboripat, D., Nontabenjawan, K., Leesin, K., Teerapiannont, D., Sukcharoen, O. and Ruangrattanamatec, R. 1997a. "Inhibitory effect of garlic, clove and carrot on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production." *Journal of Forestry Research*. 8(1): 39-42.
- Thanaboripat, D., Premsi, T., Punbusayakul, N. and Suhcharoen, O. 1996. "Effect of food preservative on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in liquid medium." *ASEAN Food Journal*. 11(2).

- Thanaboripat, D., Suvathi, Y., Srilohasin, P., Sripakdee, S., Patthanawanitchai, O. and Charoensettasilp, S. 2007. "Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*" **KMITL Science and Technology Journal**. 7(1): 1-7.
- Thangavelu, R. Palaniswami, A. and Velazhahan, R. 2004. "Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana." **Agriculture, Ecosystems and Environment**. 103: 259-263.
- Tronsmo, A. 1991. "Biological and integrated controls of *Botrytis cinerea* on apple with *Trichoderma harzianum*." **Biological Control**. 1: 59-62.
- Todar, K. 2008. "The growth of bacterial population." **Todar's online textbook of bacteriology**. pp. 3.
- Vey, A., Hoagland, R.E. and Butt, T.M. 2001. "Toxic metabolites of fungal biocontrol agents." In: **Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential**, pp. 311-346. (Butt, T.M., Jackson, C. and Magan, N., eds.). CAB International. Bristol.
- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E.L., Lorito, M. and Sivasithamparam, K. 2006. "Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens." **Letters in Applied Microbiology**. 43: 143-148.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L. and Lorito, M. 2008. "*Trichoderma*-plant-pathogen interactions." **Soil Biology and Biochemistry**. 40: 1-10.
- Vizcaino, J.A., Sanz, L., Basilio, A., Vicente, F., Gutierrez, S., Hermosa, M.R. and Monte, E. 2005. "Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections." **Mycological Research**. 109(12): 1397-1406.
- Whipps, J.B. 1987. "Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi." **The New Phytologist**. 107: 127-142.
- Wilson, D.W., Mixon, A.C. and Troeger, J.M. 1997. "Aflatoxin contamination of peanuts resistant to seed invasion by *Aspergillus flavus*." **Phytopathology**. 67: 922-924
- Woo, S.L., Formisano, E., Fogliano, V., Cosenza, C., Mauro, A., Turra', D., Soriente, I., Ferraioli, S., Scala, F. and Lorito, M. 2004. "Factors that contribute to the mycoparasitism stimulus in *Trichoderma atroviride* strain P1." **Journal of Zhejiang University Science**. 30: 421.
- Woo, S.L. and Lorito, M. 2007. "Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol." In: **Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Enhancement and Management. pp. 107-130. (Vurro, M. and Gressel, J., eds.), IOS, Springer Press, Amsterdam, the Netherlands.

Worasatit, N., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L. and Rowland, C. 1994. "Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of rhizoctonia root rot of wheat among single spore isolates of *Trichoderma koningii*." **Mycological Research.** 98(12): 1357-1363.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato Dextrose Agar: PDA

| | |
|----------|-----------------|
| Potato | 200 กรัม |
| Dextrose | 20 กรัม |
| Agar | 15 กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 มิลลิลิตร |

อาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเตรียมเรียบร้อยแล้วจะต้องนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การเตรียมสีย้อม

Lactophenol cotton blue (Mounting fluid for fungi)

| | |
|----------------|-----------------|
| Glycerol | 40 กรัม |
| Lactic acid | 20 กรัม |
| Phenol crystal | 20 กรัม |
| Cotton blue | 0.05 กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 มิลลิลิตร |

ละลาย Phenol ใน lactic acid glycerol และน้ำกลั่น โดยใช้ความร้อน เดิม cotton blue ลงไป (สำหรับ cotton blue อาจเตรียมเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วใช้ผสมในปริมาณ 2 มิลลิลิตร ต่อ สูตรที่เตรียมด้านบน)



ภาคผนวก ก
การหาความชื้นในเมล็ดถั่วลิสง

การวิเคราะห์หาความชื้นในเมล็ดถั่วลิสงตามวิธีการของ Pomeranz และ Meloan (1994) โดยมีวิธีการดังนี้

อบภาชนะที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) นำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ทำอย่างน้อย 3 ซ้ำ จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ บันทึกค่าที่ได้ทั้งหมด ใส่ถั่วลิสง 5 กรัมในภาชนะ บันทึกค่าที่ชั่งถั่วลิสงพร้อมภาชนะนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักถั่วลิสงพร้อมภาชนะอีกครั้งและวิเคราะห์หาความชื้นจากสูตรคำนวณ ดังนี้
เปอร์เซ็นต์ความชื้นที่มีอยู่ในเมล็ดถั่วลิสง

$$\frac{(\text{น้ำหนักถั่วลิสงและภาชนะครั้งที่ 1}) - (\text{น้ำหนักถั่วลิสงและภาชนะครั้งที่ 2}) \times 100}{\text{น้ำหนักถั่วลิสงจริง}}$$

