สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราโรคพืช โดยน้ำมันกานพลู

พีรวิชช์ ชัยชนะ

อดิเดช พงศ์หว่าน

ว
ว๗๔๓
๒๕๕๐

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....83762
วัน,เดือน,ปี.....15 ก.ย. 2551

b.....11983425
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Growth Inhibition of Plant Fungal Pathogens by clove oil

Mr. Peerawit Chaichana

Mr. Atidej Phongwan

A Report Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Industrial Microbiology Program

Department of Applied Biology, Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราโรคพืช โดยน้ำมันกานพลู

นักศึกษา นายพีรวิชช์ ชัยชนะ รหัส 46050476

นายอติเดช พงศ์หว่าน รหัส 47050906

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	
กรรมการ	ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์	
กรรมการ	ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสัมมนาเรื่อง การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราโรคพืช โดยน้ำมันกานพลู

นักศึกษา นายพีรวิชช์ ชัยชนะ รหัส 46050476

นายอดิเดช พงศ์หว่าน รหัส 47050906

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี

บทคัดย่อ

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของน้ำมันกานพลู ที่มีผลต่อเชื้อรา *Fusarium moniliforme*, *Sclerotium rolfsii* และ *Alternaria solani* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บนอาหาร PDA พบว่าระดับความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) ของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ได้คือ 300ppm ส่วนระดับความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) ของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และ *Alternaria solani* ได้คือ 400ppm และน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นระดับ MIC นี้ พบว่าไม่ฆ่าเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และ *Alternaria solani* แต่สามารถฆ่าเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ได้ ส่วนประสิทธิภาพการยับยั้งของน้ำมันกานพลูในพืชทดสอบ พบว่าน้ำมันกานพลูบริสุทธิ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria solani*, *Fusarium moniliforme* และ *Sclerotium rolfsii* ที่เจริญบนบริเวณแผลของมะเขือเทศ ข้าวโพด และ หัวหอม ได้ ตามลำดับ ดังนั้นน้ำมันกานพลูสามารถเป็นอีกทางเลือกหนึ่งแทนสารเคมีในการใช้ควบคุมการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อรา ในระยะหลังการเก็บเกี่ยวในผักและผลไม้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special project title Growth Inhibition of Plant Fungal Pathogens by clove oil

Student's name Peerawit Chaichana Student ID. 46050476

Atidej Phongwan Student ID. 47050906

Department Applied Biology

Programme Industrial Microbiology

Advisor Asst.Prof. Dr. Pana Lohasupthawee

Abstract

The inhibitory effects of clove oil against *Fusarium moniliforme*, *Sclerotium rolfsii*, and *Alternaria solani* were tested at different concentrations in vitro. The minimum inhibitory contration (MIC) of clove oil against *Sclerotium rolfsii* was 300ppm. The MIC of clove oil against *Alternaria solani* and *Fusarium moniliforme* were 400ppm. At MIC, the clove oil was proved to have fungistatic action against *Alternaria solani* and *Fusarium moniliforme*. But it had fungicidal action against *Sclerotium rolfsii*. The in vivo efficacy of clove oil was studied in this project. The results showed pure clove oil significantly stopped the growth of *Alternaria solani*, *Fusarium moniliforme*, and *Sclerotium rolfsii* on the wounded tomato, maize, and onion, respectively. Therefore, clove oil could be an alternative to chemicals for control of postharvest phytopathogenenic fungi on fruits or vegetables.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ในการให้คำแนะนำและคำปรึกษาที่ดีในการทำวิจัยตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา รวมทั้งตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ เพื่อให้โครงงานพิเศษฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์ นักศึกษารู้สึกซาบซึ้งและขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่คอยให้กำลังใจ และเงินทุนในการทำโครงงานพิเศษเสมอมา ขอขอบพระคุณพี่เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่คอยช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ต่างๆ เพื่อใช้ในโครงงานพิเศษ รวมถึงพี่ปริญญา โท และเพื่อนๆ ทุกท่านที่ได้มีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษชิ้นนี้เสร็จสมบูรณ์

คณะผู้จัดทำใคร่ขอโอกาสนี้ขอบพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวนามมา และไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ด้วย หากโครงงานพิเศษนี้มีสิ่งใดที่ขาดตกบกพร่อง คณะผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ทั้งหมด ส่วนความดีที่ปรากฏในโครงงานพิเศษฉบับนี้ ขอยกให้เป็นความดีของผู้มีส่วนช่วยเหลือในการทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ข
กิตติกรรมประกาศ.....ค
สารบัญ.....ง
สารบัญตาราง.....ช
สารบัญรูป.....ซ

บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ..... 2
1.4 ขั้นตอนการทำงาน..... 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3
2.1 น้ำมันหอมระเหย.....3
2.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย.....3
2.1.2 วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหย 4
2.2 กานพลู (clove, *Syzygium aromaticum*).....7
2.3 เชื้อรา..... 9
2.4 *Fusarium moniliforme* 11
2.4.1ลักษณะทั่วไป..... 11
2.4.2 โรคที่เกิดจาก *Fusarium moniliforme*..... 11
2.5 *Sclerotium rolfsii*..... 14
2.5.1 ลักษณะทั่วไป 14
2.5.2 โรคที่เกิดจาก *Sclerotium rolfsii*.....15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6 *Alternaria solani* 16
2.6.1 ลักษณะทั่วไป 16
2.6.2 โรคที่เกิดจาก *Alternaria solani* 16
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 19

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 21
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 21
3.1.1 อุปกรณ์ 21
3.1.2 สมุนไพรที่ใช้ในการควบคุมเชื้อ 21
3.1.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ 21
3.1.4 เชื้อราที่ใช้ 22
3.2 การสกัดและการเตรียมน้ำมันหอมระเหย 22
3.3 การเตรียมชุดควบคุม 22
3.4 การทดลอง *In vitro* 23
3.4.1 การทดสอบหาระดับความเข้มข้นของน้ำมันสกัดกานพลูที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้สมบูรณ์ในอาหาร PDA 23
3.4.2 การทดสอบหาผลของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูว่าสามารถฆ่าเชื้อรา (fungicidal) หรือ ได้เพียงแค่ยับยั้งเชื้อรา (fungistatic) 23
3.5 การทดลอง *In vivo* 24
3.5.1 การทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria solani* ของน้ำมันสกัดกานพลูบนมะเขือเทศ 24
3.5.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium moniliforme* ของน้ำมันสกัดกานพลูบนฝักข้าวโพด 25
3.5.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ของน้ำมันสกัดกานพลูบนหัวหอมใหญ่ 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล 26
ผลการทดลองระดับ *In vitro*
4.1 ผลของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium moniliforme* 26
4.2 ผลของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* 27
4.3 ผลของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria solani* 28
4.4 ผลการทดสอบหาคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยว่าเป็น สารยับยั้ง (fungistatic) หรือ การกำจัด (fungicide) 32
ผลการทดลองระดับ *In vivo*
4.5 ผลการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria solani* ด้วยน้ำมันสกัดกานพลูบนมะเขือเทศ 33
4.6 ผลการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium moniliforme* ด้วยน้ำมันสกัดกานพลูบนชิ้นข้าวโพด 34
4.7 ผลการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ด้วยน้ำมันสกัดกานพลูบนชิ้นหัวหอม 35

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 39

บรรณานุกรม 40

ภาคผนวก 42
ภาคผนวก ก ข้อมูลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม (SPSS) 42
ภาคผนวก ข ผลการทดลองไม่เป็นทางการ 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 สารประกอบเคมีในน้ำมันสกัดจากกานพลู 8
4.1 ผลการยับยั้งเชื้อ *Fusarium moniliforme* ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 26
4.2 ผลการยับยั้งเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 27
4.3 ผลการยับยั้งเชื้อ *Alternaria solani* ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 28
4.4 แสดงการเจริญของเชื้อรา หลังจากที่ถ่ายเชื้อราที่ถูกยับยั้ง ลงใน PDA เป็นเวลา 5 วัน 32
4.5 ผลการยับยั้งเชื้อ *Alternaria solani* ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บนมะเขือเทศ 33
4.6 ผลการยับยั้งเชื้อ *Fusarium moniliforme* ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บนชิ้นข้าวโพด 34
4.7 ผลการยับยั้งเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บนชิ้นหัวหอม 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ชุดกลั่นชนิด clevenger....5
2.2 การกลั่นโดยใช้น้ำและไอน้ำ....5
2.3 (ก) ดอกสด (ข) ดอกตากแห้ง (ค) ต้นกานพลู....8
2.4 ก. ลักษณะเส้นใยของ *Fusarium moniliforme* 12
ข. โคโลนีของ *Fusarium moniliforme*.... 12
2.5 ก. ลำต้นที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะมีสีน้ำตาลแดง.... 13
ข. เชื้อรา *Fusarium moniliforme* ที่ขึ้นในข้าวโพด.... 13
2.6 โคโลนีของ *Sclerotium rolfsii*....15
2.7 หัวหอมที่ถูกทำลายด้วย *Sclerotium rolfsii*....16
2.8 วัฏจักรของการเกิดโรคจุดวง.... 17
2.9 ก. ผลของมะเขือเทศที่ถูกทำลายด้วยเชื้อ *Alternaria solani*.... 18
ข. ส่วนใบของต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคโรคใบจุดสีน้ำตาล (Early blight) 18
ค. ลักษณะ conidia ของ *Alternaria solani*.... 18
4.1 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารสกัดกานพลู....29
4.2 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Sclrotium rolfsii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารสกัดกานพลู....30
4.3 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Alternaria solani* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารสกัดกานพลู....31
4.4 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *Alternaria solani* ของสารสกัดกานพลูที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในการทดสอบกับมะเขือเทศ.... 36
4.5 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *Fusarium moniliforme* ของสารสกัดกานพลูที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในการทดสอบกับชิ้นข้าวโพด.... 37
4.6 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *Sclerotium rolfsii* ของสารสกัดกานพลูที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในการทดสอบกับชิ้นหัวหอม.... 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

เชื้อจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กมีหลายสายพันธุ์ ปัจจุบันมีการนำมาใช้ประโยชน์ในหลาย ด้าน ทั้งในด้านอาหาร การแพทย์ และการเกษตร ขณะเดียวกันเชื้อจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ก็มีโทษมากมาย เช่น พวกจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารบูดเน่า, พวกที่ก่อโรคในคน สัตว์ และพืช ซึ่งส่งผลถึงเศรษฐกิจของประเทศ โดยเฉพาะทางด้านการเกษตรจะมีผลกระทบมากที่สุด เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรเป็นอันดับต้นๆ ของโลก เกษตรกรส่วนใหญ่จึงได้หาทางกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคนี้โดยใช้สารเคมี เช่น benomyl, Copperoxychloride, Carboxin, Hymexzol และ Carbendazim ซึ่งสารเหล่านี้มีผลเป็นพิษต่อเกษตรกรและผู้บริโภค ทำให้เกษตรกรเริ่มตระหนักถึงผลที่ได้รับจากสารเคมีเหล่านี้ ปัจจุบันได้มีการนำเข้าของสารเคมีเหล่านี้มาจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ด้วยเหตุนี้จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์หลายคนเริ่มให้ความสนใจกับสิ่งที่เป็นธรรมชาติ รวมไปถึงความปลอดภัยต่อคนและสัตว์ โดยได้นำสารสกัดจากพืชสมุนไพรมาทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช ซึ่งมีงานวิจัยมาแล้วว่าสารสกัดจากสมุนไพรสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ เช่น น้ำมันสกัดจากโป๊ยกั๊กมีความเข้มข้นต่ำสุดของการยับยั้ง(MIC) ของเชื้อ *Alternaria solani* เป็น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, น้ำมันสกัดจากกานพลูสามารถยับยั้งเชื้อ *Aspergillus flavus* ในอาหาร PDA ได้ 87.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 500ppm (สิทธิชัย นวธาดานนท์, ชัชรินทร์ แซ่ตัน และ นพพล พันธุ์ดี 2549)

ดังนั้นการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรจึงเป็นการค้นคว้าที่น่าสนใจอีกหัวข้อหนึ่ง เพื่อนำใช้เป็นข้อมูลในการป้องกันเชื้อราที่ก่อโรคในพืชได้ ในงานวิจัยนี้เราใช้น้ำมันสกัดจากกานพลูมาทดสอบเนื่องจากได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับกานพลูว่าสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด แต่ยังไม่มีงานวิจัยใดที่นำมาทดสอบกับเชื้อราก่อโรคในพืช ส่วนเชื้อราที่นำมาทดสอบก็คือ *Fusarium moniliforme*, *Alternaria solani* และ *Sclerotium rolfsii* ซึ่งเชื้อราทั้ง 3 ชนิดนี้ เป็นราที่ก่อโรคในพืชเศรษฐกิจ ทำให้พืชเป็นโรคและเน่าตาย สามารถแพร่ระบาดได้ง่ายและรวดเร็วเมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ต้องการหาปริมาณของน้ำมันหอมระเหยที่น้อยที่สุดในการควบคุมเชื้อรา (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)
2. ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium moniliforme, Alternaria solani* และ *Sclerotium rolfsii* ด้วยน้ำมันสกัดจากกานพลูในระดับความเข้มข้นต่างๆในอาหาร PDA และพืชที่เชื้อราสามารถเข้าทำลายได้
3. ศึกษาว่าคุณสมบัติของน้ำมันสกัดจากกานพลูเป็นแบบ fungicidal หรือ fungistatic

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

หาปริมาณของน้ำมันหอมระเหยที่น้อยที่สุดในการควบคุมเชื้อรา(Minimum Inhibitory Concentration, MIC) โดยใช้น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูนำมาทดสอบกับเชื้อรา *Fusarium moniliforme, Alternaria solani* และ *Sclerotium rolfsii* และทดสอบดูว่าคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยกานพลูเป็นแบบ fungicidal หรือ fungistatic

1.4 ขั้นตอนการทำงาน

นำกานพลูมาสกัดเพื่อเอาน้ำมันหอมระเหยมาทำการเจือจางในระดับความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusarium moniliforme, Alternaria solani* และ *Sclerotium rolfsii* ได้ จากนั้นก็นำไปทดสอบดูว่าเชื้อราที่ถูกยับยั้งสามารถเจริญได้อีกหรือไม่ โดยการถ่ายลงใน PDA และพืชที่เชื้อราสามารถเข้าทำลายได้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นแหล่งข้อมูลที่ใช้สำหรับศึกษาและการวิจัย
2. สามารถนำไปประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ำมันหอมระเหย (http://digital.lib.kmutt.ac.th/magazine/issue1/article/aroma.html)

