สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium* sp.ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684

ABILITY OF CRUDE EXTRACT OF *Penicillium* sp. ISOLATE 480519 I06 (3) ON GROWTH INHIBITION OF *Aspergillus flavus* IMI 242684

T117172

นางสาวนพรัตน์ จินดาพร

นางสาวอรพรรณ มธุรส

นายอวยชัย คงเนียม

เลขหมู่ 117172
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี 19 ก.ค. 2554

b.....
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABILITY OF CRUDE EXTRACT OF *Penicillium* sp. ISOLATE 480519 I06 (3) ON GROWTH INHIBITION OF *Aspergillus flavus* IMI 242684

Nopparat Jindaporn

Orapan Mathurot

Ouaychai Kongniam

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium* sp.ไอโซเลต 480519 I06 (3)ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684

Ability of Crude Extract of *Penicillium* sp. Isolate 480519 I06 (3) on Growth Inhibition of *Aspergillus flavus* IMI 242684

ชื่อนักศึกษา นางสาวนพรัตน์ จินดาพร 50050826

นางสาวอรพรรณ มธุรส 50050888

นายอวยชัย คงเนียม 50050889

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์	
รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์	
ผศ.ดร.จิตติ ท่าไว	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3)ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684
ชื่อนักศึกษา	นางสาวนพรัตน์ จินดาพร
	นางสาวอรพรรณ มธุรส
	นายอวยชัย คงเนียม
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2553
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์

บทคัดย่อ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ต่อการยับยั้งการการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 โดยการสกัดสารจากน้ำหมักและเส้นใยด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต บิวทานอลและเมทานอลโดยวิธี liquid-liquid extraction พบว่าสารสกัดหยาบจากน้ำหมักในชั้นเฮกเซนและเอทิลอะซิเตตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้ โดยสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ได้ดีที่สุด โดยวัดค่าเฉลี่ยความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งได้เท่ากับ 17.50 มิลลิเมตร รองลงมาคือสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าเท่ากับ 9.87 มิลลิเมตร และสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าเท่ากับ 9.75 มิลลิเมตร

คำสำคัญ: อะฟลาทอกซิน, *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp., สารสกัดหยาบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Ability of Crude Extract of *Penicillium* sp. Isolate 480519 I06 (3) on Growth Inhibition of *Aspergillus flavus* IMI 242684
Students	Nopparat Jindaporn
	Orapan Mathurot
	Ouaychai Kongniam
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2010
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Dusanee Thanaboripat

ABSTRACT

Crude extract of *Penicillium* sp. isolate 480519 I06 (3) was tested for an ability to inhibit the growth of *Aspergillus flavus* IMI 242684. The extracts from culture filtrate and cell pettet by different solvents such as hexane, ethyl acetate, butanol and methanol by liquid-liquid extraction were compared. The results show that hexane and ethyl acetate extracts from culture filtrate could inhibit fungal growth. Hexane extract at 100 mg/mL gave the highest inhibitory zone of 17.50 mm followed by ethyl acetate extract at 100 mg/mL (inhibitory zone of 9.87 mm) and hexane extract at 50 mg/mL (inhibitory zone of 9.75 mm), respectively.

Keywords : aflatoxin, *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp., crude extract

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ที่ให้ข้อเสนอแนะ ความช่วยเหลือ ตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ผู้จัดทำ ล้วนเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์ ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ และ ผศ.ดร.จิตติ ท่าไว กรรมการสอบโครงงานพิเศษ ผู้ซึ่งให้คำแนะนำ ปรึกษา ตรวจสอบ ชี้แนะในการแก้ไขโครงงงานพิเศษให้มีความเรียบร้อยสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์อำนวยความสะดวกในการเบิกเครื่องมืออุปกรณ์ต่างๆ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการต่างๆ

ขอขอบคุณพี่ๆ ปริญญาโท โดยเฉพาะพี่กิ๊ฟ เพื่อนๆทุกคนที่คอยแนะนำให้คำปรึกษารวมถึงช่วยแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา และทุกคนในครอบครัวของผู้จัดทำที่เป็นกำลังใจนับได้ว่าเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่ง

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากโครงงานพิเศษฉบับนี้ ผู้จัดทำขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

นางสาวนพรัตน์ จินดาพร

นางสาวอรพรรณ มธุรส

นายอวยชัย คงเนียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง VIII

สารบัญรูป IX

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติของสารพิษอะฟลาทอกซิน 3

2.2 เชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน 3

2.3 ชนิดและคุณสมบัติของอะฟลาทอกซิน 4

2.4 เชื้อรา *Aspergillus flavus* 6

2.5 เชื้อรา *Penicillium* sp. 8

2.6 วิธีการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษอะฟลาทอกซิน 9

2.6.1 วิธีการทางกายภาพ 9

2.6.2 วิธีการทางชีววิทยา 10

2.6.3 วิธีการทางเคมี 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6.4 การลดความเป็นพิษ 13

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อรา 14

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี 14

3.2.1 อุปกรณ์ 14

3.2.2 สารเคมี 15

3.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ 15

3.2.4 ยาปฏิชีวนะ 15

3.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) โดย slide culture 16

3.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06(3) ในอาหารชนิดต่างๆ 16

3.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในอาหาร Yeast Extract Sucrose (YES) broth 16

3.6 การสกัดสารจากเส้นใยราและน้ำหมักจากเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06(3) 17

3.7 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 18

3.8 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06(3) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยวิธี Disc Diffusion 19

3.9 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลของการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) โดย slide culture 21

4.1.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 22

4.1.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลท 480519 I06 (3) 22

4.2 ผลของการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในอาหารแข็ง CYA, PDA, MEA, SDA และ YES 23

4.2.1 ในอาหาร CYA 23

4.2.2 ในอาหาร PDA 24

4.2.3 ในอาหาร MEA 24

4.2.4 ในอาหาร SDA 24

4.2.5 ในอาหาร YES 25

4.3 ผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว YES 27

4.4 ผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06(3) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยวิธี Disc Diffusion 28

บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ 31

เอกสารอ้างอิง 32

ภาคผนวก ก 38

ภาคผนวก ข 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ค 42

ภาคผนวก ง 44

ภาคผนวก จ 45

ภาคผนวก ฉ 46

ภาคผนวก ช 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 แสดงลักษณะและน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ที่สกัดจากเส้นใยและน้ำหนักด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด 27

4.2 ผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารแข็ง SDA เป็นเวลา 5 วัน 30

จ-1 ผลการยับยั้งของสารสกัดหยาบของเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ต่อเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารแข็ง SDA 45

ฉ-1 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารแข็ง SDA เป็นเวลา 5 วัน 46

ฉ-2 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ 47

ช-1 แสดงช่วงความหนาแน่น(OD)และจำนวนของเชื้อราที่พบได้บ่อย 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ลักษณะของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 7

2.2 โคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* ในอาหาร Czapek's Dox Agar และ Conidiophores ของ *A. flavus* 8

2.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Penicillium* sp.

ก.) โคโลนีของ *Penicillium* sp. บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน ในอาหาร Czapek yeast extract agar (ซ้าย) และ Malt Extract Agar (ขวา) 9

ข.) Conidiophores ของ *Penicillium* sp. ขนาด 10 ไมโครเมตร (กำลังขยาย 1000 เท่า) 9

3.1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 18

3.2 แสดงการวางดิสก์ของสารสกัดหยาบชุดควบคุมเชิงลบและชุดควบคุมเชิงบวก ที่อยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 20

4.1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราของ *A. flavus* IMI 242684 22

4.2 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราของ *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) 23

4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในอาหารแข็ง CYA, PDA, MEA, SDA และ YES 26

4.4 แสดงบริเวณยับยั้งของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารแข็ง SDA เป็นเวลา 5 วัน 29

ก-1 แสดงลักษณะและขนาด (เท่าจริง) ของ Haemacytometer 38

ก-2 แผนภาพแสดงลักษณะ และตำแหน่ง สำหรับการตรวจนับจำนวนตัวอย่าง เช่น สปอร์ของเชื้อรา ด้วย Haemacytometer 38

ก-3 แผนภาพแสดงบริเวณที่ใช้นับจำนวน A, B, C ,D และ E (Counting areas) ตัวอย่างที่ต้องการคำนวณหาความเข้มข้น 39

ง-1 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลต 480519 I06 (3) ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 14 วัน 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

ช-1 การทำเจือจางของสารละลายจากสารสกัดหยาบ 49

ช-2 การเตรียมสารละลายจากสารลกัดหยาบลงในถาดไมโครไดลูชัน (96 wells plate) 50

ช-3 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

Aspergillus flavus เป็นเชื้อราที่มักมีการปนเปื้อนในแปลงปลูกและเมล็ดธัญพืชต่างๆ เชื้อรานี้มีการเจริญอย่างรวดเร็วและสามารถผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ซึ่งเป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดเซลล์มะเร็ง ทำให้เกิดความผิดปกติระหว่างการพัฒนาของตัวอ่อน ทำให้ตัวอ่อนมีรูปร่างผิดปกติและก่อให้เกิดกลายในมนุษย์และสัตว์ (Ellis และคณะ, 1991 และ Ricordy และคณะ, 2004) สารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin) นี้สามารถเข้าสู่ร่างกายมนุษย์และสัตว์ผ่านทางห่วงโซ่อาหารไม่เพียงการกินโดยตรงจากอาหารที่ปนเปื้อน (เมล็ดธัญพืชหรืออาหารแปรรูป) แต่รวมถึงการบริโภคเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์อื่นๆ เช่น นมที่มาจากสัตว์ที่เลี้ยงด้วยอาหารสัตว์หมัก (silage) ที่ปนเปื้อนสารพิษ

จากอันตรายของสารพิษอะฟลาทอกซินจึงทำให้มีการศึกษาถึงการควบคุมและการกำจัดสารพิษอะฟลาทอกซินกันอย่างกว้างขวาง ซึ่งมีวิธีการต่างๆ ที่หลากหลายเพื่อใช้ในการควบคุมหรือยับยั้งรวมถึงการใช้วิธีควบคุมทางชีวภาพ (Biological control) คือการใช้สารชีวภาพหรือสิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์ในการควบคุมและยับยั้งสารพิษจากเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับการยอมรับ (อนงค์,2546)

ปัจจุบันความต้องการผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเช่น สารต้านเชื้อราเป็นที่สนใจมากขึ้น เนื่องจากส่งผลต่อสิ่งแวดล้อมและร่างกายของมนุษย์ในระดับต่ำ อีกทั้งยังสามารถควบคุมการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้มากขึ้น *Penicillium* sp.ไอโซเลต 480519 I06 (3) เป็นเชื้อราชนิดหนึ่งที่น่าสนใจที่จะใช้ในการควบคุมยับยั้งการออกฤทธิ์ของอะฟลาทอกซิน เนื่องจากเชื้อรา *Penicillium* sp.ไอโซเลต 480519 I06 (3) สามารถสร้างสารบางชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* (นันท์นภัส และลัลธริมา, 2550) และจากคุณสมบัติของเชื้อรา *Penicillium* sp.ไอโซเลต 480519 I06 (3) จึงเป็นที่มาในการศึกษาครั้งนี้โดยการทดลองจะมุ่งเน้นถึงสารต่างๆ ที่สกัดได้จากเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ที่สร้างขึ้นเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 รวมถึงการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อราด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อทำการผลิตสารทุติยภูมิจากเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว Yeast Extract Sucrose (YES)

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

1.2.3 เพื่อศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถนำเชื้อราและสารสกัดของเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) มาใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

1.4.2. สามารถนำสารสกัดที่ได้มายับยั้งการเกิดเชื้อก่อโรค ทดแทนการใช้สารเคมี

1.4.3. ช่วยลดอัตราการปนเปื้อนของเชื้อราในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติของสารพิษอะฟลาทอกซิน

สารพิษจากเชื้อราได้คุกคามต่อสุขภาพของคนและสัตว์มาเป็นเวลาช้านานแล้ว โดยเฉพาะสารพิษอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ซึ่งเป็นสารพิษที่ทำให้เกิดพิษอย่างเฉียบพลัน (acute toxicity) และทำให้เกิดมะเร็ง (carcinogenicity) ที่ตับอีกด้วย

ในปี ค.ศ. 1960 ได้เกิดโรคระบาดอย่างรุนแรงแก่ฟาร์มสัตว์เลี้ยงในประเทศอังกฤษซึ่งเรียกว่า Turkey X disease เนื่องจากมีไก่งวงตายเป็นจำนวนมาก (Blount, 1961) และต่อมายังพบว่าทำให้เกิดพิษแก่ลูกเป็ดและลูกวัวอีกด้วย สาเหตุเนื่องจากมีการนำกากถั่วลิสงมาใช้เป็นส่วนผสมของอาหาร ในปีเดียวกัน Sargeant และคณะ(1961a) ได้สกัดแยกและทำให้สารพิษบริสุทธิ์ จากถั่วลิสงที่ส่งมาจากประเทศบราซิลได้ Sargeant และคณะ(1961b) ได้พบว่าเชื้อรา คือ *A. flavus* สามารถสร้างสารพิษได้ซึ่งเป็นสารพิษชนิดเดียวกันกับสารพิษจากถั่วลิสงที่เป็นพิษ ดังนั้นสารพิษที่ได้จากเชื้อราตัวนี้จึงเรียกว่า อะฟลาทอกซิน(aflatoxin) เกิดจากการรวมคำ 3 คำเข้าด้วยกันคือ *Aspergillus* (A-) *flavus* (-fla) และ toxin

2.2 เชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* เป็นเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ เช่น *A. flavus*,*A. parasiticus*, *A. nomius* (ซึ่งคาดว่าเป็นสายพันธุ์ที่กลายมาจาก *A. flavus*) และ *A. tamarii* (Kurtzman และคณะ, 1987 และ Goto และคณะ, 1997) *A. bombycis* (Peterson และคณะ, 2001) นอกจากนี้ Ito และคณะ (2001) พบว่าเชื้อรา *A. pseudotamarii* สามารถสร้างพิษอะฟลาทอกซินได้ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะพันธุกรรม รวมถึงลักษณะการสร้างสารพิษของเชื้อรา พบว่า มีความแตกต่างจาก *A. tamarii* จึงถือว่าเชื้อรา *A. pseudotamarii* เป็นเชื้อราชนิดใหม่ที่สามารถสร้างอะฟลาทอกซิน สปอร์ของเชื้อราเหล่านี้พบอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะในดิน (WHO, 1979) แม้ว่า *A. flavus* และ *A. parasiticus* จะเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ แต่ก็มีบางสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างสารพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะฟลาทอกซินได้เช่น *A. flavus columnaris* ATCC 44310 ที่ใช้ในการหมักซีอิ้ว *A. oryzae* และ *A. sojae* ที่ใช้ในการผลิตโคจิ (Wang และ Hesseltine, 1982) เป็นต้น