ภาคผนวก ง

การตรวจนับสปอร์ของเชื้อราโดยใช้สไลด์นับเซลล์

1. เตรียมสารละลายสปอร์ โดยนำสปอร์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผสมสารละลาย tween 80
2. บีบเปิดสารละลายสปอร์ที่เตรียมไว้ลงในสไลด์นับเซลล์ (ที่ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์) คูณมา 1-2 หยด และหยดลงด้านข้างของแผ่นกระจกปิดสไลด์
3. ตรวจนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า
4. นับจำนวนสปอร์ใน 5 ช่องกลางจาก 25 ช่อง (ดังรูปที่ ง-1) แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย โดยหารด้วยจำนวนช่องทั้งหมดที่ทำการนับ ถ้าจำนวนสปอร์ที่นับได้น้อยกว่า 50 สปอร์ ให้เปลี่ยนไปใช้ตัวอย่างที่เข้มข้นขึ้นแล้วทำการนับใหม่ แต่ถ้าจำนวนสปอร์มากกว่า 400 ให้เจือจางตัวอย่างลงอีก และนับสปอร์ใหม่

วิธีการคำนวณหาปริมาณสปอร์

| | |
|---|------------------------------------|
| ปริมาตรของ 1 ช่องกลางมีค่าเท่ากับ | 0.2 มม. X 0.2 มม. X 0.1 มม. |
| หรือเท่ากับ | 0.02 ซม. X 0.02 ซม. X 0.01 ซม. |
| หรือเท่ากับ | 0.000004 ลบ.ซม หรือ 0.000004 มล. |
| เท่ากับ | 4×10^{-6} มล. |
| ปริมาตร 4×10^{-6} มล. มีจุลินทรีย์ | Z สปอร์ |
| ปริมาตร 1 มิลลิเมตรมีจุลินทรีย์ | $Z \times 1$ 4×10^{-6} |



รูปที่ ง-1 ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

ที่มา: ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี (2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

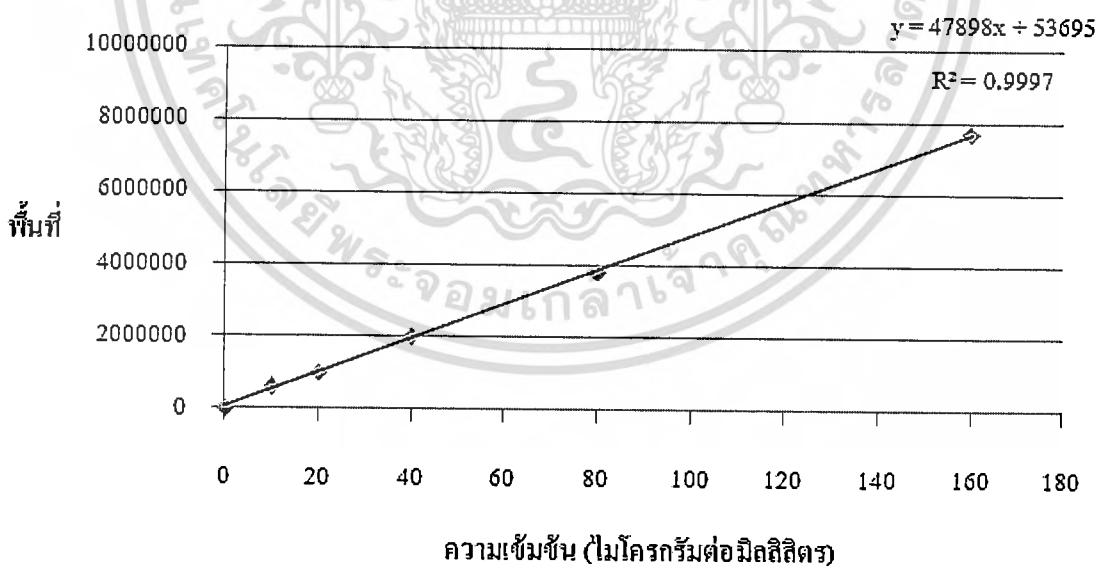
การเตรียมกราฟมาตรฐานสารพิษอะฟลาทอกซิน

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานสารพิษอะฟลาทอกซิน (B_1 และ B_2)