น้ำมันหอมระเหย (Essential Oils) เป็นน้ำมันที่พืชผลิตขึ้นตามธรรมชาติ เก็บไว้ตามส่วนต่างๆ เช่น กลีบดอก ใบ ผิวของผล เกสร รากหรือเปลือกของลำต้น เวลาที่ได้รับความร้อนอนุภาคเล็ก ๆ ของน้ำมันหอมเหล่านี้จะระเหยออกมาเป็นกลุ่มไอรอบๆ ทำให้เราได้กลิ่นหอม อบอวลไปทั่ว ช่วยดึงดูดแมลงให้มาผสมเกสรดอกไม้ ปกป้องการรุกรานจากศัตรู และรักษาความชุ่มชื้นแก่พืช สำหรับประโยชน์ต่อมนุษย์นั้น น้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโรค บรรเทาอาการอักเสบหรือลดบวม คลายเครียด หรือ กระตุ้นให้สดชื่น ทั้งนี้ขึ้นกับองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด

2.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยมีอยู่มากมายหลายร้อยชนิด แต่สามารถแยกเป็นกลุ่มของสารได้เป็น7 กลุ่ม ซึ่งในแต่ละกลุ่มจะออกฤทธิ์ในการบำบัดที่แตกต่างกันดังนี้

1. กลุ่ม Alcohols สารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติ ฆ่าเชื้อโรค ต้านเชื้อไวรัส ยกระดับจิตใจ ได้แก่ Linalol citronellol geraniol borneol menthol nerol teppineol ฯลฯ

2. กลุ่ม Aldehydes สารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการระงับประสาท ยกระดับจิตใจ ลดการอักเสบ ลดความอ้วน ขยายหลอดเลือด และมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโรค ตัวอย่างได้แก่ Cidral citronellal neral geranial

3. กลุ่ม Esters มีคุณสมบัติระงับประสาท สงบอารมณ์ ลดอาการเกร็งของกล้ามเนื้อ ลดการอักเสบ และต้านเชื้อราได้แก่ linalyl acetate geranyl acetate bomyl acetate eugenyl acetate lavendulyl acetate

4. กลุ่ม Ketones สาร Ketones มีคุณสมบัติช่วยขยายหลอดลม ละลายเสมหะ เสริมสร้างเนื้อเยื่อ และลดการอักเสบได้แก่ Jasmone fenchone camphor carvone menthone

5. กลุ่ม Oxides ในสารกลุ่มนี้ มีคุณสมบัติในการขับเสมหะ ละลายเสมหะที่สำคัญได้แก่ Cineol นอกนั้นก็มีสารที่มีคุณสมบัติฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และการกระตุ้นระบบประสาทได้แก่ Linalol oxide ascaridol bisabolol oxide bisabolon oxide

6. กลุ่ม Phenolsมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียกระตุ้นระบบประสาทและภูมิต้านทานของร่างกายได้แก่ Eugenol thymol earvacrol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. กลุ่ม Terpenesสารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อและลดการอักเสบ ประกอบด้วย Camphene cadinene caryophyllene cedrene dipentene phellandrene terpinene sabinene mycrene สาร sesquiterpenes เช่น chamazulene farnesol มีฤทธิ์ในการลดการอักเสบและต้านเชื้อแบคทีเรีย สาร limonene มีคุณสมบัติต้านไวรัส pinene มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ เป็นต้น โดยปกตินำ้มันหอมระเหยแต่ละชนิดจะมีสารประกอบทางเคมีตั้งแต่ 50-500 ชนิด องค์ประกอบทางเคมีแต่ละชนิด ก็มีคุณสมบัติแตกต่างกันไป ดังที่กล่าวแล้ว แต่เมื่อมาผสมผสานกันอยู่ มันก็ทำให้เกิดคุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชแต่ละชนิดที่มีจุดเด่นความเหมือนและความแตกต่างในการบำบัดต่างกันออกไป

2.1.2 วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหย (http://www.tistr.or.th/pharma/Essen_ext.htm)

การสกัดกลิ่นหอมออกจากพืชหอม ได้มีการทำมาเป็นเวลานานแล้ว โดยในสมัยโบราณ จะนิยมนำดอกไม้หอมมาแช่น้ำทิ้งไว้ และนำน้ำที่มีกลิ่นหอมนั้น ไปใช้ดื่มหรืออาบ ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการสกัดกลิ่นหอม เพื่อให้ได้กลิ่นหอม หรือ น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณภาพ และปริมาณสูงสุด วิธีการดังกล่าวนั้นมีหลายวิธี การที่จะเลือกใช้วิธีใดนั้น ต้องพิจารณาลักษณะของพืชที่จะนำมาสกัดด้วย วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหย สามารถแบ่งออกเป็น 6 วิธี

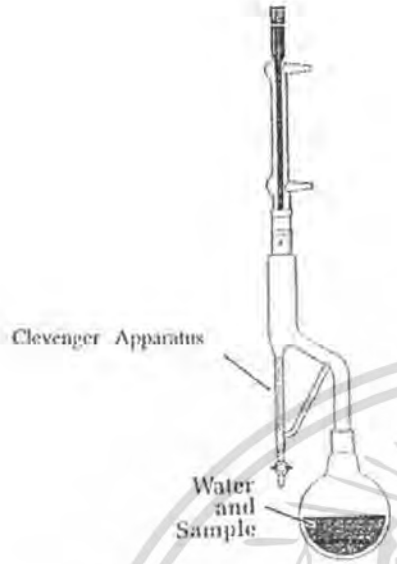
1. การกลั่นโดยใช้น้ำ

วิธีนี้สามารถทำได้โดยใช้อุปกรณ์สำหรับการกลั่น เช่น หม้อกลั่น, เครื่องควบแน่น และภาชนะรองรับน้ำมัน วิธีการก็คือ บรรจุพืชที่ต้องการสกัดน้ำมันหอม ระเหยลงในหม้อกลั่น เติมน้ำพอท่วม แล้วต้มจนน้ำเดือด เมื่อน้ำเดือดระเหยเป็นไอ ไอน้ำจะช่วยพาน้ำมันหอมระเหยที่อยู่ในเนื้อเยื่อของพืชออกมาพร้อมกันเมื่อผ่านเครื่องควบแน่น ไอน้ำและไอของน้ำมันหอมระเหยจะควบแน่นเป็นของเหลว ได้น้ำมันหอมระเหย และน้ำ แยกชั้นจากกัน

สำหรับการกลั่นพืชปริมาณน้อยๆ ในห้องปฏิบัติการ เราสามารถทำได้ โดยใช้ชุดกลั่นที่ทำจากเครื่องแก้ว เรียกว่า ชุดกลั่นชนิด Clevenger

การกลั่นโดยใช้น้ำนี้ มีข้อดี คือ เป็นวิธีที่ง่าย อุปกรณ์ในการกลั่น ไม่ยุ่งยากซับซ้อน และค่าใช้จ่ายต่ำ แต่ก็มีข้อเสีย คือ ในกรณีที่ต้องกลั่นพืชปริมาณมากๆ ความร้อนที่ให้สู่หม้อกลั่นจะไม่สม่ำเสมอตลอดทั้งหม้อกลั่น พืชที่อยู่ด้านล่างใกล้กับเตา อาจเกิดการไหม้ได้ ทำให้น้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้ มีกลิ่นเหม็นไหม้ติดปนมาอีกทั้งการกลั่นโดยวิธีนี้ พืชจะต้องสัมผัสกับน้ำเดือดโดยตรงเป็นเวลานาน ทำให้องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย เกิดการเปลี่ยนแปลงไปบ้างบางส่วน

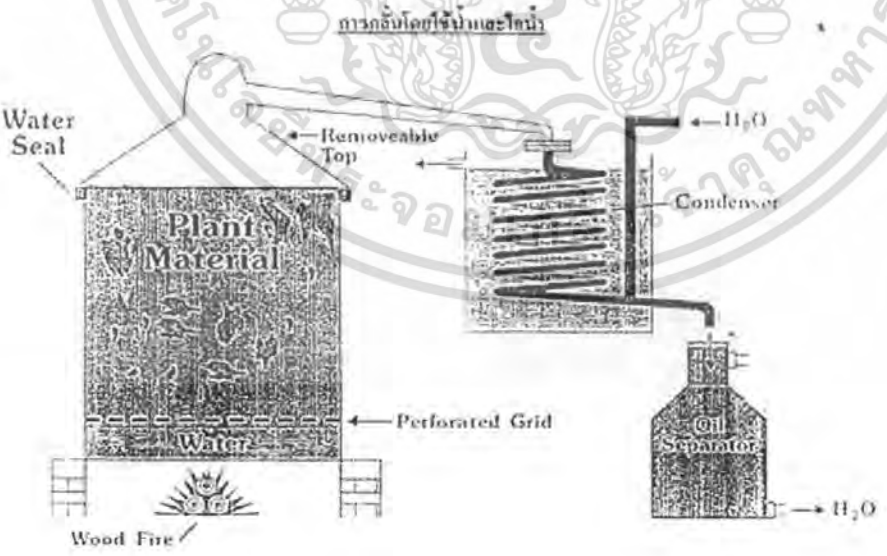
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 ชุดกลั่นชนิด clevenger

2. การกลั่นโดยใช้น้ำและไอน้ำ

วิธีนี้มีหลักการคล้ายกับการกลั่นโดยใช้น้ำ แต่แตกต่างตรงที่ ภายในหม้อกลั่นจะมีตะแกรงสำหรับวางพืชไว้เหนือระดับน้ำ เมื่อให้ความร้อน โดยเปลวไฟ หรือไอน้ำจากเครื่องกำเนิดไอน้ำ (Boiler), น้ำภายในหม้อกลั่น จะเดือดกลายเป็นไอ การกลั่นโดยวิธีนี้ พืชที่ใช้กลั่นจะไม่สัมผัสกับความร้อนโดยตรง ทำให้คุณภาพของน้ำมันหอมระเหยดีกว่าวิธีแรก



รูปที่ 2.2 การกลั่นโดยใช้น้ำและไอน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การกลั่นโดยใช้ไอน้ำ

การกลั่นโดยวิธีนี้ ก็คล้ายกับวิธีที่ 2 แต่ไม่ต้องเติมน้ำลงในหม้อกลั่น เมื่อบรรจุพืชลงบนตะแกรงแล้ว ผ่านความร้อนจากไอน้ำที่ได้จากเครื่องกำเนิดไอน้ำ ไอน้ำจะช่วยน้ำมันหอมระเหยในพืช ระเหยออกมาอย่างรวดเร็ว

วิธีนี้มีข้อดี คือ เวลาที่ใช้ในการกลั่นจะสั้นกว่า ปริมาณน้ำมันมีคุณภาพ และปริมาณดีกว่า แต่ไม่เหมาะกับพืชที่มีลักษณะบาง เช่น กลีบกุหลาบ เพราะไอน้ำจะทำ ให้กลีบกุหลาบรวมตัวกันเป็นก้อน น้ำมันหอมระเหยที่อยู่ในกลีบกุหลาบไม่สามารถออกมา พร้อมไอน้ำได้ทั้งหมด ทำให้ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยน้อยลง หรือไม่ได้เลย การกลั่นน้ำมันกุหลาบจึงควรใช้วิธีการกลั่นด้วยน้ำจะเหมาะสมกว่า

4. การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกไม้ที่ไม่สามารถใช้วิธีกลั่น โดยใช้ไอน้ำได้เนื่องจากองค์ประกอบของสารหอมระเหยในดอกไม้จะสลายตัวเมื่อ ถูกความร้อนสูง ดังนั้นจึงใช้ตัวทำละลาย เช่น เฮกเซน สกัดน้ำมันหอมระเหยออกมา หลังจากนั้นจะระเหยไล่ตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิและความกดดันต่ำ ก็จะได้หัวน้ำหอม ชนิด concrete

5. การสกัดโดยใช้ไขมัน (enfleurage)

การสกัดโดยใช้ไขมันเป็นวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม มักใช้กับดอกไม้กลีบบาง เช่นมะลิ ซ่อนกลิ่น โดยจะใช้ไขมันประเภทน้ำมันหมูเกลี่ยลงบนถาดไม้ แล้วนำ ดอกไม้มาเกลี่ยทับเป็นชั้นบางๆ จนเต็มถาด ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนดอกไม้ ชุดใหม่ ทำซ้ำประมาณ 7-10 ครั้ง ไขมันจะดูดซับสารหอมไว้เรียกไขมันที่ดูดซับ สารหอมนี้ว่า pomade หลังจากนั้นใช้เอทธานอลละลายสารหอมออกจากไขมัน นำไประเหยไล่ตัวละลายออกที่อุณหภูมิและความกดดันต่ำ จะได้หัวน้ำหอมชนิด concrete เมื่อแยกส่วนที่เป็นไขมันออกโดยการนำมาละลายเอทธานอลแล้ว แช่เย็นเพื่อแยกส่วนที่เป็นไขออก หลังจากระเหยไล่ตัวละลายออกจะได้หัวน้ำหอมชนิด absolute ซึ่งจัดเป็นหัวน้ำหอมชนิดดีและราคาแพงที่สุด

6. วิธีบีบ

วิธีนี้มักใช้กับเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม เช่น ส้ม มะนาว มะกรูด น้ำมันหอมระเหยที่ได้จะมีกลิ่นและคุณภาพดี

นอกจากนี้ ยังมีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกไม้โดยใช้ คาร์บอนไดออกไซด์เหลว โดยเรียกวิธีนี้ว่า Supercritical carbondioxide fluid extraction ซึ่งเป็นเทคนิคใหม่ เหมาะสำหรับการสกัดสารที่สลายตัวง่ายเมื่อ ถูกความร้อน แต่สูญเสียค่าใช้จ่ายมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 กานพลู (clove, *Syzygium aromaticum*)

(http://www.medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/..%5Cpubhealth%5Csyzygium.html)

ถิ่นกำเนิด อินโดนีเซีย มาเลเซีย อินเดีย

รูปลักษณะ ไม้ยืนต้นขนาดเล็ก ใบเดี่ยวสีเขียว แตกกิ่งก้านสาขากระจายออกเป็นพุ่มดอกสีขาวอมเขียว ออกเป็นช่อ ดังที่แสดงในรูป 2.3 ในดอกกานพลูมีน้ำมันซึ่งมีกลิ่นหอมและรสเผ็ดร้อน

สรรพคุณและส่วนที่นำมาใช้เป็นยา

ดอกตูม – ใช้ขับลม แต่งกลิ่น

ผล – ใช้เป็นเครื่องเทศ เป็นตัวช่วยให้มีกลิ่นหอม

น้ำมันกานพลู – ใช้เป็นยาชาเฉพาะแห่ง ฆ่าเชื้อในทางทันตกรรม ใช้เป็นยาขับลม แก้ปวดท้องแก้พิษน้ำเหลืองและน้ำคาวปลา

ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียอันเป็นสาเหตุอาการแน่นจุกเสียด

(http://www.medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/..%5Cpubhealth%5Csyzygium.html)

น้ำมันกานพลู มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุอาการแน่นจุกเสียด ได้แก่ *Escherichia coli* , *Salmonella typhi* , *S. typhosa* , *S. enteritidis* , *S. paratyphi* , *Shigella* , *Sh. Paradysenteriae* , *Sh. Dysenteriae* , *Sh. flexneri* , *Bacillus anthracis* , *B. subtilis* , *B. mesentericus* , *B. cereus* , *Proteus vulgaris* , Rabbit Cholera, *Vibrio comma* , *V. cholerae* , *V. parahemolyticus* , *Helicobacter pyroli* และ *Clostridium botulinum* สารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียอันเป็นสาเหตุอาการแน่นจุกเสียด คือ eugenol และ thymol แต่สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากดอกที่ความเข้มข้น 20 ก./100 มล. มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. typhimurium* และ *P. vulgaris* ต่ำ และสารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วยเฮกเซนจากดอก ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิด นอกจากนี้ในน้ำมันกานพลูยังมีสารประกอบอื่นๆ อีกดังตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สารประกอบเคมีในน้ำมันสกัดจากกานพลู

(Maryam et al.,2006)

Compound	Retention time (min)	Amount (%)
Chavicol	26.81	0.10
Cubenere	30.58	0.34
Eugenol	31.51	63.37
β-Caryophyllene	34.29	15.94
α-Humelene	35.29	2.62
E,E-farnesol	37.18	0.44
Eugeyl acetate	38.26	13.14
+Spathulenol	40.36	0.18
Caryophyllene oxide	40.87	1.06

(ก.)