เชื้อราแต่ละสายพันธุ์จะมีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินแตกต่างกันทั้งในด้านชนิดและปริมาณ และพบว่าความสามารถในการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อราจะลดลงเมื่อมีการถ่ายเชื้อ (subculture) บ่อยๆ (Torres และคณะ, 1980)

เชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* จัดอยู่ใน sub-division Deuteromycotina, class Hyphomycetes(Alexopoulos และคณะ, 1996) โดยโคโลนีของเชื้อราเจริญได้ดีบนอาหาร Czapeck's solution agar ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียสและมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.8-5.6 เซนติเมตรเมื่ออายุ 2 สัปดาห์ ผิวหน้าของโคโลนีมี conidial head ที่มีสีเขียวปนเหลืองเกิดขึ้นอย่างหนาแน่น ใต้โคโลนีของเชื้อรามีสีเหลืองอ่อนเมื่อนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่ามีการสร้าง sclerotium ที่มีสีน้ำตาลเข้มจนเกือบดำรูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดประมาณ 1.0 มิลลิเมตร ส่วนของ conidial head มีรูปร่างกลม หรืออาจแตกออกเป็นแฉกที่มีลักษณะหลวมๆ ตั้งแต่ 2 แฉกขึ้นไป ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 300-400 ไมโครเมตรส่วนของ conidiophore ยาวประมาณ 700-800 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10-25 ไมโครเมตรผนังขรุขระไม่มีสี หนา 1.0 ไมโครเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางของ vesicle มีขนาด 20-60 ไมโครเมตรรูปร่างค่อนข้างกลม มี sterigma แบบ 2 ชั้น conidia มีรูปร่างกลม ผนังขรุขระสีเขียวอ่อน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5-4.5 ไมโครเมตร (อุทัยวรรณ, 2522)

การศึกษาลักษณะของเชื้อราบนอาหารสูตรธรรมชาติ เช่น corn meal agar และ malt extract agar พบว่า เชื้อรามีลักษณะอื่นๆ ใกล้เคียงกับที่เลี้ยงบนอาหาร Czapeck's solution agar แต่ conidiophores มีความผันแปรในด้านความยาวน้อยกว่า ซึ่งเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* เมื่อตรวจดูลักษณะต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ฉะนั้นการจัดจำแนกเชื้อราทั้ง 2 ชนิดจึงต้องตรวจดูในระดับ DNA (Kurtzman และคณะ, 1987)

2.3 ชนิดและคุณสมบัติของอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินเป็นสารอินทรีย์ประเภท heterocyclic compound อยู่ในกลุ่มพวกบิสฟูราโนคิวมาริน (bisfuranocoumarin) ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน อะฟลาทอกซินที่พบโดยทั่วไปตามธรรมชาติจะเป็นอะฟลาทอกซิน B_1, B_2, G_1 และ G_2 แต่ก็มีอะฟลาทอกซินอีกหลายชนิดในปริมาณน้อยได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะฟลาทอกซิน M_1, M_2, B_{2a} และ G_{2a} ซึ่งเป็นสารเมแทบอไลท์ของอะฟลาทอกซิน B_1, B_2, G_1 และ G_2 ตามลำดับ อะฟลาทอกซิน M_1 และ M_2 พบมากในน้ำนมและปัสสาวะของสัตว์ที่ได้รับอะฟลาทอกซิน ส่วนอะฟลาทอกซิน B_{2a} และ G_{2a} พบได้ในอาหารทั่วๆไปความรุนแรงของการเกิดพิษจะเป็นไปตามลำดับจากมากไปหาน้อยดังนี้คือ B_1, G_1, B_2 และ G_2 (Bressac และคณะ, 1991 และ Hsu และคณะ, 1991)

การเรียกชื่อชนิดของอะฟลาทอกซินจะดูจากการเรืองแสงบนแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin-layer chromatographic (TLC) plate) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ซึ่งคุณสมบัติข้อนี้จะใช้ในการจัดจำแนกชนิดของอะฟลาทอกซิน โดยอะฟลาทอกซิน B_1 และ B_2 เป็นพวกที่เรืองแสงสีน้ำเงิน(blue fluorescence) ส่วนอะฟลาทอกซิน G_1 และ G_2 จะเรืองแสงสีเขียว (green fluorescence)

สูตรโครงสร้างของอะฟลาทอกซินทุกชนิด จะมีหมู่ methoxy ทั้งนั้นและแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างทางโครงสร้างเพียงเล็กน้อย คือ อะฟลาทอกซิน B_1 จะแตกต่างจาก B_2 ตรงที่มีพันธะคู่ (double bond) ที่วง (ring) ที่หนึ่งเพราะชนิด B_1 แสดงพันธะทางเคมีที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated bond) แต่ชนิด B_2 มีพันธะทางเคมีที่อิ่มตัว (saturated bond) ชนิด B_1จะเหมือนกับ G_1 คือจะมีพันธะคู่ในวงที่ 1 แต่จะแตกต่างกันตรงวงที่ 5 เพราะชนิด B_1เป็น five-membered ring แต่ชนิด G_1 เป็น six-membered ring ความเหมือนและแตกต่างกันของ โครงสร้างเพียงเล็กน้อยจะมีความสำคัญในการแสดงความเป็นพิษ กล่าวคือ การที่อะฟลาทอกซินมีพันธะคู่ในวงที่หนึ่งและไม่มีกลุ่มแลคโตน (lactone group) ในวงที่ห้านั้นทำให้เกิดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันและเกิดมะเร็งในตับเพิ่มขึ้นด้วย (ธีรยุทธและชัยวัฒน์, 2524)

อะฟลาทอกซินไม่ได้เป็นสารก่อมะเร็งปฐมภูมิแต่จัดเป็นโปรมิวตาเจน (promutagen) และโปรทอกซิน (protoxin) คือจะต้องเกิดการเปลี่ยนแปลงในเมแทบอลิซึมก่อนจะเปลี่ยนเป็นสารที่มีพิษและออกฤทธิ์เป็นสารก่อกลายพันธุ์ กลไกการออกฤทธิ์ของอะฟลาทอกซินที่ทำให้เกิดมะเร็งตับเริ่มจากอะฟลาทอกซิน B_1 สามารถเข้าไปที่นิวเคลียสของเซลล์ตับไปรวมกับดีเอ็นเอด้วยพันธะโควาเลนท์ โดยจับกับดีเอ็นเอที่ไมโทคอนเดรียมากกว่าที่นิวเคลียสของเซลล์ตับและหยุดการสร้างดีเอ็นเอ จึงทำให้การสังเคราะห์โปรตีนลดลงและทำให้เซลล์ของเนื้อเยื่อตับตาย ต่อมามีการขยายตัวของนิวเคลียสและเกิดเป็นก้อนมะเร็งที่ตับ (นิธิยา และวิบูลย์, 2543) นอกจากนี้ผลการศึกษาในสัตว์ทดลองยังพบว่า

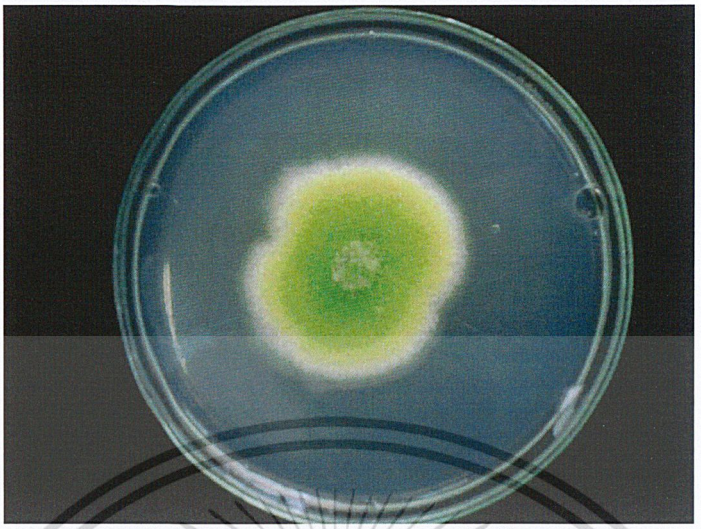
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะฟลาทอกซินสามารถทำให้เกิดมะเร็งที่ปอด ไต และลำไส้ใหญ่ แต่ตับเป็นอวัยวะเป้าหมายที่ได้รับอะฟลาทอกซินไวที่สุด และทำให้เกิดมะเร็งที่เซลล์ตับ

2.4 เชื้อรา *Aspergillus flavus*

เชื้อรา *Aspergillus* จัดอยู่ใน Kingdom Fungi Phylum Ascomycota Class Eurotiomycetes Order Eurotiales Family Trichocomaceae และ Genus *Aspergillus* เส้นใยใสมีผนังกั้นขนาด 2.5-8 ไมโครเมตร ก้านชูสปอร์หรือ conidiospore อาจสั้นหรือยาว ผิวเรียบหรือหยาบ ตั้งตรงขึ้นมาจาก foot cell ปลายของก้านชูสปอร์พองออกเป็น vesicle มี phialide รูปร่างคล้ายแจกันตั้งอยู่โดยรอบแถวเดียวเรียกว่า uniseriate phialide แต่บางสายพันธุ์มีเซลล์ที่เรียก metula รองซ้อนอีกชั้น เรียก biseriate phialide ที่ปลาย phialide มี conidia รูปกลมหรือรี อาจเรียบหรือหยาบ ต่อกันเป็นแถวยาวคล้ายโซ่เรียงรอบ *Aspergillus* แต่ละสายพันธุ์มีลักษณะ conidial head แตกต่างกัน เป็นเชื้อที่มีการเจริญเร็วภายในเวลา 3 วัน ยกเว้นบางสายพันธุ์ ระยะแรกโคโลนีเป็นสีขาวซึ่งเป็นสีของเส้นใย เมื่อมีการสร้างสปอร์โคโลนีจะมีสีต่างกันไป ตามแต่ละสายพันธุ์ เช่น เขียว เหลือง ส้ม น้ำตาล ดำ ผิวโคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ เม็ดทรายหรือปุย ใต้โคโลนีส่วนใหญ่สีขาว บางชนิดมีสีเหลืองหรือน้ำตาล เป็นเชื้อราปนเปื้อนที่ก่อโรค Aspergillosis มักเกิดกับผู้ที่ภูมิต้านทานต่ำที่ได้รับ corticosteroid ในปริมาณสูงหรือได้รับ cytotoxic drug การเกิดโรคอาจเป็นแบบก่อภูมิแพ้ ก่อโรคเฉพาะแห่งหรือติดเชื้อแบบลุกลามไปตามอวัยวะต่างๆ เช่น ที่ปอด โพรงจมูก ตา หู เล็บ ผิวหนัง เยื่อเมือกและอวัยวะภายในอื่นๆ เชื้อรา *Aspergillus* ที่รู้จักทั้งหมดมีประมาณ 175 สายพันธุ์ มีเชื้อที่สำคัญ 5 สายพันธุ์ใน 20 สายพันธุ์ที่ก่อโรค ได้แก่ *A. fumigatus, A. flavus, A. niger, A. terreus* และ *A. nidulans* (บงกชวรรณ, 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

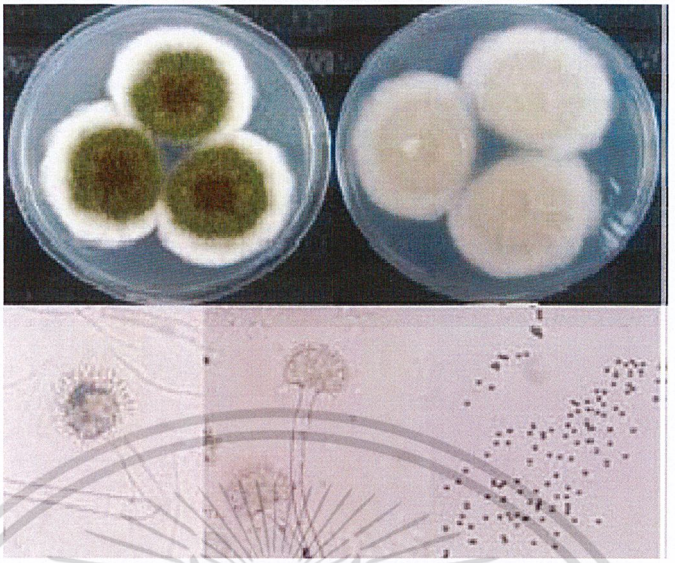


รูปที่ 2.1 ลักษณะของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

ที่มา : จันทมาส (2553)

เชื้อรา *A. flavus* (รูปที่ 2.1) มีลักษณะเด่น คือ ที่ปลายก้านชูสปอร์มี vesicle เป็นกระเปาะรูปโดม (dome-shape) ขนาด 10-40 ไมโครเมตรรอบๆ versicle มี phialide ชั้นเดียว (uniseriate) เมื่อโคโลนีแก่ขึ้น phialide จะกลายเป็นสองชั้น (biseriate) เกาะโดยรอบ vesicle คล้ายรัศมี มี conidia รูปกลม ผิวไม่เรียบเรียงต่อกันเป็นสายยาว เชื้อมีเจริญเร็วภายใน 3-5 วัน ขึ้นได้ที่อุณหภูมิห้องและที่ 37 องศาเซลเซียส ระยะแรกโคโลนีสีเหลืองอ่อน ต่อมาค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลืองหรือน้ำตาลเมื่อแก่สีจะเข้มขึ้น ลักษณะผิวโคโลนีคล้ายเม็ดทราย (granular) ใต้โคโลนีส่วนใหญ่ไม่มีสี (รูปที่ 2.2) เป็นเชื้อราก่อโรคที่ก่อโรคได้บ่อยในโพรงจมูกหรือหู อาจก่อโรคที่ปอดและอวัยวะอื่นของร่างกายได้ บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินที่เป็นสาเหตุหนึ่งของมะเร็งตับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

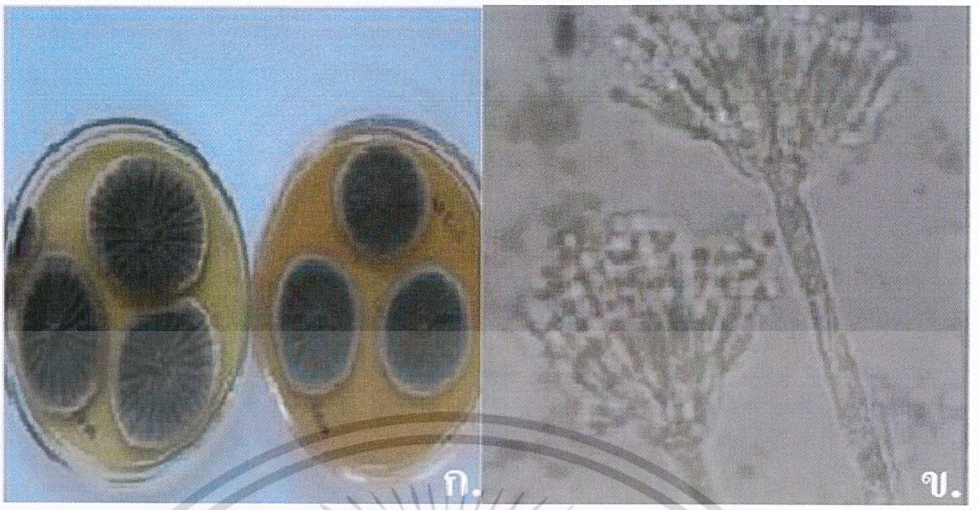


รูปที่ 2.2 โคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* ในอาหาร Czapek's Dox Agar และ Conidiophores ของ *A. flavus* ที่มา : ชลนิชา และวิเชียร (2549)

2.5 เชื้อรา *Penicillium* sp.

