สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สารชีวภาพต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช

นางสาวจิราภรณ์ กรสิทธิกุล
นางสาววันดี โรจน์อนวัช
นายศิรพงษ์ ณ พงษา

ว/พ.
จ535ส
2537
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน.เดือน.ปี.....

612541229

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2537

Effect of Biological Agent on Plant Pathogen

Miss Jiraphorn Kornsitthikul

Miss Wandee Roj-anawach

Mr. Siraphong Na phongsa

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the

Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1994

หัวข้อโครงงานพิเศษ	สารชีวภาพต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช	
โดย	นางสาวจิราภรณ์	กรสิทธิกุล
	นางสาววันดี	โรจน์อนวัช
	นายศิรพงษ์	ณ พงษา
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์อรไท	สุขเจริญ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

(ดร. อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

..... ประธานกรรมการ

(ดร. อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล)

..... กรรมการ

(รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์)

..... กรรมการ

(อ. อรไท สุขเจริญ)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ สารชีวภาพต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช
นักศึกษา นางสาวจิราภรณ์ กรสิทธิกุล
นางสาววันดี โรจน์อนวัช
นายศิรพงษ์ ณ พงษา
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์อรไท สุขเจริญ
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา 2537

บทคัดย่อ

ในการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* และ *B. theobromae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคผลเน่าในมะม่วงโดยใช้สมุนไพรและเชื้อจุลินทรีย์จากดิน สมุนไพรที่ใช้ได้แก่ กระเทียม กะเพรา ขิง ขมิ้น-อ้อย โป๊ยกั๊ก และมะกรูด พบว่าสารสกัดจากกระเทียมในคลอโรฟอร์มมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* ได้ดีที่สุด สารสกัดจากกระเทียมในเฮกเซนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. theobromae* ได้ดีที่สุด ทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเทียมในเฮกเซนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* และ *B. theobromae* ได้ ส่วนสารที่เชื้อ Z_1 ผลิตซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรีย สามารถให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* และ *B. theobromae* ได้ดีที่สุด จากการตรวจสอบทางอนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรียพบว่า เชื้อ Z_1 คือ *Streptococcus* sp.

การแยกสารสกัดจากกระเทียมในเฮกเซนโดยใช้วิธีทินน์เลเยอร์โครมาโตกราฟี พบว่าสารที่มีค่า R_f อยู่ในช่วง 0.775-0.943 และ 0.808-0.932 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* และ *B. theobromae* ได้ตามลำดับซึ่งอาจเป็นสารชนิดเดียวกัน ส่วนสารจากเชื้อ Z_1 เมื่อแยกโดยวิธีทินน์-เลเยอร์โครมาโตกราฟี พบว่าสารที่มีค่า R_f อยู่ในช่วง 0.157-0.685 และ 0.157-0.640 ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* และ *B. theobromae* ได้ตามลำดับซึ่งอาจเป็นสารชนิดเดียวกัน

Special Project Title Effect of biological agent on plant pathogen

Name Miss Jiraphorn Komsitthikul

Miss Wandee Roj-anawach

Mr. Siraphong Na phongsa

Special Project Advisor Miss Oratai Sukchareon

Department Applied Biology

Academic Year 1994

Abstracts

The antifungal activity of herbs and microorganisms against *A. niger* and *B. theobromae* causing stem-end rot of mango was studied. Garlic, basil, ginger, zedoary, star anise and kaffir lime were used. The chloroform extract of garlic was the most effective agent in inhibiting the growth of *A. niger* and the hexane extract of garlic inhibited the growth of *B. theobromae*. Hexane extract of garlic at all concentrations could inhibit the growth of *A.niger* and *B. theobromae*. Biological agents of bacteria Z_1 could inhibit the growth of *A. niger* and *B. theobromae*. Z_1 was identified as *Streptococcus* sp.

The hexane extract of garlic and biological agents of Z_1 were separated by thin layer chromatography. R_f values of biological agents of garlic effecting the growth inhibition of *A. niger* and *B. theobromae* were between 0.775-0.943 and 0.808-0.932 respectively. These agents might be the same substance. R_f values of biological agents of Z_1 inhibiting the growth of *A. niger* and *B. theobromae* were between 0.157-0.685 and 0.157-0.640 respectivety. These agents might be the same substance.

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีด้วยความอนุเคราะห์จากอาจารย์อรไท สุขเจริญ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และเป็นผู้ชี้แนะแนวทางในการทำโครงงานพิเศษ และอาจารย์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อโครงงานพิเศษนี้ รวมทั้งประธานกรรมการสอบและคณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ ซึ่งทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

นอกจากนี้คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ คุณพยอม เกียติกำจร คุณวิทยา เขียวเขิน ซึ่งเป็นเจ้าหน้าที่ห้องทดลองคณะวิทยาศาสตร์ และขอบใจเพื่อนนักศึกษารวมทั้งผู้มีอุปการะคุณที่มิอาจกล่าวนามไว้ครบถ้วนที่ได้ช่วยเหลือทั้งกำลังกาย กำลังใจ กำลังความคิด ซึ่งส่งผลให้โครงงานพิเศษดำเนินไปอย่างราบรื่น และสำเร็จลงด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2538

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ-ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
2.1 ความเป็นมาของมะม่วง	3
2.2 โรคภายหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วง	3
2.3 การป้องกันกำจัดเชื้อราโดยใช้จุลินทรีย์	5
2.4 การป้องกันกำจัดเชื้อราโดยใช้สมุนไพร	7
บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงาน	10
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	19
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	40
ภาคผนวก ก	41
ภาคผนวก ข	44
เอกสารอ้างอิง	45

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงขนาด (ซม.) ของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* โดยสารจากจุลินทรีย์ 22

ตารางที่ 2 แสดงผลของสารชีวภาพที่เชื้อ Z_1 ผลิตต่อการเจริญของเชื้อ *A. niger* 22

ตารางที่ 3 แสดงขนาด (ซม.) ของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* โดยสารสกัดจากสมุนไพรต่าง ๆ 23-24

ตารางที่ 4 แสดงขนาด (ซม.) ของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* โดยสารสกัดจากกระเทียมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 25

ตารางที่ 5 แสดงขนาด (ซม.) ของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. theobromae* โดยสารสกัดจากจุลินทรีย์ 25

ตารางที่ 6 แสดงผลของสารชีวภาพที่เชื้อ Z_1 ผลิตต่อการเจริญของเชื้อ *B. theobromae* 26

ตารางที่ 7 แสดงขนาด (ซม.) ของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. theobromae* โดยสารสกัดจากสมุนไพรต่าง ๆ 27-28

ตารางที่ 8 แสดงขนาด (ซม.) ของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. theobromae* โดยสารสกัดจากกระเทียมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 29

ตารางที่ 9 แสดงช่วง R_f ของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* และ *B. theobromae* 29

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 3-1	Rotary evaporator	15
รูปที่ 3-2	Freeze drier	15
รูปที่ 3-3	กระเทียมและใบกะเพราที่อบแห้งด้วยเครื่อง freeze drier	16
รูปที่ 3-4	ขิงและขมิ้นอ้อย ที่อบแห้งด้วยเครื่อง freeze drier	16
รูปที่ 3-5	โป๊ยกั๊กและมะกรูด ที่อบแห้งด้วยเครื่อง freeze drier	17
รูปที่ 3-6	เชื้อ *A. niger* ด้วยกำลังขยายเลนส์วัตถุ 40x	17
รูปที่ 3-7	เชื้อ *B. theobromae* ด้วยกำลังขยายเลนส์วัตถุ 40x	18
รูปที่ 4-1	แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* ของสารชีวภาพจากเชื้อ Z_1 และ Z_2	30
รูปที่ 4-2	แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* ของสารชีวภาพจากเชื้อ Z_1	30
รูปที่ 4-3	แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* ของสารสกัดจากกระเทียมในเฮกเซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	31
รูปที่ 4-4	แสดงขนาดบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* โดยสารสกัดจากกระเทียมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	32
รูปที่ 4-5	แสดงขนาดบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* โดยสมุนไพรในตัวทำละลาย 4 ชนิด	33
รูปที่ 4-6	แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. theobromae* ของสารชีวภาพจากเชื้อ Z_1 และ Z_2	34
รูปที่ 4-7	แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. theobromae* ของสารชีวภาพจากเชื้อ Z_1	34
รูปที่ 4-8	แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. theobromae* ของสารสกัดจากกระเทียมในเฮกเซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	35

สารบัญรูป (ต่อ)

		หน้า
รูปที่ 4-9	แสดงขนาดบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B.theobromae* โดยสารสกัดจากกระเทียมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	36
รูปที่ 4-10	แสดงขนาดบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B.theobromae* โดยสมุนไพรในตัวทำละลาย 4 ชนิด	37
รูปที่ 4-11	เชื้อ Z_1 ด้วย กำลังขยายเลนส์วัตถุ 40x	39
รูปที่ 6-1	Gram - Reaction	43

บทที่ 1
บทนำ

จากสภาวะการบริโภคอาหารในปัจจุบัน ผู้บริโภคต้องเผชิญกับพืช ผัก ผลไม้ ที่มีสารเคมีที่อาจมีสารพิษตกค้างอยู่ ซึ่งต้องทนต่อราคาที่แพงขึ้นเนื่องจากต้นทุนการผลิตสูงขึ้นตามปริมาณการใช้สารเคมีเป็นสารยับยั้งโรคพืช ดังนั้นจึงมีการศึกษาค้นคว้าวิธีทางชีวภาพที่จะนำมาทดแทนการใช้สารเคมีในการยับยั้งโรคพืช ซึ่งวิธีหนึ่งที่น่าสนใจคือ การใช้เชื้อจุลินทรีย์และสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของพืชที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งวิธีนี้ผู้บริโภคจะได้รับความปลอดภัยในการบริโภคมากยิ่งขึ้น อีกทั้งยังไม่สามารถส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมอันสืบเนื่องมาจากการที่มีสารพิษตกค้างอยู่ในดินหรือปนเปื้อนลงสู่แม่น้ำลำคลอง เป็นต้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของพืชสมุนไพรที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช
2. เพื่อหาจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคพืช
3. เพื่อศึกษาหาค่าของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช ซึ่งจะนำไปสู่กระบวนการสังเคราะห์สารดังกล่าวตามกระบวนการทางเคมี

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

เพื่อศึกษาหาสารจากธรรมชาติที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์หรือจากส่วนต่าง ๆ ของพืชสมุนไพรที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช รวมทั้งการวิเคราะห์ชนิดของสารดังกล่าว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ผู้บริโภคจะได้รับความปลอดภัยมากยิ่งขึ้นในการบริโภคอาหาร
2. ลดปัญหาการดื้อยาของโรคพืช
3. เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตสารยับยั้งโรคพืชในระดับอุตสาหกรรม
4. ได้ทักษะในการวางแผนการทดลอง ตลอดจนประสบการณ์ในการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการทดลอง

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

2.1 ความเป็นมาของมะม่วง

มะม่วงเป็นไม้ผลที่สำคัญทางเศรษฐกิจของเขตร้อน มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอินเดียและพม่า โดยได้มีการแพร่กระจายของการปลูกมะม่วงไปพร้อม ๆ กับการเผยแพร่ศาสนาและการค้า ประเทศไทยรู้จักมะม่วงกันมาตั้งแต่สมัยพ่อขุนรามคำแหง

มะม่วงอาจแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มอินเดีย และกลุ่มอินโดจีน มะม่วงกลุ่มอินเดียปกติเมล็ดจะให้ต้นกล้าเพียง 1 ต้น ต่อ 1 เมล็ด มีกลิ่น รสจัดกว่ากลุ่มอินโดจีน เปลือกผลมีสีแดง ส้มจัด เหลืองจัด กลิ่นแรง ต้นกล้าจะกลายพันธุ์ได้มาก เพราะเกิดจากการผสมพันธุ์ กลุ่มอินโดจีนเป็นพวกที่มีเมล็ดให้ต้นกล้าหลายต้นต่อเมล็ด อาจถึง 8 ต้น ต่อ 1 เมล็ด ผิวผลมีสีเขียว จนถึงสีเหลืองแก่ ต้นกล้าจะตรงกับต้นแม่เพราะต้นกล้าที่ได้เกิดจากเนื้อหนังของต้นแม่ ต้นอ่อนที่เกิดจากการผสมพันธุ์มักจะตายเสียก่อน

โรคภายหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วง

โรคของผลมะม่วงหลังเก็บเกี่ยวเป็นอุปสรรคอย่างหนึ่งในการส่งมะม่วงไปจำหน่ายต่างประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่มีความเข้มงวดในการนำเข้าซึ่งผักและผลไม้สด ในต่างประเทศมีรายงานว่า สาเหตุที่ทำให้เกิดการเน่าเสียกับมะม่วงภายหลังเก็บเกี่ยว และในระหว่างการเก็บรักษานั้น มักมาจากเชื้อ *Botryodiplodia theobromae, Dithiorella dominicana, Phomopsis mangiferae , Colletotrichum gloeosporioides* Penz, *Diplodia natalensis, Pestalotia mangiferae* P. Henn. , *Gloeosporium mangiferae , Aspergillus niger , Anidulans, Colletotrichum capsici, Curvularia penniseti, Phoma* spp. , *Fusarium* sp.และ *Rhizopus arrhizus* สำหรับในประเทศไทย มีรายงานถึงการเน่าเสียของผลมะม่วงภายหลังการเก็บเกี่ยวว่าเกิดจากเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., *Botryodiplodia theobromae , Aspergillus niger, Phomopsis* sp. , *Dothiorella* sp. และ *Gloeosporium mangiferae*