(ข.)

(ค.)

รูปที่ 2.3 (ก) ดอกสด (ข) ดอกตากแห้ง (ค) ต้นกานพลู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 เชื้อรา (http://www.bangkokhealth.com/sitesearch_detail.asp?Number=9389)

เชื้อราแบ่งเป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ คือ ราชนิดเซลล์เดียว และราสายซึ่งเป็นราชนิดหลายเซลล์ ราชนิดเซลล์เดียว เรียกว่า yeast เมื่อพูดถึงยีสต์ก็มักจะเป็นที่รู้จักกันดีโดยทั่วไป ส่วนราสายนั้นมีชื่อเรียกว่า mold หรือ mould ซึ่งมีทั้งชนิดที่ก่อให้เกิดโรค และชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา พบได้ทั้งในมนุษย์ โรคของสัตว์ และโรคของพืช การศึกษาเรื่องราวของเชื้อราจึงกระทำได้อย่างกว้างขวางมาก ทั้งนี้ขึ้นกับแง่มุมที่สนใจและแนวทางที่จะนำความรู้มาประยุกต์ใช้

เนื่องจากเชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถสังเคราะห์อาหารเองได้จำเป็นต้องอาศัยอาหารจากผู้อื่น เชื้อราบางชนิดอาศัยอินทรีย์สารจากซากพืช บางชนิดเจริญเติบโตและก่อโรคในสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ เชื้อราก่อโรคในมนุษย์ส่วนใหญ่เป็นทั้งสองแบบ ทั้งก่อให้เกิดโรคและเจริญได้โดยอาศัยอินทรีย์สารจากธรรมชาติ ความต้องการอาหารของเชื้อราแต่ละชนิดแตกต่างกันไป น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งของคาร์บอนที่เชื้อราชอบ สำหรับแหล่งของไนโตรเจนมักเป็นสารประกอบแอมโมเนีย ราบางจำพวกต้องการธาตุไนโตรเจนจากกรดอะมิโน เคอราติน และพบว่าราส่วนใหญ่ไม่ต้องการวิตามินในการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของราทั่วไปคืออุณหภูมิห้องหรือประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส เชื้อราก่อโรคส่วนใหญ่มักจะเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิห้องจนถึง 37 องศาเซลเซียส ราบางชนิดเจริญได้ดีในที่อุณหภูมิสูง 40-50 องศาเซลเซียส ที่สำคัญคือเชื้อราชนิด *Aspergillus* spp.

สำหรับยีสต์ (yeast) จัดเป็นราชนิดเซลล์เดียว มีรูปร่างได้หลายแบบ ส่วนใหญ่เป็นรูปกลมรี หรือเซลล์รูปยาวหัวท้ายตัดป้าน เจริญแพร่พันธุ์โดยการแตกหน่อเซลล์ลูกจะหลุดออกไปจากเซลล์แม่และเจริญมีการแตกหน่อต่อไปอีก ยีสต์บางชนิด เช่น Candida นอกจากจะพบเซลล์ที่แตกหน่อตามปกติแล้ว ในบางสภาวะยังพบการสร้างสายราเทียมหรือสายราแท้ได้ด้วย ในขณะที่ยีสต์บางชนิด เช่น Cryptococcus ที่มักพบเป็นสาเหตุของเชื้อราขึ้นสมองในคนไข้โรคเอดส์จะสร้างสายราเฉพาะในช่วงชีวิตที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเท่านั้น ประการสุดท้ายพบว่ายีสต์บางชนิด เช่น Histoplasma ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคสำคัญในคนไข้โรคเอดส์เช่นกัน จะมีลักษณะพิเศษ คือในธรรมชาติจะเป็นราสายแต่เมื่อเข้ามาก่อโรคในเซลล์มนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันราชนิดนี้จะเปลี่ยนรูปเจริญเป็นยีสต์ทันที นับเป็นเรื่องที่แปลกพอสมควร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกลุ่มราสาย (mould) ซึ่งจัดเป็นราชนิดหลายเซลล์ ประกอบด้วยสายราซึ่งมีการเจริญที่ปลายสายและมีการแตกแขนง สายรามีทั้งแบบไม่มีผนังกั้นและแบบมีผนังกั้น การสืบพันธุ์ของราแบ่งออกเป็นสองแบบใหญ่ๆ คือ แบบไม่อาศัยเพศ และแบบอาศัยเพศ วงจรชีวิตของเชื้อราสาย นอกจากการเจริญตามปกติของแนวทางการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแล้ว ยังพบมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศอีกด้วย โดยทั่วไปมักพบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในราสายพันธุ์เดียวกัน สำหรับแบบที่เกิดจากสายราต่างสายพันธุ์มาผสมกัน หรืออีกนัยหนึ่งคือสายราต่างเพศ พบว่ามีการพัฒนารูปร่างบางส่วนของสายราไปเป็นอวัยวะสืบพันธุ์ ประกอบด้วยเซลล์สืบพันธุ์ เซลล์สืบพันธุ์ต่างเพศอาจมีรูปร่างหน้าตาเหมือนกันหรือต่างกันก็ได้ สปอร์ของเชื้อราจึงมีความสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการช่วยจำแนกเชื้อราในระดับไฟลัม และสปีชีย์

วิธีการเข้าทำลายพืชของเชื้อราและการเกิดโรค

(http://www.sut.ac.th/e-texts/Agri/myweb2/link109.htm)

เมื่อส่วนหนึ่งส่วนใดของเชื้อราปกติมักจะเป็นสปอร์ไปสัมผัสกับพืช ก็จะงอกและเข้าไปภายในส่วนต่างๆของพืช การเข้าสู่พืชของเชื้อรามีวิธีการต่าง ๆดังนี้

1. การเข้าทางบาดแผล

2. การเข้าทางช่องเปิดทางธรรมชาติ (natural openings) ซึ่งมีปากใบช่องเปิดปลายใบ รอยแตกตามธรรมชาติที่ลำต้นและราก เป็นต้น

3. การเข้าโดยตรงทางชั้นเคลือบผิว (cuticle) และเซลล์ผิว(direct penetration) หลังจากที่เชื้อราเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืชแล้ว เชื้อราจะใช้อาหารจากพืชเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ของเชื้อ ทำให้พืชเกิดการขาดอาหาร และเป็นสาเหตุให้พืชเกิดอาการของโรค

นอกจากอาการของโรคที่เกิดจากการขาดอาหารเนื่องจากเชื้อราเป็นสาเหตุโดยตรงแล้ว อาการของโรคยังเกิดจากเชื้อราทางอ้อมโดยที่เชื้อราขับถ่ายสารต่างๆออกมาแล้วไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและกิจกรรมเมตาบอลิซึม (metabolism) ของเนื้อเยื่อพืช สารที่เชื้อราสร้างขึ้นดังกล่าว ได้แก่ เอนไซม์ ทอกซิน(toxins)สารควบคุมการเจริญเติบโต(growth regulators) สารปฏิชีวนะ (antibiotic) และสารพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ชนิดต่างๆ เชื้อราบางตัวอาจจะสร้างสารเพียงชนิดเดียว บางตัวก็สร้างหลายๆ ชนิดรวมกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ สารต่างๆเหล่านี้อาจจะทำลายเซลล์พืชโดยตรงหรือมีอิทธิพลกับกลไกที่ควบคุมขบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆในเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคพืชที่เกิดจากเชื้อราเป็นโรคพืชกลุ่มใหญ่ที่สุด มีจำนวนมากที่สุด ในบรรดาโรคพืชที่เกิดจากสาเหตุอื่น ๆ ประมาณกันไว้ว่า โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรามีมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของโรคพืชที่เกิดขึ้นทั้งหมด ในบทนี้จะกล่าวเพียงโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราที่พบเห็นกันบ่อยและเป็นโรคพืชที่มีความสำคัญต่อพืชเศรษฐกิจ

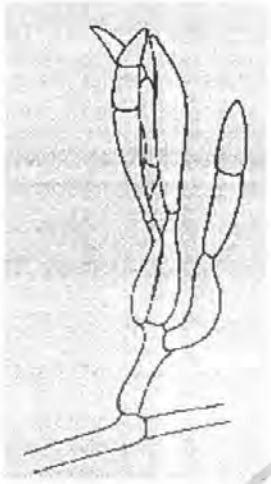
2.4 *Fusarium moniliforme*

2.4.1ลักษณะทั่วไป (http://www.doctorfungus.org/thefungi/fusarium_moniliforme.htm)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่านั้นอาจมีความสำคัญที่หลาก-หลายแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ การอธิบายลักษณะของตัวเชื้อนี้จะขึ้นอยู่กับการเจริญของเชื้อในอาหาร Potato flask agar บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งทำการเปิด-ปิดแสงไฟสลับกันไปครั้งละ 12 ชั่วโมง ในช่วงแรกนั้นโคโลนีจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วและโคโลนีจะมีลักษณะเป็นจุด หรือ แต้ม สีขาวและม่วงอ่อน จากนั้นจะกลายเป็น ไม่มีสี จนถึง สีม่วงเข้ม ดังที่แสดงในรูป 2.4 เมื่อมี Sporodochia ก่อตัวขึ้น โคโลนีจะมีสีครีมจนถึงสีส้ม อย่างไรก็ตามการกระจัดกระจายของโคโลนีบนอาหาร PFA นั้น อาจเกิด Sclerotia สีน้ำเงินเข้มเกิดขึ้น

เส้นใยที่พบได้แก่ septate และ hyaline ความยาวของ Conidiophores นั้นอยู่ในขนาดปานกลาง ซึ่งมีขนาดสั้นกว่าที่พบในเชื้อชนิด *F.solani* แต่จะมีความยาวมากกว่าที่พบในเชื้อชนิด *F.oxysporum* ซึ่งจะมีทั้งรูปแบบธรรมดาและแบบกิ่ง Conidiogenous cell นั้นเป็น monophialides Macroconidia นั้นมีการกระจายตัวอยู่ทั่วไป และมีลักษณะบางรูปร่างคล้ายเคียว หรือ เมล็ดถั่วซึ่งวัดขนาดในชนิด5-septateได้ 31-58 x 2.7-3.6 ไมโครเมตร ในseptate มีรูปร่างคล้ายวงรี หรือ กระบองวัดขนาดได้ 7-10 x 2.5-3.2 ไมโครเมตร และจะเกิดขึ้นที่หัวเทียม(การสะสมของโคนิเดียที่ปลาย phialide) และสายโซ่ แต่ไม่พบ Chlamydoconidia

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)

(ข)

รูปที่ 2.4 ก. ลักษณะเส้นใยของ *Fusarium moniliforme*
ข. โคโลนีของ *Fusarium moniliforme*

2.4.2 โรคที่เกิดจาก *Fusarium moniliforme*

โรคลำต้นเน่าในข้าวโพด (http://www.doa.go.th/fieldcrops/corn/pest/008.htm)

โรคนี้พบระบาดทั่วไปในแหล่งที่มีการปลูกข้าวโพด มักพบระบาดในระยะที่ข้าวโพดออกดอก และมีอาการรุนแรงมากขึ้นเมื่อข้าวโพดติดฝัก อาการจะพบบริเวณราก และลำต้นส่วนล่างทำให้พืชตายก่อนแก่ ฝักเล็กเมล็ดลีบ สภาพดินเป็นกรด ดินร่วนปนทรายโรคจะรุนแรงมาก

