



การควบคุมการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่นโดยใช้สารเคมี

Chemical Control of Filamentous Fungi on Para Rubber (*Hevea brasiliensis*) Sheets

สุพรรณษา ชาญด้วยกิจ

Supansa Chanduaykit

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Biotechnology**

Prince of Songkla University

2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การควบคุมการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่นโดยใช้สารเคมี

Chemical Control of Filamentous Fungi on Para Rubber (*Hevea brasiliensis*) Sheets

สุพรรณษา ชาญด้วยกิจ

Supansa Chanduaykit

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Biotechnology
Prince of Songkla University**

2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(1)

ชื่อวิทยานิพนธ์ การควบคุมการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่นโดยใช้สารเคมี
ผู้เขียน นางสาวสุพรรณษา ชาญด้วยกิจ
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญญา หันพงษ์กิตติกุล)

.....ประธานกรรมการ
(ดร.อภิชาติ อุโฬจิตร)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญญา หันพงษ์กิตติกุล)

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

..... กรรมการ
(ดร.จริยา สากยโรจน์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การควบคุมการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่นโดยใช้สารเคมี
ผู้เขียน	นางสาวสุพรรณษา ชาญด้วยกิจ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2550

บทคัดย่อ

ผลิตภัณฑ์ยางพาราแผ่นที่ได้จากน้ำยางของ *Hevea brasiliensis* เป็นสินค้าที่ทำรายได้หลักให้กับเกษตรกรในภาคใต้ของประเทศไทย อย่างไรก็ตาม พบว่ามีการเจริญของเชื้อราทำให้คุณภาพของยางพาราแผ่นลดลงและยังส่งผลต่อสุขภาพของเกษตรกรผู้ผลิตด้วย ได้เก็บตัวอย่างยางพาราแผ่นจาก 13 แหล่งในภาคใต้ทางฝั่งทะเลตะวันออกและตะวันตกของประเทศไทย วิเคราะห์ห่อหุ้มประกอบโปรตีนพบว่าอยู่ระหว่าง 0.032-1.225 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำตาลทั้งหมด 0.127-1.130 มิลลิกรัมต่อกรัม และน้ำตาลรีดิวิซ 0.015-0.175 มิลลิกรัมต่อกรัม เชื้อราที่ปนเปื้อนมีจำนวนเฉลี่ย 1.86×10^6 CFU/g เชื้อราที่พบบ่อยบนยางพาราแผ่นอยู่ในจีนัส *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Mucor* sp., *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp., *Geotrichum* sp., *Tritirachium* sp., *Daldinia eschscholzii* และ *Schizophyllum commune* เลือกเชื้อราจำนวน 27 ไอโซเลต (*Aspergillus* spp. 10 ไอโซเลต, *Penicillium* spp. 6 ไอโซเลต, *Fusarium* spp. 4 ไอโซเลต, *Rhizopus* spp. 2 ไอโซเลต, *Cladosporium* spp. 3 ไอโซเลต, *Mucor* sp. 1 ไอโซเลต และ *Geotrichum* sp. 1 ไอโซเลต) นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นด้วยวิธี hyphal extension-inhibition assay กับสารเคมี ได้แก่ แคลเซียมโพรฟิออนด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมซอร์เบต โพแทสเซียมเบนโซเอต โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ โซเดียมอะซิเตต โซเดียมไนเตรด แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต และกรดอะซิติกที่ระดับความเข้มข้น 1-10% (w/v) หรือ (v/v) และน้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ กระถิน และยูคาลิปตัสที่ระดับความเข้มข้น 10-100% (v/v) พบว่าสารยับยั้งเชื้อราที่มีประสิทธิภาพคือ โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ โพแทสเซียมซอร์เบต โพแทสเซียมเบนโซเอต และกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10% และน้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ที่ความเข้มข้น 100% เมื่อนำสารยับยั้ง 5 ชนิด นี้ไปทดสอบหาค่า MIC กับเชื้อราทั้ง 27 ไอโซเลต พบว่าเชื้อราที่มีความทนทานต่อสารยับยั้งที่มากที่สุดคือ *Aspergillus* (SR9) โดยมีค่า MIC ของโพแทสเซียมซอร์เบต 10% (w/v) โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 5% (w/v) โพแทสเซียมเบนโซเอต 5% (w/v) กรดอะซิติก 0.313% (v/v) และน้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ 6.25% (v/v) ที่เวลา 72 ชั่วโมง (บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง) นอกจากนี้ยังพบว่าโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 2 เท่า MIC สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่นได้มากกว่า 7 วัน