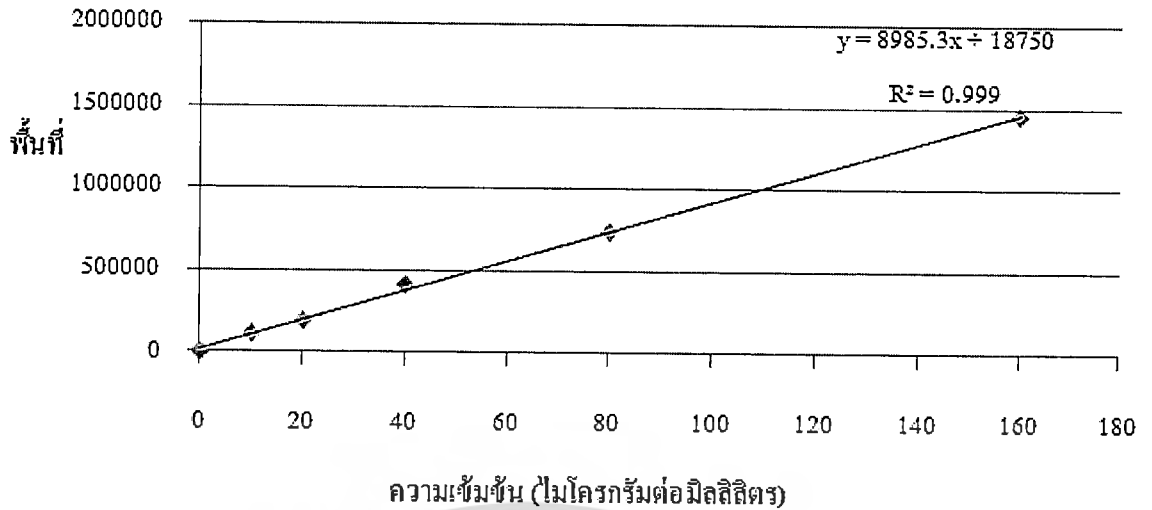
1.1 ปิเปตต์เมทานอลความเข้มข้น 99.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดที่บรรจุสารพิษอะฟลาทอกซิน ปริมาตร 10 มิลลิกรัม

1.2 เจือจางให้ได้สารละลายอะฟลาทอกซินที่มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.3 จากนั้นนำมากรองผ่าน membrane filter (millipore) 0.45 ไมครอน เก็บไว้ในขวดเก็บตัวอย่างขนาดเล็ก (vial) นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ใช้ UV spectrophotometric detector SPD เป็นเครื่องวัดสัญญาณที่มีความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ใช้คอลัมน์ชนิด reverse phase C_{18} ขนาด 4.9x25 เซนติเมตร เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ใช้อัตราส่วนของเมทานอล : น้ำ : กรดแอซิดิก (30 : 63 : 7) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ฉีดสารครั้งละ 10 ไมโครลิตร บันทึกโครมาโทแกรม (chromatogram) ของอะฟลาทอกซิน โดยนำค่าพื้นที่ที่พิก (peak area) และค่าความเข้มข้นของสารพิษอะฟลาทอกซินไปเขียนกราฟมาตรฐาน



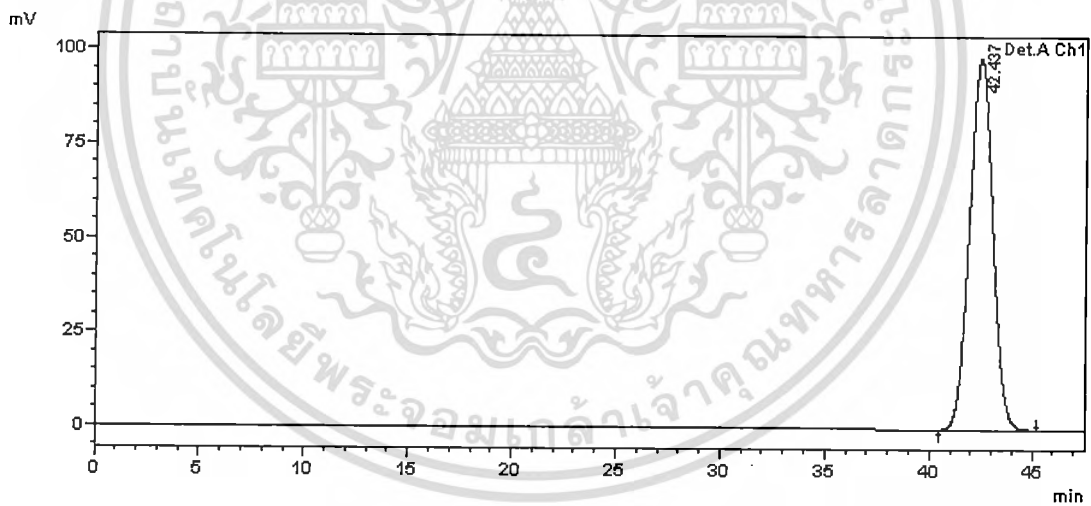
รูปที่ จ-1 แสดงกราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซิน B_1