ลักษณะอาการ

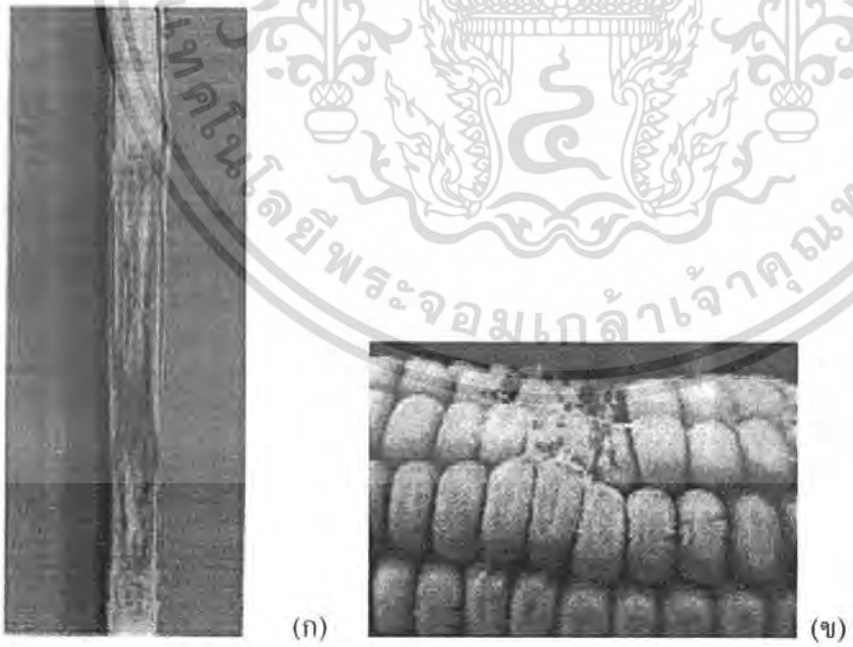
สังเกตพบว่าใบต้นที่เป็นโรคสลดสีเขียวอมเทาต่อมาจะไหม้แห้งตาย ลำต้นส่วนล่างไม่แข็งแรง จะมีลักษณะเป็นแผลสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม บริเวณแผลจะแห้งยุบตัวลง ลำต้นแตก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือฉีกบริเวณเหนือดิน เมื่อผ่าดูจะพบเส้นใยของเชื้อราสีขาวปกคลุม บริเวณแผลภายในลำต้น (ไส้) จะมีลักษณะเป็นสีชมพูหรือม่วง ดังที่แสดงในรูป 2.5 ต่อมาลำต้นจะกลวงเพราะถูกเชื้อราย่อยสลาย เมื่อถูกลมพัดต้นหักล้มได้ง่าย

การแพร่ระบาด

เชื้อราติดมากับเมล็ด (Bacon et al.,1992) หรืออาศัยในดินและเศษซากพืชที่เป็นโรคนี้ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมประกอบกับบริเวณราก ลำต้นข้าวโพด ถูกแมลงทำลายทำให้เกิดแผล เชื้อโรคจะเข้าทำลายได้ง่ายขึ้น เชื้อโรคสามารถแพร่กระจายอยู่ในลำต้นทั้งที่ไม่แสดงอาการโรค (Anderson and White,1987) เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม แผลจะแตกสร้างสปอร์มากมายและสามารถแพร่กระจายไปตามลม จากการสร้างสปอร์ 2 ขนาดคือ Macroconidia (สปอร์ขนาดใหญ่) และMicroconidia (สปอร์ขนาดเล็ก) ซึ่งจะพบสปอร์บนเส้นใยสีชมพูอมม่วงหรือชมพูอมส้มเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม เชื้อที่ปลิวไปในอากาศสามารถเข้าทำลายข้าวโพดโดยตรงได้ทางรูเปิดตามธรรมชาติที่มีความชื้น เช่น บริเวณกาบใบ หรือติดไปกับฝักเมื่อถูกกะเทาะออกมาสามารถแพร่กระจายปนเปื้อนเมล็ดอื่นทั่วทั้งโรงเก็บ (Kucharek and Kommedahl, 1966) เชื้อรานี้สร้างสารพิษ Fumonisins ซึ่งเป็นสาเหตุของมะเร็ง (Marasas et al, 1984)



(ก) (ข)

รูปที่ 2.5 (ก) ลำต้นที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะมีสีน้ำตาลแดง

(ข) เชื้อรา *Fusarium moniliforme* ที่ชื้นในข้าวโพด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 *Sclerotium rolfsii*

2.5.1 ลักษณะทั่วไป (http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/s_rolfs.htm)

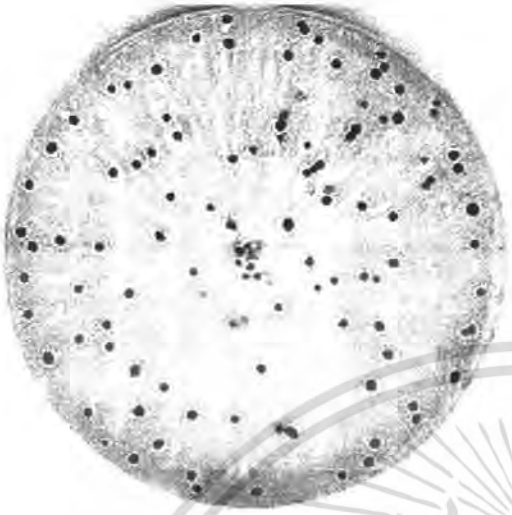
การอยู่รอดหรือการเจริญของเชื้อรา *S.rolfsii* และการโจมตีพืชซึ่งเจริญที่ผิวดิน ก่อนที่เชื้อก่อโรคจะทำการเจาะเข้าสู่เนื้อเยื่อของโฮส มันจะผลิตเส้นใยไมซีเลียมปกคลุมพื้นผิวของต้นพืช ซึ่งกระบวนการนี้จะใช้เวลาประมาณ 2-10 วัน การเจาะเข้าสู่เนื้อเยื่อของโฮสนั้นจะเกิดขึ้นเมื่อเชื้อที่ก่อโรคนั้นผลิตเอนไซม์ซึ่งจะทำลายชั้นเซลล์ภายนอกของโฮส ต่อมาเนื้อเยื่อจะเกิดการย่อยสลาย ต่อจากนั้นการผลิตผลิตภัณฑ์และการพัฒนาของ Scerotia จะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

การงอก เพิ่มจำนวนและแตกหน่อของ hyphal นั้นเป็นลักษณะพิเศษซึ่งเกิดขึ้นจากการเจริญของเส้นใยที่พื้นผิวของ scerotial ในขณะที่ลักษณะของการงอกนั้นจะขึ้นกับกลุ่มเส้นใยไมซีเลียมซึ่งจะแตกตัวทะลุออกมาจากพื้นผิวของ scerotial ปริมาณการเจริญและพลังงานที่ใช้ของ mycelial นั้นจะขึ้นกับประเภท และชนิดของ scerotial ที่เกิดการงอกนั้นๆ ซึ่งการงอกนั้นต้องการแหล่งอาหารเพื่อที่จะใช้ในการแพร่เชื้อเข้าสู่เนื้อเยื่อของโฮส เพราะว่าการเจริญของเส้นใยนั้นจะเกิดอย่างกระจายตัว อย่างไรก็ตาม ไมซีเลียมที่เกิดจากการงอกของ scerotia นั้นสามารถแพร่กระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อของโฮส โดยไม่จำเป็นที่จะต้องได้รับแหล่งอาหารจากภายนอก

S. rolfsii นั้นสามารถดำรงชีวิตอยู่ภายใต้สิ่งแวดล้อมหลายรูปแบบและหลายสภาวะ และสามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชที่กว้างและเจริญได้ดีที่สุดในดินที่เป็นกรดช่วงพีเอชที่ต่ำที่สุดสำหรับการเจริญของ mycelial คือ 3.0-5.0 การงอกหรือเพิ่มจำนวนนั้นจะถูกยับยั้งที่ค่าพีเอชมากกว่า7.0 mycelial สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ช่วงอุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส เจริญได้น้อยที่ 10 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญได้ที่ 40 องศาเซลเซียส scerotial จะสามารถพัฒนาได้สูงสุดที่อุณหภูมิขั้นต่ำสำหรับการเจริญของ Mycelial และ Mycelium จะถูกกำจัดที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แต่ screotia นั้นสามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง -10 องศาเซลเซียส ราต้องการความชื้นสูงสำหรับการเจริญเติบโต โดยScerotialจะไม่สามารถงอกหรือเพิ่มจำนวนได้เมื่อความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่าจุดอิ่มตัวมากเกินไป อย่างไรก็ตามมีการศึกษายืนยันว่าscerotia สามารถงอก/เพิ่มจำนวนได้ดีที่สุดที่ความชื้นสัมพัทธ์ 25-35เปอร์เซ็นต์ การเจริญของ mycelial และการงอก/เพิ่มจำนวนของ scerotial จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อได้รับแสงอย่างต่อเนื่อง แม้ว่าสถานการณ์นี้จะสามารถเกิดขึ้นได้ในความมืดถ้ามีสภาวะอื่นที่ดีกว่าส่งเสริม

ในบางครั้ง *S.rolfsii* จะมีสภาวะที่จะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยพัฒนามาจากส่วนที่ไม่ได้รับแสงหรือได้รับบาดเจ็บ สปอร์ที่ไม่มีสี 2-4 ชั้น จะอยู่บนหนามสั้นๆ สปอร์นั้นมีน้ำหนักที่เบามาก ซึ่งถ้าผลิตออกมาจำนวนมากจะทำให้สามารถเคลื่อนที่ไปได้ระยะทางไกลๆในอากาศ สภาวะนี้จะไม่สามารถพบได้บ่อยในทุ่งหญ้าและไม่ได้เป็นปัจจัยสำคัญในการแพร่ระบาดของเชื้อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 โคโลนีของ *Sclerotium rolfsii*

ระบาดวิทยา

S. rolfsii สามารถดำรงชีวิตได้ในฤดูหนาวในรูปแบบของ mycelium ในเนื้อเยื่อซึ่งติดเชื้อหรือซากพืช มันจะคงอยู่ในรูปแบบของscerotia โดย scerotia นั้นอาจแพร่กระจายมาจากอุปกรณ์การเกษตร (ดินที่มีเชื้ออาศัยอยู่ และ เครื่องมือที่มีการปนเปื้อน) การขนย้ายต้นกล้า น้ำจากการชลประทาน ลม และอาจติดจากเมล็ดพืช และยังมีโอกาสเล็กน้อยที่เชื้อจะสามารถมีชีวิตรอดโดยอาศัย แกะ วัว ควาย และสามารถแพร่กระจายโดยผ่านทางปุ๋ยได้อีกด้วย

2.5.2 โรคที่เกิดจาก *Sclerotium rolfsii*

โรคหัวและรากเน่า

http://agriqua.doae.go.th/plantclinic/clinic/plant/garlic/dgar6_2.htm

ใบแก่ของหอมจะเหลืองเหี่ยวแห้งและหักพับลงจากปลาย เมื่อ ดึงต้นขึ้นก็จะหลุดจากดินได้ง่ายเพราะส่วนรากถูกทำลายหมด กาบหัวหอมช้ำน้ำ เนื้อเยื่อนิ่มเน่าและเปื่อยยุ่ย ลักษณะอาการในตอนต้น ใกล้เคียงกับโรคแรก แต่โรคนี้นอกจากจะพบเส้นใยสีขาวฟู ซึ่งค่อนข้างหยาบกว่าโรคแรกแล้ว ในระยะต่อมาจะพบเม็ดสเคลอโรเตียม (คล้ายเม็ดผักกาด) ขนาดเล็กสีขาวปนน้ำตาลขึ้นอยู่ตามรากและโคนต้นที่เน่านั้น (ในระยะนี้จะคล้ายกับโรคโคนต้นเน่า) และยังพบเจริญแทรกอยู่ตามดินบริเวณใกล้เคียงด้วย เมื่อเข้าระยะที่สร้างเม็ดสเคลอโรเตียม จะมีสีเข้มขึ้น เชื้อจะเข้าทำลายต้นหอมจนกระทั่งหัวเหี่ยวหดย่น และเน่าตาย ดังที่แสดงในรูปที่ 2.7 โรคนี้พบเกิดกับหัวหอมขณะเก็บรักษาและรอการขนส่งด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.7 หัวหอมที่ถูกทำลายด้วย *Sclerotium rolfsii*

2.6 *Alternaria solani* (http://en.wikipedia.org/wiki/Alternaria_solani#_note-3)

2.6.1 ลักษณะทั่วไป

Alternaria solani เป็นเชื้อก่อโรคเกิดมาจากโรคในมะเขือเทศและมันฝรั่งที่เรียกว่า Early blight ซึ่งจะก่อให้เกิดบาดแผลเล็กๆบนต้นพืชซึ่งจะแพร่กระจายเป็นจุดดำไปตามเนื้อเยื่อพืชส่วนที่ตายแล้ว บ่อยครั้งจะทำลายต้นพืชในระยะยาว ถ้าแมล็ดพันธุ์ติดเชื้อนี้อาจจะทำให้เน่าเสียในระหว่างการงอกได้ ซึ่งโรคนี้จะสามารถป้องกันได้โดยสารฆ่าเชื้อราเช่น azoxystrobin, potassium bicarbonate, hydrogen dioxide ซึ่งจะให้ผลได้เทียบเท่าการควบคุมทางชีวภาพโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* วิธีการป้องกันอื่นๆได้แก่ การควบคุมการไหลเวียนของอากาศในแปลงพืชและการปลูกพืชหมุนเวียนซึ่งจะทำให้มีพืชที่เจริญได้ดีในที่ร่มปลูกในทุกๆ3ปี แล้วจึงทำการเลือกสายพันธุ์ที่มีความต้านทานที่มีการพัฒนาสายพันทางธรรมชาติ

2.6.2 โรคที่เกิดจาก *Alternaria solani*

โรคใบจุดวง (Early blight)