จากการวิจัยของสาขาโรคพืชผลิตผลเกษตร กองวิจัยโรคพืช พบโรคของมะม่วงภายหลังการเก็บเกี่ยว และในระหว่างเก็บรักษาดังนี้ (วัลลภา และ ดารา , 2523)

1.**โรคแอนแทรคโนส** (Anthracnose) เกิดจากเชื้อ *Collecctotrichum gloeosporioides* Penz. โรคนี้พบเสมอในมะม่วงที่เก็บเกี่ยวมาแล้วและวางจำหน่ายอยู่ทั่วไป โดยลักษณะของโรคจะทำให้เกิดแผลรูปร่างค่อนข้างกลม มีขอบเขตชัด สีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้มเกือบดำ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมเชื้อราจะสร้างสีส้มตรงบริเวณกลางแผล และจะทำลายเนื้อผลลึกลงไปเป็นรูปครึ่งวงกลม จึงสามารถแยกส่วนที่ดีและเสียออกจากกันได้ง่าย มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ และพันธุ์ทองดำจะเป็นโรคแอนแทรคโนสรุนแรงกว่าพันธุ์อื่น ๆ เชื้อราที่ติดมากับผลจะสามารถทำให้เกิดโรคกับมะม่วงได้โดยที่ไม่จำเป็นต้องมีบาดแผลบนผลหรือแม้ว่าจะเก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำประมาณ 10 องศาเซลเซียสก็ตาม

2. โรคผลเน่า มีลักษณะอาการต่างกันไปตามชนิดของเชื้อสาเหตุจากการทดลองเก็บรักษามะม่วงพบอาการต่าง ๆ กัน คือ

2.1 โรคผลเน่า เกิดจากเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* โดยอาการเน่าที่เกิดนั้น จะเกิดได้ในส่วนต่าง ๆ ของผล รวมทั้งการเน่าจากขั้วผล การเกิดแผลนิ่ม การน่วมจนลามออกไปเป็นสีน้ำตาลแดงถึงน้ำตาลดำ โดยมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ และพันธุ์แแรดจะเป็นโรคนี้ได้รุนแรง ในกรณีที่มีบาดแผล และพันธุ์อกร่องจะเกิดอาการเน่าจากขั้วผลมากกว่าพันธุ์อื่น ๆ โรคนี้มักจะพบอยู่เสมอ แม้ว่าจะไม่มากเท่าโรคแอนแทรคโนส แต่เมื่อเป็นแล้วจะทำให้เกิดการเน่าเสียทั้งผลอย่างรวดเร็ว

การเจริญของเชื้อ *B. theobromae* เมื่อเจริญบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) จะมีลักษณะเป็นเส้นใยขาวฟู เมื่อเชื้อมีอายุ 1-2 วันและต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีดำ เส้นใยมีลักษณะเป็น septate hyphae และมีสีเข้มเมื่อแก่

เชื้อนี้ยังเป็นสาเหตุของโรคหลังการเก็บเกี่ยวของพืชหลายชนิด ได้แก่ มะละกอ ฝรั่ง มะม่วง ละมุดฝรั่ง ส้ม พุทรา มะพร้าว กล้วยและมันเทศ สำหรับพืชอาศัยอื่น ๆ ได้แก่ น้อยหน่า มะตูม เปปเปอร์-มินต์ มะขามป้อม มะกอก อินทผลัม ขนุนดง กระเจี๊ยบ ขิง ไผ่ป่า กะเพรา ว่านหางจระเข้ พลับพลึง พุดซ้อน กระเช้าสีดา บานชื่น นางแย้มป่า เลี้ยวดอกแดง เอื้องสามปอยอินเดีย ต้อยติ่ง หญ้านกเค้า หอมแยก พุทธรักษา สาวน้อยประแป้ง มะลิเลื้อย กระทุ่มดง และว่านตะขาบ

2.2 โรคผลเน่าเกิดจากเชื้อ *Aspergillus niger* เชื้อราจะเข้าทำลายทางบาดแผลบนผล และทางขั้วผล แผลมีรูปร่างกลม สีเหลืองอ่อนซีด ฉ่ำน้ำ แผลนิ่ม ถ้าผิวเปลือกมะม่วงมีสีเขียวจะมองเห็นแผลได้ชัดเจน สีอาจจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อแผลมีอายุมากขึ้น เมื่อมีอาการรุนแรงและสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะเห็นสปอร์สีดำของเชื้อราขึ้นอยู่บนแผล อาการเน่าเสียที่เกิดจากเชื้อนี้ไม่พบบ่อยนักและไม่พบว่าเกิด

กับมะม่วงที่เก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำประมาณ 10 องศาเซลเซียส แต่เชื้อจะยังคงอยู่และเริ่มแสดงอาการเมื่อย้ายมะม่วงออกมาไว้ในอุณหภูมิที่สูงขึ้นจากการทดลองปลูกเชื้อกับมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า เมื่อมีบาดแผลบนผล มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้จะเป็นโรคผลเน่ารุนแรงรองลงมาคือพันธุ์ทองดำและแรด ส่วนอาการเน่าจากขั้วผลจะเป็นค่อนข้างรุนแรงในพันธุ์อกร่องและทองดำ

2.3 โรคผลเน่าเกิดจากเชื้อ *Phomopsis* sp. ลักษณะอาการคล้ายแผลที่เกิดจากเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* แต่ลักษณะแผลจะมีสีค่อนข้างเข้มกว่า รูปร่างแผลค่อนข้างกลมและไม่ลามมาก พบน้อยกว่าชนิดแรก ยังไม่พบอาการโรคที่เกิดจากขั้ว

2.4 พบอาการผลเน่าอีกแบบหนึ่งในมะม่วงพันธุ์พิมเสนเปรี้ยว แผลมีรูปร่างไม่แน่นอน สีน้ำตาลเข้มเกือบดำเริ่มแรกจะเป็นที่ผิวเปลือกเมื่อมะม่วงสุกจะมีอาการรุนแรงขึ้น พบมากในมะม่วงพันธุ์พิมเสนเปรี้ยว และเป็นปัญหาสำคัญในมะม่วงพันธุ์นี้ที่ส่งออกไปขายยังประเทศสิงคโปร์รองลงมาจากอาการเห็บของมะม่วงทำให้ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด เชื้อสาเหตุของโรคนี้กำลังอยู่ในระหว่างการจำแนกชนิด

อาการเน่าเสียของมะม่วงอาจมีสาเหตุจากเชื้อราหรือแบคทีเรียอื่น ๆ อีกหลายชนิด ซึ่งถ้าได้มีการสำรวจกันต่อไป ก็อาจจะพบอาการนอกเหนือไปจากที่กล่าวมาแล้ว เป็นที่น่ายินดีว่าในปัจจุบันนักวิชาการโรคพืชให้ความสนใจศึกษาเกี่ยวกับโรคหลังเก็บเกี่ยวของมะม่วงมากขึ้น ซึ่งจะเป็นแนวทางในการหาวิธีป้องกันกำจัดโรค เพื่อลดความเสียหายและเป็นการปรับปรุงคุณภาพของผลไม้ชนิดนี้ต่อไปในอนาคต

โครงงานพิเศษนี้จะได้ศึกษาสารทางชีวภาพที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์และส่วนต่าง ๆ ของพืชสมุนไพรที่มีผลในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคผลเน่าของมะม่วง

การป้องกันกำจัดเชื้อราโดยใช้จุลินทรีย์

การควบคุมเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* มีรายงานว่า thiabendazole ความเข้มข้น 2,000-2,500 พีพีเอ็ม สามารถป้องกันอาการผลเน่าของฝรั่งได้ดี นอกจากนี้ ยังมีสารเคมีฆ่าเชื้อราและสารปฏิชีวนะอื่น ๆ ที่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อ *B. theobromae* ได้ เช่น benomyl, prochloraz, CGA 64251, carbendazim, auerofungin, brassicol, captan, agrosan, nystatin, delan WP 75, saprol

วีระศักดิ์ และ ระวีวรรณ (2528) ได้แยกเชื้อรา *Trichoderma harzianum* Rifai จากดินที่ปลูกมะเขือเทศ ซึ่งสามารถใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* Sacc. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคโคนเน่าของมะเขือเทศ พริก โรคเน่าของกระเทียม ถั่วลิสง โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเป็นโรคของพืชดังกล่าวจะลดลงเป็น 20.7, 1.3, 10.7, และ 5.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

H. R. Azad และคณะ (1987) ได้ศึกษาพบว่า *Verticillium dahliae* Kleb ทำให้เกิดโรค Verticillium wilt ในมันฝรั่ง ซึ่งพันธุ์ของมันฝรั่งที่มีความไวต่อเชื้อโรคนี้คือ พันธุ์ Russet Burbank โดยแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ *V. dahliae* คือ เชื้อประเภท *Bacillus* spp. ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนที่พบในรากพืชจะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้จะสามารถกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อ *Verticillium dahliae* ใน Russet Burbank ได้ ซึ่งได้แก่เชื้อจุลินทรีย์ประเภท *Azomonas* และ *Azotobactor* spp. นอกจากนั้นยังมีเชื้อ *Pseudomonas, Gluconobacter, Flavobacterium* และ *Streptomyces*

A. Sukhoom และคณะ (1990) ได้ศึกษาผลของสภาวะต่างๆ ต่อการผลิตชีวสารจาก เชื้อ *Bacillus licheniformis* พบว่าในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนคือ กลูโคสร้อยละ 1 แหล่งไนโตรเจนคือ ซอยโทน ร้อยละ 2 และสารสกัดจากมอลต์ร้อยละ 1 จะให้การผลิตชีวสารได้สูงสุด ในสภาวะที่มีการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส มีการควบคุมพีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยงอยู่ที่ 7.0-8.5 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ซึ่งการผลิตจะลดลงในสภาพที่เป็นกรด ชีวสารจาก *Bacillus licheniformis* มีผลยับยั้งเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืช เช่น *Fusarium* sp., *Alternaria solani, Sclerotium rolfsiin* และ *Streptomyces scabies* และชีวสารจาก *Bacillus* sp. ส่วนใหญ่จะเป็นสารปฏิชีวนะพวกเพปไทด์ (peptide antibiotics)

มณจันทร์ (2536) ได้ใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* AP01 ในการยับยั้งเชื้อ *Phytophthora palmivora, Colletotricum truncarum* และ *Sclerotium rolfsii* โดยการยับยั้งจะเป็นแบบสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) นอกจากนี้ยังได้มีการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งกับเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv.*citri, Fusarium roseum* และ *Pythium* sp. โดยการยับยั้งจะเป็นแบบอยู่เป็นกลุ่ม (colonization)

H. I. Haavik (1973) ได้ศึกษาผลของกลูโคสต่อการสร้าง bacitracin โดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* ATCCIO 716 พบว่าการสังเคราะห์สาร bacitracin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะพวกเพปไทด์ (peptide antibiotic) จะเกิดขึ้นในช่วงหลังของการเจริญและก่อนการสร้างสปอร์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากกลูโคส แต่เมื่อเติมกลูโคสลงไปร้อยละ 5 จะทำให้เกิดการสังเคราะห์ bacitracin สูงสุด

H. I. Haavik และ S. Thomassem (1973) ได้ศึกษาผลของการสังเคราะห์ bacitracin ที่มีผลเกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ โดยใช้เชื้อสายพันธุ์ mutant ของ *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 ซึ่งผลที่ได้จะเห็นว่าการสังเคราะห์ bacitracin มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ ถ้าไม่มีการสังเคราะห์สาร bacitracin จะไม่มีการสร้างสปอร์

การป้องกันกำจัดเชื้อราโดยใช้สมุนไพร

ความหมายของคำว่า "สมุนไพร" ตามพระราชบัญญัติยา หมายถึงยาที่ได้จากพืช สัตว์ และแร่ธาตุ ซึ่งยังมิได้ผสมหรือแปรสภาพ เช่น พืชที่ยังเป็นส่วนของราก ลำต้น ใบ ดอก ผล เป็นต้น

การเก็บพืชสมุนไพรในเวลาที่ต่าง ๆ กัน อาจจะให้ผลในการรักษาต่างกันออกไปและพืชสมุนไพรชนิดเดียวกันแต่ปลูกคนละท้องถิ่นอาจให้ผลการรักษาต่างกันได้ ซึ่งในปัจจุบันวงการศึกษาก็ยอมรับว่าการที่รักษาด้วยพืชสมุนไพรไม่ได้ผลในบางครั้งนั้น อาจเนื่องมาจากสมุนไพรที่ใช้แตกต่างกันตามสายพันธุ์ (genetic) ท้องที่ (enviroment) และฤดูกาลที่เก็บ (ontogeny) จากการพัฒนาทางด้านวิทยาศาสตร์การสกัดและแยกสารเคมีบริสุทธิ์ได้จากพืชทำให้นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าสารเคมีเหล่านี้เองที่เป็นตัวกำหนดสรรพคุณของพืชสมุนไพรชนิดนั้น ๆ

สารเคมีที่แยกได้จากพืชนั้น นักวิทยาศาสตร์ได้จำแนกออกเป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ สารปฐมภูมิ (primary metabolite) และสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) จากการศึกษาสามารถนำมาใช้เป็นยาสมุนไพร ซึ่งอาจจำแนกออกเป็น 9 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

1. คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate)
2. แอลคาลอยด์ (alkaloid)
3. ไกลโคไซด์ (glycoside)
4. น้ำมันระเหย (volatile oil)
5. ไขมัน (lipid)
6. เรซิน (resin)
7. วิตามิน (vitamin)
8. สเตอรอยด์ (steroid)
9. ยาปฏิชีวนะ (antibiotic)

Suzuki และคณะ (1973) รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยของกานพลูและใบกระวานสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบรวมถึงเชื้อราบางชนิด และน้ำมันหอมระเหยจากพริกไทย ขิง สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด Tansey และ Appleton (1975) ได้ทำการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยใช้น้ำคั้นจากกระเทียมสดพบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ได้เป็นจำนวนมาก ได้แก่ *Allomyces arbuscula* Butler, *Alternaria alternata* Keissler, *Apiporthe* sp., *Ascobolus lineolatus* van Brummelen, *Aspergillus amstelodami* Mang. Thom and Church, *A. nidulans* Wint., *A. niger* van Tiegh, *C. albicans, Cephalosporium*

globosum Kunze ex Fr., *Chaetomium* sp., *Cladosporium resinae* de Vries, *Collybia velutipes* Quel., *Coniophora suffocata* Massee, *Coniothyrium* sp., *Coprinus atramentarius* , *Corticium galactinum* Burt.,*Cunninghamella echinulata* Thaxt., *Dipodascus uninucleatus* Biggs., *E. floccosum, Favolus* sp., *Fomes everhartii* von Schrenk and Spaulding, *Fusarium solani* Appel. and Wollenw., *Geotrichum candidum* Link ex Fers., *Hansenula wingei* Wickerham, *Histoplasma capsulatum* Darling, *Lenzites betulina* L. ex Fr., *Leptosphaerulina argentinensis* Graham and Luttrell, *Lipomyces starkeyi* Lodder and van Rij., *Microsporium* sp., *Mortierella ramanniana* Linnemann, *Mucor plumbeus* Bon., *M. spinosus* van Teigh., *Mycotypha microspora* Fenner, *Penicillium camenbertii* Thom, *P. cyclopium* Westling., *P. notatum* Westling., *P. vermiculatum* Dang., *Phoma* sp., *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff., *Pichia membranaefaciens* Hansen., *Polyporus versicolor* L. ex Fr., *Saccharomyces microellipsodes* Osterwalder, *Stereum frustulatum* Fuckel, *S. hirsutum* S.F. Gray, *Trichophyton rubrum* Sabour.

ประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของสารที่สกัดด้วย Morris (1979) รายงานว่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย anethole ที่ระดับ 500 พีพีเอ็ม.สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, E. coli* และ *Corynebacterium* sp.ได้ และที่ระดับความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม. สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ได้ ส่วนการใช้สารพวก carvone ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม.จะยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ได้เช่นเดียวกัน Pellecuer (1979) พบว่าน้ำมันหอมระเหยของ *Lavanula officinalis* L. มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคและทำให้อาหารเน่าเสียได้ น้ำมันหอมระเหยของเทียนขาว เทียนแกลบ เทียน ข้าวเปลือก กระเทียม และหัวหอม ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Clostridium* sp. ได้ (Huhtanen,1980) ส่วนกานพลูและโป๊ยกั๊กสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* spp. (Hitokoto,1980) ได้มีผู้ศึกษาประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ กระไดลิง ขมิ้นเครือ ขมิ้นอ้อย กระทกรก เจตมูลเพลิงแดง เหงือกปลาหมอ จำปี โด่ไม่รู้ล้ม ตะโก ทองพันชั่ง เป็นต้น โดยทดสอบกับจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้แก่ *S. aureus, B. subtilis, E. coli* และ *C. albicans* ปรากฏว่า สมุนไพรหลายชนิดจะมีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ได้มากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสมุนไพร และชนิดของจุลินทรีย์ สารสกัดจากสมุนไพรในแอลกอฮอล์ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าสารสกัดในคลอโรฟอร์ม และปิโตรเลียมอีเทอร์ (พรรนิภา,2521)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องเทศ 27 ชนิด ในการยับยั้งจุลินทรีย์ 33 ชนิด ปรากฏว่าส่วนมากน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากเครื่องเทศสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเครื่องเทศที่ไม่สกัดน้ำมัน และน้ำที่เหลือจากการสกัดน้ำมัน ซึ่งพบว่า กานพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizopus* sp. ได้ดีที่สุด กระชายยับยั้งการเจริญของ *Rhizopus* sp. ข่ายับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. ขิงแก่ยับยั้งการเจริญของ *Alternaria* sp. และ *Aspergillus* sp. ขิงอ่อนยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. และ *Rhizopus* sp. ขมิ้นขาวและขมิ้นเหลืองยับยั้งการเจริญของ *S. cerevisiae* ดอกจันทน์ยับยั้งการเจริญของ *Alternaria* sp. ตะไคร้ยับยั้งการเจริญของ *Rhizopus* sp. และ *Penicillium* sp. ใบกระเพราและใบมะกรูดยับยั้งการเจริญของ *Cunninghamella* sp. และ *Aspergillus* sp. นอกจากนี้ยังมีใบโหระพา ผิวมะกรูด พริกขี้หนูผลยาว พริกขี้ฟ้า ไพล ลูกกระวาน ลูกจันทน์ ลูกผักชี ใบสะระแหน่ พริกไทย หัวหอมแดง หัวกระเทียม อบเชย ยี่หร่า และพริกขี้หนูผลสั้น สามารถยับยั้งการเจริญของ *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Cunninghamella* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Curvularia* sp. และ *Mucor* sp. เป็นต้น (บัญญัติ,2518)

ยังมีรายงานเพิ่มเติมว่า ขมิ้นอ้อยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger, Curvularia* sp., *Helminthosporium* sp., *Sartorya* sp., *Trichoderma* sp., *Emericella* sp., *Penicillium* sp. และ *Alternaria* sp. (เอี่ยงคุณ,2524)

สารที่แยกได้จากเปลือกมังคุดเป็นพวก xanthone, 3-o-methyl mangostin, 3-6-di-o-methyl mangostin, 1-isomangostin และ mangostin triacetate โดยทดสอบกับเชื้อรา 14 ชนิด ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคกับมนุษย์และเชื้อราสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืช ปรากฏว่าเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบพวกที่ถูกยับยั้งการเจริญได้สูงคือ *E. floccossum, A. solani, Mucor* sp., *Rhizopus* sp. และ *C. echinulata* พวกที่ถูกยับยั้งปานกลางได้แก่ *T. mentagrophytes, A. niger, A. flavus, Penicillium* sp. ส่วนเชื้อรา *C. albicans* สามารถเจริญได้เป็นปรกติ

บทที่ 3
ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 เชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วง : *Botryodiplodia theobromae* และ *Aspergillus niger* van Tieghem

1.2 เชื้อต้านโรค : เชื้อจุลินทรีย์จากดิน

2. สมุนไพร : กระเทียมสด โป๊ยกั๊ก ขิงแก่ ใบกระเพรา ใบมะกรูด ขมิ้นอ้อย

3. อุปกรณ์และสารเคมี :

<u>อุปกรณ์</u>

1. ตู้บ่ม (incubator)
2. เครื่องชั่ง
3. เครื่องเขย่า (shaker
4. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
5. แผ่นเคลือบซิลิกาเจล (Merck)
6. cellulose acetate membrane และชุดเครื่องกรอง
7. เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น หลอดทดลอง จานเพาะเชื้อ ปิเปตต์ บีกเกอร์ ฟลาสก์

<u>สารเคมี</u>

1. เฮกเซน
2. คลอโรฟอร์ม
3. เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95
4. เอทิลอะซีเตต
5. โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต

4. วิธีดำเนินการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดิน

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างดินจากสถานที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย

2. ทำตัวอย่างดินให้อยู่ในสภาพแขวนลอย (suspension) โดยใส่ตัวอย่างดิน 1 กรัมลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และทำให้เจือจางเป็น 1:1000,1:10000 ตามลำดับ

3. ปีเปตต์สารแขวนลอยของดินที่เจือจางตามที่เตรียมไว้ความเจือจางละ 1 มิลลิลิตรใส่ในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ตามลงไป ผสมให้เข้ากันโดยหมุนไปทางขวา 10 ครั้ง ทางซ้าย 10 ครั้ง

4. นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน เมื่อครบเวลาที่บ่มเชื้อแล้วนำมาคัดเลือกโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีลักษณะแตกต่างกันเก็บไว้บนอาหารผิวเอียง

4.2 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารชีวภาพซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* และ *Aspergillus niger*

วิธีการ

1. นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บไว้บนอาหารผิวเอียงมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (กรณีที่เป็นราใช้ Potato dextrose broth) โดยเขี่ยมา 1 ลูป ใส่ในอาหารเหลวในแต่ละฟลาสก์บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

2. นำมากรองแยกส่วนที่เป็นเส้นใยของเชื้อหรือตัวเซลล์จุลินทรีย์ออกจากอาหาร โดยใช้กระดาษกรองวัทแมน เบอร์ 1 (กรองแบบหยาบ) และกรองอีกครั้งโดยใช้ เซลลูโลสไนเตรตขนาด 0.45 ไมครอน (กรองแบบละเอียด)

3. เตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อ *Botryodiplodia. theobromae* และ *Aspergillus niger* ในน้ำกลั่นที่มี tween 80 0.01 เปอร์เซนต์ ให้มีความเข้มข้นของสปอร์เป็น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

4. ปีเปตต์สารแขวนลอยของสปอร์ของเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* และ *Aspergillus niger* 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อ เชื้อละ 4 จาน เทอาหาร Potato dextrose agar (PDA) 20 มิลลิลิตรตามลงไป ผสมให้เข้ากัน

5. ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะอาหารที่มีสารแขวนลอยของสปอร์ในข้อ 4

6. ปิเปตต์สารที่กรองได้จากข้อ 2 80 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมที่ได้เจาะไว้แล้ว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

7. หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น

4.3 การสกัดสมุนไพร

<u>วิธีการ</u>

1. ล้างพืชสมุนไพรให้สะอาดนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น (blender)ให้ละเอียด

2. อบแห้งพืชสมุนไพรด้วยเครื่อง Freeze drier

3. ชั่งสมุนไพรที่ปั่นละเอียดและอบแห้งแล้ว 10 กรัม

4. เติมตัวทำละลาย คือน้ำกลั่นลงไปในพืชสมุนไพรจากข้อ 3. ที่ได้ชั่งน้ำหนักไว้ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วันเพื่อให้สารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในพืชสมุนไพรถูกสกัดออกมาอยู่ในน้ำกลั่น

6. กรองกากพืชสมุนไพรออกด้วยกระดาษกรอง วัทแมน เบอร์ 4 เก็บส่วนใสที่กรองได้ไว้ที่ 4-8 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิแช่เย็น) นำกากสมุนไพรมาสกัดอีกครั้งด้วยตัวทำละลายตัวเดิม 100 มิลลิลิตร

7. กรองพืชกากสมุนไพรออกด้วยกระดาษกรอง วัทแมน เบอร์ 4 นำส่วนใสที่กรองได้ไปรวมกับส่วนใสในข้อ 6 นำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ เพื่อหาน้ำหนักแห้งของสารสกัด

8. ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 4-7 โดยเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 เฮกเซน และคลอโรฟอร์ม

4.4 การศึกษาอิทธิพลของสมุนไพรต่อการเจริญของ *Botryodiplodia theobromae* และ *Aspergillus niger* บนอาหารแข็ง

<u>วิธีการ</u>

1. เตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* และ *Aspergillus niger* ในน้ำกลั่นที่มี tween 80 0.01 เปอร์เซนต์ ให้มีความเข้มข้นของสปอร์เป็น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2. ปิเปตต์สารแขวนลอยของสปอร์ของเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* และ *Aspergillus niger* 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อ เชื้อละ 4 จาน เทอาหาร Potato dextrose agar (PDA) 20 มิลลิลิตรตามลงไป ผสมให้เข้ากัน

3. ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะอาหารที่มีสารแขวนลอยของสปอร์ในข้อ 2

4. นำพืชสมุนไพรที่สกัดได้มาเติมตัวทำละลายต่าง ๆ ให้มีความเข้มข้นเป็น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำมากรองด้วยเซลลูโลสไนเตรต ที่มีขนาดรู 0.45 ไมครอน

5. ปิเปตต์สารที่กรองได้ 80 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมที่ได้เจาะไว้แล้ว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

6. หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น

4.5การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการเจริญของ *Botryodiplodia theobromae* และ *Aspergillus niger* บนอาหารแข็ง

<u>วิธีการ</u>

1. เตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* และ *Aspergillus niger* ในน้ำกลั่นที่มี tween 80 0.01 เปอร์เซนต์ ให้มีความเข้มข้นของสปอร์เป็น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2. ปิเปตต์สารแขวนลอยของสปอร์ของเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* และ *Aspergillus niger* 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อ เชื้อละ 4 จาน เทอาหาร Potato dextrose agar (PDA) 20 มิลลิลิตรตามลงไป ผสมให้เข้ากัน

3. ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะอาหารที่มีสารแขวนลอยของสปอร์ในข้อ 2

4. นำสารที่สกัดได้จากพืชสมุนไพรนำมาทำความเข้มข้น ที่ 3, 6, 9, 12 และ 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5. ปิเปตต์สารที่เตรียมไว้ 80 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมที่เจาะได้ไว้แล้ว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

6. หลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ตรวจผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น

4.6 การศึกษาเบื้องต้นในการแยกสารชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์และสารสกัดจากพืชสมุนไพรออกจากสิ่งเจือปนโดยใช้วิธีทินน์เลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (thin layer chromatography)

มีวิธีการดังนี้

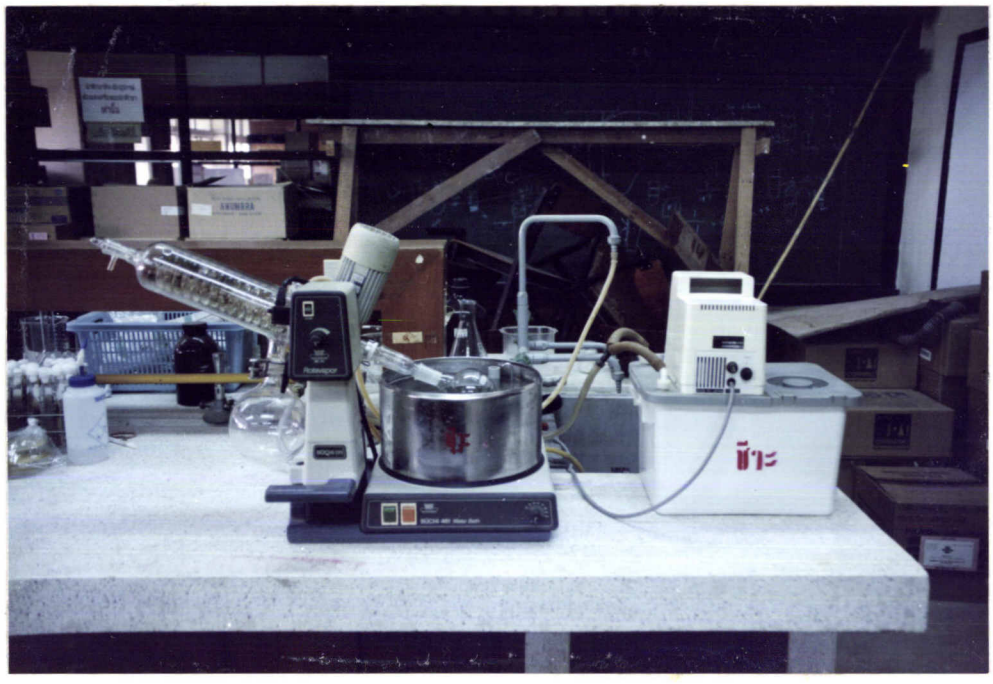
1.การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์และสารสกัดจากพืชสมุนไพร โดยวิธีทินน์เลเยอร์โครมาโตกราฟฟีใช้สารสกัดของสารชีวภาพที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ และสารสกัดจากสมุนไพรนำไปทำให้เข้มข้น โดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส หยดสารที่ทำให้เข้มข้นแล้วลงบนแผ่นซิลิกาเจล (Silica gel 60 ; Merck Germany) ที่หนา 0.25 มิลลิเมตร กว้าง 10 เซนติเมตรและยาว 10 เซนติเมตร โดยตำแหน่งที่หยดอยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นซิลิกาเจลประมาณ 1.5 เซนติเมตร โดยทำใน 2 ลักษณะ คือ ทำแบบหยดเป็นจุดกับหยดเป็นทางยาวในแนวตรงนำแต่ละแผ่นไปดีเวลลอป (develop) ในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยสารละลายผสมโดยให้ส่วนปลายล่างของแผ่นแช่อยู่ในตัวทำละลายสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยใช้สารละลายผสมดังนี้ เอทิลอะซีเตต : เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม เป็นอัตราส่วน 5 : 5 : 1

เมื่อสารละลายซึมมาถึงตำแหน่งที่ห่างจากปลายบนประมาณ 2.0 เซนติเมตร นำมาทำให้แห้ง นำส่วนที่หยดแบบจุดมาทำการตรวจหาตำแหน่งของสาร โดยใช้โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต แล้วนำไปเทียบกับตำแหน่งที่หยดเป็นทางยาวในแนวเส้นตรง ทำการขูดผงซิลิกาในแต่ละตำแหน่งของสารไปทำการแยกออกจากผงซิลิกา โดยละลายในตัวทำละลายชนิดใดชนิดหนึ่งใน 6 ชนิดที่กล่าวมาข้างต้น หลังจากนั้นนำมากรองโดยใช้ millipore filter จะได้สารสกัดที่เราต้องการนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช

4.7 การตรวจหาชนิดของจุลินทรีย์ (Identification)

<u>วิธีการ</u>

1. ทำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ให้บริสุทธิ์
2. ดูคุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา เช่น รูปร่าง การเรียงตัวของเซล คุณสมบัติการติดสีแกรม
3. ทดสอบคุณสมบัติทางด้านชีวเคมี เช่น ความสามารถในการใช้น้ำตาลต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน การสร้างเอนไซม์บางชนิด ความสัมพันธ์กับออกซิเจน และแหล่งอื่น ๆ แล้วนำคุณสมบัติที่ทดสอบได้ของเชื้อที่ไม่ทราบชนิด (Unknown sample) เอาไปเปรียบเทียบกับคุณสมบัติของเชื้อที่ทราบแล้ว



รูปที่ 3-1 Rotary evaporator

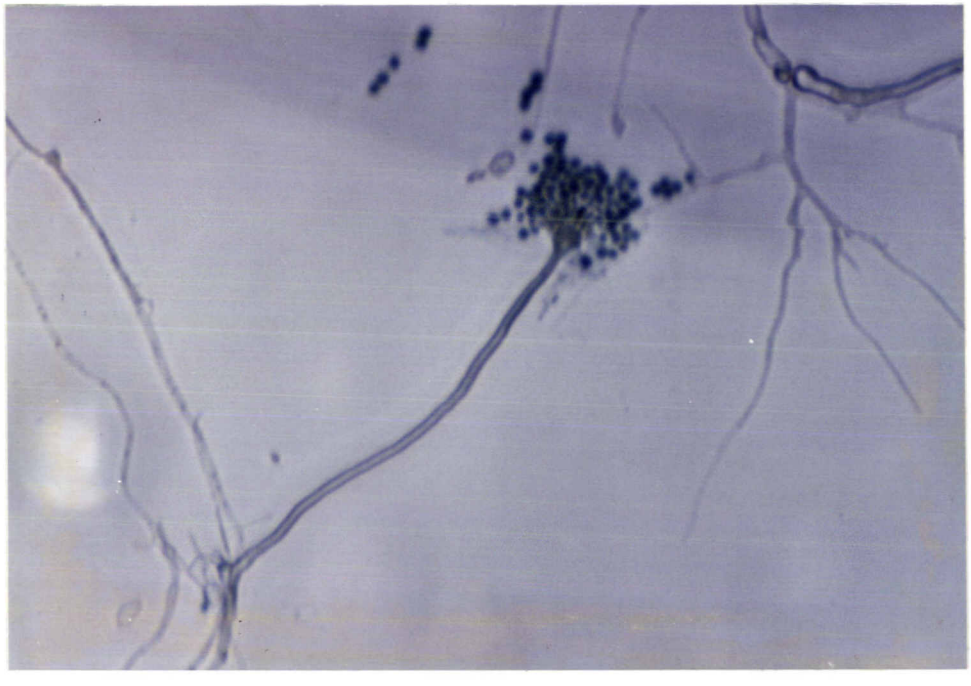
รูปที่ 3-2 Freeze drier

รูปที่ 3-3 กระเทียมและใบกะเพราที่อบแห้งด้วยเครื่อง freeze drier

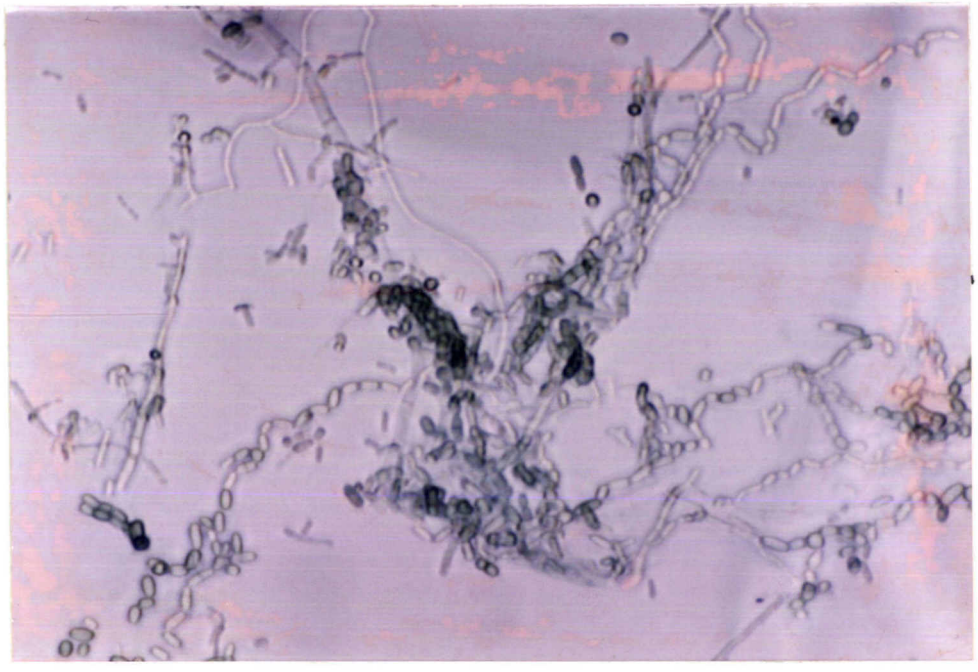
รูปที่ 3-4 ขิงและขมิ้นอ้อย ที่อบแห้งด้วยเครื่อง freeze drier

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รูปที่ 3-5 โป๊ยกั๊กและมะกรูด ที่อบแห้งด้วยเครื่อง freeze drie



รูปที่ 3-6 เชื้อ *A. niger* ด้วยกำลังขยายเลนส์วัตถุ 40x



รูปที่ 3-7 เชื้อ *B. theobromae* ด้วยกำลังขยายเลนส์วัตถุ 40x

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากดินที่สามารถผลิตสารชีวภาพซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger*

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากดินทั้งหมด 30 ชนิด ได้เชื้อแบคทีเรีย 6 ชนิด และเชื้อรา 2 ชนิด ที่คาดว่าจะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A.niger* ผลของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการเจริญของเชื้อรา *A.niger* ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 จากการทดลองพบว่า สารชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ Z_1 ซึ่งเป็นแบคทีเรีย สามารถยับยั้งการเจริญของ *A.niger* ได้มากที่สุด โดยวัดขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้งได้ 0.8 ซม. รองลงมาคือ Z_2 , Z_7 , Z_4 และ Z_5 โดยวัดขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้งได้ 0.5063 , 0.4, 0.2625 และ 0.125 ซม. ตามลำดับ เมื่อนำสารที่เชื้อ Z_1 มาทำการกรองละเอียดและกรองหยาบ พบว่า สารที่ได้จากการกรองหยาบ มีผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* โดยวัดขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้งได้ 0.125 ซม. แต่สารที่ได้จากการกรองละเอียดไม่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A.niger* ผลของการกรองสารที่เชื้อ Z_1 ผลิตได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 รูปที่ 4-2 จากผลการกรองนี้ แสดงให้เห็นว่าสารที่มีผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A.niger* เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 0.45 ไมครอน

4.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของสมุนไพรต่อการเจริญของเชื้อ *A.niger*

ผลของสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด คือ กระเทียม กะเพรา ขิง ขมิ้นอ้อย โป๊ยกั๊ก และมะกรูด ในตัวทำละลายต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อ *A.niger* ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 จากการทดลองพบว่า สมุนไพรทั้ง 6 ชนิด ที่สกัดในแอลกอฮอล์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A.niger* โดยขิงให้การยับยั้งมากที่สุด โดยวัดขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้งได้ 0.6 ซม. รองลงมาคือ ขมิ้นอ้อย กะเพรา กระเทียม โป๊ยกั๊ก และมะกรูด โดยขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้งได้ 0.5062, 0.4125, 0.358, 0.3625 และ 0.3062 ตามลำดับ สมุนไพรที่สกัดด้วยน้ำกลั่นจะให้ผลในการยับยั้งน้อยมากหรือไม่ให้ผลของการยับยั้งเลย สมุนไพรที่สกัดในเฮกเซนส่วนใหญ่จะให้ผลการยับยั้งของเชื้อ *A.niger* ที่ดี เช่น กระเทียมจะให้ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส คือ 1.5375 ซม. ขิง ขมิ้นอ้อย โป๊ยกั๊ก จะให้ขนาดบริเวณที่เกิดการยับยั้ง คือ 0.3375 0.3375 และ 0.27 ซม. ตามลำดับ ซึ่งสมุนไพรที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A.niger* ที่ดีที่สุด คือ

กระเทียมในคลอโรฟอร์ม ซึ่งให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส คือ 1.8625 ซม. ดังนั้นการทดลองขั้นต่อไปจึงควรเลือกกระเทียมที่สกัดในคลอโรฟอร์ม แต่เนื่องจากคลอโรฟอร์มมีจุดเดือดต่ำคือ 61.7 องศาเซลเซียส ระเหยง่ายมาก ซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นของสารที่สกัดเปลี่ยนแปลงได้ ดังนั้นจึงเลือกกระเทียมและเฮกเซนเป็นตัวทำละลายมาทำการทดลองต่อไป

ผลของกระเทียมในเฮกเซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4 และ รูปที่ 4-3 พบว่าขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้งจะแปรผันตามความเข้มข้น โดยที่ความเข้มข้นสูง ๆ ในที่นี้ คือ 15 มก./มล. จะพบว่าให้ขนาดบริเวณที่เกิดการยับยั้งมากที่สุด คือ 1.63 ซม. และที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 3 มก./มล. จะให้ขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้งน้อยที่สุด คือ 0.33 ซม. ซึ่งแสดงให้เห็นว่า กระเทียมมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A.niger* ได้สูง แม้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ จากรูปที่ 4-4 ที่ระดับความเข้มข้น 12 มก./มล. เกิดผลการยับยั้งที่ดี และไม่ต่างจากที่ระดับความเข้มข้น 15 มก/มล. มากนัก ดังนั้นในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A.niger* จึงควรเลือกใช้ที่ระดับความเข้มข้น 12 มก./มล.