รูปที่ จ-2 แสดงกราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซิน B₂

2. ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานสารพิษอะฟลาทอกซิน

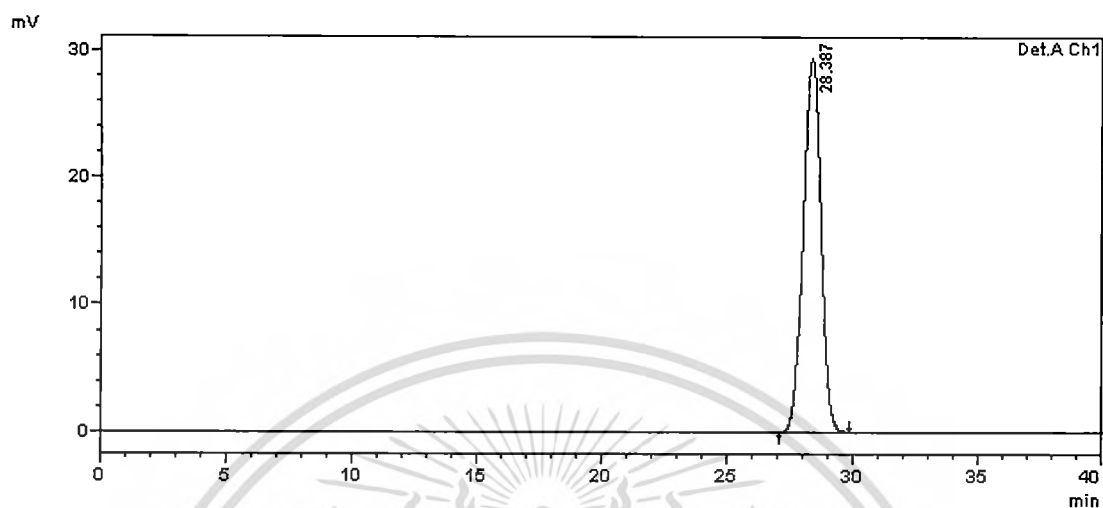
โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานสารพิษอะฟลาทอกซิน B₁ (ดังรูป จ-3) แสดงให้เห็นเวลา retention time ของอะฟลาทอกซิน B₁ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 42.437 นาที



รูปที่ จ-3 แสดงโครมาโตแกรมของสารพิษอะฟลาทอกซิน B₁

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานสารพิษอะฟลาทอกซิน B₂ (ดังรูป จ-4) แสดงให้เห็นเวลา retention time ของอะฟลาทอกซิน B₂ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 28.387 นาที



รูปที่ จ-4 แสดงโครมาโตแกรมของสารพิษอะฟลาทอกซิน B₂

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ ฉ-1 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 เป็นเวลา 7 วันในการทดสอบ การเจริญแบบแบ่งชั้นกับเชื้อรา *Trichoderma* spp.

| เชื้อรา | ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของ เชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 (มิลลิเมตร.) | | | | | |
|----------------------------------|--|-------|-------|-------|-------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | เฉลี่ย |
| <i>Trichoderma</i> sp.TISTR 3167 | 23.00 | 22.00 | 22.00 | 23.00 | 24.00 | 22.80 |
| <i>Trichoderma</i> sp.KMC 5 | 23.00 | 24.00 | 24.00 | 24.00 | 25.00 | 24.00 |
| <i>Trichoderma</i> sp.SRS 4 | 25.00 | 24.00 | 24.00 | 25.00 | 24.00 | 24.40 |
| <i>Trichoderma</i> sp.SCP III | 25.00 | 26.00 | 26.00 | 27.00 | 27.00 | 26.20 |
| <i>A. flavus</i> (ชุดควบคุม) | 50.00 | 52.00 | 51.00 | 52.00 | 52.00 | 51.40 |

ตารางที่ ฉ-2 ผลการเจริญคลุมทับเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ต่อเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

| <i>Trichoderma</i> spp. | ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อรา (มิลลิเมตร) | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|--|-------|-------|-------|-------|--------|----------|-------|------|-------|-------|--------|
| | วันที่ 4 | | | | | | วันที่ 8 | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | เฉลี่ย |
| TISTR 3167 | 65.00 | 62.00 | 62.00 | 63.00 | 63.00 | 63.00 | 83.00 | 85.00 | 85.0 | 86.00 | 86.00 | 85.00 |
| KMC 5 | 65.00 | 62.00 | 61.00 | 58.00 | 60.00 | 61.20 | 84.00 | 84.00 | 83.0 | 82.00 | 81.00 | 82.80 |
| SRS 4 | 63.00 | 63.00 | 61.00 | 64.00 | 60.00 | 62.20 | 86.00 | 85.00 | 81.0 | 84.00 | 83.00 | 83.80 |
| SCP III | 59.00 | 63.00 | 60.00 | 62.00 | 60.00 | 60.80 | 68.00 | 72.00 | 71.0 | 71.00 | 70.00 | 70.80 |
| <i>A. flavus</i> (ควบคุม) | 32.00 | 35.00 | 33.00 | 33.00 | 35.00 | 33.60 | 54.00 | 56.00 | 53.0 | 55.00 | 55.00 | 54.60 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๓-3 ผลการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ โดย Dialysis Membrane Technique

| <i>Trichoderma</i> spp. | ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 (มิลลิเมตร) | | | | | |
|-------------------------|--|------------|------------|------------|------------|--------|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | ครั้งที่ 4 | ครั้งที่ 5 | เฉลี่ย |
| TISTR 3167 | 12.00 | 11.00 | 12.00 | 10.00 | 12.00 | 11.40 |
| KMC 5 | 15.00 | 16.00 | 15.00 | 17.00 | 16.00 | 15.80 |
| SRS 4 | 17.00 | 16.00 | 16.00 | 15.00 | 17.00 | 16.20 |
| SCP III | 20.00 | 22.00 | 21.00 | 21.00 | 22.00 | 21.20 |
| ชุดควบคุม (control) | 53.00 | 53.00 | 54.00 | 54.00 | 52.00 | 53.20 |