ลักษณะอาการ

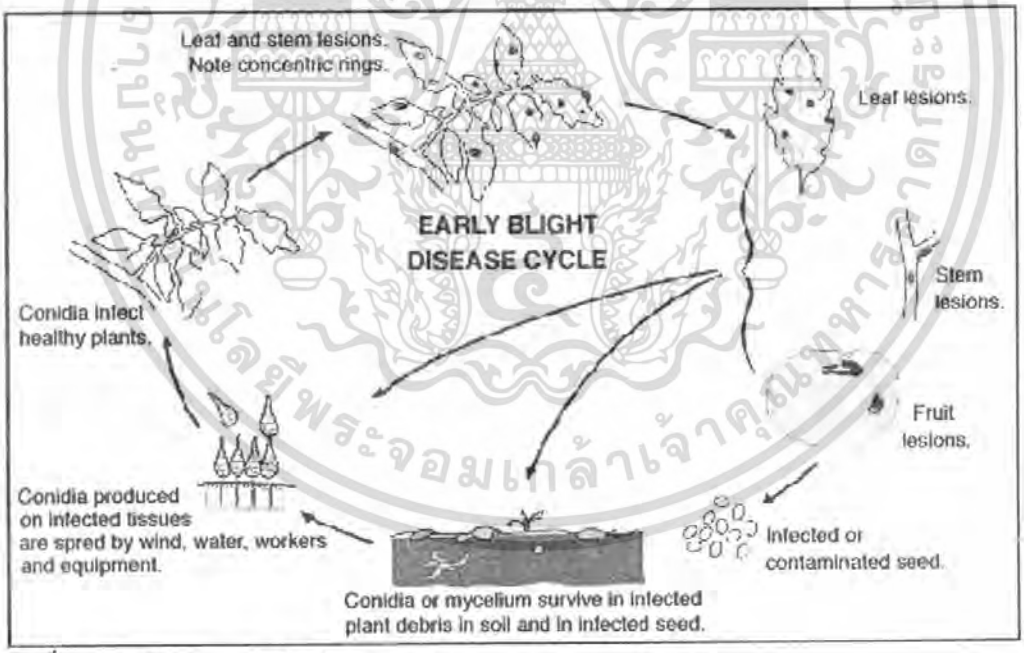
ปรากฏอาการบนใบ โดยเริ่มจากจุดเล็กๆสีน้ำตาลที่อาจมีสีเข้มจนเป็นสีดำ เป็นทรงกลมหรือเหลี่ยมขนาด 2-4 มิลลิเมตร และเป็นแอ่งจมยุบลงไปจากผิวเนื้อเยื่อใบปกติเล็กน้อย เพราะแผลถูกจำกัดขนาดโดยเส้นใบ มีขนาด 1-2 เซนติเมตร จุดแผลสีดำเล็กๆนั้นจะเกิดเป็นวงกลมเรียงซ้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กันเป็นชั้นๆ โดยมีจุดศูนย์กลางร่วมกัน แผลมักปรากฏบนใบมากกว่าที่ลำต้น และมักปรากฏในช่วงที่มันฝรั่งเริ่มลงหัว โดยเกิดที่ใบแก่ซึ่งอยู่ส่วนล่างๆของลำต้นก่อน แล้วจึงลุกลามติดกัน ทำให้ใบเหลือง ร่วง และตาย หัวมันฝรั่งที่เน่าเนื่องจากโรคนี้จะมีแผลเป็นลักษณะแห้ง เหนียว สีน้ำตาลคล้ำ ซึ่งจะพบในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต เช่น อากาศร้อน ความชื้นสูง ขาดธาตุอาหาร หรือมีโรคอื่นๆร่วมด้วย ทำให้พืชอ่อนแอต่อโรคนี้ และพืชแห้งตายก่อนกำหนด ดังที่แสดงในรูปที่ 2.9

ระบาดวิทยา

เชื้อราอัลเทอร์นาเรียอาศัยเกาะกินและเจริญเติบโตบนพืชที่ยังมีชีวิตอยู่ และซากพืชที่ปล่อยทิ้งไว้ตามดินในแปลงปลูก นอกจากนั้นเชื้อรายังติดไปกับท่อนพันธุ์ เมื่อนำไปเพาะเชื้อก็จะงอกเข้าทำลายพืชที่อยู่ใกล้ทันที เชื้อที่จะสร้างสปอร์บนแผลที่ต้น กิ่ง ใบ เมื่อสปอร์แก่ก็จะหลุดออกแล้วปลิวไปตามลม น้ำ แมลง มนุษย์ สัตว์ และสิ่งเคลื่อนไหวได้ทุกชนิด ตลอดจนเครื่องมือเครื่องใช้ต่างๆ เมื่อตกลงบนพืชและสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมก็จะงอกเข้าทำลายพืช

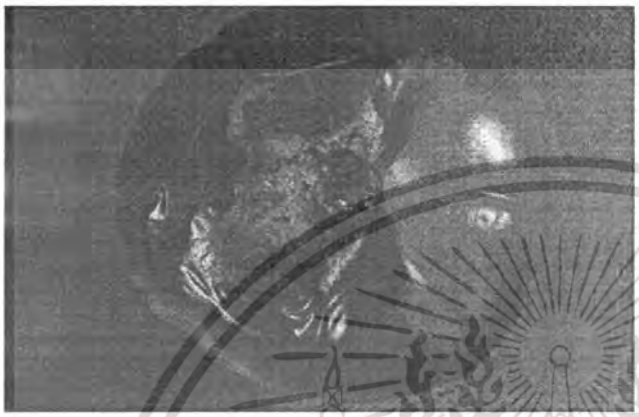


รูปที่ 2.8 วัฏจักรของการเกิดโรคจุดวง (www.nysaes.cornell.edu)

จากรูปที่ 2.8 เชื้อราสามารถอยู่รอดได้ในดินและเข้าไปแฝงตัวในพืชผลและเศษวัชพืช เชื้อสามารถติดมากับเมล็ด ลม น้ำ แมลง คนงาน และ อุปกรณ์ในไร่ต่างๆ สปอร์ซึ่งตกลงบนต้นมะเขือเทศจะเริ่มเจริญเติบโตและเข้าไปฝังตัวที่บริเวณใบที่เปียก เชื้อราจะมีประสิทธิภาพสูงสุดใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
83762

อุณหภูมิปานกลางและบรรยากาศชื้นๆ เชื้อโรคจะมีประสิทธิภาพต่ำที่สุดในฤดูฝน โรคใบจุดวงจะทำความเสียหายสูงสุดบนพืชที่มีผลติดต้นเต็มที่ ต้นพืชที่ถูกพยาธิตัวกลมโจมตี หรือ มีภาวะขาดไนโตรเจน เป็นต้น

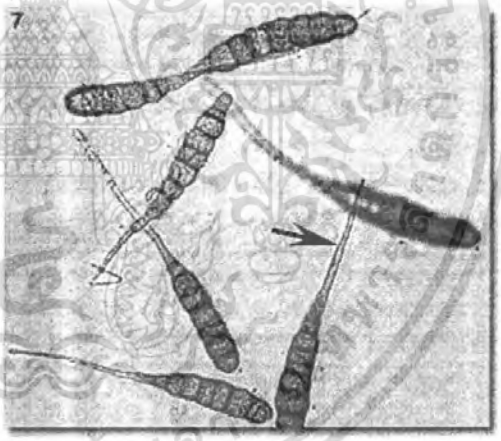


(ก.)

www.inra.fr

www.pinus-tki.si

(ข.)



www.potatodiseases.org

(ค.)

รูปที่ 2.9 (ก.) ผลของมะเขือเทศที่ถูกทำลายด้วยเชื้อ *Alternaria solani*

(ข.) ส่วนใบของต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคโรคใบจุดวง (Early blight)

(ค.) ลักษณะ conidia ของ *Alternaria solani*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จำรัส (2529) ได้ทำการนำสารสกัดจากกานพลูมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสกุล *Aspergillus* 13 ชนิด : *Aspergillus auricomus, A.fumigatus, A. fischeri, A.flavus , A. candidus, A. nidulans, A.niger, A.oryzae, A.sydowi, A. terreus, A. terricola, A. ustus* และ *A. versicolor* บนอาหาร PDA ที่ผสมผงกานพลูที่ความเข้มข้น 0 , 2,000 , 4,000 , 6,000 , 8,000 และ 10,000 ppm. ปรากฏว่ากานพลูสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ทั้ง 13 ชนิดในทุกระดับความเข้มข้น แต่มีแนวโน้มว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *A.flavus* และ *A.fumigatus* ได้ดีที่สุด ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 2,000ppm. โดยยับยั้งได้ 91.46 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรา *A.candidus* เป็นเชื้อราที่กานพลูสามารถยับยั้งได้น้อยสุด ได้เพียง 80 เปอร์เซ็นต์

Maryam และคณะ (2006) ได้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* ของน้ำมันสกัดจาก ทามย์, ซัมเมอร์ซาเวอรี และ กานพลู บนอาหาร Sabouraud Dextrose Broth และ กากมะเขือเทศ โดยเจือจางน้ำมันสกัดเหล่านี้ให้มีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 0, 50, 200, 350 และ 500 ppm แล้วนำไปผสมลงในอาหารแต่ละชนิด และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *A.flavus* ได้โดยที่น้ำมันสกัดจาก ทามย์, ซัมเมอร์ซาเวอรี และ กานพลู ที่ความเข้มข้น 500ppm สามารถยับยั้งได้ 100, 100 และ 87.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อนำไปทดสอบ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของน้ำมันสกัดแต่ละชนิดในการมะเขือเทศ ปรากฏมีเปอร์เซ็นต์ต่ำกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อนำไปประเมินทางด้านรสชาติและกลิ่นของซอสมะเขือเทศที่มีน้ำมันสกัดของแต่ละชนิดผสมอยู่ ปรากฏว่าการใช้ thyme ที่ความเข้มข้น 500ppm เป็นระดับที่ยอมรับที่สุดจากผู้ประเมิน และกานพลูอยู่ในระดับที่ต่ำที่สุด

Matan และคณะ (2006) ได้นำส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยและกานพลูมาทดสอบคุณสมบัติและความต้านทานต่อการทำให้เน่าเสียของจุลินทรีย์สำคัญๆกับอาหารที่มีความชื้นปานกลางกับเชื้อรา 4 ชนิด (*Aspergillus flavus, Penicillium roqueforti, Mucor plumbeus* และ*Eurotium sp.*) ,ยีสต์ 4 ชนิด (*Debaryomyces hansenii, Pichia membranaefaciens, Zygosaccharomyces rouxii* and *Candida lipolytica*), แบคทีเรีย 2 ชนิดได้แก่ (*Staphylococcus aureus* และ *Pediococcus halophilus*) โดยจะแบ่งการลงเชื้อในเพลทที่มีอาหารวุ้น บรรจุในถุง และเปิดค่อเมื่อจะใส่น้ำมันหอมระเหยภายใต้บรรยากาศที่ถูกดัดแปลงให้มี ออกซิเจนต่ำ น้อยกว่า 0.05 – 10% และให้มีปริมาณ คาร์บอนไดออกไซด์สูง (20 หรือ 40 เปอร์เซ็นต์) และปริมาณไนโตรเจนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมดุล *Aspergillus flavus* และ *Eurotium sp* นั้นได้มีการยืนยันว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความต้านทานมากที่สุด ปริมาณของน้ำมันหอมระเหยที่จะเติมนั้นอยู่ระหว่าง 1000 ถึง 4000 ไมโครลิตร ที่อัตราส่วน 1 : 1 ได้ถูกทดสอบปริมาณขั้นต่ำสำหรับการยับยั้ง รา และ ยีสต์ ใน gas phase นั้นใช้น้ำมันหอมระเหยประมาณ 1000 ไมโครลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Candida lipolytica* และ *Pichia membranaefaciens* ; ในปริมาณ 2000 ไมโครลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. flavus, P. roqueforti, M. plumbeus, Eurotium sp., D. hansenii, Z.. rouxii* ในขณะที่การยับยั้งเชื้อ *A. flavus* ต้องใช้ปริมาณน้ำมันถึง 4000 ไมโครลิตร และเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของน้ำมันหอมระเหยจะทำให้การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. flavus* มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

Feng และ Zheng (2007) ได้ทำการทดลองนำน้ำมันสกัดคาสเซีย (Cassia) มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Alternaria solani* บนอาหาร PDA โดยผสมความเข้มข้นที่ 100, 200, 300, 400 และ 500ppm บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน ผลปรากฏว่าที่ระดับความเข้มข้น 300ppm สามารถยับยั้ง *Alternaria solani* ได้สมบูรณ์ จากนั้นได้ทำการทดสอบหาคุณสมบัติของน้ำมันคาสเซียว่าเป็น fungicide หรือ fungistatic โดยการถ่ายเชื้อที่ถูกยับยั้งที่ 300ppm, 400ppm และ 500ppm มาลงในอาหาร PDA ทุกวันที่ 1, 3, 6 และ 12 ผลปรากฏว่าเชื้อไม่มีการเจริญหลังจากถ่ายเชื้อที่มีอายุ 6 วันจาน 300 และ 400ppm และไม่มีการเจริญหลังจากถ่ายเชื้อที่มีอายุ 3 วันจาน 500ppm นอกจากนั้นยังได้ทดสอบการยับยั้งในมะเขือเทศ โดยใช้น้ำมันคาสเซียที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ 500ppm ใช้ชุดความเข้มข้นละ 20 ผล บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน ผลปรากฏว่าที่ระดับความเข้มข้น 500ppm สามารถลดการเข้าทำลายได้ 34.2 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์

1. ชุดสกัดน้ำมันหอมระเหย
2. บีกเกอร์
3. กระบอกตวง
4. ขวดแก้วเล็ก
5. แท่งแก้ว
6. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ(Plate)
7. ตะเกียงแอลกอฮอล์
8. ลูปเขี่ยเชื้อ(Loop)
9. เข็มเขี่ยเชื้อ(Needle)
10. cock borer
11. ปิเปต
12. ไมโครปิเปต(Micropipette)
13. ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ (Duran)
14. เครื่องบด (blender)
15. ไม้บรรทัด

3.1.2 สมุนไพรที่ใช้ในการควบคุมเชื้อ

กานพลู (*Syzygium aromaticum* L.)