4.3 การศึกษาอิทธิพลของสารชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่อการเจริญของเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* บนอาหารแข็ง

จากการศึกษาผลของสารชีวภาพที่ได้จากจุลินทรีย์ 8 ตัวอย่างที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *B. theobromae* ดังแสดงในตารางที่ 5 จะเห็นว่าเชื้อ Z_1 สามารถยับยั้งการเจริญเกิดบริเวณใสที่มีขนาด 0.8 ซม. เชื้อ Z_2 เกิดบริเวณใสที่มีขนาด 0.5063 ซม. เชื้อ Z_4 เกิดบริเวณใสที่มีขนาด 0.2625 ซม. เชื้อ Z_5 เกิดบริเวณโส 0.125 ซม. เชื้อ Z_3 กับ Z_6 ไม่เกิดบริเวณใส โดยเชื้อ Z_1 - Z_6 เป็นเชื้อแบคทีเรีย ส่วนเชื้อ Z_7 และ Z_8 เป็นเชื้อรา ซึ่งทำให้เกิดบริเวณใสที่มีขนาด 0.4 และ 0.45 ซม. เมื่อนำสารที่เชื้อ Z_1 มาทำการกรองแบบหยาบและแบบละเอียด แล้วนำสารที่ผ่านการกรองทั้งสองแบบมาทำการทดสอบ ผลที่ได้จะเห็นว่าการกรองแบบหยาบจะให้ผลในการยับยั้ง ส่วนกรองละเอียดจะไม่ให้ผลของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B.theobromae* ดังแสดงในตารางที่ 6 รูปที่ 4-7

4.4 การศึกษาอิทธิพลของสารสกัดจากสมุนไพรต่อการเจริญของเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* บนอาหารแข็ง

ผลของสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด คือ กระเทียม ขิง มะกรูด กะเพรา ขมิ้นอ้อย และโป๊ยกั๊ก โดยละลายในตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ เฮกเซน และคลอโรฟอร์ม ต่อการเจริญของเชื้อ

Botryodiplodia theobromae บนอาหาร PDA ได้แสดงไว้ในตารางที่ 7 จากการทดลองพบว่ากระเทียมที่ละลายในตัวทำละลายแอลกอฮอล์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. theobromae* โดยเกิดเป็นบริเวณของการยับยั้งขนาด 1.4 ซม. และในตัวทำละลายคลอโรฟอร์มสามารถทำให้เกิดบริเวณที่มีการยับยั้งขนาด 1.5 ซม. ในตัวทำละลายเฮกเซนจะเกิดเป็นบริเวณใสขนาด 1.725 ซม ซึ่งเป็นค่าที่มากที่สุด ส่วนสมุนไพรชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. theobromae* หลังจากนั้นนำสารสกัดกระเทียมในตัวทำละลายเฮกเซน ซึ่งให้ผลในการยับยั้งมากที่สุดมาทำการทดสอบผลการยับยั้งของเชื้อนี้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 3, 6, 9, 12 และ 15 มก./มล. ผลของระดับความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมในเฮกเซนต่อการเจริญของเชื้อ *B. theobromae* ได้แสดงไว้ในตารางที่ 8 รูปที่ 4-8 พบว่าเกิดบริเวณที่มีการยับยั้งแปรผันตามความเข้มข้น คือจะให้การยับยั้งมากที่สุดเกิดบริเวณใสขนาด 1.7 ซม. และที่ความเข้มข้น 3 มก./มล. จะมีบริเวณใสที่มีขนาด 1.25 ซม. จากรูปที่ 4-9 ที่ระดับความเข้มข้น 6 มก./มล. เริ่มเกิดการยับยั้งที่ดี ดังนั้นในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B.theobromae* จึงควรเลือกที่ระดับความเข้มข้น 6 มก./มล.

4.5 ผลการศึกษาเบื้องต้นในการแยกสารชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์และสารสกัดจากสมุนไพรออกจากสิ่งเจือปนโดยใช้วิธีทินน์เลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin layer chromatography)

สารชีวภาพที่เชื้อ Z_1 ผลิต เมื่อนำมาแยกด้วยวิธีทินน์เลเยอร์โครมาโตกราฟีโดยใช้สารละลายผสมของเอธิลอะซิเตต : เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม โดยมีอัตราส่วนเป็น 5 : 5 : 1 จะพบสาร 3 ชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* โดยมี R_f อยู่ในช่วง 0.044-0.112, 0.157-0.685 และ 0.775-0.966 และพบสารเพียงชนิดเดียวที่มีผลยับยั้งเชื้อ *B.theobromae* โดยมี R_f อยู่ในช่วง 0.157-0.640 จะเห็นได้ว่าสารที่ให้ค่า R_f อยู่ในช่วง 0.157-0.685 และ 0.157-0.640 สามารถยับยั้งเชื้อ *A. niger* และเชื้อ *B. theobromae* ได้ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นสารชนิดเดียวกัน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 9

สารสกัดจากกระเทียมในเฮกเซน เมื่อนำมาแยกด้วยวิธีทินน์เลเยอร์โครมาโตกราฟีด้วยระบบตัวทำละลายเดิม พบสาร 2 ชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* โดยมี R_f อยู่ในช่วง 0.393-0.730 และพบสารเพียงชนิดเดียวที่มีผลยับยั้งเชื้อ *B.theobromae* โดยมี R_f อยู่ในช่วง 0.808-0.932 และ จะเห็นได้ว่าสารที่ให้ค่า R_f อยู่ในช่วง 0.775-0.966 และ 0.808-0932 สามารถยับยั้งเชื้อ *A. niger* และเชื้อ *B. theobromae* ได้ตามลำดับ อาจเป็นสารชนิดเดียวกัน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 9

ตารางที่ 1 แสดงขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* โดยสารจากจุลินทรีย์

ชนิดของจุลินทรีย์	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (ซม.)	ขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (ซม.)
น้ำกลัน	0.8	
แบคทีเรีย (Z_1)	1.6	0.8
แบคทีเรีย (Z_2)	1.3063	0.5063
แบคทีเรีย (Z_3)	0.8312	0.0312
แบคทีเรีย (Z_4)	1.0625	0.2625
แบคทีเรีย (Z_5)	0.925	0.125
แบคทีเรีย (Z_6)	0.8	0
รา (Z_7)	1.2	0.4
รา (Z_8)	0.8	0

หมายเหตุ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ซ้ำ

ตารางที่ 2 แสดงผลของสารชีวภาพที่เชื้อ Z_1 ผลิตต่อการเจริญของเชื้อ *Aspergillus niger*

ชนิดของสาร	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (ซม.)	ขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (ซม)
น้ำกลัน	0.8	
กรองละเอียด	0.8	0
กรองหยาบ	1.55	0.75

หมายเหตุ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ซ้ำ

ตารางที่ 3 ขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* โดยสารสกัดจากสมุนไพรต่าง ๆ

สมุนไพร	ตัวทำละลาย	ความเข้มข้น (มก./มล.)	เส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	ขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (ซม.)
กระเทียม	แอลกอฮอล์	0	0.8	
		15	1.175	0.358
	เฮกเซน	0	0.8	
		15	2.3375	1.5375
	คลอโรฟอร์ม	0	0.8	
		15	2.6625	1.8625
	น้ำ	0	0.8	
		15	0.8	0
ใบกะเพรา	แอลกอฮอล์	0	0.8	
		15	1.2125	0.4125
	เฮกเซน	0	0.8	
		15	0.8	0
	คลอโรฟอร์ม	0	0.8	
		15	0.8	0
	น้ำ	0	0.8	
		15	0.8875	0.0875
ขิง	แอลกอฮอล์	0	0.8	
		15	1.4	0.6
	เฮกเซน	0	0.8	
		15	1.1375	0.3375
	คลอโรฟอร์ม	0	0.8	
		15	0.8	0
	น้ำ	0	0.8	
		15	0.9	0.1

หมายเหตุ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ซ้ำ

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สมุนไพร	ตัวทำละลาย	ความเข้มข้น (มก./มล.)	เส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	ขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (ซม.)
ขมิ้นอ้อย	แอลกอฮอล์	0	0.8	
		15	1.3062	0.5062
	เฮกเซน	0	0.8	
		15	1.1375	0.3375
	คลอโรฟอร์ม	0	0.8	
		15	0.8	0
	น้ำ	0	0.8	
		15	0.9	0.1
โป๊ยกั๊ก	แอลกอฮอล์	0	0.8	
		15	1.1562	0.3562
	เฮกเซน	0	0.8	
		15	1.07	0.27
	คลอโรฟอร์ม	0	0.8	
		15	0.8357	0.0357
	น้ำ	0	0.8	
		15	0.085	0.05
ใบมะกรูด	แอลกอฮอล์	0	0.8	
		15	1.1062	0.3062
	เฮกเซน	0	0.8	
		15	0.8	0
	คลอโรฟอร์ม	0	0.8	
		15	0.8	0
	น้ำ	0	0.8	
		15	0.8125	0.0125

หมายเหตุ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ซ้ำ

ตารางที่ 4 แสดงผลการยับยั้งเชื้อ *Aspergillus niger* โดยกระเทียมในเฮกเซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (มก/มล)	เส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม)	ขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (ซม)
0	0.8	
3	1.13	0.33
6	1.51	0.71
9	2.03	1.23
12	2.40	1.6
15	2.43	1.63

หมายเหตุ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ซ้ำ

ตารางที่ 5 แสดงขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. theobromae* โดยสารจากจุลินทรีย์

ชนิดของจุลินทรีย์	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (ซม.)	ขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (ซม.)
น้ำกลั่น	0.8	
แบคทีเรีย (Z_1)	1.6	0.8
แบคทีเรีย (Z_2)	1.3063	0.5063
แบคทีเรีย (Z_3)	0.84	0.04
แบคทีเรีย (Z_4)	1.0625	0.2625
แบคทีเรีย (Z_5)	0.925	0.125
แบคทีเรีย (Z_6)	0.8	0
รา (Z_7)	1.2	0.4
รา (Z_8)	1.25	0.45

หมายเหตุ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ซ้ำ

ตารางที่ 8 แสดงผลของสารชีวภาพที่เชื้อ Z_1 ผลิตต่อการเจริญของเชื้อ *Botryodiplodia theobromae*

ชนิดของสาร	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (ซม)	ขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (ซม)
น้ำกลั่น	0.8	
กรองละเอียด	0.8	0
กรองหยาบ	1.6	0.8

หมายเหตุ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ซ้ำ

ตารางที่ 7 แสดงขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* โดยสารสกัดจากสมุนไพรต่าง ๆ

สมุนไพร	ตัวทำละลาย	ความเข้มข้น (มก./มล.)	เส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	ขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (ซม.)
กระเทียม	แอลกอฮอล์	0	0.8	
		15	2.2	1.4
	เฮกเซน	0	0.8	
		15	2.525	1.725
	คลอโรฟอร์ม	0	0.8	
		15	2.3	1.5
	น้ำ	0	0.8	
		15	0.8	0
ใบกะเพรา	แอลกอฮอล์	0	0.8	
		15	0.8	0
	เฮกเซน	0	0.8	
		15	0.8	0
	คลอโรฟอร์ม	0	0.8	
		15	0.8	0
	น้ำ	0	0.8	
		15	0.8	0
ขิง	แอลกอฮอล์	0	0.8	
		15	0.8	0
	เฮกเซน	0	0.8	
		15	0.8	0
	คลอโรฟอร์ม	0	0.8	
		15	0.8	0
	น้ำ	0	0.8	
		15	0.8	0

หมายเหตุ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ซ้ำ

ตารางที่ 7 (ต่อ)

สมุนไพร	ตัวทำละลาย	ความเข้มข้น (มก./มล.)	เส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	ขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (ซม.)
ขมิ้นอ้อย	แอลกอฮอล์	0	0.8	
		15	0.875	0.075
	เฮกเซน	0	0.8	
		15	0.8	0
	คลอโรฟอร์ม	0	0.8	
		15	0.8	0
	น้ำ	0	0.8	
		15	0.8	0
โป๊ยกั๊ก	แอลกอฮอล์	0	0.8	
		15	0.8	0
	เฮกเซน	0	0.8	
		15	0.8	0
	คลอโรฟอร์ม	0	0.8	
		15	0.8875	0.0875
	น้ำ	0	0.8	
		15	0.8	0
ใบมะกรูด	แอลกอฮอล์	0	0.8	
		15	0.8	0
	เฮกเซน	0	0.8	
		15	0.8	0
	คลอโรฟอร์ม	0	0.8	
		15	0.8375	0.0375
	น้ำ	0	0.8	
		15	0.8	0