Thesis Title	Chemical Control of Filamentous Fungi on Para Rubber (<i>Hevea brasiliensis</i>) Sheets
Author	Miss Supansa Chanduaykit
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2007

ABSTRACT

Dry para rubber sheets produced from latex of *Hevea brasiliensis* are one of a major goods to generate income for most farmers in southern Thailand. However, there are many kinds of molds growing on sheets which may reduce sheet quality and effect on health of farmers and producers. Para rubber sheet samples were collected from thirteen places of the east and west coasts of southern Thailand. The sheets contained protein 0.032-1.225 mg/g, total sugar 0.127-1.130 mg/g and reducing sugar 0.015-0.175 mg/g. The average mold count on the contaminated sheets was 1.86×10^6 CFU/g. The common fungal genera found on the sheets were *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Mucor* sp., *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp., *Geotrichum* sp., *Tritirachium* sp., *Daldinia eschscholzii* and *Schizophyllum commune*. Twenty-seven fungal isolates (10 *Aspergillus* spp., 6 *Penicillium* spp., 4 *Fusarium* spp., 2 *Rhizopus* spp., 3 *Cladosporium* spp., *Mucor* sp. and *Geotrichum* sp.) were selected to test against various antifungal agents: calcium propionate, calcium hydroxide, potassium sorbate, potassium benzoate, sodium metabisulphite, sodium acetate, sodium nitrate, ammonium bicarbonate, acetic acid and smoked acids from different kinds of woods (bamboo, koa haole and eucalyptus) by a hyphal extension-inhibition assay. Most agents were tested at the concentrations of 1-10% (w/v) or (v/v) excepted smoke acids at 10-100% (v/v). The effective agents were 10% sodium metabisulphite, potassium sorbate, potassium benzoate, acetic acid and 100% smoked acid from bamboo. The minimal inhibitory concentrations (MIC) of these agents against 27 tested fungal isolates were determined. *Aspergillus* sp. SR9 was the most tolerant to all antifungal agents tested for 72 h at room temperature with MIC values of 10% (w/v) potassium sorbate, 5% (w/v) sodium metabisulphite, 5% (w/v) potassium benzoate, 0.313% (v/v) acetic acid and 6.25% (v/v) smoked acid from bamboo. In addition, sodium metabisulphite at a concentration of 2 MIC could prevent fungal growth on para rubber sheet for more than 7 days.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงษ์กิตติกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ ซึ่งแนะแนวทางในระหว่างการทำกรวิจัย การค้นคว้า และการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับคำแนะนำ ซึ่งแจ่ม คำสั่งสอนต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.อภิชาติ อุโฬจิตร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.จริยา สากยโรจน์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่สละเวลาอันมีค่าอย่างยิ่งในการให้ข้อคิดเห็น เสนอแนะ และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่ให้ทุนอุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ ขอขอบคุณ สกว. และ บัณฑิตวิทยาลัยสำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง ที่ให้โอกาสและกำลังใจ ใน การศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อุตสาหกรรมทุกท่าน สำหรับกำลังใจดีๆ และทำให้การทำงานวิจัยในห้องปฏิบัติการมีความสุขและ สนุกสนาน รวมทั้งพี่ๆ น้องๆ ห้องปฏิบัติการราวิทยาทุกคน ที่ช่วยให้คำแนะนำช่วยเหลือในการ ทำงานวิจัย และส่งกำลังใจให้กันเสมอมา ตลอดจนทุกๆ ท่านที่ไม่ได้กล่าวนาม ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วน ช่วยให้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุพรรณษา ชาญด้วยกิจ