เชื้อรา *Penicillium* sp.(รูปที่ 2.3) จัดอยู่ใน Kingdom Fungi Phylum Deuteromycota Class Eurotiomycetes Order Moniliales Family Moniliaceae และ Genus *Penicillium* เส้นใยใส มีผนังกั้น ก้านชูสปอร์ (conidiophores) อาจแตกแขนงหรือไม่ก็ได้ ก้านที่แยกออกไปอีกชั้นเรียก metula บน metula มี phialide รูปร่างคล้ายแจกันรองรับ conidia ที่มีรูปร่างกลม ผนังเรียบหรือหยาบ เรียงต่อกันยาวคล้ายโซ่ ลักษณะโดยรวมคล้ายแปลงหรือไม้กวาด (brush) เป็นเชื้อมีเจริญเร็วภายใน 4 วัน ที่อุณหภูมิห้องแต่ไม่เจริญหรือเจริญไม่ดีที่ 37 องศาเซลเซียส โดยในระยะแรกโคโลนีสีขาวแล้วค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเขียว อมฟ้า (bluish green) ขอบสีขาวแต่มีบางสายพันธุ์ที่มีสีแตกต่างจากนี้ ผิวโคโลนีคล้ายผงแป้ง ใต้โคโลนีสีขาว แต่หากพบใต้โคโลนีเป็นสีแดงและสีซึมแพร่เข้าไปในเนื้อของอาหารวุ้นให้คำนึงถึงเชื้อ *Penicillium marneffeii* ซึ่งเป็นราสองรูปร่าง (dimorphic fungi) ที่จะต้องนำมาทดสอบการเปลี่ยนเป็น yeast from ต่อไป เป็นเชื้อราที่ปนเปื้อนที่อาจกลายเป็นราฉวยโอกาสก่อโรคกับอวัยวะต่างๆ ของร่างกายได้กว้างขวางมากโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เกิดการติดเชื้อที่กระจกตา หู ผิวหนัง ระบบหายใจ ทางเดินปัสสาวะ และลิ้นหัวใจ บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษได้ (บงกชวรรณ, 2550 และ กัญญา และคณะ, 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Penicillium* sp.

ก.) โคโลนีของ *Penicillium* sp. บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน ในอาหาร Czapek yeast extract agar (ซ้าย) และ Malt Extract Agar (ขวา)

ข.) Conidiophores ของ *Penicillium* sp. ขนาด 10 ไมโครเมตร (กำลังขยาย 1000 เท่า)

ที่มา : Petit และคณะ (2009)

2.6 วิธีการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษอะฟลาทอกซิน

แนวทางที่ดีที่สุดในการแก้ปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของเชื้อ *A. flavus* และอะฟลาทอกซิน คือ การป้องกันซึ่งต้องมีความรู้เพียงพอในการดำเนินการ รวมทั้งต้องมีการพิจารณาหาวิธีลดการปนเปื้อนของเชื้อ แนวทางในการป้องกันสารพิษจากเชื้อราในระดับฟาร์มใหญ่ๆ ควรมีการควบคุมทั้งในระยะปลูก ระยะเก็บเกี่ยว และในระยะเก็บรักษา แต่อย่างไรก็ตาม ปัญหาในเรื่องการผลิตและการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินยังคงเกิดขึ้นอยู่ แม้ว่าจะได้ทำการป้องกันแล้วก็ตาม จึงได้มีการศึกษาหาวิธีต่างๆ ในการควบคุมปริมาณอะฟลาทอกซิน (ธรรมศักดิ์, 2540) ดังต่อไปนี้

2.6.1 วิธีการทางกายภาพ

1) การคัดแยกเมล็ด (Physical separation) เช่น การคัดเลือกเมล็ดถั่วลิสงที่มีเชื้อ *A. flavus* และสารพิษปนเปื้อนอยู่ออกไป วิธีการคัดแยกเมล็ดที่เสียออกไปนี้ อาจใช้วิธีทางกล เช่น ใช้เครื่องแยกไฟฟ้า (electronic sieving) หรือใช้วิธีการคัดแยกด้วยมือ (hand sorting) วิธีดังกล่าวนี้ในเมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถั่วลิสงทำได้ดีกว่าในเมล็ดข้าวโพด เนื่องจากสามารถสังเกตเห็นเมล็ดที่มีเชื้อราขึ้นปะปนได้ชัดเจนกว่าโดยดูจากส่วนของเมล็ดที่ถูกทำลายและสีที่เปลี่ยนแปลงไป Anderson (1983) และ Breakke และคณะ(1975) พบว่า วิธีการแยกทางกายภาพนี้มีประสิทธิภาพต่ำ ถ้าเมล็ดธัญพืชมีสารพิษอะฟลาทอกซินตามธรรมชาติในปริมาณต่ำ

2) การใช้ความร้อน เช่น การใช้อุณหภูมิไอน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง สามารถลดปริมาณสารอะฟลาทอกซินได้ร้อยละ 66 และถ้าใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสจะให้ผลดียิ่งขึ้น

3) การใช้รังสี (irradiation) วิธีนี้ใช้ได้ผลในพวกเมล็ดน้ำมัน มีการทดลองใช้รังสีแกมมา พบว่า สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินได้ร้อยละ 90 แต่วิธีนี้ยังไม่เป็นที่นิยมใช้กันเพราะอาจมีผลต่อคุณค่าทางอาหาร นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง (Anderson, 1983)

Inan และคณะ (2007) ทำการศึกษาผลความเข้มข้นของก๊าซโอโซน (ozone) และเวลาการให้ก๊าซต่อการลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน B_1 ในพริกไทยแดงบดละเอียดและพริกไทยแดงสับพบว่าความเข้มข้นของโอโซนที่ร้อยละ 80 และ 93 เป็นเวลา 60 นาที ช่วยลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน B_1 ในพริกไทยแดงบดละเอียดและพริกไทยแดงสับ

Giorni และคณะ (2008) พบว่าที่ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มากกว่าร้อยละ 75 และที่ค่า a_w 0.95 และ 0.92 สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์และบนเมล็ดข้าวโพด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 21 วัน

2.6.2 วิธีการทางชีววิทยา

การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษอะฟลาทอกซินโดยวิธีทางชีวภาพเป็นการนำเอาจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ แอคติโนมัยสีท สาหร่าย และอื่นๆ มาทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อราและสารพิษอะฟลาทอกซิน หรือเปลี่ยนรูปโครงสร้างของอะฟลาทอกซินเพื่อทำให้ความเป็นพิษลดลงหรือไม่เกิดความเป็นพิษต่อสัตว์

Gelestin และBullerman (1998) พบว่าการเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* ร่วมกับ *A. niger* จะมีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินน้อยกว่าการเลี้ยงเชื้อแยกกัน เนื่องจากการอยู่ร่วมกันของเชื้อราหลายชนิดในเมล็ดธัญพืช มีการเจริญแบบแข่งขัน นอกจากนี้ยังพบจุลินทรีย์อื่นๆ ที่มีการเจริญแบบแข่งขันกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อรา *A. flavus* เช่น *Rhizopus nigricans, Saccharomyces cerevisiae, Brevibacterium linens* และ lactic acid bacteria บางชนิด เชื้อเหล่านี้สามารถลดการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus*

Thanaboripat และคณะ (2002) ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือ (*Ganogerma lucidum*) บนเมล็ดข้าวฟ่างเป็นเวลา 3 วันหรือมากกว่า ก่อนทำการปลูกเชื้อ *A. parasiticus* IMI 20256 พบว่า เส้นใยของเห็ดสามารถยับยั้งการเจริญและสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อราได้

Thanaboripat และคณะ (2007) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 16 ชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ จากการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi*) มีประสิทธิภาพดีที่สุด รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย (*Cinnamomum cassia*) และลาเวนเดอร์ (*Lavandula officinalis*) ตามลำดับ โดยใช้ความเข้มข้นที่ต่างกัน น้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาวใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อบเชยและลาเวนเดอร์ ใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และพบว่าน้ำมันจากเสม็ดขาวใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จะมีประสิทธิภาพในยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ได้อย่างสมบูรณ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ เป็นเวลา 28 วัน

2.6.3 วิธีการทางเคมี

1) การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราบางชนิด เพื่อยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* และ *A. parasiticus* เช่น ใช้สารเคมี thiabenazole หรือ benomyl ในอัตรา 10 พีพีเอ็ม ขึ้นไป หรือ captan ก็สามารถยับยั้งเชื้อได้ แต่ต้องใช้ในอัตราความเข้มข้นที่สูงกว่ามาก (Garcia และ Ilag, 1986 ; ทิพยวรรณ และธรรมศักดิ์, 2531) นอกจากนี้ยังมีการใช้สารเคมีอื่นๆ อีก เช่น mercuric chloride ($HgCl_2$) เป็นต้น การใช้สารเคมีในลักษณะนี้ไม่สามารถนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์บริโภคได้ เนื่องจากมีพิษตกค้างค่อนข้างสูง

2) การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิด ชัยวัฒน์ (2528) รายงานว่า สารสกัดจากพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ดีที่สุด ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10,000 พีพีเอ็มขึ้นไป รองลงมา ได้แก่ กานพลู พริกไทย พริกหอม ดีปลี ชะอมเทศ ดอกจันทร์ ขิงแก่ ใบกะวานโป๊ยกั๊ก และเทียนขาว ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) การใช้สารเคมีเพื่อลดความเป็นพิษ มีการวิจัยในถั่วลิสงและพวกกากเมล็ดฝ้าย เพื่อหาวิธีการลดความเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน อาทิเช่น การนำแอมโมเนียมาทดสอบเพื่อลดสารพิษอะฟลาทอกซินในข้าวโพด พบว่า แอมโมเนียสามารถลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินจากเดิมที่มีค่ามากกว่า 1,000 พีพีบีจนเหลือน้อยกว่า 10 พีพีบี การนำแอมโมเนียมาใช้อาจใช้ได้ทั้งในสภาพก๊าซและของเหลวและอาจจะใช้แอมโมเนียเดี่ยวๆหรือใช้ร่วมกับความร้อนก็ได้ (Anderson, 1983)

สารเคมีพวก hydrogen peroxide และ sodium hypochlorite ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 1.0-2.0 (มวลต่อปริมาตร) มีประสิทธิภาพในการลดสารพิษอะฟลาทอกซิน ถ้านำสารเคมีทั้งสองชนิดนี้มาใช้กับเมล็ดพืชเป็นระยะเวลานานจะไปเปลี่ยนแปลงสารพิษอะฟลาทอกซิน B_1 ให้อยู่ในรูปสารพิษอะฟลาทอกซิน B_1 -2.3 dichloride ซึ่งจัดเป็นพวกสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) และ mutagen แต่ถ้าลดความเข้มข้นของสารเคมีให้เหลือร้อยละ 1-1.5 (โดยปริมาตร) และผสม acetone ลงไปในอัตราความเข้มข้นร้อยละ 5.0 จะสามารถกำจัดสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งได้ (Anderson, 1983)

Thanaboripat และคณะ (1993) พบว่า ความเข้มข้นของเกลือที่ 80, 120 และ 160 มิลลิกรัมต่อกรัมสามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ขณะที่เกลือความเข้มข้นต่ำมีผลไปกระตุ้นให้เชื้อรามีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินมากขึ้น

Thanaboripat และคณะ (1996) ศึกษาประสิทธิภาพของสารถนอมอาหาร benzoic acid, sodium benzoate และ potassium metasulphite ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 6.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการกวนเป็นเวลา 6 วัน จากการทดลองพบว่า sodium benzoate ที่ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสามารถลดการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ร้อยละ 13 และ 35 ตามลำดับ benzoic acid ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสามารถลดการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ร้อยละ 72 และ 87 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 6.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสามารถยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่ potassium metasulphite ที่ความเข้มข้น 2.0, 6.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ได้อย่างสมบูรณ์

Reddy และคณะ (2009) พบว่า benzoic acid ที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อกิโลกรัมสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ได้ถึงร้อยละ 72 รวมถึง *A. ochraceus* ขณะที่ความเข้มข้นที่มากกว่า 1 กรัมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิโลกรัมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. niger* และ vanillin ที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อกิโลกรัมสามารถลดการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน B_1 บนเมล็ดข้าวได้อย่างสมบูรณ์

2.6.4 การลดความเป็นพิษ

จากการศึกษาของ เกศรา (2527) พบว่า สารพิษอะฟลาทอกซินจะลดลงร้อยละ 70-80 ถ้าคลุกและอบถั่วลิสงด้วยสารละลายแอมโมเนียความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 6-16 วัน แต่ข้อเสียคือ ถั่วลิสงจะมีสีคล้ำ ไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค

การลดปริมาณของสารพิษอะฟลาทอกซินในน้ำมันถั่วลิสงธรรมชาติลงให้ต่ำกว่า 20 พีพีบี สามารถทำได้โดยใช้ดินฟอกสีดูดสารพิษนี้ เมื่อกวนดินฟอกสีร้อยละ 0.3 (โดยน้ำหนัก) ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ลดปริมาณอะฟลาทอกซินจาก 76 พีพีบี เป็น 7.85 พีพีบี คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันถั่วลิสงซึ่งผ่านกรรมวิธีนี้แล้วจะมีมาตรฐานตามที่กระทรวงสาธารณสุขกำหนดไว้ การลดปริมาณอะฟลาทอกซินโดยวิธีนี้ได้ผลดีกรรมวิธีไม่ยุ่งยาก อุปกรณ์ที่ใช้ก็มีเพียงถังกวนซึ่งสร้างขึ้นได้เองและเครื่องกรองที่มีอยู่ในโรงงานผลิตน้ำมันถั่วลิสงแล้วค่าใช้จ่ายก็ไม่สูงนัก ปัจจุบันโรงงานผลิตน้ำมันถั่วลิสงได้นำกรรมวิธีนี้ไปใช้แล้ว (เกศรา, 2527)