ตารางที่ ๓-4 ผลการยับยั้งของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารพีดีเอ

| ไอโซเลต | ตัวทำละลาย | ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร) | | | | | |
|-------------------|--------------|--|------------|------------|------------|------------|--------|
| | | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | ครั้งที่ 4 | ครั้งที่ 5 | เฉลี่ย |
| TISTR 3167 | เฮกเซน | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 |
| | เอทิลอะซิเตต | 40.00 | 35.00 | 37.00 | 37.00 | 36.00 | 37.00 |
| | บิวทานอล | 10.00 | 09.00 | 09.00 | 10.00 | 08.00 | 09.20 |
| | เมทานอล | 15.00 | 15.00 | 15.00 | 15.00 | 15.00 | 15.00 |
| KMC 5 | เฮกเซน | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 |
| | เอทิลอะซิเตต | 36.00 | 37.00 | 36.00 | 38.00 | 37.00 | 36.80 |
| | บิวทานอล | 10.00 | 10.00 | 09.00 | 09.00 | 09.00 | 09.40 |
| | เมทานอล | 14.00 | 14.00 | 14.00 | 14.00 | 14.00 | 14.00 |
| SRS 4 | เฮกเซน | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 |
| | เอทิลอะซิเตต | 36.00 | 33.00 | 34.00 | 36.00 | 34.00 | 34.60 |
| | บิวทานอล | 08.00 | 08.00 | 09.00 | 10.00 | 09.00 | 08.80 |
| | เมทานอล | 13.00 | 14.00 | 14.00 | 14.00 | 14.00 | 13.80 |
| SCP III | เฮกเซน | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 |
| | เอทิลอะซิเตต | 08.00 | 07.00 | 07.00 | 08.00 | 08.00 | 07.60 |
| | บิวทานอล | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 |
| | เมทานอล | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 |
| ควบคุม (nystatin) | - | 19.00 | 20.00 | 22.00 | 21.00 | 21.00 | 20.60 |
| ควบคุม (DMSO) | - | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 |

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ห้ามมิให้นำไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑-5 แสดงความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

| ไอโซเลต | ความเข้มข้น | ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) | | | | | |
|------------------|-------------|--|------------|------------|------------|------------|--------|
| | | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | ครั้งที่ 4 | ครั้งที่ 5 | เฉลี่ย |
| TISTR 3167 | 1 มก./มล. | 13.00 | 14.00 | 14.00 | 14.00 | 14.00 | 13.80 |
| | 25 มก./มล. | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 |
| | 50 มก./มล. | 31.00 | 31.00 | 32.00 | 32.00 | 32.00 | 31.60 |
| | 100 มก./มล. | 31.00 | 32.00 | 32.00 | 32.00 | 32.00 | 31.80 |
| KMC 5 | 1 มก./มล. | 13.00 | 13.00 | 14.00 | 13.00 | 14.00 | 13.40 |
| | 25 มก./มล. | 26.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.20 |
| | 50 มก./มล. | 31.00 | 31.00 | 31.00 | 31.00 | 31.00 | 31.00 |
| | 100 มก./มล. | 31.00 | 32.00 | 32.00 | 32.00 | 31.00 | 31.60 |
| SRS 4 | 1 มก./มล. | 13.00 | 13.00 | 13.00 | 13.00 | 13.00 | 13.00 |
| | 25 มก./มล. | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 24.00 | 24.00 | 24.60 |
| | 50 มก./มล. | 31.00 | 30.00 | 31.00 | 30.00 | 32.00 | 30.80 |
| | 100 มก./มล. | 31.00 | 32.00 | 32.00 | 31.00 | 32.00 | 31.60 |
| SCP III | 1 มก./มล. | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 25 มก./มล. | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 50 มก./มล. | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 100 มก./มล. | 8.00 | 8.00 | 8.00 | 8.00 | 8.00 | 8.00 |
| ควบคุม(nystatin) | 20 มก./มล. | 20.00 | 20.00 | 22.00 | 22.00 | 21.00 | 21.00 |
| ควบคุม(DMSO) | - | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๖-6 ผลของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ต่อการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสง

| สารสกัด | จำนวนสปอร์ของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 (สปอร์ต่อกรัม) | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | วันที่ 7 | | | | วันที่ 14 | | | | วันที่ 21 | | | | วันที่ 28 | | | |
| | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย |
| TISTR3167 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 9.60x10 ² | 1.83 x10 ³ | 2.01x10 ³ | 1.60x10 ³ |
| KMC 5 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 1.13x10 ³ | 2.67 x10 ³ | 1.86x10 ³ | 1.88x10 ³ |
| SRS 4 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 3.98x10 ³ | 2.12 x10 ³ | 3.41x10 ³ | 3.17x10 ³ |
| ชุดควบคุม | 3.63x10 ⁹ | 3.33x10 ⁹ | 4.13x10 ⁹ | 3.69x10 ⁹ | 9.33x10 ⁹ | 1.71x10 ¹⁰ | 8.81x10 ⁹ | 1.17x10 ¹⁰ | 7.63x10 ¹⁰ | 9.03x10 ¹⁰ | 1.18x10 ¹¹ | 9.48x10 ¹⁰ | 3.13x10 ¹¹ | 1.83x10 ¹¹ | 5.46x10 ¹⁰ | 1.84x10 ¹¹ |