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพ	(9)
บทที่	
1. บทนำ	
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	19
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุ	20
อุปกรณ์	21
วิธีการทดลอง	22
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	
ผลการเก็บตัวอย่าง	28
ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของยางพาราแผ่น	32
ผลการวิเคราะห์ปริมาณและการจำแนกชนิดของเชื้อราจากตัวอย่างและบริเวณที่ตากหรือเก็บยางพาราแผ่น	38
การศึกษาผลของสารยับยั้งเชื้อรา	51
การศึกษาผลการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่น	68
การประยุกต์ใช้สารเคมีในการป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่น	73
4. สรุปผลการทดลอง	82
เอกสารอ้างอิง	85
ภาคผนวก	
ก. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	96
ข. วิธีการวิเคราะห์	98
ค. การเตรียมความชื้นสัมพัทธ์	104
ง. ผลการทดลอง	105
ประวัติผู้เขียน	119
	(6)

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ส่วนประกอบของน้ำยางธรรมชาติ	3
2. ส่วนประกอบของเนื้อยางแห้ง	6
3. ค่าความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วลม และอุณหภูมิของสถานที่เก็บตัวอย่างยางพาราแผ่น	31
4. ค่าพีเอชของตัวอย่างยางพาราแผ่นที่ปนเปื้อนเชื้อราจากแหล่งต่างๆ	37
5. จำนวนไอโซเลตของเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างยางพาราแผ่นจากแหล่งต่างๆ	39
6. จำนวนไอโซเลตของเชื้อราที่แยกได้จากอากาศจากแหล่งต่างๆ ที่เก็บตัวอย่าง	44
7. ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราที่พบได้บ่อยบนยางพาราแผ่น	50
8. ผลของชนิดและความเข้มข้นสารยับยั้งเชื้อราต่อการเจริญของเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่น	53
9. ช่วงของค่า MIC และ MFC ของสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราต่อเชื้อราที่พบบ่อยบนยางพาราแผ่น	66
10. ช่วงของค่า MIC และ MFC ต่อเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่น	67
11. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อรา 3 ชนิดบนยางพาราแผ่นตากที่ความชื้นสัมพัทธ์ต่างๆ	69
12. ผลของความชื้นสัมพัทธ์ต่อการเจริญของเชื้อรา 3 ชนิดบนยางพาราแผ่นตากที่อุณหภูมิห้อง	70
13. ผลของอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ต่อการเจริญของเชื้อรา 3 ชนิดบนยางพาราแผ่น	71
14. การเจริญของ <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> และ <i>Fusarium</i> บนยางพาราแผ่นที่จุ่มด้วยสารยับยั้งเชื้อราชนิดต่างๆ ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80%	76
15. การเจริญของ <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> และ <i>Fusarium</i> บนยางพาราแผ่นที่จุ่มด้วยสารยับยั้งเชื้อราชนิดต่างๆ ที่ความชื้นสัมพัทธ์ห้อง (70.7%RH)	77
16. ประสิทธิภาพของสารยับยั้งเชื้อราบนยางพาราแผ่นโดยการไม่เพาะสปอร์ของเชื้อรา (natural infection) ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80% และอุณหภูมิห้อง (29.2°C)	81
17. ประสิทธิภาพของสารยับยั้งเชื้อราบนยางพาราแผ่นโดยการไม่เพาะสปอร์ของเชื้อรา (natural infection) ที่ความชื้นสัมพัทธ์ห้อง (73.4%RH) และอุณหภูมิห้อง (29.2°C)	81

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
18. ผลของสารยับยั้งเชื้อราที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่น	105
19. ค่า MIC และ MFC ของสารยับยั้งเชื้อราต่อเชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp. ที่แยกได้จากยางพาราแผ่น	114
20. ค่า MIC และ MFC ของสารยับยั้งเชื้อราต่อเชื้อรา <i>Penicillium</i> spp. ที่แยกได้จากยางพาราแผ่น	115
21. ค่า MIC และ MFC ของสารยับยั้งเชื้อราต่อเชื้อรา <i>Fusarium</i> spp. ที่แยกได้จากยางพาราแผ่น	116
22. ค่า MIC และ MFC ของสารยับยั้งเชื้อราต่อเชื้อรา <i>Cladosporium</i> spp. ที่แยกได้จากยางพาราแผ่น	117
23. ค่า MIC และ MFC ของสารยับยั้งเชื้อราต่อเชื้อรา <i>Rhizopus</i> spp. <i>Mucor</i> sp. และ <i>Geotrichum</i> sp. ที่แยกได้จากยางพาราแผ่น	118