Niyomka และ Suttajit (1988) ทดลองคลุกผลผลิตถั่วลิสงด้วยกรด benzoic, propionic และ sorbic พบว่า สารพิษอะฟลาทอกซินลดลงและเมื่อนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ เช่น ไก่ พบว่าไม่มีผลต่อดัพภะและไม่เป็นสารมะเร็งต่อ Ames'bacterial test นอกจากนี้ ทิพย์วรรณ และธรรมศักดิ์ (2531) ยังพบว่ากรด propionic หรือ sodium bisulfite ที่ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็มมีผลต่อการลดสารพิษอะฟลาทอกซินได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อรา

3.1.1 *Aspergillus flavus* IMI 242684 จาก International Mycological Institute ประเทศอังกฤษ

3.1.2 *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาจากสำนักงานปรมาณู ประเทศไทย

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 อุปกรณ์

3.2.1.1 กรวยบุชเนอร์ (buchner funnel)

3.2.1.2 ฟลาสก์บุชเนอร์ (buchner flask) จากบริษัท Duran ประเทศอังกฤษ

3.2.1.3 ขวดเก็บตัวอย่างขนาดเล็ก (vial) จากบริษัท อาศรม จำกัด ประเทศไทย

3.2.1.4 กรวยแยก (separatory funnel) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร จากบริษัท Pyrex ประเทศเยอรมัน

3.2.1.5 สไลด์นับเซลล์ (haemacytometer) จากบริษัท Boeco ประเทศเยอรมันนี

3.2.1.6 กระดาษกรองวัทแมนเบอร์ 1 และเบอร์ 4 จากบริษัท Whatman ประเทศอังกฤษ

3.2.1.7 เวอร์เนีย ดิจิตอล (vernier digital) จากบริษัท BEC ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.1.8 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) จากบริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น

3.2.1.9 ไมโครปิเปตต์ (micro pipette) ขนาด 50-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร จากบริษัท Gilson ประเทศอเมริกา

3.2.1.10 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (balance) รุ่น AR2140 จากบริษัท Ohaus ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.1.11 เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) รุ่น D-91126

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Schwabach ของบริษัท Heidolph ประเทศอังกฤษ

3.2.1.12 ตู้ปลอดเชื้อ (larmina air flow) รุ่น ISSCO BTV 123 จากบริษัท International Scientific Supply จำกัด ประเทศไทย

3.2.1.13 หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) รุ่น HA-300 HIV จากบริษัท Hirayama ประเทศญี่ปุ่น

3.2.1.14 คอร์ก บอเรอร์ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 และ 7 มิลลิเมตร

3.2.1.15 แผ่นดิสก์ (Paper Disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

3.2.1.16 เวอร์เนียร์ดิจิตอล (Digital vernier calipers) จากบริษัท BEC ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.2 สารเคมี

3.2.2.1 เมทานอล เกรดวิเคราะห์ จากบริษัท MERCK ประเทศเยอรมันนี

3.2.2.2 เอทิลอะซิเตต เกรดวิเคราะห์ จากบริษัท MERCK ประเทศเยอรมันนี

3.2.2.3 บิวทานอล เกรดวิเคราะห์ จากบริษัท MERCK ประเทศเยอรมันนี

3.2.2.4 เฮกเซน เกรดวิเคราะห์ จากบริษัท MERCK ประเทศเยอรมันนี

3.2.2.5 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide; DMSO) เกรดวิเคราะห์ จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.2.6 ไดคลอโรมีเทน เกรดวิเคราะห์ จากบริษัท Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย

3.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.3.1 Potato Dextrose Agar (PDA)

3.2.3.2 Potato Dextrose Broth (PDB)

3.2.3.3 Yeast Extrac Sucrose broth (YES)

3.2.3.4 Malt Extract Agar (MEA)

3.2.3.5 Sabourand Dextrose Broth (SDB)

3.2.3.6 Czapek Yeast Extract Agar (CYA)

3.2.4 ยาปฏิชีวนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4.1 นิสตาติน (Nystatin) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และ เชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) โดย slide culture

ทำการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน นำ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิลิตร เจาะบริเวณปลายเส้นใย (mycelial disc) โดยวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน (จันทมาส, 2553) และอีกส่วนนำไปทำ slide culture (Harris, 1986) เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตลักษณะ เส้นใย สีของเส้นใย สปอร์และขนาด phialide

3.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และ เชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในอาหารชนิดต่างๆ

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และ *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) เขี่ยเชื้อราจากอาหารแข็ง PDA ไปแตะลงตรงกลางจานอาหารแข็ง PDA, MEA, CYA, SDB และ YES บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการวัดขนาดของโคโลนีของเชื้อราและบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เกิดขึ้น

3.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว Yeast Extract Sucrose (YES)

เตรียมอาหารเหลว YES broth (ภาคผนวก ค) ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 90 มิลลิลิตร (นันท์นภัส และลัลธริมา , 2550) จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

นำ mycelial disc ของเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร ใส่ลงในอาหารเหลว YES ที่เตรียมไว้นำไปบ่มที่สภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบเวลาการบ่มทำการกรองน้ำหมักเชื้อรา ด้วยกระดาษกรองวัทแมนเบอร์ 4 เพื่อแยกส่วนน้ำหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

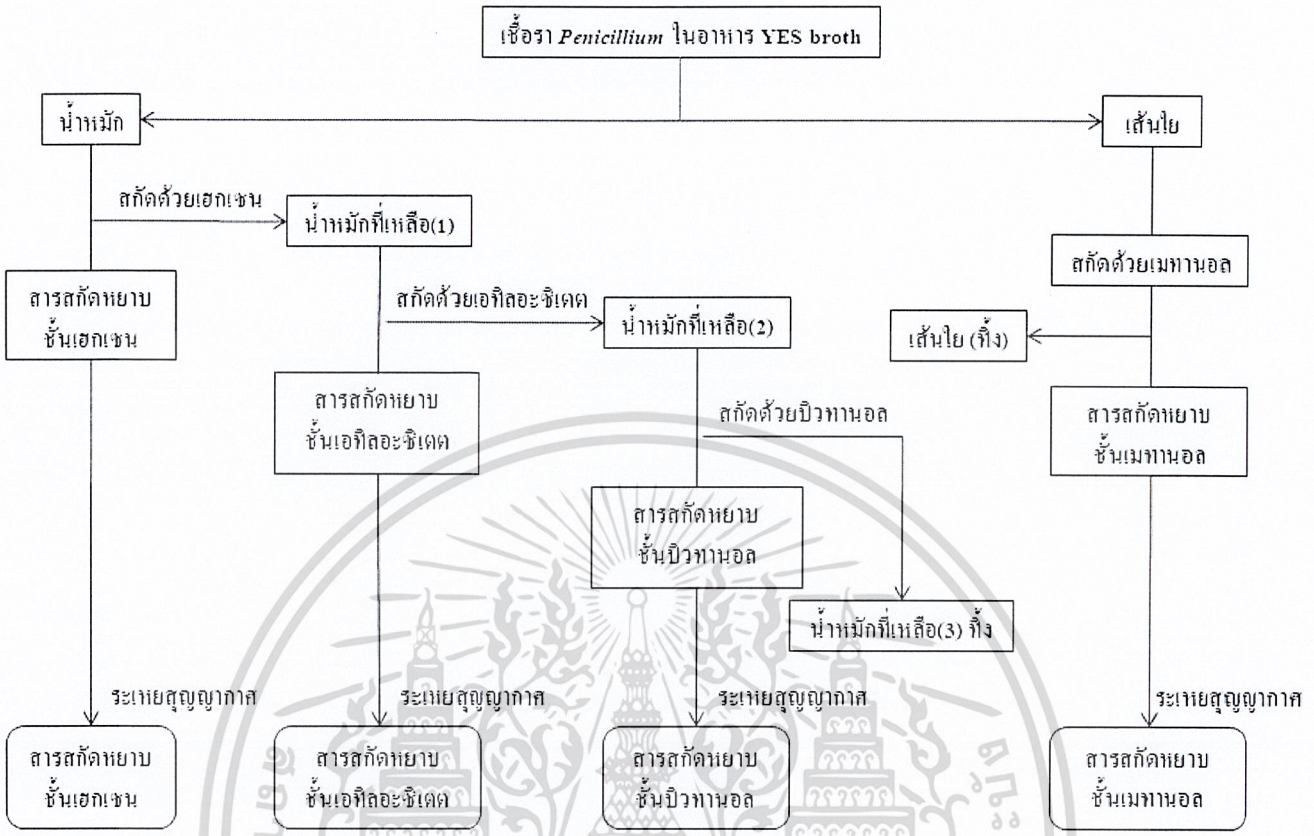
และเส้นใยออกจากกัน นำเส้นใยราที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น(ฆ่าเชื้อแล้ว) เพื่อล้างน้ำหมักและสารทุติยภูมิที่อยู่ในน้ำหมักออกจากเส้นใยรา นำเส้นใยราที่ได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทำการสกัด (ดัดแปลงจากวิธีของจันทมาส, 2553)

3.6 การสกัดสารจากเส้นใยราและน้ำหมักจากเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3)

ทำการสกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction โดยนำเส้นใยราที่ได้จากข้อ 3.5 ไปบดด้วยไนโตรเจนเหลว สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที กรองผ่านกระดาษวัทแมนเบอร์ 1 ก่อนนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Vizcaino และคณะ, 2005) สำหรับน้ำหมักที่ได้จากข้อ 3.5 นำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และบิวทานอล ตัวทำละลายเฮกเซนและเอทิลอะซิเตตใช้อัตราส่วน 1 ต่อ 1 (น้ำหมักต่อตัวทำละลาย) สกัดจำนวน 3 ครั้ง ก่อนนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ส่วนตัวทำละลายบิวทานอลใช้อัตราส่วน 1 ต่อ 1 (น้ำหมักต่อตัวทำละลาย) สกัดจำนวน 3 ครั้ง ก่อนนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ โดยเติมน้ำลงไปในฟลาสก์รูปแพร์ (pear shape) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 (น้ำต่อตัวทำละลายที่มีสารสกัดละลายอยู่) ระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงวิธีการจาก Se-Gul และคณะ, 2009)บันทึกน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบ (crude extract) จากเส้นใยราและน้ำหมัก เก็บสารสกัดหยาบไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) จนแห้งและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำสารสกัดไปทำการทดสอบต่อไป ขั้นตอนการสกัดสารดังสรุปไว้ในรูปที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

117172



รูปที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

3.7 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

เลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในอาหารแข็ง PDA ผิวหน้าเอียง (slant) ให้เชื้อมีการเจริญ 10-14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ทำสารละลายสปอร์โดยใส่ 10 มิลลิลิตรของสารละลาย tween 80 ร้อยละ 0.05 จากนั้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ขูดสปอร์ให้หลุดออกจากผิวหน้าอาหาร แล้วกรองสารละลายที่ได้ผ่านชุดกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทำการนับสารละลายสปอร์โดยใช้สไลด์นับเซลล์ (haemacytometer) ให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (Nguefack และคณะ, 2004) นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยวิธี Disc Diffusion

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่มีผลต่อการยับยั้งของเชื้อรา ดัดแปลงตามวิธีของปิยะวดี (2550) เป็นการทดสอบโดยวิธี Disc Diffusion ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ก. การเตรียมเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

นำสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่มีความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ผสมในอาหาร SDA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่หลอมเหลวแล้วโดยมีอุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส เทลงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 เซนติเมตร ที่มีอาหาร SDA ปริมาตร 20 มิลลิลิตรซึ่งแข็งตัวแล้ว จากนั้นรอให้ผิวหน้าของอาหารแห้ง

ข. การเตรียมแผ่นดิสก์ของสารสกัดหยาบ

ละลายสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium* sp.ไอโซเลต 480519 I06 (3) ด้วยเมทานอล ทำการเจือจาง (serial dilution) ให้มีความเข้มข้น 1, 12.5, 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายของสารสกัดหยาบในแต่ละชั้นที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยอดลงตรงกลางของแผ่นดิสก์ที่ปราศจากเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้แห้ง

ค. การเตรียมสารละลายชุดควบคุมเชิงบวก (Positive control)

ใช้นิสตาติน (Nystatin) เป็นสารละลายชุดควบคุมเชิงบวก โดยละลายนิสตาตินด้วยเมทานอลเจือจางให้มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ง. การเตรียมสารละลายชุดควบคุมเชิงลบ (Negative control)

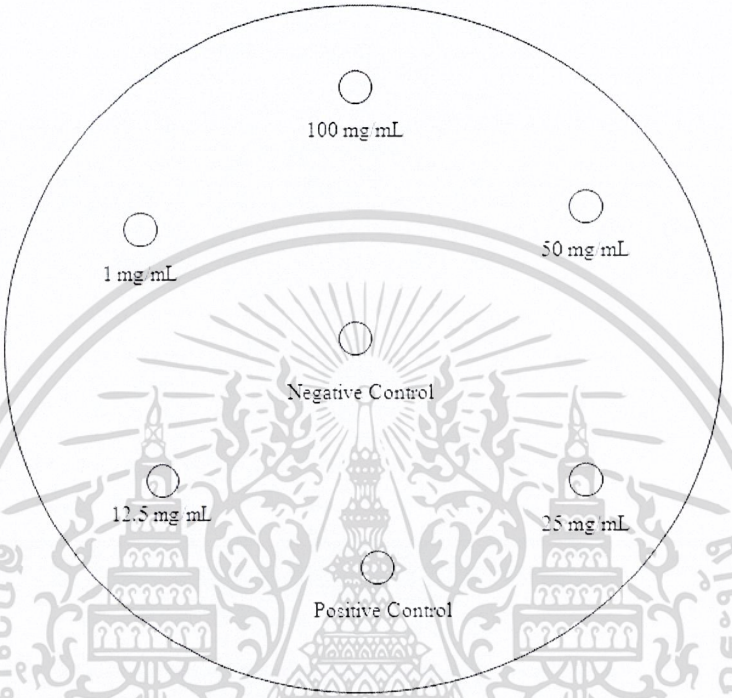
ใช้เมทานอล เป็นสารละลายชุดควบคุมเชิงลบ

จ. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

ใช้ปากคีบ (forceps) คีบแผ่นดิสก์ของสารสกัดหยาบ สารละลายชุดควบคุมเชิงบวกและสารละลายชุดควบคุมเชิงลบ วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เตรียมไว้จากข้อ ก. โดยให้สารสกัดหยาบ ชุดควบคุมเชิงลบและชุดควบคุมเชิงบวกอยู่ในจานอาหารเดียวกัน (รูปที่3.2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10-20 นาที เพื่อให้เกิดการแพร่กระจายของสารไปสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร) ด้วยเวอร์เนียร์ดิจิตอล (Digital vernier calipers)



รูปที่ 3.2 แสดงการวางดิสก์ของสารสกัดหยาบ ชุดควบคุมเชิงลบและชุดควบคุมเชิงบวกที่อยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