3.1.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. แอบโซลูทเอทานอล
2. PDA
3. มะเขือเทศ
4. หัวหอมใหญ่
5. ข้าวโพด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4 เชื้อราที่ใช้

1. *Fusarium moniliforme*

2. *Sclerotium rolfsii*

3. *Alternaria solani*

3.2 การสกัดและการเตรียมน้ำมันหอมระเหย

1. นำตัวอย่างที่ต้องการสกัดตามปริมาณที่ต้องการมาบดหรือทำให้เป็นชิ้นเล็ก
2. แบ่งตัวอย่างมา 5 กรัม ใส่ลงไปใน flask แล้วเติมน้ำลงไป 300 มิลลิลิตร
3. นำไปเข้าเครื่องสกัดเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง
4. จากนั้นนำมาขจัดน้ำโดยเติม anhydrous sodium sulphate
5. เก็บน้ำมันหอมระเหยที่ได้ใส่ในหลอดที่มีฝาปิดสนิท
6. นำน้ำมันที่สกัดได้มาเจือจางกับเอทิลแอลกอฮอล์และหาความเข้มข้นที่แน่นอน

3.3 การเตรียมชุดควบคุม

1. ใช้แอบโซลูทเอทานอลเป็นชุดควบคุมโดยปิเปตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยให้ปริมาตรของเอทานอลเท่ากับปริมาตรของน้ำมันหอมระเหยที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนที่ผสมลงในอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ 80 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 3 จานเท่าๆกันและตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

2. นำเชื้อราทั้ง 3 ชนิดที่เลี้ยงบนอาหาร PDA จนได้โคโลนีขนาดประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของจาน มาทำการเจาะบริเวณขอบของโคโลนีด้วย cock borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยก้อนวุ้นขึ้นมา แล้วนำไปวางบนจานอาหารที่ผสมน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 โดยวางก้อนวุ้น 1 ชิ้นต่อ 1 จานต่อ 1 ความเข้มข้น ที่บริเวณกลางจานเพาะเลี้ยง

3. นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยสำหรับ *Fusarium moniliforme* บ่มเป็นเวลา 7 วัน, *Alternaria solani* บ่มเป็นเวลา 9 วัน และ*Sclerotium rolfsii* บ่มเป็นเวลา 5 วัน เพื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การทดสอบระดับ *In vitro*

3.4.1 การทดสอบหาระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้สมบูรณ์ในอาหาร PDA

1. คำนวณปริมาตรน้ำมันหอมระเหยที่แต่ละความเข้มข้นแล้วนำไปผสมในอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ 80 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 3 จานเท่าๆกัน และตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

2. นำเชื้อราทั้ง 3 ชนิดที่เลี้ยงบนอาหาร PDA จนได้โคโลนีขนาดประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของจาน มาทำการเจาะบริเวณขอบของโคโลนีด้วย cock borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยก้อนวุ้นขึ้นมา แล้วนำไปวางบนจานอาหารที่ผสมน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 โดยวางก้อนวุ้น 1 ชิ้นต่อ 1 จานต่อ 1 ความเข้มข้น ที่บริเวณกลางจานเพาะเลี้ยง

3. นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยสำหรับ *Fusarium moniliforme* บ่มเป็นเวลา 7 วัน, *Alternaria solani* บ่มเป็นเวลา 9 วัน และ*Sclerotium rolfsii* บ่มเป็นเวลา 5 วัน

4. ตรวจผลการยับยั้งเชื้อรา โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อราที่เลี้ยงในจานที่ผสมน้ำมันหอมระเหยรวมทั้งในชุดควบคุมที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3 และสังเกตชุดที่มีระดับความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำให้เชื้อไม่สามารถโตได้ ที่ระดับความเข้มข้นนั้นคือ ค่า MIC

5 นำผลที่วัดได้ไปคำนวณด้วยโปรแกรมทางสถิติ

หมายเหตุ โดยขั้นตอนทั้งหมดทำการปฏิบัติด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (Aseptic Technique)

3.4.2 การทดสอบหาผลของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูว่าสามารถฆ่าเชื้อรา (fungicidal) หรือได้เพียงแค่ยับยั้งเชื้อรา (fungistatic)

หลังจากที่ทดลองหาค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ระดับความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (MIC) แต่เราก็ยังไม่สามารถทราบได้ว่าเชื้อราที่ไม่สามารถเจริญได้ในจานทดสอบนั้น มันจะยังมีชีวิตรอดอยู่หรือไม่ เราสามารถทดสอบได้โดยการถ่ายเชื้อราที่ถูกยับยั้งไปยังจานที่มีอาหาร PDA อยู่ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม หากเชื้อมีการเจริญก็แสดงว่าคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยกานพลูเป็น fungistatic คือสามารถยับยั้งได้เท่านั้น แต่ถ้าเชื้อไม่มีการเจริญก็แสดงว่ามันมีคุณสมบัติเป็น fungicidal คือ สามารถฆ่าเชื้อราตายได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการทดลอง

1. นำเชื้อราที่ต้องการทดสอบมาเลี้ยงใน PDA ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ระดับความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งได้เป็นเวลา 12 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2. เมื่อครบ 12 วัน ก็ทำการถ่ายเชื้อลงในจานที่มี PDA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วสังเกตผลว่าเชื้อราสามารถเจริญได้หรือไม่

หมายเหตุ โดยขั้นตอนทั้งหมดทำการปฏิบัติด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (Aseptic Technique)

3.5การทดสอบระดับ *In vivo*

3.5.1 การทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria solani* ของน้ำมันหอมระเหยกานพลูบนผลมะเขือเทศ

1 เตรียมน้ำมันสกัดกานพลูบริสุทธิ์และที่เจือจางด้วยแอบโซลูทเอทิลแอลกอฮอล์ ที่ระดับความเข้มข้น 600, 800 และ 1000ppm

2 นำมะเขือเทศทำให้เกิดแผล โดยการเฉือนที่ขั้วออกบางๆ โดยให้มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร และทำการแบ่งกองมะเขือเทศออกเป็นแต่ละชุดความเข้มข้น โดยใช้มะเขือเทศ 8 ลูกต่อ 1 ชุดความเข้มข้น

3 ปิเปตน้ำมันหอมระเหยกานพลูแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มาหยดลงบนบริเวณที่ถูกเฉือนของมะเขือเทศในแต่ละชุดความเข้มข้น ปริมาณ 100µl ต่อ 1 ตัวอย่าง

4 เตรียมชุดควบคุมด้วยแอบโซลูทเอทิลแอลกอฮอล์ มาหยดลงบนบริเวณที่ถูกเฉือนของมะเขือเทศ ปริมาณ 100µl ต่อ 1 ตัวอย่าง จำนวน 8 ซ้ำ

5 นำเชื้อรา *Alternaria solani* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA มาทดสอบ โดยใช้ cock borer ที่จุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนไฟแล้ว นำไปเจาะก้อนวุ้นบริเวณที่มีเชื้อราเจริญ จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่จุ่มแอลกอฮอล์ ลนไฟแล้ว เขี่ยก้อนวุ้นขึ้นมาแล้วนำไปวางบนบริเวณรอยเฉือนของมะเขือเทศ

6 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน แล้วบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium moniliforme* ของน้ำมันหอมระเหยกานพลูบนฝักข้าวโพด

1 เตรียมน้ำมันหอมระเหยกานพลูบริสุทธิ์และที่เจือจางด้วยแอบโซลูทเอทิลแอลกอฮอล์ให้ได้ระดับความเข้มข้น 600, 800 และ 1000ppm

2 เตรียมชิ้นข้าวโพดที่มีพื้นที่ผิวประมาณ 3 ตารางเซนติเมตร หนักประมาณ 5 กรัม มาแบ่งเป็นชุดความเข้มข้นละ 8 ชิ้น

3 ปิเปตน้ำมันสกัดกานพลูแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มาหยดลงบนชิ้นข้าวโพดในแต่ละชุดความเข้มข้น ปริมาณ 100µl ต่อ 1 ตัวอย่ง

4 เตรียมชุดควบคุมด้วยแอบโซลูทเอทิลแอลกอฮอล์ มาหยดลงบนชิ้นข้าวโพด ปริมาณ 100µl ต่อ 1 ตัวอย่าง จำนวน 8 ซ้ำ

5 นำเชื้อรา *Fusarium moniliforme* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA มาทดสอบ โดยใช้ cock borer ที่จุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนไฟแล้ว นำไปเจาะก้อนวุ้นบริเวณที่มีเชื้อราเจริญ จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่จุ่มแอลกอฮอล์ ลนไฟแล้ว เขี่ยก้อนวุ้นขึ้นมาแล้วนำไปวางบนชิ้นข้าวโพด

6 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน แล้วบันทึกผล

3.5.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ของน้ำมันสกัดกานพลูบนหัวหอมใหญ่

1 เตรียมน้ำมันสกัดกานพลูบริสุทธิ์และที่เจือจางด้วยแอบโซลูทเอทิลแอลกอฮอล์ ให้ได้ระดับความเข้มข้น 400, 600, 800, 1000, 5000 และ 10000ppm

2 นำหัวหอมมาหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมประมาณ 2×2 เซนติเมตร แล้วแบ่งเป็นชุดความเข้มข้นละ 8 ชิ้น

3 ปิเปตน้ำมันสกัดกานพลูแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มาหยดลงบนชิ้นหัวหอมในแต่ละชุดความเข้มข้น ปริมาณ 100µl ต่อ 1 ตัวอย่าง

4 เตรียมชุดควบคุมด้วยแอบโซลูทเอทิลแอลกอฮอล์ มาหยดลงบนชิ้นหัวหอม ปริมาณ 100µl ต่อ 1 ตัวอย่าง จำนวน 8 ซ้ำ

5 นำเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA มาทดสอบ โดยใช้ cock borer ที่จุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนไฟแล้ว นำไปเจาะก้อนวุ้นบริเวณที่มีเชื้อราเจริญ จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่จุ่มแอลกอฮอล์ ลนไฟแล้ว เขี่ยก้อนวุ้นขึ้นมาแล้วนำไปวางบนชิ้นหัวหอม

6 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน แล้วบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

<u>ผลการทดลองระดับ *In vitro*</u>

4.1 ผลของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium moniliforme*

ผลการศึกษาสารสกัดน้ำมันหอมระเหยที่ผสมลงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ระดับความเข้มข้น 100, 200, 300 และ 400ppm ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium moniliforme* หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสารสกัดน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้สมบูรณ์(MIC) คือ 400ppm ส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อราในที่ความเข้มข้น 100ppm มีขนาดเล็กกว่าในจานควบคุมไม่มากนัก ดังรูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการยับยั้งเชื้อ *Fusarium moniliforme* ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ความเข้มข้นน้ำมันหอมระเหย (ppm)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อ *Fusarium moniliforme* (cm)				
	0	100	200	300	400
กานพลู	5.4^{e}	4.2^{d}	3.37^{c}	1.23^{b}	0.5^{a}

หมายเหตุ - มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ขนาดของ
- เส้นผ่าศูนย์กลางของก้อนเชื้อมีขนาด 0.5 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

ผลการศึกษาสารสกัดน้ำมันหอมระเหยที่ผสมลงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ระดับความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ 500ppm ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าสารสกัดน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้สมบูรณ์(MIC) คือ 300ppm ส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อราในที่ความเข้มข้น 100ppm ไม่มีความแตกต่างจากจานควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดัง รูปที่ 4.2 และ ตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการยับยั้งเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ความเข้มข้นน้ำมันหอมระเหย (ppm)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* (cm)					
	0	100	200	300	400	500
กานพลู	8.46[c]	8.43[c]	3.37[b]	0.5[a]	0.5[a]	0.5[a]

หมายเหตุ - มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ขนาดของ
- เส้นผ่าศูนย์กลางของก้อนเชื้อมีขนาด 0.5 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria solani*

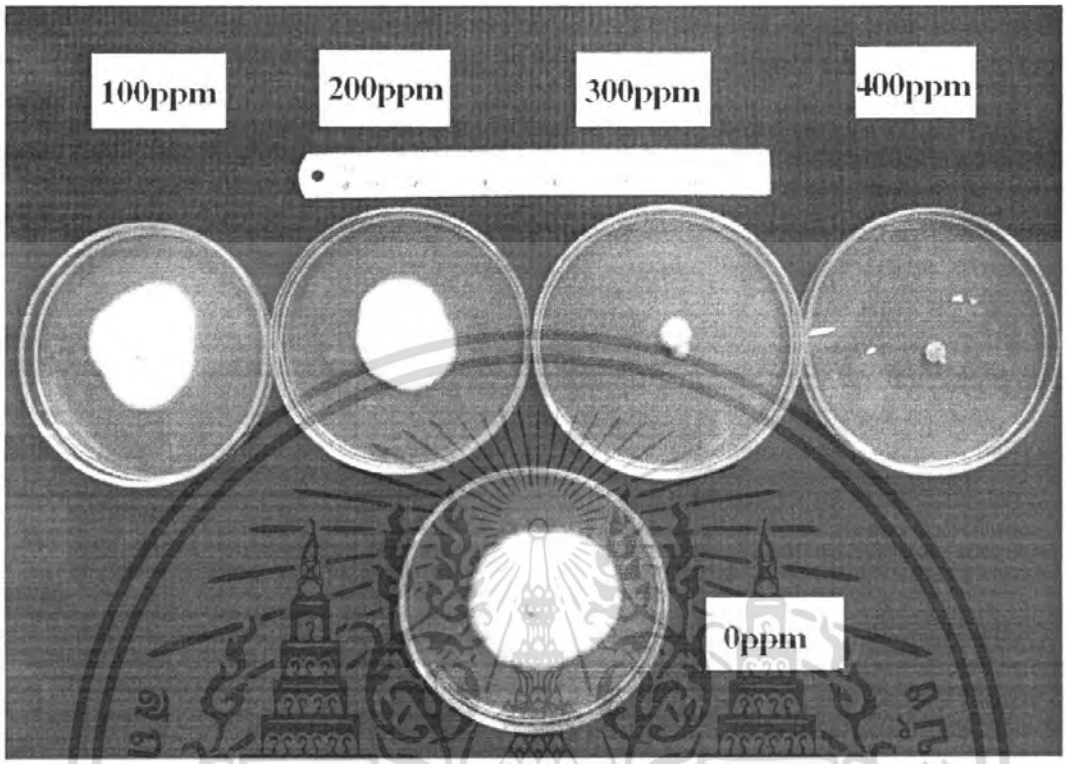
ผลการศึกษาสารสกัดน้ำมันหอมระเหยที่ผสมลงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ระดับความเข้มข้น 100, 200, 300 และ 400ppm ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria solani* หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน พบว่าสารสกัดน้ำมันหอมระเหยที่ดับความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่ สามารถยับยั้งได้(MIC) คือ 400ppm ดังรูปที่ 4.3 และตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการยับยั้งเชื้อ *Alternaria solani* ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ความเข้มข้นน้ำมันหอมระเหย (ppm)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อ *Alternaria solani* (cm)				
	0	100	200	300	400
กานพลู	6.43[e]	3.73[d]	2.1[c]	0.6[b]	0.5[a]

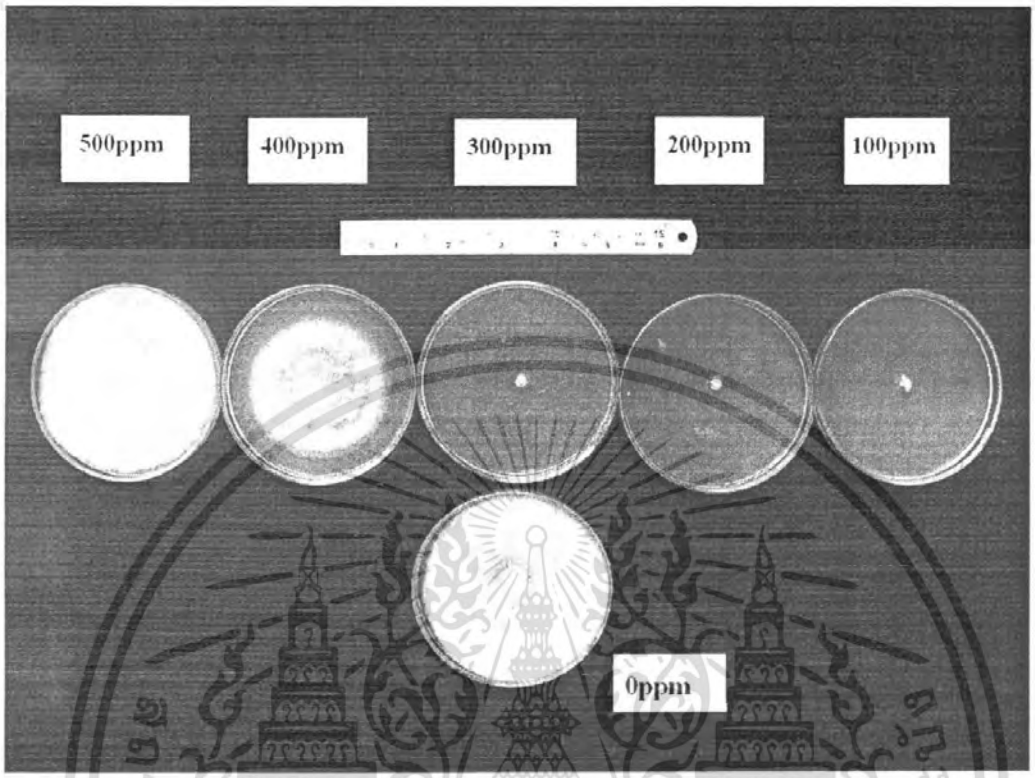
หมายเหตุ - มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ขนาดของ
- เส้นผ่าศูนย์กลางของก้อนเชื้อมีขนาด 0.5 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