หมายเหตุ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ซ้ำ

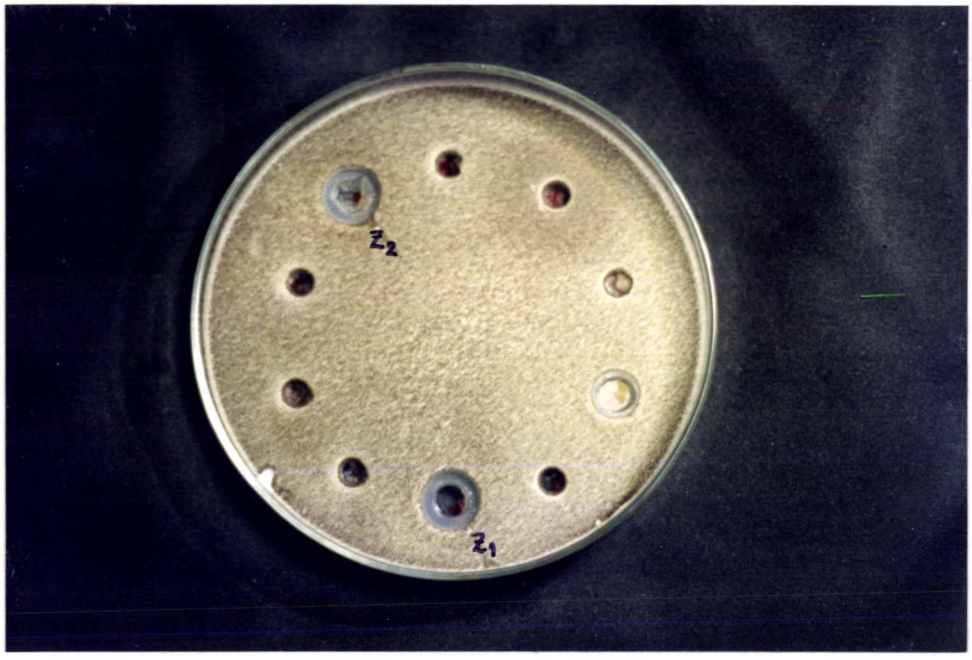
ตารางที่ 8 แสดงผลการยับยั้งเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* โดยกระเทียมในเฮกเซน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (มก/มล)	เส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม)	ขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (ซม)
0	0.8	
3	1.25	0.45
6	2.07	1.27
9	2.31	1.51
12	2.40	1.6
15	2.50	1.7

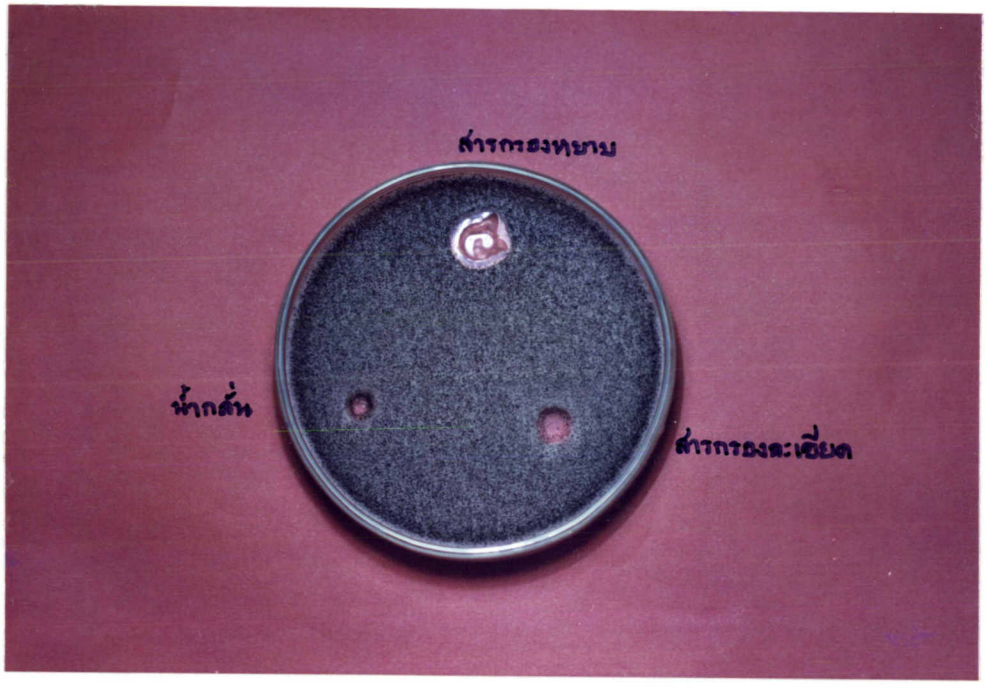
หมายเหตุ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ซ้ำ

ตารางที่ 9 แสดงช่วง R_f ของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aspergillus niger* และเชื้อ *Botryodiplodia theobromae*

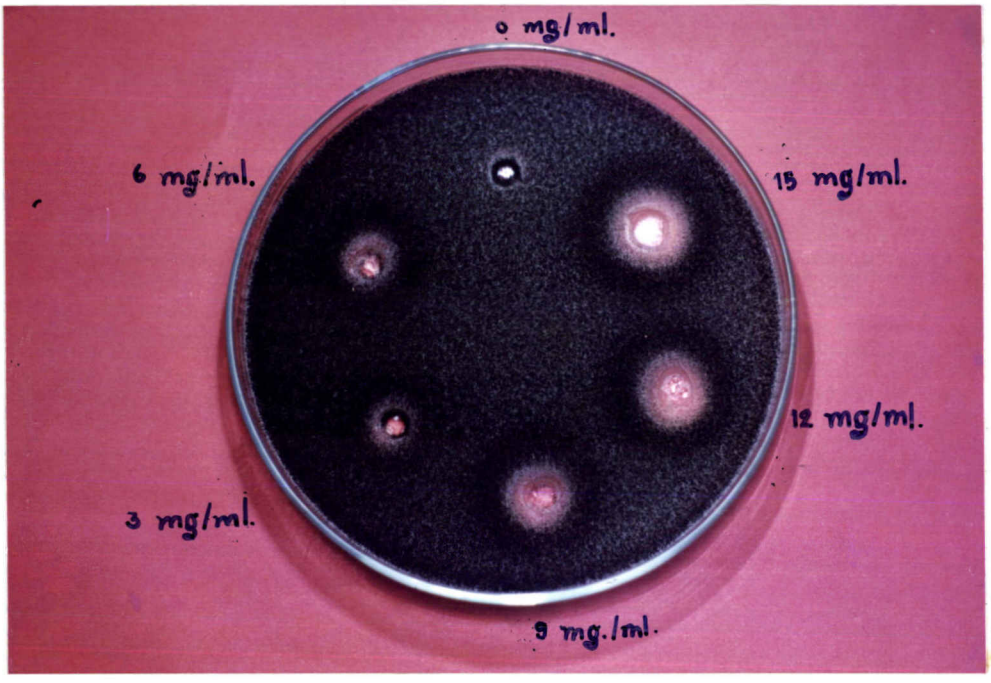
เชื้อ	Rf	
	สารจากกระเทียมในเฮกเซน	สารจากเชื้อ Z_1
A. niger	0.393-0.730 0.775-0.943	0.044-0.112 0.157-0.685 0.775-0.966
B. theobromae	0.808-0.932	0.157-0.640



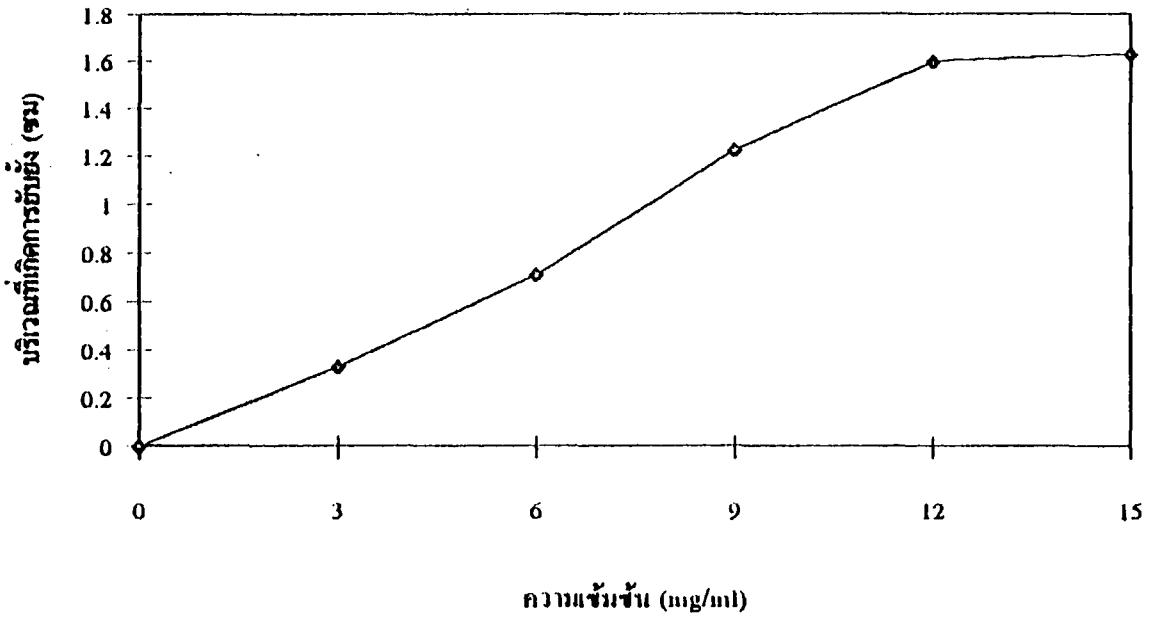
รูปที่ 4-1 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* ของสารชีวภาพจากเชื้อ Z_1 และ Z_2



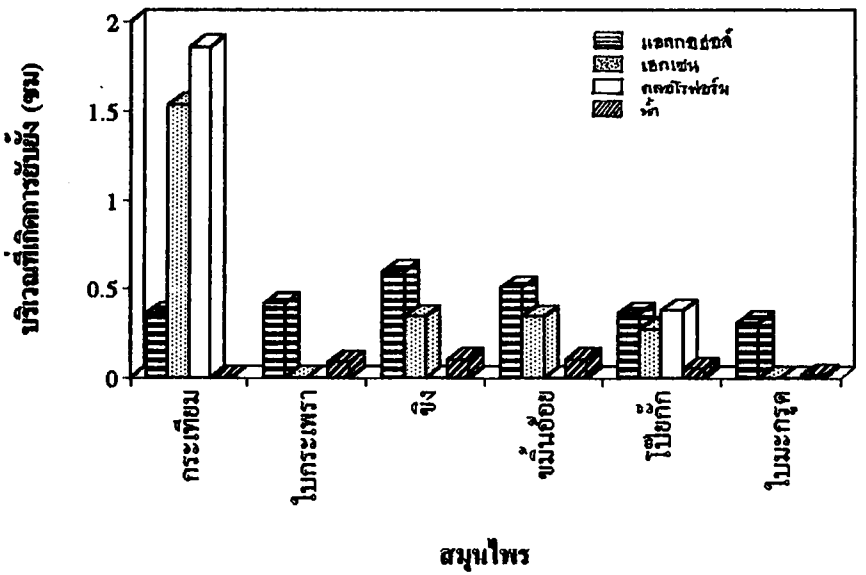
รูปที่ 4-2 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* ของสารชีวภาพจากเชื้อ Z_1



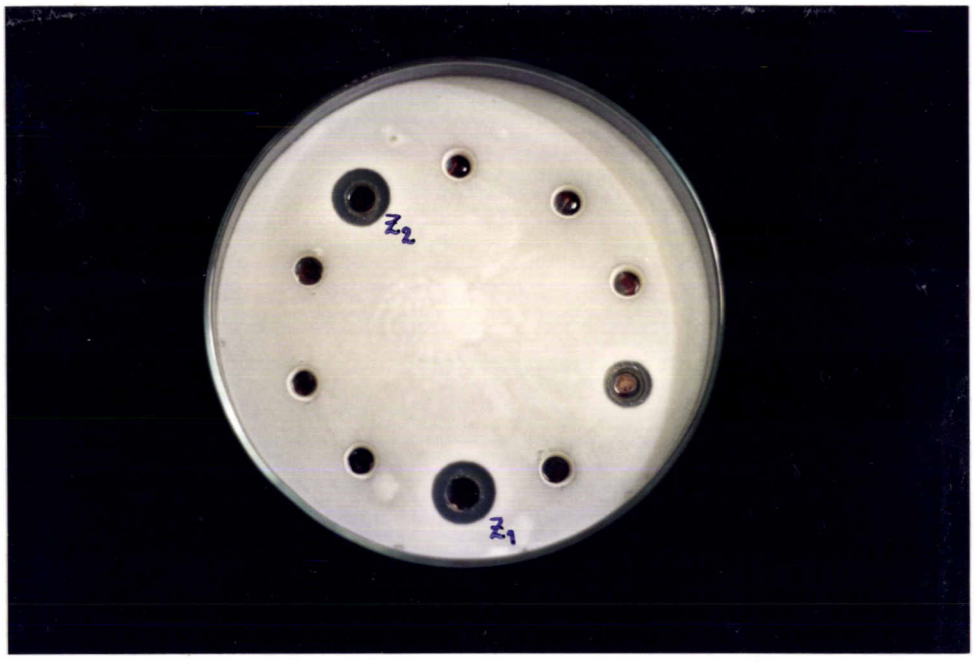
รูปที่ 4-3 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* ของสารสกัดจากกระเทียมในเฮกเซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ



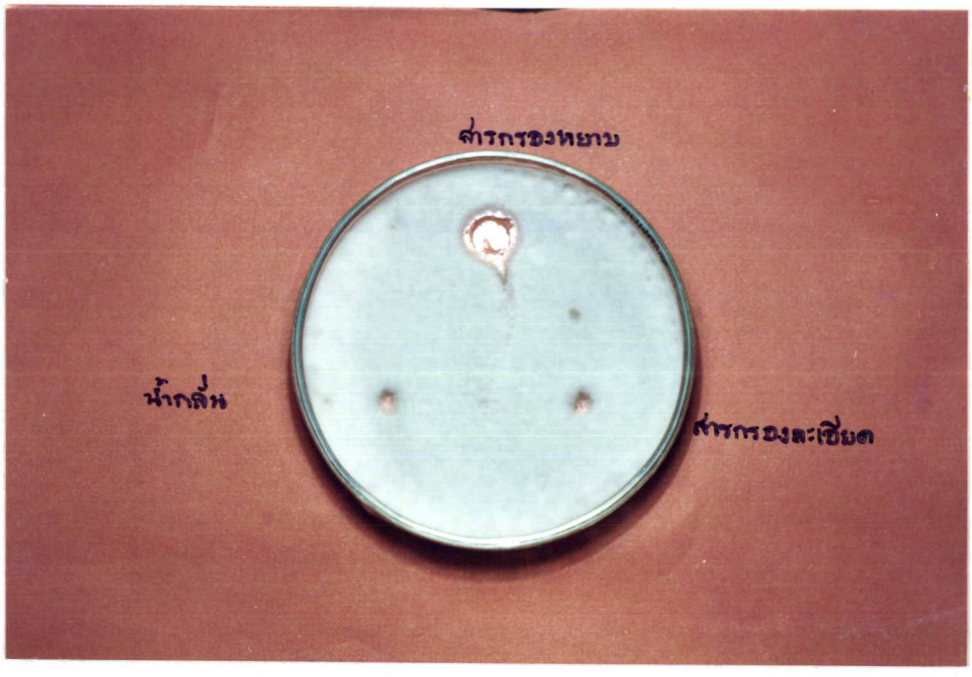
รูปที่ 4-4 แสดงขนาดบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* โดยสารสกัดจากกระเทียมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ



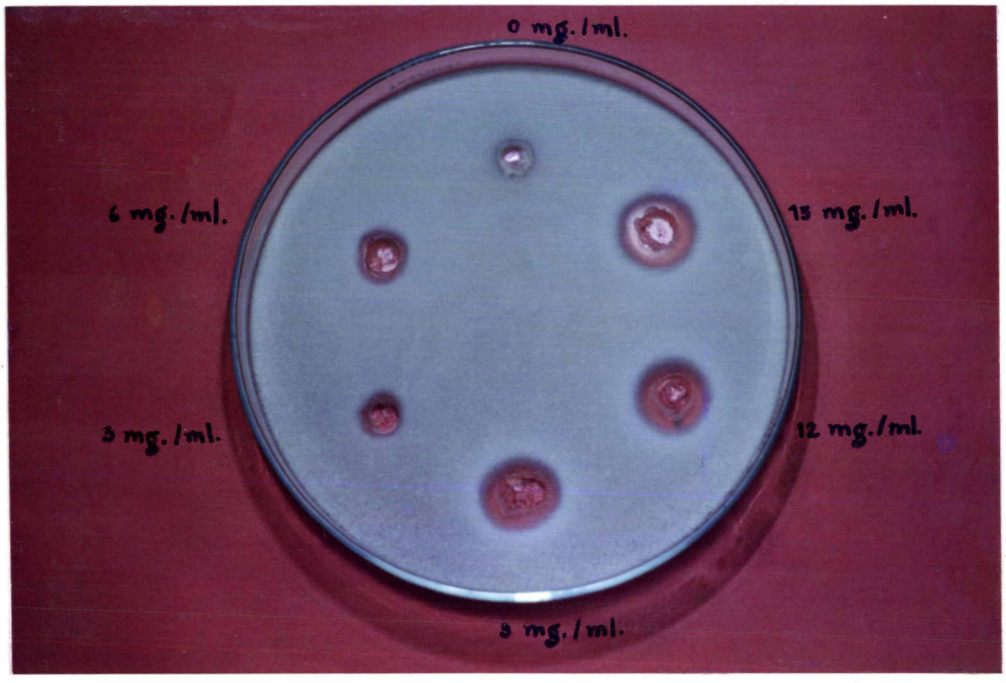
รูปที่ 4-5 แสดงขนาดบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* โดยสมุนไพรในตัวทำละลาย 4 ชนิด



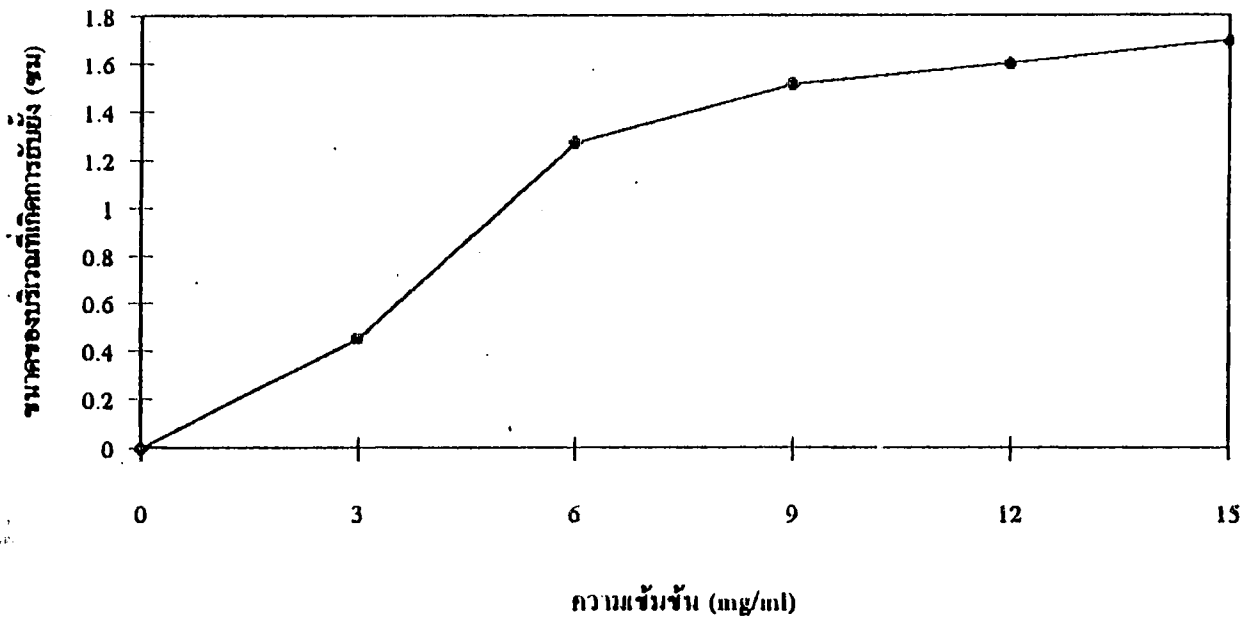
รูปที่ 4-6 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. theobromae* ของสารชีวภาพจากเชื้อ Z_1 และ Z_2



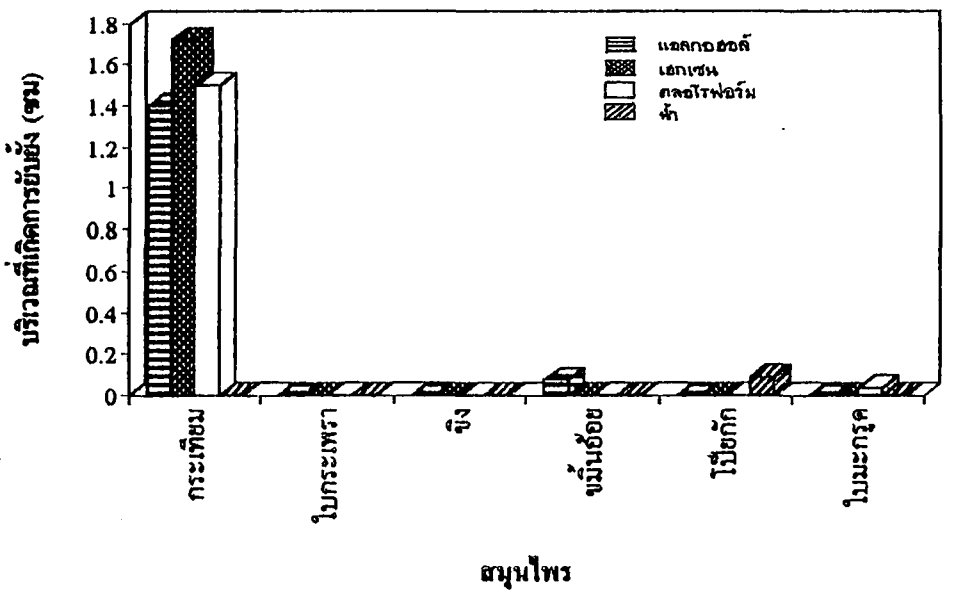
รูปที่ 4-7 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. theobromae* ของสารชีวภาพจากเชื้อ Z_1



รูปที่ 4-8 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. theobromae* ของสารสกัดจากกระเทียมในเฮกเซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 4-9 แสดงขนาดบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B.theodbromae* โดยสารสกัดจากกระเทียมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

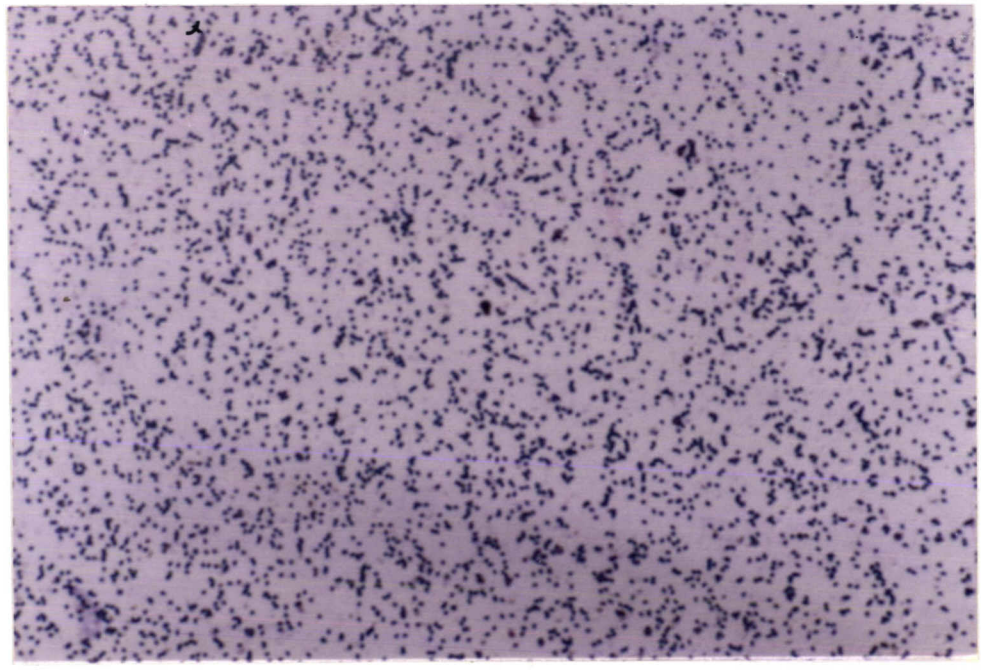


รูปที่ 4-10 แสดงขนาดบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B.theobromae* โดยสมุนไพรในตัวทำละลาย 4 ชนิด

4.6 ผลของการตรวจสอบหาชนิดของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* และ *B. theobromae* มากที่สุด คือ เชื้อ Z_1 มีลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาดังนี้ คือผิวหน้ามันเยิ้ม ขอบของโคโลนีเรียบสีขาวเป็นแบคทีเรีย เมื่อทำการย้อมแกรมปรากฏว่า ติดสีน้ำเงินของคริสตัลไวโอเลต แสดงว่าเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก และเมื่อดูรูปร่างและการเรียงตัวของเซลด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยายของเลนส์วัตถุ 100 เท่า พบว่าเซลมีรูปร่างกลม การเรียงตัวจะอยู่เป็นคู่ เคลื่อนที่ไม่ได้

เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีโดยทดสอบการสร้างเอนไซม์บางชนิด ในที่นี้ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสตามปฏิกิริยาของแกรม (Gram-Reaction ดังรูปที่ 6-1 ในภาคผนวก ก) ซึ่งใช้ในการแยกแบคทีเรีย staphylococci ออกจาก streptococci ผลปรากฏว่าเป็นลบ ไม่เกิดฟองก๊าซ ของก๊าซออกซิเจนแสดงว่าเป็นแบคทีเรียจำพวก streptococci ดังรูปที่ 4-11