3.9 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลอง 3.8 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P \leq 0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows (Statistical Package for the Social Sciences) เวอร์ชั่น 17.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

งานวิจัยนี้ได้นำเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาจากสำนักงานปรมาณู ประเทศไทยมาทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684

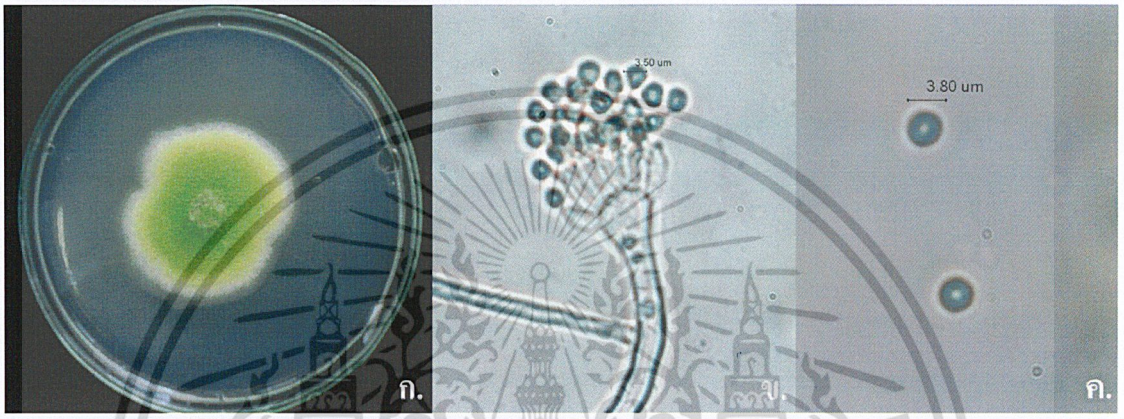
นันท์นภัส และลัลธริมา (2550) ทำการศึกษาเรื่อง การควบคุมการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินโดย *Pennicillium* และ *Trichoderma* พบว่า การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. paraciticus* โดย *Pennicillium* และ *Trichoderma* ในอาหารเหลว Malt Extract Broth (MEB), Potato Dextrose Broth (PDB) และ Yeast Extract Broth (YES) ที่สภาวะนิ่งและเขย่า พบว่าเชื้อราแต่ละไอโซเลต สามารถเจริญและสร้างสารยับยั้งในอาหารแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรามีผลต่อการเจริญและสร้างสารยับยั้งด้วยเช่นกัน ซึ่งพบว่า เชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุดเนื่องจากอาหารเหลว YES มีสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) และที่สภาวะนิ่งเชื้อราสามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีกว่าที่สภาวะเขย่า เนื่องจากที่สภาวะเขย่าเส้นใยของเชื้อราเกิดการแตกหัก จึงทำให้เชื้อรานำสารอาหารที่มีอยู่ในอาหารเหลวนั้นไปใช้ในการเจริญมากกว่าการนำไปสร้างสารยับยั้ง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงคัดเลือกเชื้อราดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

4.1 ผลของการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) โดย slide culture

จากการศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และ *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นจึงนำมาสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะของเชื้อราดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.1. ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โคโลนีมีสีเขียว มีการเจริญรวดเร็ว สร้างสปอร์เป็นจำนวนมาก สปอร์มีรูปร่างกลม conidiophore ไม่แตกแขนง ด้านบนของ conidiophores มี vesicle เป็นกระเปาะบวม ส่วนปลายของ vesicle มี phialide งอกออกมาเต็ม และส่วนปลายของ vesicle มี conidia งอกออกมารูปร่างกลม (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราของ *A. flavus* IMI 242684

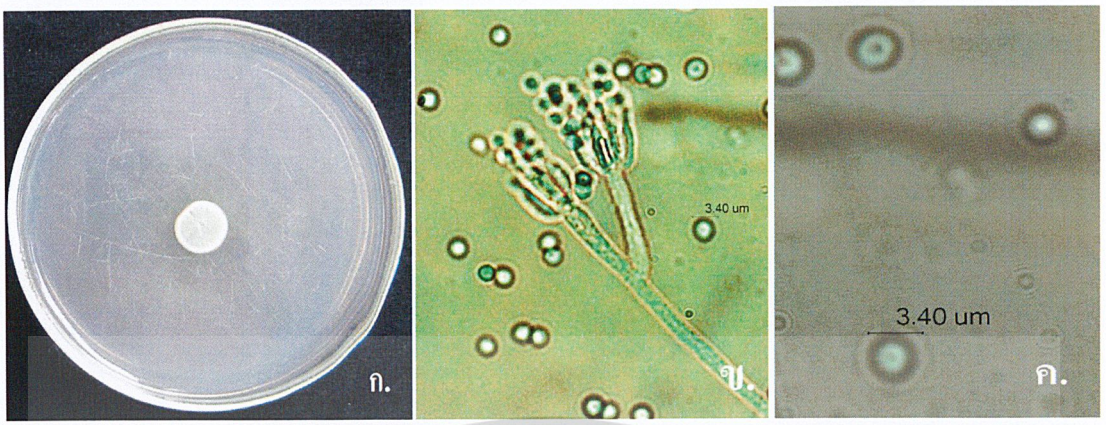
ก. โคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารพีดีเอ อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

ข. conidiophore และ phialide กำลังขยาย 1000 เท่า

ค. conidia กำลังขยาย 1000 เท่า

4.1.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Penicillium* sp.ไอโซเลท 480519 I06 (3) โคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่สีเขียว มีการเจริญค่อนข้างช้า สร้างสปอร์จำนวนน้อย โดยสปอร์มีรูปร่างกลม conidiophore ไม่แตกแขนง มี phialide ที่ปลายของ conidiophore ซึ่งมีลักษณะคล้ายแปรง มีการสร้าง conidia บน phialide ซึ่ง conidia จะเรียงต่อเป็นเส้นสาย (รูปที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราของ *Penicillium* sp. ไอโซเลท 480519 I06 (3)

ก. โคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วันที่อุณหภูมิห้อง

ข. conidiophore และ phialide กำลังขยาย 1000 เท่า

ค. conidia กำลังขยาย 1000 เท่า

4.2 ผลของการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และ เชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในอาหารแข็ง CYA, PDA, MEA, SDA และ YES

จากการศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และ เชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) โดยการเลี้ยงในอาหารแข็ง 5 ชนิด เป็นเวลา 7 วัน พบลักษณะการเจริญของเชื้อรา (รูปที่ 4.3) ดังนี้

4.2.1 ในอาหาร CYA

พบว่าเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 เจริญได้ไม่ดี เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 29 มิลลิเมตร โคโลนีมีขนาดเล็ก เส้นใยมีสีขาว สร้างสปอร์สีเขียว สปอร์ขึ้นไม่หนาแน่นและเชื้อรา *Penicillium* sp.ไอโซเลต 480519 I06 (3) เจริญได้ช้า เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 16 มิลลิเมตร โคโลนีเจริญเป็นวงขนาดเล็ก มีลักษณะคล้ายกำมะหยี่สีเขียว ตรงกลางมีสีขาว สร้างสปอร์เล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากงานวิจัยของ Petit และคณะ (2009) พบว่า โคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร CYA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โคโลนีจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 30-36 มิลลิเมตร ซึ่งบริเวณรัศมีที่อยู่บนผิวหน้าของอาหารเป็นสีดำ คล้ายลักษณะของ sclerotia และจะอยู่กันอย่างหนาแน่น บริเวณแนวรัศมี ซึ่งประกอบด้วยเส้นใยราและอยู่ในระดับต่ำกว่าปกติ เส้นใยมีสีขาว conidia ก็มีปริมาณมากและเป็นสีเหลืองอ่อนหรือสีเทา

4.2.2 ในอาหาร PDA

พบว่าเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 เจริญได้ดี เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 25 มิลลิเมตร โคโลนีมีขนาดใหญ่ เส้นใยมีสีขาว สร้างสปอร์สีเขียว มีสปอร์ขึ้นหนาแน่น และเชื้อรา *Penicillium* sp.ไอโซเลต 480519 I06 (3) เจริญได้ช้า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 11 มิลลิเมตร โคโลนีมีขนาดเล็ก ลักษณะคล้ายกำมะหยี่ผิวเรียบสีเขียว สร้างสปอร์เล็กน้อย

4.2.3 ในอาหาร MEA

พบว่า เชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 เจริญได้ดี เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ประมาณ 40 มิลลิเมตร โคโลนีมีขนาดใหญ่ เส้นใยมีสีขาวฟู สร้างสปอร์สีเหลือง มีสปอร์ขึ้นหนาแน่น และเชื้อรา *Penicillium* sp.ไอโซเลต 480519 I06 (3) เจริญได้ช้า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 17 มิลลิเมตร โคโลนีมีขนาดเล็ก มีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ โคโลนีมีสีขาวตรงกลาง และขอบด้านนอก มีสีเขียว มีรอยหยักตรงกลางและขอบของโคโลนี สร้างสปอร์เล็กน้อย

จากการทดลองของ Petit และคณะ (2009) พบว่า โคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร MEA ที่อุณหภูมิ25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันโคโลนีจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 32-35 มิลลิเมตร

4.2.4 ในอาหาร SDA

พบว่าเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 เจริญได้ดี เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 42 มิลลิเมตร โคโลนีมีขนาดใหญ่ มีเส้นใยสีขาว ลักษณะฟู สร้างสปอร์สีเหลืองอมเขียว มีสปอร์ขึ้นหนาแน่นและเชื้อรา *Penicillium* sp.ไอโซเลต 480519 I06 (3) เจริญได้ดี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ

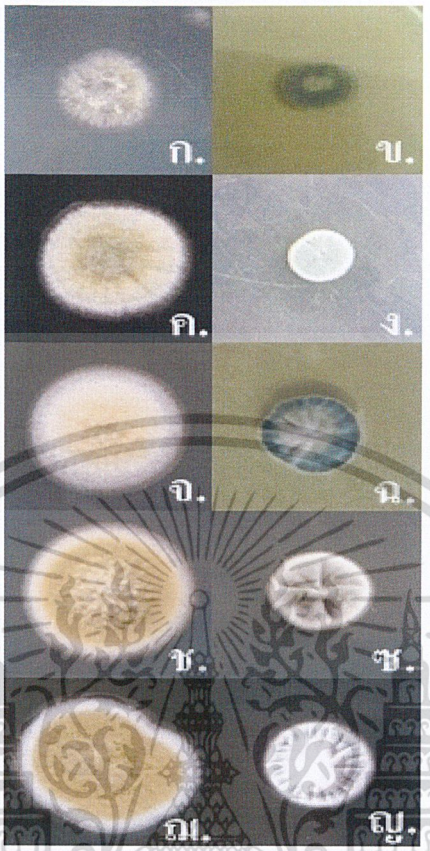
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคโลนีประมาณ 11 มิลลิเมตร โคโลนีมีขนาดเล็ก มีลักษณะคล้ายกำมะหยี่สีเขียว มีรอยหยักบนโคโลนี สร้างสปอร์เล็กน้อย

4.2.5 ในอาหาร YES

พบว่าเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 เจริญได้ดี เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 63 มิลลิเมตร โคโลนีมีขนาดใหญ่ เส้นใยมีสีขาว ลักษณะฟู สร้างสปอร์สีเหลืองอมเขียว สปอร์ขึ้นหนาแน่นมากและเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) เจริญได้ดี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 19 มิลลิเมตร โคโลนีมีขนาดเล็ก มีลักษณะคล้ายกำมะหยี่สีขาว และขอบโคโลนีมีสีเขียว มีรอยหยักบนโคโลนี มีสปอร์เล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในอาหารแข็ง CYA, PDA, MEA, SDA และ YES

ก.) เชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในอาหาร CYA

ข.) เชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในอาหาร CYA

ค.) เชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในอาหาร PDA

ง.) เชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในอาหาร PDA

จ.) เชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในอาหาร MEA

ฉ.) เชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในอาหาร MEA

ช.) เชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในอาหาร SDA

ซ.) เชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในอาหาร SDA

ฌ.) เชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในอาหาร YES

ญ.) เชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในอาหาร YES

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว YES

จากการศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* sp.ไอโซเลต 480519 I06 (3)โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 14 วัน พบลักษณะการเจริญของเชื้อราดังนี้ เชื้อรามีการสร้างเส้นใย สีขาวขุ่นและมีรอยหยักมาก เกาะอยู่รวมกันเป็นขนาดใหญ่ ลอยอยู่บนผิวหน้าอาหาร แต่ไม่มีการสร้างสปอร์เกิดขึ้น (ภาคผนวก ง) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของนันท์นภัส และลัลธริมา (2550) ได้ทำการศึกษาเรื่องการควบคุมการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินโดย *Pennicillium* และ *Trichoderma*

จากการศึกษาพบว่า การสกัดสารจากเส้นใยราและน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* sp.ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในอาหารเหลว YES เป็นเวลา 14 วัน พบว่า ลักษณะของสารสกัดหยาบในแต่ละตัวทำละลายไม่แตกต่างกันคือ มีสีน้ำตาลเข้มลักษณะเหนียวหนืด ยกเว้นในชั้นบิวทานอลที่สารสกัดหยาบที่ได้มีสีเหลืองส้มและได้ปริมาณสารสกัดหยาบมากกว่าในชั้นอื่นๆ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะและน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium* sp.ไอโซเลต 480519 I06 (3) ที่สกัดจากเส้นใยและน้ำหนักด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด

ตัวทำละลาย	น้ำหนัก (กรัมต่อลิตร)	อัตราร้อยละของผลได้* (% yield)	ลักษณะสารสกัดหยาบ
เมทานอล	0.3227	32.27	สีน้ำตาลเข้ม ลักษณะเหนียวหนืด
เฮกเซน	0.0949	9.49	สีน้ำตาลเข้ม ลักษณะเหนียวหนืด
เอทิลอะซิเตต	0.3389	33.89	สีน้ำตาลเข้ม ลักษณะเหนียวหนืด
บิวทานอล	9.8732	987.32	สีเหลืองส้ม ลักษณะเหนียวหนืด

อัตราร้อยละของผลได้* (% yield) คำนวณได้ดังนี้

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบ (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของสารตั้งต้น(Substrate)}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium* sp.ไอโซเลต 480519 I06(3) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยวิธี Disc Diffusion