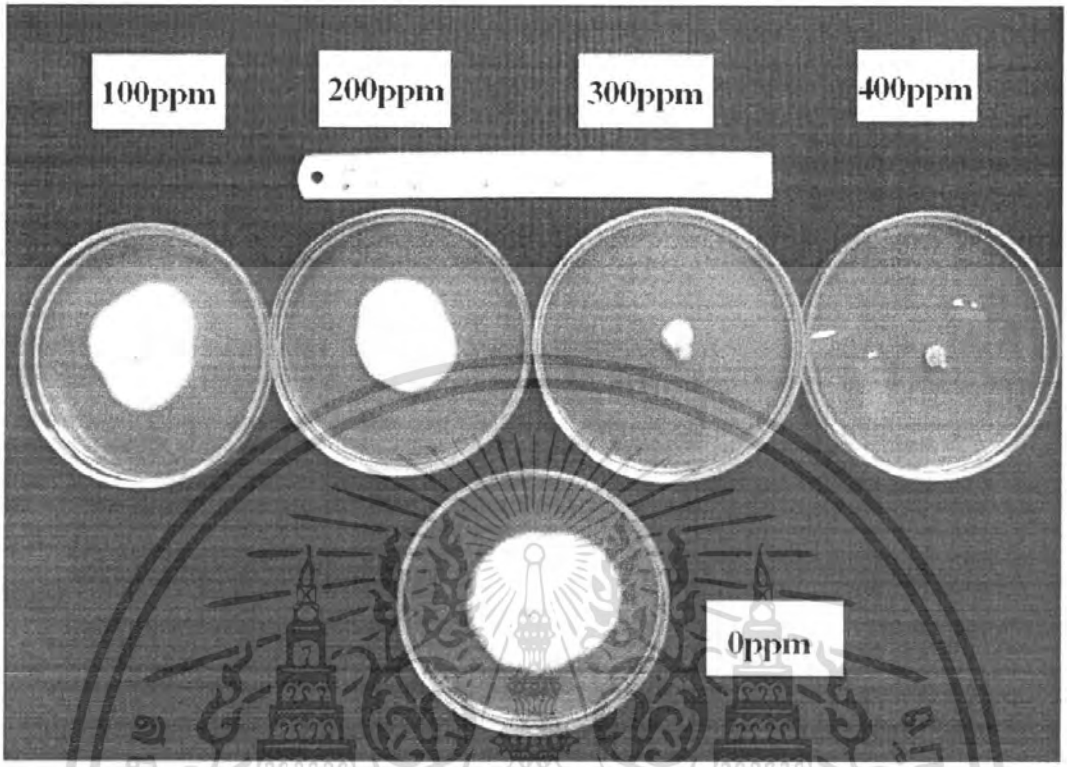
รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยกานพลู บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่4.2 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Schrotium rolfsii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยกานพลู บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่4.3 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Alternaria solani* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยกานพลู บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการทดสอบหาคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยกานพลูว่าเป็น สารยับยั้ง (fungistatic) หรือ สารฆ่าเชื้อรา (fungicide)

จากการทดลอง หลังจากที่มีการนำเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และ *Alternaia solani* ไปเลี้ยงในอาหารที่ผสมน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ (MIC) หรือที่ 400ppm เป็นเวลา 12 วันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำไปถ่ายลงบนอาหาร PDA ปกติ บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าเชื้อรายังสามารถเจริญได้

ส่วน *Sclerotium rolfsii* ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ผสมน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ (MIC) หรือที่ 300ppm เป็นเวลา 12 วันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำไปถ่ายลงในอาหาร PDA ปกติ บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าเชื้อรา ไม่มีการเจริญ ดังที่แสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงการเจริญของเชื้อรา หลังจากที่ถ่ายเชื้อราที่ถูกยับยั้ง ลงใน PDA เป็นเวลา 5 วัน

เชื้อที่ทดสอบ	ผลหลังจากถ่ายเชื้อลงใน PDA เป็นเวลา 5 วัน
Fusarium moniliforme (MIC ที่ 400ppm)	เจริญ
Sclerotium rolfsii (MIC ที่ 300ppm)	ไม่เจริญ
Alternaria solani (MIC ที่ 400ppm)	เจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองระดับ *In vivo*

4.5 ผลการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria solani* ด้วยน้ำมันสกัดกานพลูบนผลมะเขือเทศ

จากผลการศึกษาการยับยั้งเชื้อรา ด้วยน้ำมันสกัดกานพลูที่หยดลงบนมะเขือเทศตรงบริเวณที่เป็นแผล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และน้ำมันสกัดกานพลูบริสุทธ์ โดยทดสอบกับเชื้อรา *Alternaria solani* พบว่าเริ่มเห็นการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 800ppm และไม่มีการเจริญในชุดความเข้มข้นที่ใช้น้ำมันสกัดกานพลูบริสุทธิ์ ดังที่แสดงในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.4

ตารางที่ 4.5 ผลการยับยั้งเชื้อ *Alternaria solani* ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บนผลมะเขือเทศ (2 วัน)

ความเข้มข้นน้ำมันหอมระเหย (ppm)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเชื้อ *Alternaria solani* (cm)				
	0ppm	*600ppm*	*800ppm*	*1000ppm*	Clove oil 100%
กานพลู	0.82^{c}	0.82^{c}	0.6^{b}	0.58^{b}	0.5^{a}

หมายเหตุ - มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ขนาดของ
- เส้นผ่าศูนย์กลางของก้อนเชื้อมีขนาด 0.5 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium moniliforme* ด้วยน้ำมันสกัดกานพลูบนชิ้นข้าวโพด

จากผลการศึกษาการยับยั้งเชื้อรา ด้วยน้ำมันสกัดกานพลูที่หยดลงชิ้นข้าวโพดตรงบริเวณที่เป็นแผล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยทดสอบกับเชื้อรา *Fusarium moniliforme* พบว่าเริ่มเห็นการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 600ppm และไม่มีการเจริญในชุดความเข้มข้นที่ใช้น้ำมันสกัดกานพลูบริสุทธิ์ ดังที่แสดงในตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.5

ตารางที่ 4.6 ผลการยับยั้งเชื้อ *Fusarium moniliforme* ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บนชิ้นข้าวโพด (2 วัน)

ความเข้มข้นน้ำมันหอมระเหย (ppm)	เส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเชื้อ *Fusarium moniliforme* (cm)				
	0	600	800	1000	Clove oil 100%
กานพลู	1.5	1.3	1	0.7	0.5

หมายเหตุ - เส้นผ่าศูนย์กลางของก้อนเชื้อมีขนาด 0.5 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 ผลการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ด้วยน้ำมันสกัดกานพลูบนชิ้นหัวหอม

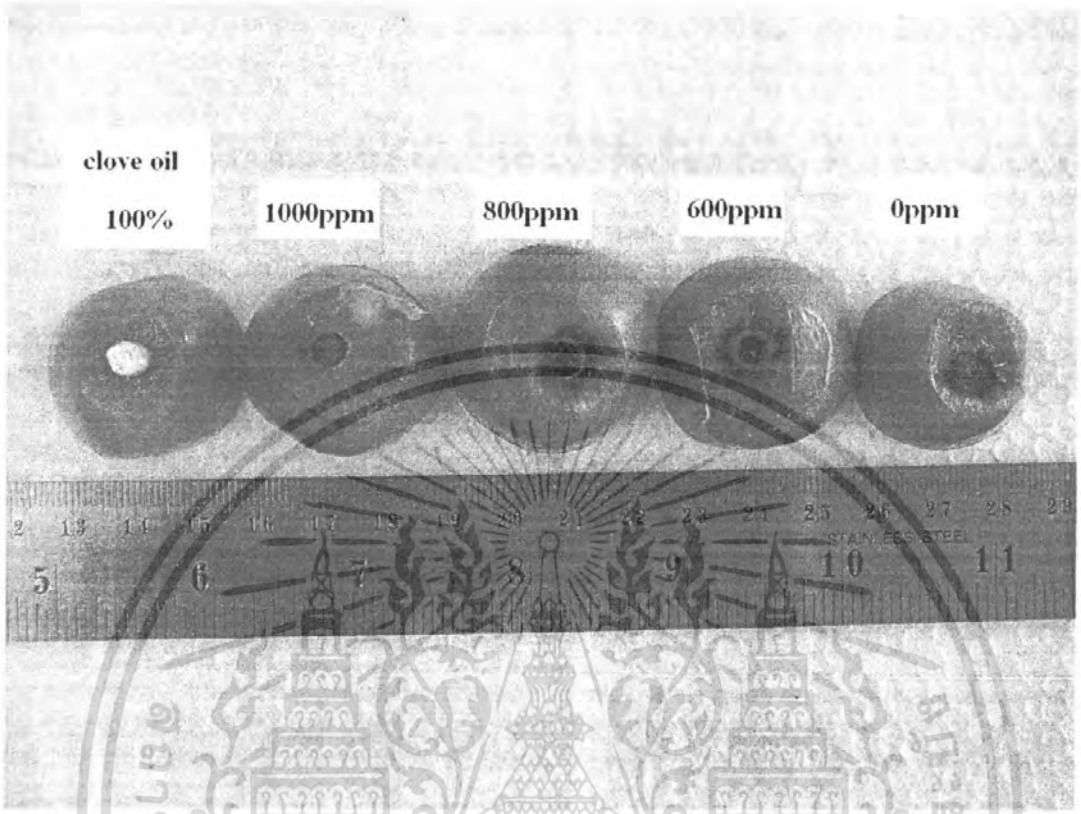
จากผลการศึกษาการยับยั้งเชื้อรา ด้วยน้ำมันสกัดกานพลูที่หยดลงชิ้นหัวหอมบริเวณที่เป็นแผล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยทดสอบกับเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* พบว่าเริ่มเห็นการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 600ppm และไม่มีการเจริญในชุดความเข้มข้นที่ใช้น้ำมันสกัดกานพลูบริสุทธิ์ ดังที่แสดงในได้ผลดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.6

ตารางที่ 4.7 ผลการยับยั้งเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บนชิ้นหัวหอม (2วัน)

ความเข้มข้นน้ำมันหอมระเหย (ppm)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* (cm)							
	0	400	600	800	1000	5000	10000	Clove oil 100%
กานพลู	2.19^{c}	2.13^{c}	2.07^{c}	2.03^{c}	1.39^{b}	0.62^{a}	0.5^{a}	0.5^{a}

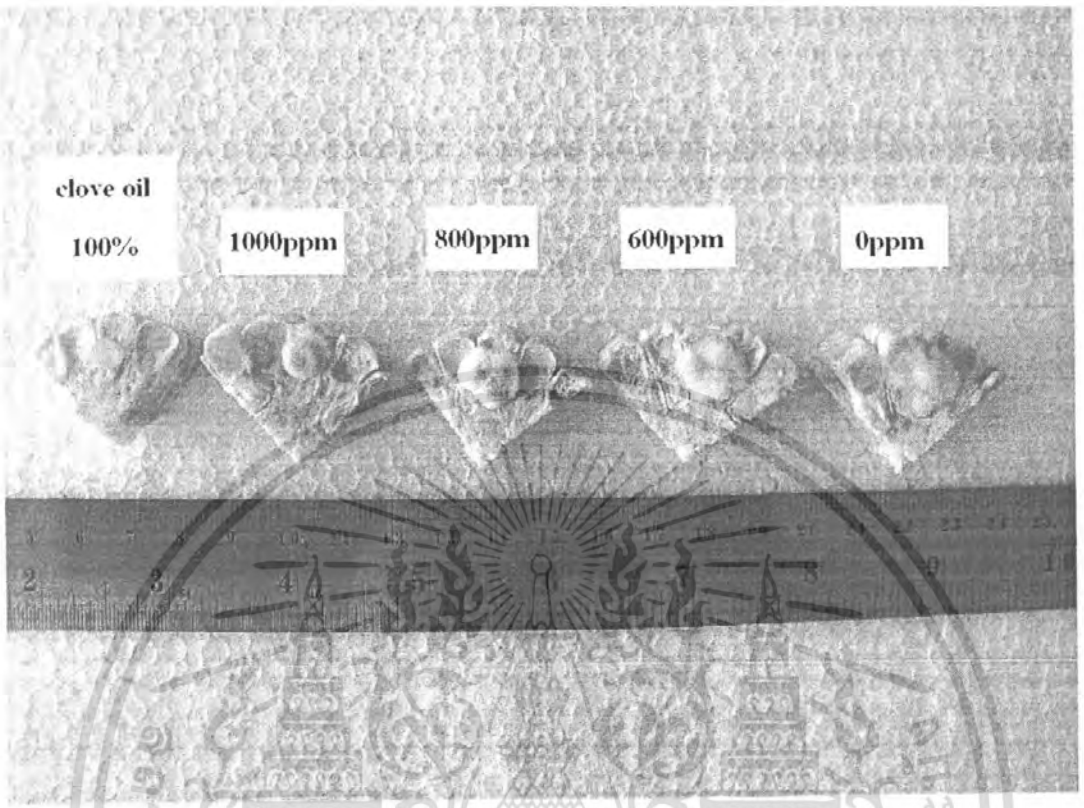
หมายเหตุ - มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ขนาดของ
- เส้นผ่าศูนย์กลางของก้อนเชื้อมีขนาด 0.5 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