ตารางที่ ๖-7 ผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสงโดยการตรวจวัดสารพิษอะฟลาทอกซิน B₁ โดยใช้เครื่อง HPLC

| สารสกัด | ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน B ₁ (ไมโครกรัมต่อกรัม) | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|---|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|
| | วันที่ 7 | | | | วันที่ 14 | | | | วันที่ 21 | | | | วันที่ 28 | | | |
| | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย |
| TISTR 3167 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.09 | 0.10 | 0.09 | 0.09 |
| KMC 5 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.25 | 0.22 | 0.23 | 0.23 |
| SRS 4 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.31 | 0.28 | 0.29 | 0.29 |
| ชุดควบคุม | 108.15 | 107.68 | 108.08 | 107.97 | 147.51 | 148.25 | 147.92 | 147.89 | 221.14 | 219.89 | 220.55 | 220.52 | 285.51 | 283.71 | 284.61 | 284.61 |

ตารางที่ ๘-8 ผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสงโดยการตรวจวัดสารพิษอะฟลาทอกซิน B₂ โดยใช้เครื่อง HPLC

| สารสกัด | ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน B ₂ (ไมโครกรัมต่อกรัม) | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|---|-------|-------|--------|-----------|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|
| | วันที่ 7 | | | | วันที่ 14 | | | | วันที่ 21 | | | | วันที่ 28 | | | |
| | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย |
| TISTR 3167 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.22 | 0.23 | 0.22 | 0.22 |
| KMC 5 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.10 | 0.11 | 0.10 | 0.10 |
| SRS 4 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.16 | 0.18 | 0.17 | 0.17 |
| ชุดควบคุม | 64.45 | 66.80 | 65.53 | 65.59 | 107.98 | 108.23 | 108.09 | 108.10 | 140.12 | 139.66 | 139.83 | 139.87 | 162.77 | 164.01 | 163.51 | 163.43 |

ตารางที่ ๘-9 ผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสงโดยการตรวจวัดสารพิษอะฟลาทอกซินรวม (B₁+B₂) โดยใช้เครื่อง HPLC

| สารสกัด | ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินรวม (B ₁ +B ₂) (ไมโครกรัมต่อกรัม) | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|---|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|
| | วันที่ 7 | | | | วันที่ 14 | | | | วันที่ 21 | | | | วันที่ 28 | | | |
| | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย |
| TISTR 3167 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.31 | 0.33 | 0.31 | 0.32 |
| KMC 5 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.35 | 0.33 | 0.33 | 0.34 |
| SRS 4 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.47 | 0.46 | 0.46 | 0.46 |
| ชุดควบคุม | 172.60 | 174.48 | 173.61 | 173.56 | 255.49 | 256.48 | 256.01 | 255.99 | 361.26 | 359.55 | 360.38 | 360.40 | 448.28 | 447.72 | 448.12 | 448.04 |

ภาคผนวก ข

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ตารางที่ ข-1 แสดงการเปรียบเทียบผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 อายุ 7 วันในการทดสอบการเจริญแบบแข่งขันกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ

ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|----------|------|
| Between Groups | 11189.030 | 4 | 2797.257 | 1939.805 | .000 |
| Within Groups | 28.841 | 20 | 1.442 | | |
| Total | 11217.870 | 24 | | | |

Duncan^a

| <i>Trichoderma</i> spp. | N | Subset for alpha = .05 | | | |
|-------------------------|---|------------------------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| control | 5 | .0000 | | | |
| SCP III | 5 | | 49.0360 | | |
| SRS 4 | 5 | | | 52.5120 | |
| KMC5 | 5 | | | 53.3120 | |
| TISTR 3167 | 5 | | | | 55.6340 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | .305 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

ตารางที่ ซ-2 แสดงการเปรียบเทียบผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในการทดสอบการเจริญคลุมทับเส้นใยโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ

ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 12196.000 | 4 | 3049.000 | 213.965 | .000 |
| Within Groups | 285.000 | 20 | 14.250 | | |
| Total | 12481.000 | 24 | | | |

Duncan^a

| <i>Trichoderma</i> spp. | N | Subset for alpha = .05 | | |
|-------------------------|---|------------------------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| control | 5 | .0000 | | |
| SCP III | 5 | | 24.0000 | |
| SRS4 | 5 | | | 54.0000 |
| KMC5 | 5 | | | 54.0000 |
| TISTR 3167 | 5 | | | 55.0000 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | .697 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-3 แสดงเปรียบเทียบแสดงผลการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไชโหลตต่างๆ ในการควบคุมการเจริญเชื้อราของ *A. flavus* IMI 242684 อายุ 4 วัน

ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|----------|------|
| Between Groups | 20244.111 | 4 | 5061.028 | 1854.481 | .000 |
| Within Groups | 54.582 | 20 | 2.729 | | |
| Total | 20298.693 | 24 | | | |

Duncan^a

| <i>Trichoderma</i> spp. | N | Subset for alpha = .05 | | | |
|-------------------------|---|------------------------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| control | 5 | .0000 | | | |
| SCP III | 5 | | 60.1320 | | |
| SRS 4 | 5 | | | 69.5260 | |
| KMC 5 | 5 | | | 70.2960 | |
| TISTR 3167 | 5 | | | | 78.5580 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | .470 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๔-4 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดเหยาจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ จากตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารพีดีเอ เป็นเวลา 5 วัน

ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|----------|------|
| Between Groups | 14442.489 | 17 | 849.558 | 1609.689 | .000 |
| Within Groups | 38.000 | 72 | .528 | | |
| Total | 14480.489 | 89 | | | |

Duncan^a

| ตัวทำละลาย | N | Subset for alpha = .05 | | | | | | | |
|--------------|---|------------------------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Hex_3167 | 5 | .0000 | | | | | | | |
| Hex_KMC 5 | 5 | .0000 | | | | | | | |
| Hex_SRS 4 | 5 | .0000 | | | | | | | |
| Hex_SCP III | 5 | .0000 | | | | | | | |
| But_SCP III | 5 | .0000 | | | | | | | |
| Met_SCP III | 5 | .0000 | | | | | | | |
| DMSO | 5 | .0000 | | | | | | | |
| Ethy_SCP III | 5 | | 7.6000 | | | | | | |
| But_SRS 4 | 5 | | | 8.8000 | | | | | |
| But_3167 | 5 | | | 9.2000 | | | | | |
| But_KMC 5 | 5 | | | 9.4000 | | | | | |
| Met_SRS 4 | 5 | | | | 13.8000 | | | | |
| Met_KMC 5 | 5 | | | | 14.0000 | | | | |
| Met_3167 | 5 | | | | | 15.0000 | | | |
| Nystatin | 5 | | | | | | 20.6000 | | |
| Ethy_SRS 4 | 5 | | | | | | | 34.6000 | |
| Ethy_KMC 5 | 5 | | | | | | | | 36.8000 |
| Ethy_3167 | 5 | | | | | | | | 37.0000 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | .223 | .665 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | .665 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการสงวนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๕-5 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดเหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารพีดีเอ เป็นเวลา 5 วัน

ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|----------|------|
| Between Groups | 13437.200 | 17 | 790.424 | 3744.111 | .000 |
| Within Groups | 15.200 | 72 | .211 | | |
| Total | 13452.400 | 89 | | | |

Duncan^a

| ความเข้มข้น | N | Subset for alpha = .05 | | | | | | | | |
|-------------|---|------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| SCP III_1 | 5 | .0000 | | | | | | | | |
| SCP III_25 | 5 | .0000 | | | | | | | | |
| SCP III_50 | 5 | .0000 | | | | | | | | |
| Nystatin | 5 | .0000 | | | | | | | | |
| SCP III_100 | 5 | | 8.0000 | | | | | | | |
| SRS 4_1 | 5 | | | 13.0000 | | | | | | |
| KMC 5_1 | 5 | | | 13.4000 | 13.4000 | | | | | |
| 3167_1 | 5 | | | | 13.8000 | | | | | |
| DMSO | 5 | | | | | 21.0000 | | | | |
| SRS 4_25 | 5 | | | | | | 24.6000 | | | |
| 3167_25 | 5 | | | | | | 25.0000 | | | |
| KMC 5_25 | 5 | | | | | | 25.2000 | | | |
| SRS 4_50 | 5 | | | | | | | 30.8000 | | |
| KMC 5_50 | 5 | | | | | | | 31.0000 | 31.0000 | |
| 3167_50 | 5 | | | | | | | | 31.6000 | 31.6000 |
| KMC 5_100 | 5 | | | | | | | | 31.6000 | 31.6000 |
| SRS 4_100 | 5 | | | | | | | | 31.6000 | 31.6000 |
| 3167_100 | 5 | | | | | | | | | 31.8000 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | .173 | .173 | 1.000 | .054 | .494 | .062 | .538 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-6 แสดงการเปรียบเทียบจำนวนเฉลี่ยสปอร์ต่อกรัมของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสงที่ใส่สารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. โยโซเลตต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