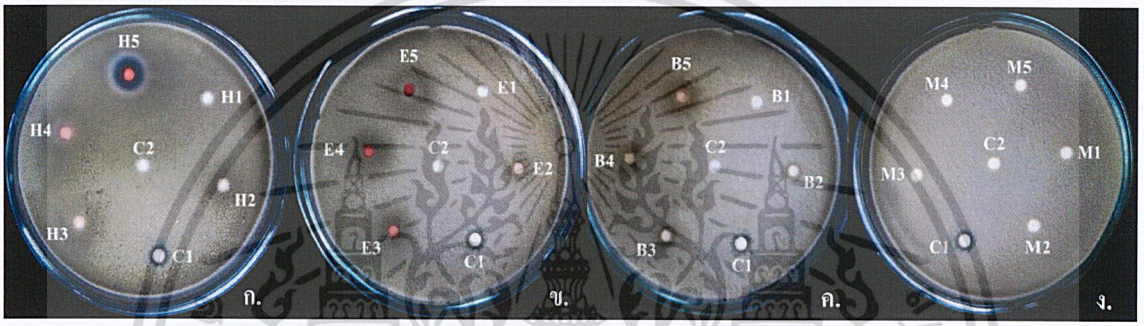
จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยที่สกัดด้วยเมทานอลและสารสกัดหยาบจากน้ำหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตตและบิวทานอล พบว่าสารสกัดหยาบจากน้ำหมักในชั้นเฮกเซนและเอทิลอะซิเตต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684ได้ โดยสารสกัดหยาบจากน้ำหมักในชั้นเฮกเซน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีกว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตต ส่วนสารสกัดหยาบในชั้นบิวทานอลและสารสกัดหยาบจากเส้นใยที่สกัดด้วยเมทานอลไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง (รูปที่ 4.4) กล่าวได้ว่า สารสกัดหยาบจากน้ำหมักมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ได้ ในขณะที่สารสกัดหยาบจากเส้นใยไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง แสดงว่า เชื้อรา *Penicillium* sp.ไอโซเลต 480519 I06 (3) มีการสร้างสารต่อต้านเชื้อราและปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของนันท์นภัส และลัลธริมา (2550) ที่พบว่า เชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลต 480519 I06 (3) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่งสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ได้ รวมถึงงานวิจัยของจันทมาส (2553) ที่พบว่า สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อรา *Trichoderma* spp. TISTR 3167, KMC 5 และ SRS ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ได้

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยวิธี Disc Diffusion โดยสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1, 12.5, 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นิสตาตินที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กรรมวิธีควบคุมเชิงบวก) และตัวทำละลายเมทานอล (กรรมวิธีควบคุมเชิงลบ) พบว่า ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด โดยวัดค่าเฉลี่ยความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งได้เท่ากับ 17.50 มิลลิเมตร รองลงมาคือสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตมีค่าเท่ากับ 9.87 มิลลิเมตร และที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนมีค่าเท่ากับ 9.75 มิลลิเมตร ส่วนสารสกัดหยาบนอกเหนือจากที่กล่าวมาที่ความเข้มข้นต่างๆ และตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมทานอล (กรรมวิธีควบคุมเชิงลบ)ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ได้ (ตารางที่ 4.2)

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดย Duncan's multiple rang test (DMRT) พบว่า สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนที่ความเข้มข้น 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.2) ขณะที่สารสกัดหยาบในชั้นบิวทานอลและเมทานอลไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งทุกระดับความเข้มข้น



รูปที่ 4.4 แสดงบริเวณยับยั้งของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารแข็ง SDA เป็นเวลา 5 วัน

ก.) สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน (H)

ข.) สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตต (E)

ค.) สารสกัดหยาบในชั้นบิวทานอล (B)

ง.) สารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล (M)

(C1) กรรมวิธีควบคุมเชิงบวก (นิสตาติน)

(C2) กรรมวิธีควบคุมเชิงลบ (เมทานอล)

(1) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

(2) ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

(3) ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

(4) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

(5) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium* sp.ไอโซเลต 480519 I06 (3) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารแข็ง SDA เป็นเวลา 5 วัน

สารสกัดหยาบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)*
เฮกเซน	1	00.00 ± 0.00^{d}
	12.5	00.00 ± 0.00^{d}
	25	00.00 ± 0.00^{d}
	50	9.75 ± 1.70^{c}
	100	17.50 ± 1.91^{a}
เอทิลอะซิเตต	1	00.00 ± 0.00^{d}
	12.5	00.00 ± 0.00^{d}
	25	00.00 ± 0.00^{d}
	50	00.00 ± 0.00^{d}
	100	9.87 ± 1.31^{bc}
บิวทานอล	1	00.00 ± 0.00^{d}
	12.5	00.00 ± 0.00^{d}
	25	00.00 ± 0.00^{d}
	50	00.00 ± 0.00^{d}
	100	00.00 ± 0.00^{d}
เมทานอล	1	00.00 ± 0.00^{d}
	12.5	00.00 ± 0.00^{d}
	25	00.00 ± 0.00^{d}
	50	00.00 ± 0.00^{d}
	100	00.00 ± 0.00^{d}
นิสตาติน	0.05	10.75 ± 0.95^{b}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันที่แตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ($P \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

จุดมุ่งหมายของการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยพบว่าสารสกัดจากเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนและเอทิลอะซิเตต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ได้

เมื่อนำสารสกัดหยาบในแต่ละตัวทำละลายมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารแข็ง SDA ด้วยวิธี Paper Disc Diffusion พบว่า สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ได้ดีที่สุด

ข้อเสนอแนะ

ควรทดสอบฤทธิ์ทางด้านชีวภาพทางด้านอื่นๆ ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) เช่นการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสายพันธุ์อื่นๆ เซลล์แบคทีเรีย เซลล์ยีสต์ และเซลล์มะเร็ง เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กัญญา ปรีชาศุทธิ์, ขจรศักดิ์ ตระกูลบัว และบงกชวรรณ สุตาพาหะ. 2547. **เชื้อราที่สำคัญทางการแพทย์** เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เกศรา นุตาลัย. 2527. **งานวิจัยเกี่ยวกับแอลฟลาทอกซินในถั่วลิสง รายงานความก้าวหน้าปี 2526**. รายงานการสัมมนาเรื่อง งานวิจัยถั่วลิสง ครั้งที่ 3 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน 19-21 เมษายน 2527.

จันทมาส จันทราช. 2553. "ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดถั่วลิสง." วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

ชลนิชา ทองขลิบ และวิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2549. "เชื้อรา *Aspergillus* ที่แยกจากประเทศไทยและความสามารถในการผลิตเอนไซม์อาหารสัตว์." โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ชัยวัฒน์ โตอนันต์. 2528. "อิทธิพลของพืชสมุนไพรและเครื่องเทศบางชนิดที่มีผลต่อการเจริญของรา *Aspergillus* " วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ทิพย์วรรณ จตุมานัสศิริ และธรรมศักดิ์ สมมาตย์. 2531. "การควบคุมเชื้อและการลดสารพิษแอฟลาทอกซินด้วยสารเคมีในถั่วลิสงป่น." **รายงานการสัมมนาเรื่องงานวิจัยถั่วลิสง** ครั้งที่ 7 ณ โรงแรมซีบรีซ พัทยา ชลบุรี 16-18 มีนาคม 2531.

ธีรยุทธ์ กลิ่นสุคนธ์ และชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว. 2524. **สารพิษจากเชื้อราที่ทำให้เกิดมะเร็งของตับ** กรุงเทพฯ.

ธรรมศักดิ์ สมมาตย์. 2540. **โรคถั่วลิสง (Peanut diseases)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

นันท์นภัส สรรพกิจจานนท์ และลัลธริมา พรมมิ. 2550. "การควบคุมการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินโดย *Penicillium* และ *Trichoderma*." โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิธิยา รัตนาปนนท์ และวิบูลย์ รัตนาปนนท์. 2543. **สารพิษในอาหาร**. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

บงกชวรรณ สุตะพาหะ. 2550. **การตรวจพิสูจน์เชื้อราก่อโรคทางห้องปฏิบัติการ**. คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ปิยะวดี เจริญวัฒนา. 2550. "ประสิทธิภาพของสารสกัดพลูในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus*." **วารสารวิทยาศาสร์การเกษตร.** 38(6): 50-53.

อนงค์ บิณฑวิหค. 2546. **สารพิษจากเชื้อรา.** โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

อุทัยวรรณ แสงวนิช. 2522. "การตรวจหา *Aspergillus* ที่สร้าง aflatoxin ในการผลิตผลเกษตร วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Alexopoulos, C.J. *et al*. 1996. **Introductory mycology.** 4th ed. New York : Jonh Wiley and Sons.

Anderson, R.A. 1983. "Detoxification of aflatoxin-contaminated corn." (Diener, U. L., Asquith, R. L. and Dickens, J. W. eds.). Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. So. Coop. Ser. Bull. 279. Alabama.

Blount, W.R. 1961. "Turkey X disease." **Turkey.** 9 : 52.

Breakke, O. L., Peplinski, A. J. and Griffin, E. L. Jr. 1975. "Cleaning trials for corn containing aflatoxin." **Cereal Chem**. 52 : 198-204.

Bressac, J. P. *et al*. 1991. "Selective G to T mutation of *p*53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa." **Nature.** 350 : 429-430

Ellis, W.O., Smith, J.P. and Simson, B.K., 1991. " Aflatoxin in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection and methods of control." **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 30 : 403– 439.

Garcia, R. P. and Ilag, L. L. 1986. " Aflatoxin in the Philippines." In Batan, E. L. ed. Aflatoxin in Maize. A Proceeding of the Workshop. Mexico.

Gelastin, M. and Bullerman, L. 1998. "Inhibition of aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by *Bacillus pumilis*." **Mycopatologia.** 40 : 163-169.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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., Y., Peterson, S.W. and Wicklow, D.T. 1997. "Mycotoxin production ability of *Aspergillus tamarii.*" **Mycotoxins**. 44 : 17-20.

Harris, J.L. 1986. " Modified method for fungal slide culture." **Journal of Clinical Microbiology**. 24(3) : 460-461.

Hsu, I.C. *et al.*1991. "Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas." **Nature.** 350 : 427-428.

Inan, F., Pala, M. and Doymaz, I. 2007. " Use of ozone in detoxification of aflatoxin B_1 in red pepper." **Journal of Stored Products Research.** 43 : 425-429.

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

Kurtzman, C. P., Horn, B. W. and Hesseltine, C. W. 1987. " *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari.*" **Journal of Microbiology.** 53 : 147-158.

Niyomka, P. and Suttajit, M. 1988. " Inhibitory effect of benzoic propionic, and sorbio acids on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in peanut and corn." Proceedings of the 7th IUPAC. Tokyo. 83-84.

Nguefack, J., Leth, V., Zollo, A.P.H. and Mathur, S.B. 2004. " Evaluation of five essential oils from aromatic plant of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi." **International Journal of Food Microbiology**. 94 : 329-334.

Peterson, S.W., Ito, 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Petit, P., Lucas, E.M.F., Abreu,L.M., L.H. and Takahashi, J.A. 2009. "Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. Isolated from Brazilian Cerrado Soil." **Journal of Biotechnology**.

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.

Ricordy, R., Cacci, E. and Augusti-Tocco, G., 2004. " Aflatoxin B1 and cell cycle perturbation." **Food and Nutrition Toxicity**. 4 : 213– 233.

Sargeant, K. *et al.* 1961a. "The assay of a toxic principle in certain groundnut meals." **Vet. Record.** 73 : 1219

Sargeant, K. *et al.* 1961b. "Toxicity associated with certain sample of groundnut." **Nature.** 192 : 1096

Schwalbe, R., Steele-Moore, L. and Goodwin, A.C. 2007. "Antifungal susceptibility testing of filamentous fungi." **Antimicrobial Susceptibility Testing Protocol**. 10:209-242

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.

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., 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) : 61-64.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

Torres, J. *et al.* 1980. " Morphological changes in strains of *Aspergillus flavus* Link Exfries and *Aspergillus parasiticus* Spears related with aflatoxin production." **Mycopathol.** 72(3) : 171-174

Vizcaino, J.A., Sanz, L., Basilio, A., Vicente, F., Gutierrez, S., Hermosa, M.R. and Monte, E. 2005. "Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolate representing three *Trichoderma* sections." **Mycological Research**. 109(12) : 1397-1406.

Wang, H.L. and Hesseltine, C.W. 1982. " Prescott and Dunn Industrial Microbiology." 4th ed. Connecticus : Westport.

WHO. 1979. **Environmental Health Criteria II : Mycotoxins.** World Health Organization. Geneva

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

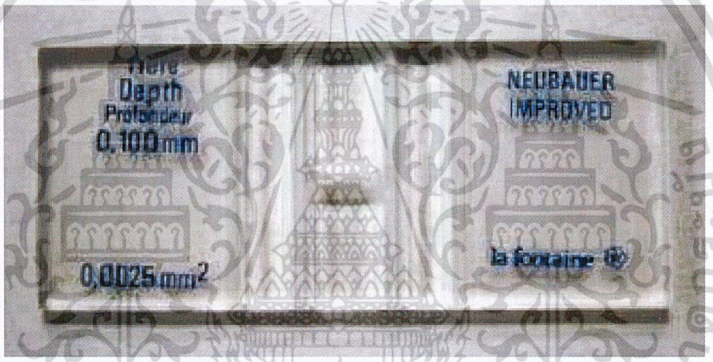
ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

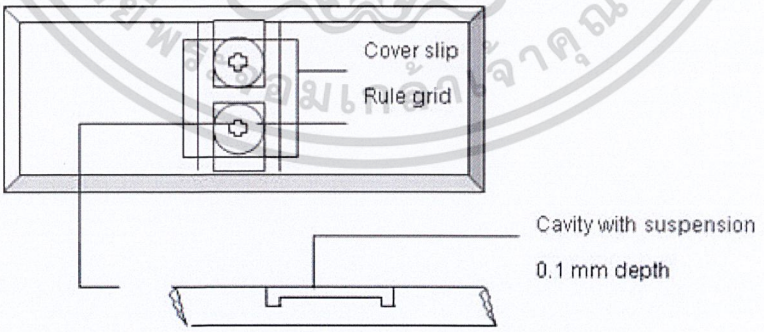
ภาคผนวก ก

การนับเซลล์ด้วย Haemacytometer

ก่อนการเตรียม Inoculum ของเชื้อควรทราบวิธีการใช้เครื่องมือวัดความเข้มข้นที่เรียกว่า Haemacytometer ซึ่งเป็นอุปกรณ์ขนาดเล็ก คล้ายสไลด์แต่มีความหนามากกว่าสไลด์แก้วธรรมดาตรงกลางมีร่องเป็นรูปตัว H (รูปที่ ก-1) ซึ่งทำให้เกิดบริเวณที่ใช้ในการตรวจนับขึ้น 2 บริเวณ ตรงกลางตัว H ซึ่งทำเป็น scale (รูปที่ ก-2 และ รูปที่ ก-3) ที่ใช้ในการตรวจนับเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารแขวนลอย เช่น สปอร์ หรือเซลล์ต่าง ๆ