รูปที่ 4-11 เชื้อ Z_1 ด้วย กำลังขยายเลนส์วัตถุ 40x

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาอิทธิพลของสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด ซึ่งได้แก่ กระเทียม กะเพรา ขิง ขมิ้นอ้อย โป๊ยกั๊ก และมะกรูด ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* และ *B. theobromae* พบว่าสมุนไพรทั้ง 6 ชนิดที่สกัดในแอลกอฮอล์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* โดยขิงให้ผลการยับยั้งที่ดีที่สุด สมุนไพรที่สกัดในเฮกเซนส่วนใหญ่จะให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* ที่ดี ส่วนสมุนไพรที่สกัดด้วยน้ำกลั่นจะให้ผลการยับยั้งน้อยมาก หรือไม่ให้ผลการยับยั้งเลย สมุนไพรที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *A. niger* ที่ดีที่สุดคือ กระเทียมที่สกัดในคลอโรฟอร์ม ในเชื้อ *B. theobromae* พบว่ามีเพียงกระเทียมชนิดเดียวที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้ได้ โดยจะเกิดผลการยับยั้งที่ดีที่สุดเมื่อใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย และทุกระดับความเข้มข้นของกระเทียมในเฮกเซนสามารถให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* และ *B. theobromae* ได้ สารในกระเทียมที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* และ *B. theobromae* จะมีค่า R_f อยู่ในช่วง 0.775-0.943 และ 0.808-0.932 ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นสารชนิดเดียวกัน

จากการศึกษาอิทธิพลของสารที่จุลินทรีย์ผลิตต่อการเจริญของเชื้อ *A. niger* และ *B. theobromae* พบว่าสารที่ผลิตจากเชื้อ Z_1 จะให้ผลการยับยั้งที่ดีที่สุด โดยสารที่กรองละเอียดจะไม่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* และ *B. theobromae* แสดงว่าสารที่เชื้อ Z_1 ผลิตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* และ *B. theobromae* นั้นเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ จากการตรวจสอบทางอนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเชื้อ Z_1 คือเชื้อ *Streptococcus* sp. และสารที่เชื้อ Z_1 ผลิต ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* และ *B. theobromae* ได้ จะมีค่า R_f อยู่ในช่วง 0.157-0.685 และ 0.157-0.640 ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นสารชนิดเดียวกัน

การศึกษาทดลองในครั้งนี้มีการเก็บผลเพียง 1 วัน ไม่ได้คำนึงถึงความต้านทานของเชื้อ ดังนั้นในการทดลองต่อไปควรจะศึกษาถึงความต้านทานที่เชื้อสร้างขึ้นต่อสารที่ใช้ในการยับยั้ง เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1.การศึกษารูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียโดยการย้อมสีแบบ gram stain

<u>การเตรียมสไลด์</u>

สไลด์ต้องสะอาด ทำโดยใช้นิ้วมือแตะสบู่หรือผงซักฟอกที่เปียกน้ำถูบริเวณสไลด์ ให้ทั่วใช้ผ้านุ่มและสะอาดเช็ดคราบสบู่ออกให้หมด การตรวจว่าสไลด์สะอาดหรือไม่ โดยการหยดน้ำลงบนสไลด์ถ้าสะอาดหยดน้ำจะแผ่กระจาย

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย โดยการหยดน้ำลงบนสไลด์หนึ่งหยดใช้ลวดเขี่ยเชื้อเผาให้แดงทิ้งไว้ 5-1 นาที จากนั้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อแตะเชื้อที่ผิวอาหารแล้วเขี่ยลงบนหยดน้ำพร้อมทั้งเกลี่ยให้เชื้อกระจายออกเป็นฟิลม์บาง ๆ บนสไลด์ เรียกวิธีนี้ว่าสเมียร์ จากนั้นนำมาลนผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เรียกวิธีนี้ว่า การตรึง

การย้อมสีแบบ Gram stain

1.หยดสีคริสตัล ไวโอเลท ลงบนสไลด์ให้ท่วมรอยสเมียร์ของเชื้อ *A.niger* และ *B.theobromae* ทิ้งไว้นาน 1 นาที

2.ล้างออกด้วยแกรมไอโอดีน แล้วหยดไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์

3.ล้างไอโอดีนออกด้วยน้ำ แล้วล้างอีกด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ ใช้เวลาไม่เกิน 20 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำทันที

4.ย้อมทับด้วยซาฟรานิน นาน 1 นาที

5.ล้างด้วยน้ำก๊อก แล้วปล่อยให้สไลด์แห้ง

6.ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

2.การตรวจสอบแคตาเลส

การทดสอบเอนไซม์ catalase ได้มีการใช้มานานในการแยกแบคทีเรีย staphylococci ออกจาก streptococci และใช้ในการแยกแบคทีเรียอื่น ๆ

Mcleod และ Gordon ได้แบ่งแบคทีเรียตามความสามารถในการสร้าง catalase ส่วนพวกที่ไม่สามารถสร้าง catalase มักมีแนวโน้มว่าจะตายถ้าในอาหารไม่มีน้ำตาลหรือไม่ก็เป็นเพราะมันสร้าง

H_2O_2 หรือเกิด H_2O_2 สะสมจากการที่เชื้อถูกแสงและอากาศ สาร H_2O_2 เป็นสารพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต จึงควรเก็บ stock culture ไว้ในที่อากาศจำกัดและมืด

ได้มีการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ H_2O_2 ในการทดสอบ catalase โดยใช้ความเข้มข้น 1.5-30 เปอร์เซนต์ พบว่าความเข้มข้นระหว่าง 0.5-5 เปอร์เซนต์ ให้ผลดีและ 1 หยด ของ 3 เปอร์เซนต์ H_2O_2 ให้ผลดีที่สุดและในการทดสอบต้องใช้เชื้ออายุไม่เกิน 24 ชม. เพราะ catalase จะอยู่เฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น ข้อควรระวังคือห้ามเอาเชื้อที่เลี้ยงบน blood containing medium เพราะในอาหารนั้นจะมี catalase

กลไกในการทำงานของ catalase

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O_2 + O_2$$

ถ้ามีการสร้างฟอง O_2 ถือว่าได้ผลบวก ซึ่งจะเป็นพวก staphylococcus

ถ้าไม่มีการสร้างฟอง O_2 ถือได้ว่าเป็นผลลบ ซึ่งจะเป็นพวก streptococcus

วิธีทดสอบ

Tube Test

1.เลี้ยงเชื้อลงบน slant บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 18-24 ชม.

2.เติม 1 มล. ของ 3 เปอร์เซนต์ H_2O_2 เอียงให้ไหลลงบนผิวอาหาร

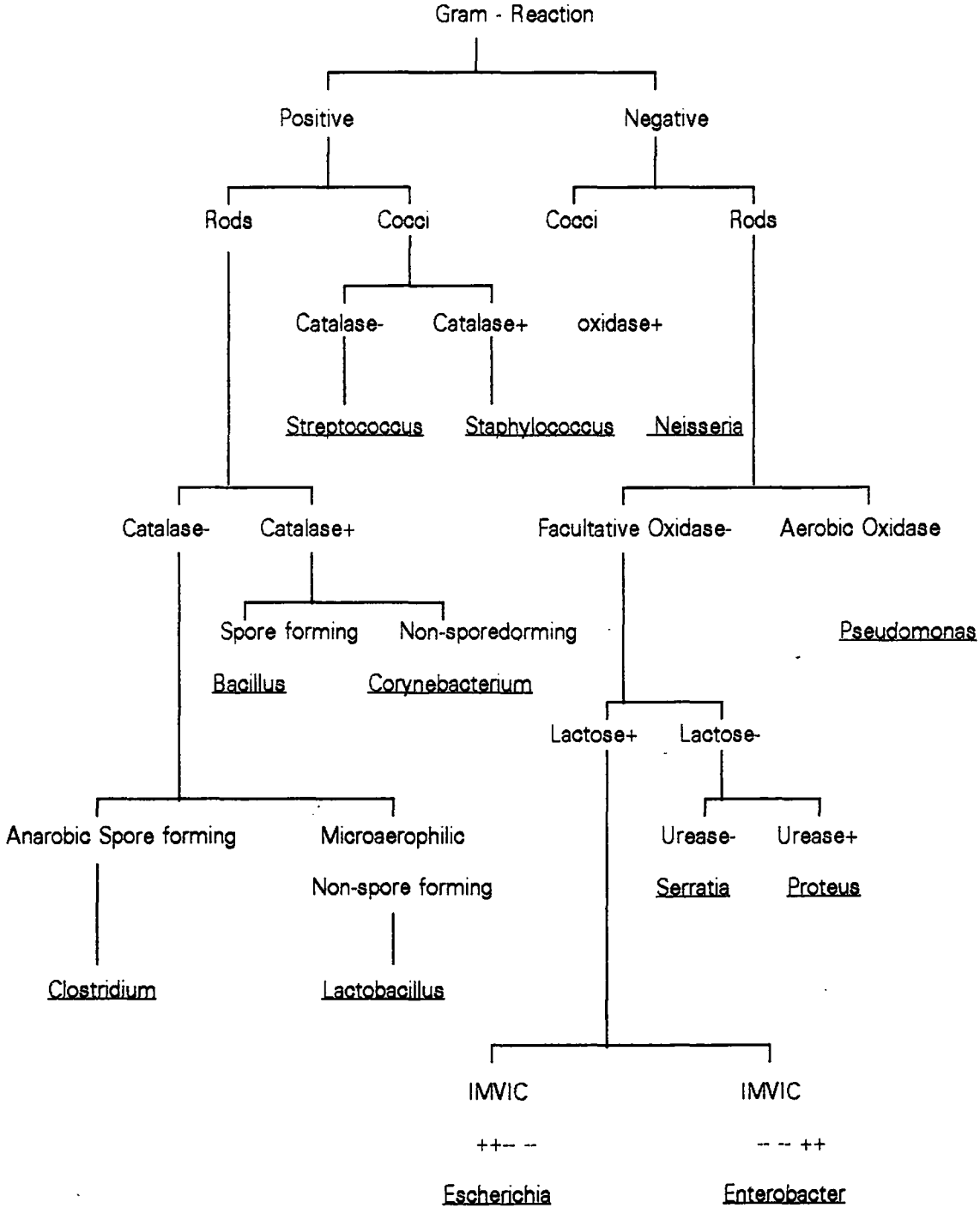
3.ตรวจผลว่าเป็นบวกหรือลบ

Plate Test

1.หยด H_2O_2 ที่มีความเข้มข้น 3 หรือ 30 เปอร์เซนต์ หยดลงบนสไลด์

2.ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ ผสมให้เข้ากัน

3.ตรวจผลว่าเป็นผลบวกหรือลบ



รูปที่ 6-1 Gram - Reaction

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient agar

Beef extract	3	g.
Peptone	5	g.
Agar	15	g.
น้ำกลั่น	1000	ml

ปรับ พีเอช ให้อยู่ในระหว่าง 6.8-7.0

2. Potato dextrose agar

Glucose monohydrate	20	g.
มันฝรั่งปอกเปลือกและหั่น	200	g.
Agar	20	g.
น้ำ	1000	ml

นำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกและหั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋า 200 กรัม ต้มนาน 30 นาที กรองเอาแต่น้ำ ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มล. เติมกลูโคสและวุ้นต้มต่อจนวุ้นละลาย ฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

เอกสารอ้างอิง

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2518. ประสิทธิภาพของเครื่องเทศบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พรรนิภา ชุมศรี. 2521. การตรวจสอบสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์. สภาวิจัยแห่งชาติ กรุงเทพฯ.

มณจันทร์ เมฆธน. 2536. ศักยภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis* AP01 ในการป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุของโรคพืช. วารสารวิทยาศาสตร์. 11(1) : 9-20.

วัลลภา ธีรภาวะ และดารา พวงสุวรรณ. 2523. รวมเรื่องเกี่ยวกับมะม่วง. ชมรมผู้พัฒนามะม่วงแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และ ระวีวรรณ ศรีละเอียด. 2528. การศึกษาเชื้อ*Trichoderma* spp. เพื่อใช้ป้องกันกำจัดโรคโคนเน่าของผักและถั่วลิสงโดยชีววิธี. แก่นเกษตร. 13(4) : 278-282. เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. น. 408-415.

เอี้ยงคุณ แซ่อึ้ง. 2524. ประสิทธิภาพของขมิ้นอ้อย เทียนขาว และเทียนตากบในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิด. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, บางแสน.

Azad, H. R., J. R. Davis, W. C. Schnathorst and C. I. Kado. 1987. Influence of verticillium wilt resistant and susceptiboe potato genotypes on populations of antagonistic rhizosphere and rhizoplane bacteria and free nitrogen fixers. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26 : 99-104.

Haavik, H. I. 1974. Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis* : effect of glucose. 81 : 383-390.

Haavik, H. I. and S. Thomassen. 1973. A Bacitracin-negative mutant of *Bacillus licheniformis* which is able to sporulate. J. of General Microbiology. 76 : 451-454.

Hitokoto, H., S. Morozumi, T. Wauke, S. Sakai and H. Kurata. 1980. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. Appl. Environ. Microbiol. 39 : 818-822.

Huhtanen, C.N. 1980. Inhibition of *Clostridium botulinum* by spice extracts and aliphatic alcohols. J. Food Production. 43 : 195-196.

Morris, J.A. 1979. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. J. of the America Oil Chemist's Soc. 56 : 595-603.

Sukhoom, A., S. Chavanich and S. Hayashida. 1990. Condition effects on production of biological active substance from *Bacillus licheniformis*. Microbial Utilization of Renewable Resouces. 7 : 275-282.

Suzuki, I. J., B. Dainuis and J. H. Kilbuck. 1973. A modified method of aflatoxin determination in spices. J. Food Sci. 30 : 940-950.

Tansey, M. R. and J. A. Appleton. 1975. Inhibition of fungal growth by garlic extract. Mycologia 67 : 409-411.