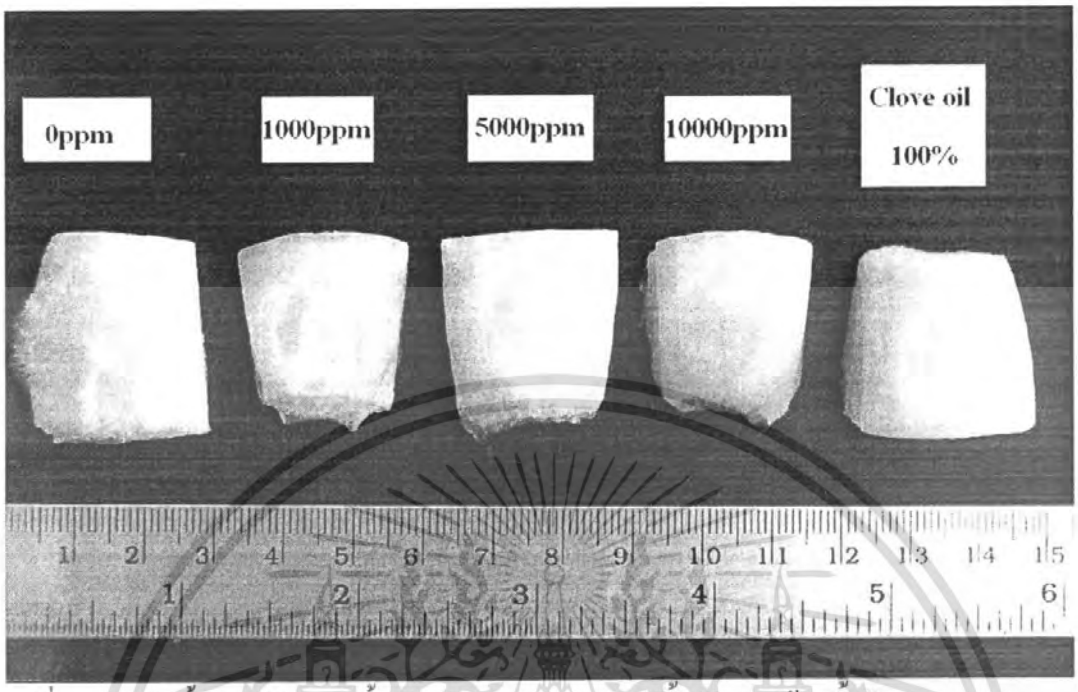
รูปที่ 4.4 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria solani* บนมะเขือเทศด้วยน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* บนชิ้นข้าวโพดด้วยน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* บนชิ้นหัวหอมด้วยน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium moniliforme, Sclerotium rolfsii* และ *Alternaria solani* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA โดยต้องการหาระดับความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้ได้อย่างสมบูรณ์ (MIC) พบว่า

- ที่ระดับความเข้มข้น 400ppm เป็นระดับที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้ง *Fusarium moniliforme* และ *Alternaria solani* ได้อย่างสมบูรณ์ แต่เมื่อนำเชื้อที่ถูกยับยั้งนี้ ไปถ่ายลงในอาหาร PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ปรากฏว่าเชื้อรายังเจริญได้ จึงสรุปได้อีกว่าน้ำมันกานพลูมีคุณสมบัติเป็น fungistatic สำหรับเชื้อ *Fusarium moniliforme* และ *Alternaria solani*
- ที่ระดับความเข้มข้น 300ppm ระดับที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้ง *Sclerotium rolfsii* ได้สมบูรณ์ และไม่มีการเจริญอีกเมื่อนำเชื้อไปถ่ายลงในอาหาร PDA และไม่มีการเจริญอีกเมื่อนำเชื้อไปถ่ายลงในอาหาร PDA จึงสรุปได้ว่า น้ำมันกานพลูมีคุณสมบัติเป็น fungistatic สำหรับเชื้อ*Sclerotium rolfsii*

นอกจากนั้น เมื่อได้ลองนำการทดสอบการยับยั้งเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยกานพลูนี้มาทดสอบบนพืช ที่เชื้อราแต่ละชนิดสามารถก่อโรคในพืชชนิดนั้นได้ จากผลการทดลองสรุปได้ว่า

- *Alternaria solani* เมื่อนำไปทดสอบบนมะเขือเทศเป็นเวลา 2 วัน การยับยั้งเริ่มเห็นได้ชัดที่ความเข้ม 800ppm และ ถูกยับยั้งสมบูรณ์เมื่อใช้ น้ำมันสกัดกานพลูบริสุทธิ์
- *Sclerotium rolfsii* เมื่อนำไปทดสอบบนชิ้นหัวหอมเป็นเวลา 2 วัน การยับยั้งเริ่มเห็นได้ชัดที่ความเข้ม 600ppm และ ถูกยับยั้งสมบูรณ์ที่ 10000ppm
- *Fusarium moniliforme* ที่นำไปทดสอบบนชิ้นข้าวโพดเป็นเวลา2 วัน การยับยั้งเริ่มเห็นได้ชัดที่ความเข้ม 800ppm และ ถูกยับยั้งสมบูรณ์เมื่อใช้ น้ำมันสกัดกานพลูบริสุทธิ์

ข้อเสนอแนะ

ในการทดลองการยับยั้งเชื้อราของน้ำมันสกัดกานพลู ที่นำไปทดสอบกับพืชนั้น ควรมีการมีการศึกษาต่อเพิ่มเติมเพื่อหาระดับ MIC ที่แน่นอนของเชื้อราทั้ง 3 เชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

สิทธิชัย นวธาดานนท์ ชัชรินทร์ แซ่ตัน และ นพพล พันธุ์ดี. 2549 การยับยั้งการเจริญเติบโตของของเชื้อรา *Alternaria solani* โดยสารสกัดจากพืชสมุนไพร. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

จำรัส คู่ณรงค์นันทกุล, 2529 การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ด้วยสารสกัดจากกานพลู ปัญหาพิเศษ (วท.บ.(เกษตรศาสตร์)) – สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Maryam, O. Barzega, M. Hamidi, Z. Naghdibadi, H. 2006 Antifungal activity of thyme, summer savory and clove oil essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food control 18: 1518-1523*

Matan, N Rimkeeree, H Mawson, A.J. Chompreeda, P Haruthaithanasan, M. and Parker 2006 Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology 107: 180-185*

Feng, W. and Zheng, X. 2007 Essential oils to control Alternaria alternate in *vitro* and in *vivo*. *Food Control 18 : 1126-1130*

Anderson, B. and D.G. White. 1987. Fungi associated with cornstalks in 1982 and 1983. Plant Disease 71 : 135-137.

Bacon, C.W. ; R.M. Bennett ; D.M. Hinton and K.A. Voss. 1992. Scanning electron microscopy of Fusarium moniliforme within asymptomatic corn kernels and kernels associated with equine leukoencephalomalacia. Plant.Dis. 76 : 144-148.

Kucharek, T.A. and T. Kommedahl. 1966. Kernel infection and corn stalk rot caused by Fusarium moniliforme. Phytopathology 56 : 983-984.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม(ต่อ)

Marasas, W.F.O. ; P.E. Nelson and T. A. Toussoun. 1984 Toxigenic Fusarium Species : Identity and Mycotoxicology. The Pennsylvania State Uiversity Press. University Park. 349 pp.

http://digital.lib.kmutt.ac.th/magazine/issue1/article/aroma.html

http://www.tistr.or.th/pharma/Essen_ext.htm

http://www.medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/..%5Cpubhealth%5Csyzygium.html

http://www.bangkokhealth.com/sitesearch_detail.asp?Number=9389

http://www.sut.ac.th/e-texts/Agri/myweb2/link109.htm

http://www.doctorfungus.org/thefungi/fusarium_moniliforme.htm

http://www.doa.go.th/fieldcrops/corn/pest/008.htm

http://sfcrc.suphanburi.info/dss_01rrd.htm

http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/s_rolfs.htm

http://agriqua.doae.go.th/plantclinic/clinic/plant/garlic/dgar6_2.htm

http://plantpro.doae.go.th/plantclinic/clinic/plant/tomato/pto45.htm

http://www.doae.go.th/pest/filcrop/soybean/sodam.htm

http://en.wikipedia.org/wiki/Alternaria_solani#_note-3

http://www.nysaes.cornell.edu

http://www.inra.fr

http://www.pinus-tki.si

http://www.potatodiseases.org

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

ข้อมูลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Statistical Package for Social Science (SPSS)

<u>ผลการเปรียบเทียบทางสถิติของการทดสอบการยับยั้งเชื้อราของน้ำมันกานพลูใน PDA (In vitro)</u>

ตารางที่ 1 ผลการเปรียบเทียบทางสถิติของน้ำมันสกัดกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ทดสอบการยับยั้ง *Fusarium moniliforme* และ *Alternaria solani* บนอาหาร PDA

Oneway

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
fusarium	Between Groups	50.063	4	12.516	426.670	.000
	Within Groups	.293	10	.029		
	Total	50.356	14			
Alternaria	Between Groups	73.836	4	18.459	3461.063	.000
	Within Groups	.053	10	.005		
	Total	73.889	14			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

Fusarium moniliforme

Duncan

	N	Subset for alpha = .05				
conc	1	*a*	b	c	d	e
400	3	.5000				
300	3		1.2333			
200	3			3.3667		
100	3				4.2000	
0	3					5.4000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Alternaria solana

	N	Subset for alpha = .05				
conc	1	a	b	c	d	e
400	3	.5000				
300	3		.6000			
200	3			2.1000		
100	3				3.7333	
0	3					6.4333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 2 ผลการเปรียบเทียบทางสถิติของน้ำมันสกัดกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ทดสอบการยับยั้ง *Sclerotium rolfsii* บนอาหาร PDA

Oneway

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	251.867	5	50.373	8242.909	.000
Within Groups	.073	12	.006		
Total	251.940	17			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

Duncan

	N	Subset for alpha = .05		
conc	1	2	3	1
300	3	.5000		
400	3	.5000		
500	3	.5000		
200	3		6.8000	
100	3			8.4333
0	3			8.4667
Sig.		1.000	1.000	.611

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการเปรียบเทียบทางสถิติของการทดสอบการยับยั้งเชื้อราของน้ำมันกานพลูใน พืช (In vivo)

ตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบทางสถิติของน้ำมันสกัดกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ทดสอบการยับยั้ง *Alternaria solani* บนมะเขือเทศ

Oneway

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.254	4	.563	26.575	.000
Within Groups	.424	20	.021		
Total	2.678	24			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

Duncan

	N	Subset for alpha = .05		
conc	1	a	b	c
100%	5	.5000		
1000ppm	5		.5800	
800ppm	5		.6000	
600ppm	5			.8200
0ppm	5			.8200
Sig.		1.000	.830	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 4 ผลการเปรียบเทียบทางสถิติของน้ำมันสกัดกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ทดสอบการยับยั้ง *Sclerotium rolfsii* บนหัวหอม

Oneway

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	34.731	7	4.962	45.480	.000
Within Groups	3.491	32	.109		
Total	38.222	39			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

Duncan

	N	Subset for alpha = .05		
conc	1	2	3	1
100%	5	.5000		
10000ppm	5	.5000		
5000ppm	5	.6200		
1000ppm	5		1.3900	
800ppm	5			2.0300
400ppm	5			2.0700
0ppm	5			2.1300
600ppm	5			2.1900
Sig.		.157	1.000	.492

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

หมายเหตุ เส้นผ่าศูนย์กลางของก้อนเชื้อมีขนาด 0.5 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผนวก ข

ผลการทดลองไม่เป็นทางการ

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อราของน้ำมันกานพลูใน PDA (In vitro)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบของน้ำมันสกัดกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ทดสอบการยับยั้ง *Fusarium moniliforme* บนอาหาร PDA

น้ำมันหอมระเหย	เส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเชื้อ *Fusarium moniliforme* (cm)											
	400ppm			300ppm			200ppm			100ppm		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
กานพลู	0.5	0.5	0.5	1.2	1.2	1.3	3.6	3.3	3.2	3.9	4.2	4.5
คอนโทรล	5.5	5.4	5.3	5.6	5.9	5.5	5.4	5.2	5.2	4.2	4.4	4.5

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบของน้ำมันสกัดกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ทดสอบการยับยั้ง *Alternaria solani* บนอาหาร PDA

ความเข้มข้นน้ำมันหอมระเหย	เส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเชื้อ *Alternaria solani* (cm)											
	400ppm			300ppm			200ppm			100ppm		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
กานพลู	0.5	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	2.1	2.1	2.1	3.6	3.8	3.8
คอนโทรล	6.3	6.5	6.5	6	6	6.2	6.1	6.3	6.4	6.2	6.2	6.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบของน้ำมันสกัดกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ทดสอบการยับยั้ง *Sclerotium rolfsii* บนอาหาร PDA

ความเข้มข้นน้ำมันหอมระเหย	เส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเชื้อ *Sclerotium Rolfsii* (cm)														
	500ppm			400ppm			300ppm			200ppm			100ppm		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
กานพลู	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	6.9	6.6	6.9	8.4	8.5	8.4
คอนโทรล	8.4	8.4	8.6	8.5	8.4	8.5	8.5	8.4	8.6	8.2	8.5	8.4	8.4	8.5	8.5

หมายเหตุ เส้นผ่าศูนย์กลางของก้อนเชื้อมีขนาด 0.5 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อราของน้ำมันกานพลูใน พืช (In vivo)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบของน้ำมันสกัดกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ทดสอบการยับยั้ง *Sclerotium rolfsii* บนหัวหอม

ระดับความเข้มข้น (ppm)	เส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเชื้อ *Alternaria solani* (cm)				
	1	2	3	4	5
0	0.9	0.8	0.8	0.9	0.7
600	1.0	0.8	0.8	0.7	0.8
800	1.0	0.8	0.7	0.7	0.7
1000	0.5	0.7	0.5	0.6	0.6
Clove oil	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบของน้ำมันสกัดกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ทดสอบการยับยั้ง *Alternaria solani* บนมะเขือเทศ

ระดับความเข้มข้น (ppm)	เส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* (cm)				
	1	2	3	4	5
0	1.9	2.6	2.5	2.15	2.5
400	2.1	2.3	2.3	2.0	1.65
600	2.4	2.5	2.65	1.9	1.5
800	2.3	2.1	2.35	1.85	1.55
1000	1.7	1.4	1.45	1.4	1
5000	0.9	0.5	0.7	0.5	0.5
10000	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Clove oil	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

หมายเหตุ *เส้นผ่าศูนย์กลางของก้อนเชื้อมีขนาด 0.5 เซนติเมตร*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้