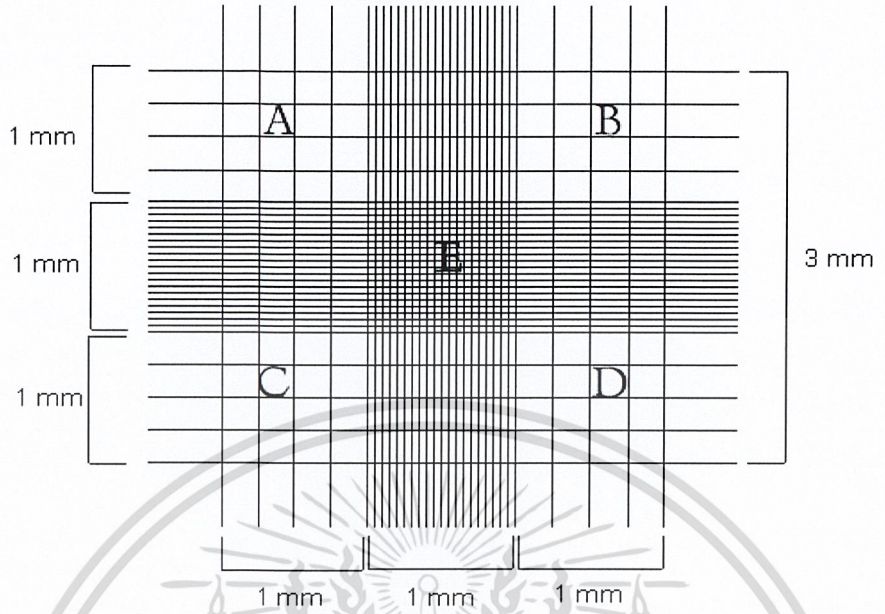


รูปที่ ก-1 แสดงลักษณะและขนาด (เท่าจริง) ของ Haemacytometer



รูปที่ ก-2 แผนภาพแสดงลักษณะ และตำแหน่ง สำหรับการตรวจนับจำนวนตัวอย่าง เช่น สปอร์ของเชื้อรา ด้วย Haemacytometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก-3 แผนภาพแสดงบริเวณที่ใช้นับจำนวน A, B, C ,D และ E (Counting areas) ตัวอย่างที่ต้องการคำนวณหาความเข้มข้น

การคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ Haemacytometer

1. ในกรณีที่สปอร์หรือเซลล์ที่ต้องการนับมีขนาดเล็ก การนับควรใช้บริเวณ E ตรงกลาง ซึ่งประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก (Small square) ทั้งหมด 25 ช่อง และแต่ละช่องเล็กนั้นจะประกอบด้วยช่องขนาดเล็กที่สุด (Smallest square) อยู่ 16 ช่อง การนับสปอร์จำนับจำนวน ทั้งหมดที่อยู่ในบริเวณนี้รวมทั้งสปอร์ที่อยู่บริเวณขอบของตารางทุกช่องด้วย

2. พื้นที่บริเวณ E เท่ากับ 25 x 16 x 1/400 ตารางมิลลิเมตร

3. หากคิดเป็นปริมาตร (มีความลึก 1/10 มิลลิเมตร) จะเท่ากับ 25 x 16 x 1/400 x 1/10 ลูกบาศก์มิลลิเมตร หรือ 0.1 ลบ.มม

4. สมมุตินับสปอร์ในบริเวณ E ได้รวมทั้งหมดเท่ากับ Y สปอร์ ใน 0.1 ลบ . มม

5. ต้องการเทียบความเข้มข้นในหน่วย 1 ลบ. ซม หรือ 1 มล . ซึ่ง 1 มล . เท่ากับ 1000 ลบ. มม

ดังนั้น ในปริมาตร 0.1 ลบ. มม นับสปอร์ได้ = Y สปอร์

ถ้าใน 1000 ลบ . มม (1 มล .) จะมีสปอร์ = Y x 1000 x 1/0.1 สปอร์

= Y x 1 x 10^4 สปอร์ / มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ในกรณีสปอร์ หรือ เซลล์มีขนาดใหญ่ ควรนับจำนวนสปอร์หรือเซลล์ทุกบริเวณ A B C D และ E จากนั้นนำค่าที่ได้มารวมกัน และหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วย 5 อีกครั้ง ก่อนนำไปคำนวณความเข้มข้น เช่น สมมตินับจำนวนสปอร์ได้รวมกันเท่ากับ Z สปอร์ ดังนั้นความเข้มข้นของสปอร์ต่อ 1 มิลลิลิตร เท่ากับ $Z/5 \times 1 \times 10^4$ สปอร์ ต่อ มิลลิลิตร

7. การตรวจนับความเข้มข้นจะให้ผลใกล้เคียงมากที่สุด จะต้องทำให้ Suspension กระจายตัวมากที่สุดหรืออาจจำเป็นจะต้องมีการนับมากครั้งขึ้น เช่น 5-10 ครั้ง แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยภายหลังหรือบางครั้งอาจจำเป็นต้องเติม Wetting agent เช่น Tween 20 ลงไปเพื่อช่วยให้สปอร์หรือเซลล์กระจายตัวได้ดีขึ้น (ทั้งนี้เพื่อให้การคำนวณความเข้มข้นถูกต้องแม่นยำมากขึ้น) จากนั้นจึงใช้ Dropper หรือ Loop หยด Suspension ของเชื้อลงบน Scale ของ Haemacytometer ข้างละ 1 หยด จากนั้นใช้ Cover slip ปิดทับ กดเบา ๆ หากใส่หยดของ Spore suspension พอดีจะไม่มีเชื้อเหลือล้นออกมาจากสไลด์

8. นำสไลด์ที่เตรียมได้ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์นับจำนวนสปอร์หรือเซลล์ของเชื้อแล้วนำไปคำนวณหาความเข้มข้นโดยวิธีคำนวณข้างต้น ซึ่งความเข้มข้นที่มักใช้ในการปลูกเชื้อโดยทั่วไป เช่น เชื้อราจะอยู่ในช่วง 10^4-10^6 สปอร์ ต่อ มิลลิลิตร เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การทำ Slide culture

1. นำจานแก้วที่รองด้วยกระดาษกรอง และมียางวงเล็กวางอยู่ใต้แผ่น สไลด์แก้ว และมีแผ่นปิดสไลด์ด้วยอย่างละ 1 แผ่น จานแก้วและอื่นๆ ห่ออยู่ในกระดาษ และนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2. นำจานอาหาร PDA มา 1 จาน ตัด PDA เป็นชิ้นเล็กๆสี่เหลี่ยม ขนาดประมาณ 5x5 ย้ายชิ้น PDA วางตรงกลางแผ่นสไลด์ ใช้ loop ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วย้ายเชื้อราที่เตรียมไว้ไปแตะตรงขอบของชิ้น PDA ทั้ง 4 ด้าน รวมทั้งผิวบนของชิ้น PDA ด้วย ปิดทับด้วยแผ่นสไลด์ ทุกขั้นตอนเตรียมภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

3. ตรวจผลการเจริญของเชื้อราว่าเชื้อราเจริญบริเวณใดบ้าง โดยการนำสไลด์ และแผ่นปิดสไลด์เปล่าอีกชุดหนึ่งมา แล้วหยด lactophenol ลงตรงกลางแผ่นสไลด์ใหม่ ย้ายแผ่นปิดสไลด์จากที่เลี้ยงเชื้อไว้มาปิดทับลงบนแผ่นสไลด์นั้น จากนั้นจึงคีบเอาชิ้น PDA ที่มีเชื้อราเจริญอยู่ออก หยด lactophenol ลงไป นำแผ่นปิดสไลด์แผ่นใหม่ปิดทับลงไปตรวจสอบการเจริญของเชื้อราที่เห็นเป็นอย่างไร ตรวจผลหลังปลูกเชื้อ 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาล(Dextrose)	20	กรัม
ผงวุ้น (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

Czapek yeast extract Agar (CYA)

Yeast extract	1	กรัม
Sodium nitrate	3	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	1	กรัม
Magnesium sulphate (7 H_2O)	0.5	กรัม
Potassium chloride	0.5	กรัม
Ferrous sulphate (7 H_2O)	10	กรัม
Agar	15	กรัม
Sucrose	30	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

Sabourand Dextrose Broth (SDB)

Yeast extract	2.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Extrose	40.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Malt extract agar (MEA)

Malt extract	20	กรัม
Peptone	10	กรัม
Glucose	20	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

Yeast extract sucrose (YES)

Yeast extract	20	กรัม
Sucrose	150	กรัม
Magnesium sulphate (7 H_2O)	0.5	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมต่างๆ ให้เข้ากันในน้ำปริมาตร 1 ลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะตามที่ต้องการนำไปฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

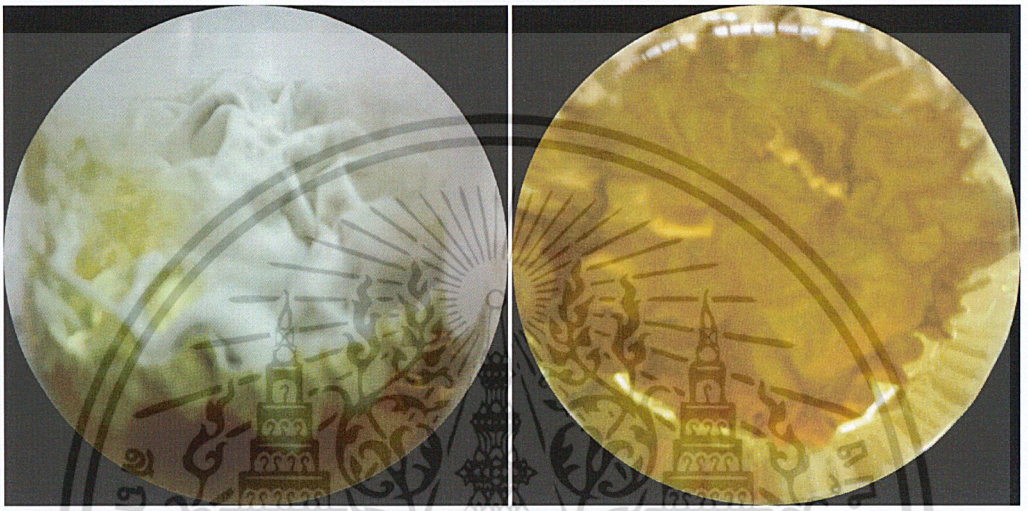
สารละลายน้ำเกลือ (Saline solution)

Soduim choride (NaCL)	8.5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลต 480519 I06 (3)



รูปที่ ง-1 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* ไอโซเลต 480519 I06 (3) ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YES ที่สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ จ-1 ผลการยับยั้งของสารสกัดหยาบของเชื้อรา *Penicillium* sp.ไอโซเลต 480519 I06 (3) ต่อเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารแข็ง SDA

สารสกัดหยาบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิลิตร)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4
เฮกเซน	1	0.00	0.00	0.00	0.00
	12.5	0.00	0.00	0.00	0.00
	25	0.00	0.00	0.00	0.00
	50	8.00	10.00	12.00	9.00
	100	19.00	17.00	15.00	19.00
เอทิลอะซิเตต	1	0.00	0.00	0.00	0.00
	12.5	0.00	0.00	0.00	0.00
	25	0.00	0.00	0.00	0.00
	50	0.00	0.00	0.00	0.00
	100	10.50	10.00	8.00	11.00
บิวทานอล	1	0.00	0.00	0.00	0.00
	12.5	0.00	0.00	0.00	0.00
	25	0.00	0.00	0.00	0.00
	50	0.00	0.00	0.00	0.00
	100	0.00	0.00	0.00	0.00
เมทานอล	1	0.00	0.00	0.00	0.00
	12.5	0.00	0.00	0.00	0.00
	25	0.00	0.00	0.00	0.00
	50	0.00	0.00	0.00	0.00
	100	0.00	0.00	0.00	0.00
ควบคุม (Nystatin)	0.05	12.00	10.00	11.00	10.00
ควบคุม (เมทานอล)	-	0.00	0.00	0.00	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ตารางที่ ฉ-1 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของเชื้อรา *Penicillium* sp.ไอโซเลต 480519 I06 (3) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารแข็ง SDA เป็นเวลา 5 วัน

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2040.832	21	97.182	231.658	.000
Within Groups	27.688	66	.420		
Total	2068.520	87			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ-2 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ

Duncan[a]

สารสกัดหยาบ	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Hex_1mg	4	.0000			
Hex_12.5 mg	4	.0000			
Hex_25 mg	4	.0000			
Ethyl_1 mg	4	.0000			
Ethyl_12.5 mg	4	.0000			
Ethyl_25 mg	4	.0000			
Ethyl_50 mg	4	.0000			
Buta_1 mg	4	.0000			
Buta_12.5 mg	4	.0000			
Buta_25 mg	4	.0000			
Buta_50 mg	4	.0000			
Buta_100 mg	4	.0000			
Met_1 mg	4	.0000			
Met_12.5 mg	4	.0000			
Met_25 mg	4	.0000			
Met_50 mg	4	.0000			
Met_100 mg	4	.0000			
Methanol	4	.0000			
Hex_50 mg	4		9.7500		
Ethyl_100 mg	4		9.8750	9.8750	
Nystatin	4			10.7500	
Hex_100 mg	4				17.5000
Sig.		1.000	.786	.060	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ช

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ด้วยวิธี Broth Microdilution

ทำการทดสอบด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Schwalbe และคณะ, 2007) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ก. การเตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบ

ละลายสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากเชื้อรา *Penicillium* sp. ไอโซเลต 480519 I06 (3) ทำการเจือจาง (serial dilution) ตามรูปที่ ช-1 โดยใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 99.5 ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นตั้งแต่ 50,000 ถึง 1,562.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร(หลอดที่ 2 ถึง 7) เตรียมสารละลายให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิลิตร โดยคำนวณความเข้มข้นจากสูตรดังนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