ANOVA

| Source | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-----------------|--------------------------|----|-------------|-------|------|
| Corrected Model | 6.45E+022 ^(a) | 6 | 1.075 E+022 | 5.366 | .000 |
| Intercept | 1.62 E+022 | 1 | 1.619 E+022 | 8.081 | .007 |
| Crude | 4.86 E+022 | 3 | 1.619 E+022 | 8.081 | .000 |
| Block | 1.59 E+022 | 3 | 5.312 E+021 | 2.652 | .061 |
| Error | 8.21 E+022 | 41 | 2.003 E+021 | | |
| Total | 1.63 E+023 | 48 | | | |
| Corrected Total | 1.47 E+023 | 47 | | | |

a R Squared = .440 (Adjusted R Squared = .358)

Duncan^{a,b}

| สารสกัดหยาบ | N | Subset | |
|-------------|----|----------|--------|
| | | 1 | 2 |
| TISTR 3167 | 12 | 400.0000 | |
| KMC 5 | 12 | 471.6667 | |
| SRS 4 | 12 | 792.5000 | |
| Control | 12 | | 7E+010 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 |

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

b Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-7 แสดงการเปรียบเทียบผลของสารสกัดหยาบจาก *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ต่อการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน B₁ (ไมโครกรัมต่อกรัม) ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสง

ANOVA

| Source | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-----------------|-------------------------|----|-------------|---------|------|
| Corrected Model | 339455.070(a) | 6 | 56575.845 | 56.191 | .000 |
| Intercept | 108762.192 | 1 | 108762.192 | 108.023 | .000 |
| Block | 13876.400 | 3 | 4625.467 | 4.594 | .007 |
| Crude | 325578.670 | 3 | 108526.223 | 107.789 | .000 |
| Error | 41280.458 | 41 | 1006.840 | | |
| Total | 489497.719 | 48 | | | |
| Corrected Total | 380735.527 | 47 | | | |

a R Squared = .892 (Adjusted R Squared = .876)

Duncan^{a,b}

| สารสกัดหยาบ | N | Subset | |
|-------------|----|--------|----------|
| | | 1 | 2 |
| TISTR 3167 | 12 | .0233 | |
| KMC 5 | 12 | .0583 | |
| SRS 4 | 12 | .0733 | |
| Control | 12 | | 190.2500 |
| Sig. | | .997 | 1.000 |

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000.

b Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-8 แสดงการเปรียบเทียบผลของสารสกัดหยาบจาก *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ต่อการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน B₂ (ไมโครกรัมต่อกรัม) ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสง

ANOVA

| Source | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-----------------|-------------------------|----|-------------|---------|------|
| Corrected Model | 131961.033(a) | 6 | 21993.505 | 74.667 | .000 |
| Intercept | 42749.381 | 1 | 42749.381 | 145.132 | .000 |
| Block | 4068.367 | 3 | 1356.122 | 4.604 | .007 |
| Crude | 127892.666 | 3 | 42630.889 | 144.730 | .000 |
| Error | 12076.771 | 41 | 294.555 | | |
| Total | 186787.186 | 48 | | | |
| Corrected Total | 144037.804 | 47 | | | |

^a R Squared = .916 (Adjusted R Squared = .904)

Duncan ^{a,b}

| สารสกัดหยาบ | Subset | |
|-------------|--------|----------|
| | N | 1 |
| KMC 5 | 12 | .0258 |
| SRS 4 | 12 | .0425 |
| TISTR 3167 | 12 | .0558 |
| Control | 12 | 119.2483 |
| Sig. | | .997 |
| | | 1.000 |

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000.

b Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-9 แสดงการเปรียบเทียบผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ต่อการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน B₁ และ B₂ (ไมโครกรัมต่อกรัม) ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสง

ANOVA

| Source | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-----------------|-------------------------|----|-------------|---------|------|
| Corrected Model | 894161.559(a) | 6 | 149026.926 | 63.118 | .000 |
| Intercept | 287886.299 | 1 | 287886.299 | 121.930 | .000 |
| Block | 32576.916 | 3 | 10858.972 | 4.599 | .007 |
| Crude | 861584.643 | 3 | 287194.881 | 121.637 | .000 |
| Error | 96804.567 | 41 | 2361.087 | | |
| Total | 1278852.424 | 48 | | | |
| Corrected Total | 990966.126 | 47 | | | |

a R Squared = .902 (Adjusted R Squared = .888)

Duncan^{a,b}

| สารสกัดหยาบ | N | Subset | |
|-------------|----|--------|----------|
| | | 1 | 2 |
| TISTR 3167 | 12 | .0792 | |
| KMC 5 | 12 | .0842 | |
| SRS 4 | 12 | .1158 | |
| Control | 12 | | 309.4983 |
| Sig. | | .999 | 1.000 |

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000.

b Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

| | |
|------------------|--|
| ชื่อ-สกุล | จันทมาส จันทราช |
| วัน-เดือน-ปีเกิด | 18 มกราคม 2526 |
| ที่อยู่ | 303 หมู่ 3 ซ. สามศรีราชา ถ.จรดลสวรรค์ ต. ท่าบ่อ อ.ท่าบ่อ จ.หนองคาย 43110 |
| การศึกษา | ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| งานวิจัย | การตรวจนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตน้ำตาลในโรงงานน้ำตาลมิตรผลภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้