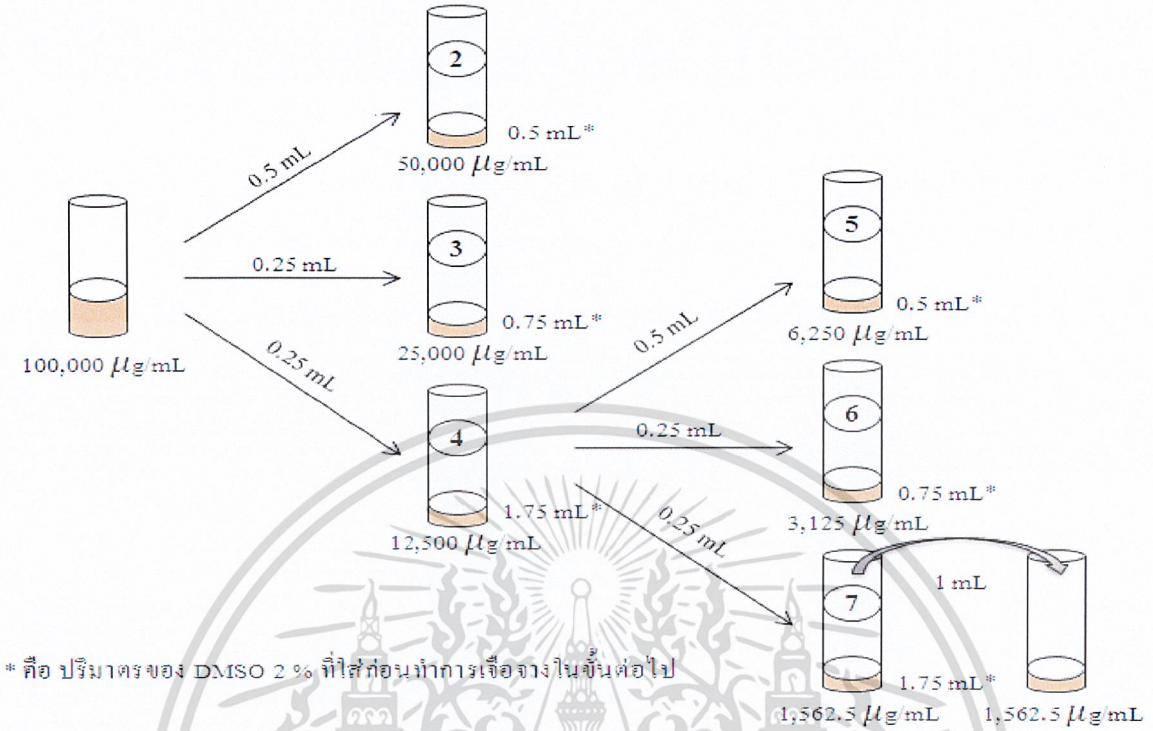
เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น

C_2 คือ ความเข้มข้นของสารที่ต้องการ

V_1 คือ ปริมาณของสารตั้งต้น

V_2 คือ ปริมาณของสารที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ช-1 การทำเจือจางของสารละลายจากสารสกัดหยาบ

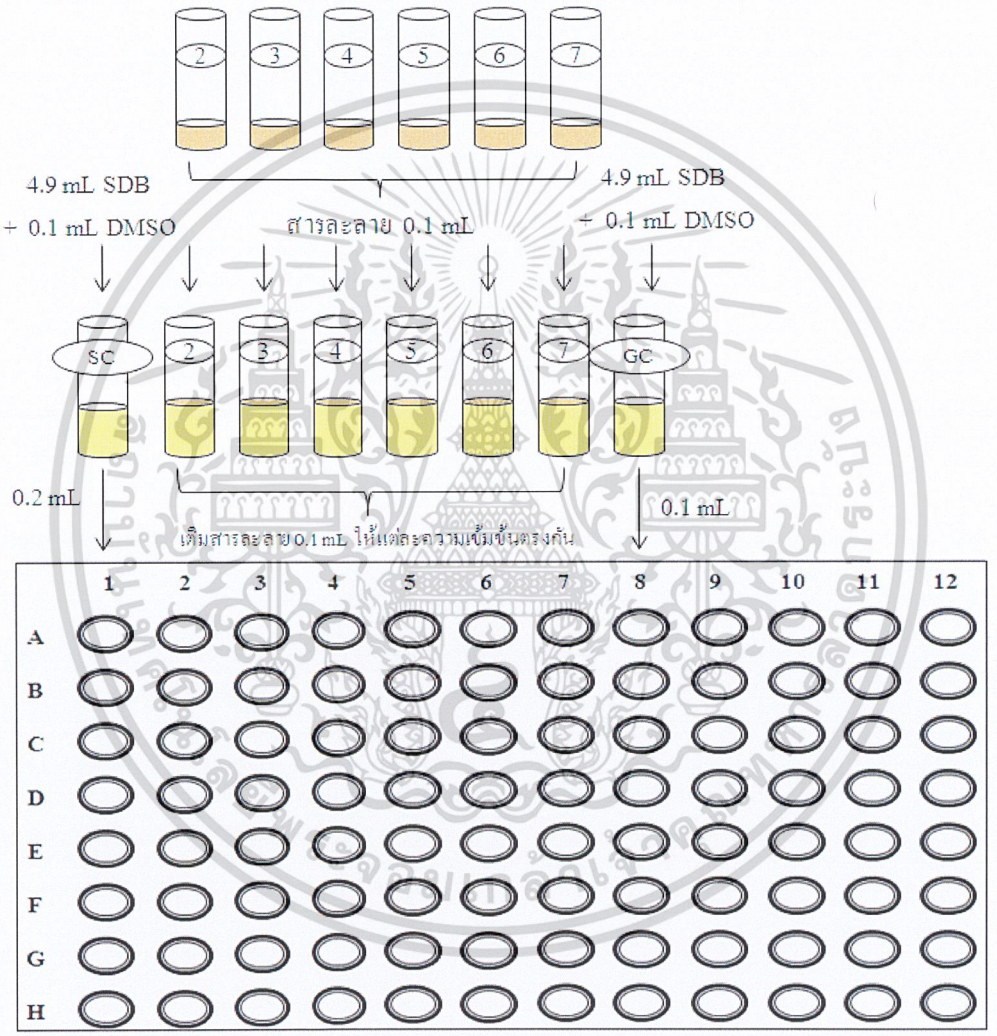
ข. การเตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบลงใน 96 wells plate

ทำการเจือจางสารละลายของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากเชื้อราที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จากข้อ ก. โดยดูดสารละลายของสารสกัดหยาบจากข้อ ก ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีอาหารเหลว SDB ปริมาตร 4.9 มิลลิลิตร ทำการเจือจาง 50 เท่า ผสมให้เข้ากันในหลอดปราศจากเชื้อ จากนั้นทำการดูดสารละลายในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใส่ลงในแต่ละหลุมของ 96 wells plate (ความเข้มข้นสุดท้ายของสารในหลอดที่ 2 ถึง 7 คือ 500 ถึง 15.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามรูปที่ ช-2

เตรียมสารละลายชุดควบคุมปราศจากเชื้อ (Sterility control) โดยดูดอาหารเหลว SDB ปริมาตร 4.9 มิลลิลิตรและไดเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 99.5 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 ต่อ 50) ทำการผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองปราศจากเชื้อและทำการดูดสารละลายที่ได้ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงหลุมในคอลัมน์ที่ 1 ของ 96 wells plate (ทำการทดลอง 4 ซ้ำ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลายชุดควบคุมการเจริญ (Growth control) ดูดอาหารเหลวSDB ปริมาตร 4.9 มิลลิลิตรและไดเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 99.5 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 ต่อ 50) ทำการผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองปราศจากเชื้อและทำการดูดสารละลายที่ได้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใส่ลงหลุมในคอลัมน์ที่ 8 ของ 96 wells plate (ทำการทดลอง 4 ซ้ำ) ตามรูปที่ ช-2



ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 500 – 15.625 μg/mL

SC : sterility control คือ สารละลายชุดควบคุมเชิงลบ (Negative control) (หลอดที่ 1)

GC : growth control คือ สารลายชุดควบคุมเชิงบวก (Positive control) (หลอดที่ 8)

รูปที่ ช-2 การเตรียมสารละลายจากสารสกัดหยาบลงในถาดไมโครไดลูชัน (96 wells plate)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค. **การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684**

เลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในอาหารแข็ง PDA ผิวหน้าเอียง (slant) ให้เชื้อมีการเจริญ 7 วันที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เตรียมสารละลายสปอร์โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารละลาย tween 20 (ความเข้มข้นร้อยละ 100) จากนั้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อไปแตะเชื้อราที่อยู่ในหลอดอาหารเอียง ให้ลวดเขี่ยเชื้อสัมผัสสปอร์เพื่อให้สปอร์ติดมากับลวดเขี่ยเชื้อที่มีสารละลาย tween 20 จากนั้นนำลวดเขี่ยเชื้อไปจุ่มลงในหลอดที่มีสารละลายน้ำเกลือ (Saline solution) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15-20 วินาที เพื่อให้เกิดการกระจายตัวของสปอร์และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3-5 นาที ทำการเจือจางสารละลายสปอร์ด้วยสารละลายน้ำเกลือให้ได้ระดับความเข้มข้นของสปอร์ 0.4-5x10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความขุ่น(OD) ระหว่าง 0.09-0.11 (ตารางที่ ช-1) จากนั้นดูดสารละลายสปอร์ที่เตรียมได้ 0.2 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดที่มีอาหารเหลว SDB ปริมาตร 9.8 มิลลิลิตร (เจือจาง 50 เท่า) จะทำให้ได้สารละลายสปอร์ที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ 0.8-1x10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตามรูปที่ ช-3)

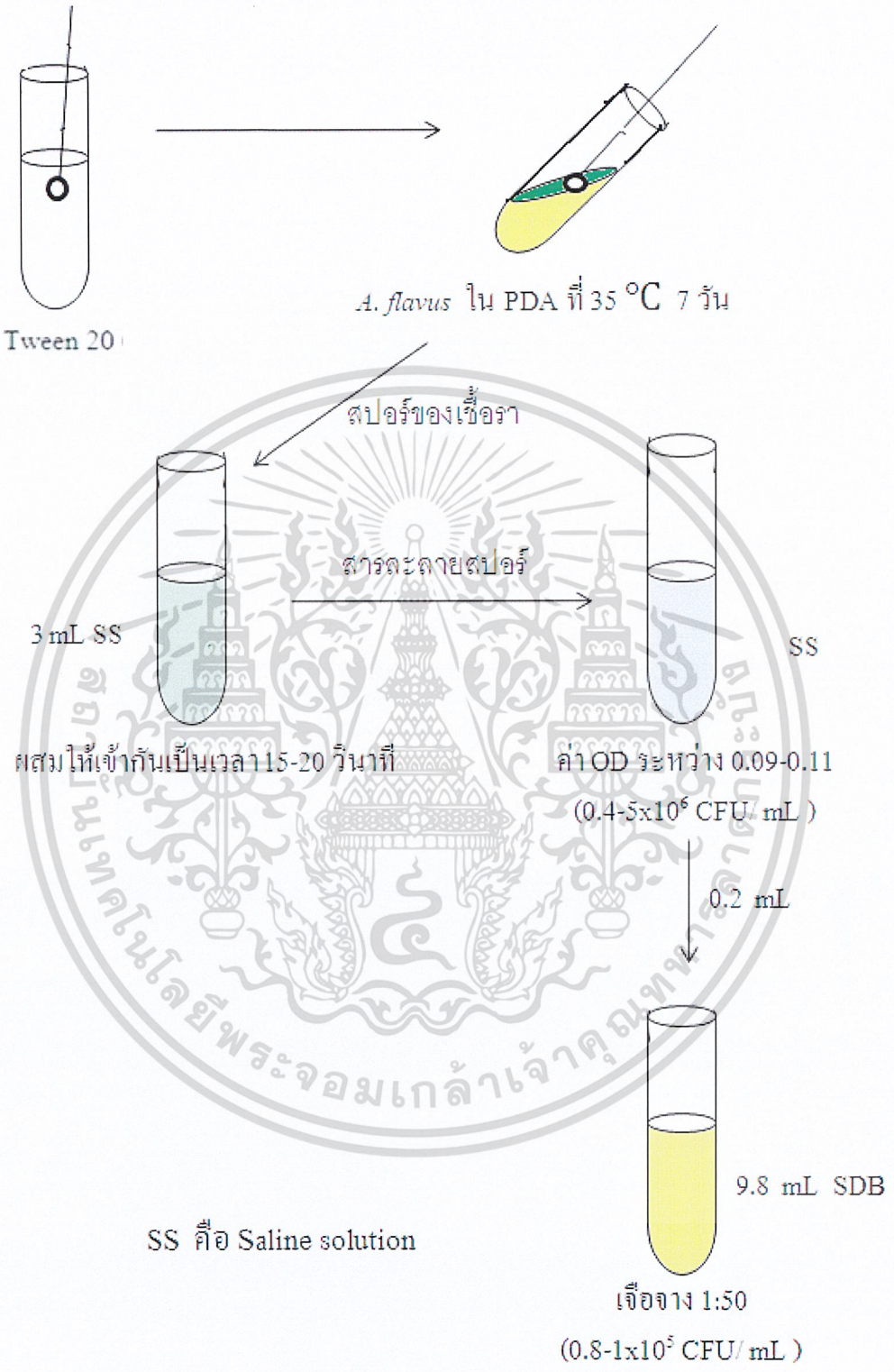
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ช-1 แสดงช่วงความหนาแน่น (OD)และจำนวนของเชื้อราที่พบได้บ่อย

Species	OD Range (%T)[a]	10^6 CFU/mL Range
A. nidulans	0.09–0.11 (80–82)	1.1–2
A flavus	0.09–0.11 (80–82)	0.4–4
A. fumigatus	0.09–0.11 (80–82)	0.6–5
A. terreus	0.09–0.11 (80–82)	0.9–5
Bipolaris hawaiiensis	0.2–0.3	0.07–0.4
B. spicifera	0.2–0.3	0.3–3
Cladophialophora bantiana	0.15–0.17 (68–70)	0.4–3.1
Dactilaria constricta	0.15–0.17 (68–70)	0.4–1
Fusarium oxysporum	0.15–0.17 (68–70)	0.8–5
F. solani	0.15–0.17 (68–70)	0.5–5.9
Paecilomyces lilacinus	0.09–0.13	0.8–2.3
P. variotii	0.09–0.11 (80–82)	ND
Scedosporium apiospermum	0.15–0.17	0.4–3.2
R. arrhizus	0.15–0.17	0.4–2.6
S. prolificans	0.15–0.17	0.6–1.7
S. schenekii	0.09–0.11	
Trichoderma longibrachiatum	0.09–0.11	0.7–2.3
Wangiella dermatitidis	0.15–0.17	1.2–3.7

[a] %T = percent transmission.
Based on Refs. 4 and 8.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ช-3 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง. การทดสอบฤทธิ์เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

นำสารละลายสปอร์ที่เตรียมได้จากข้อ ค. (ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 0.8-1สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใส่ลงใน 96 wells plate ที่เตรียมไว้แล้วจากข้อ ข.ทำการผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 46-50 ชั่วโมง

จ. การแปรผล

เมื่อครบเวลาบ่มนำสารละลายที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่อยู่ใน 96 wells plate มาเพาะเลี้ยงในจานอาหารแข็ง SDA ด้วยวิธี cross streak และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า

- ถ้าไม่เกิดการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่ระดับความเข้มข้นใด แสดงว่า ที่ระดับความเข้มข้นนั้นคือ ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เชื้อราตาย (Minimum fungicidal concentration, MFCs)
- ถ้าเกิดการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่ระดับความเข้มข้นถัดไป ซึ่งระดับความเข้มข้นต่ำกว่าค่า MFCs แสดงว่า ที่ระดับความเข้มข้นนั้น คือ ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยังยั้งการเจริญของเชื้อรา (Minimum inhibitory concentration, MICs)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้