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1. โครงสร้างของ polyisoprene	4
2. โครงสร้างสามมิติของ polyisoprene	5
3. ภาพวาดลักษณะผิว โมเลกุลของอนุภาคยาง	5
4. การป่นเหวี่ยงแยกชั้นของน้ำยาง <i>Hevea brasiliensis</i>	7
5. เส้นใยของรา 3 แบบ	11
6. ลักษณะการเก็บยางพาราแผ่นของเกษตรกร	29
7. ลักษณะการเจริญของเชื้อราบนตัวอย่างยางพาราแผ่นที่ใช้ในการทดลอง	29
8. ปริมาณความชื้นของตัวอย่างยางพาราแผ่นจากแหล่งต่างๆ	33
9. ปริมาณโปรตีน น้ำตาลทั้งหมด และ น้ำตาลรีดิวิซ์ ของยางพาราแผ่นจากแหล่งต่าง ๆ	35
10. ปริมาณเชื้อราของตัวอย่างยางพาราแผ่นจากแหล่งต่างๆ	40
11. ลักษณะ โคลโลนิของเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่นที่ปนเปื้อนเชื้อรา	41
12. ลักษณะจุดสีฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อราที่พบได้บ่อยบนยางพาราแผ่น	42
13. การกระจายชนิดของเชื้อรา (150 ไอโซเลต) ที่แยกได้จากยางพาราแผ่นที่ปนเปื้อน	45
14. การกระจายชนิดของเชื้อรา (81 ไอโซเลต) ที่แยกได้จากอากาศจากแหล่ง ที่เก็บตัวอย่างยางพาราแผ่นในที่ต่างๆ กัน	45
15. Phylogenetic tree ของเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ : <i>Daldinia eschscholzii</i> (TL4 และ TC127)	47
16. Phylogenetic tree ของเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ : <i>Schizophyllum commune</i> (NY10)	48
17. ผลของสารยับยั้งต่อการเจริญของเชื้อราโดยวิธี hyphal extension-inhibition assay	54
18. ผลของสารยับยั้งต่อการเจริญของ <i>Aspergillus</i> (PB03) โดยวิธี hyphal extension- inhibition assay	55
19. ผลของสารยับยั้งต่อการเจริญของ <i>Aspergillus niger</i> (TL3) โดยวิธี hyphal extension- inhibition assay	56
20. ค่า MIC ของสารยับยั้งเชื้อรา 5 ชนิดต่อ <i>Aspergillus</i> spp.	62
21. ค่า MIC ของสารยับยั้งเชื้อรา 5 ชนิดต่อ <i>Fusarium</i> spp.	63
22. ค่า MIC ของสารยับยั้งเชื้อรา 5 ชนิดต่อ <i>Penicillium</i> spp.	63
23. ค่า MIC ของสารยับยั้งเชื้อรา 5 ชนิดต่อ <i>Cladosporium</i> spp.	64

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
24. ค่า MIC ของสารยับยั้งเชื้อรา 5 ชนิดต่อ <i>Rhizopus</i> spp., <i>Mucor</i> sp. และ <i>Geotrichum</i> sp.	64
25. สปอร์ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า	65
26. ลักษณะการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่นส่องด้วยกล้องสเตอริโอในวันที่ 7	72
27. การเปรียบเทียบสีของยางพาราแผ่นเมื่อชุบสารยับยั้งเชื้อราชนิดต่างๆ	75

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ยางพาราแผ่นผลิตจากน้ำยางของต้นยาง (*Hevea brasiliensis*) เป็นสินค้าส่งออกทำรายได้หลักให้กับเกษตรกรทางภาคใต้ของประเทศไทย จากผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติทั่วโลกทั้งหมดโดยประมาณ 8,800,000 ตัน มีประเทศมาเลเซีย อินโดนีเซีย และประเทศไทย เป็นประเทศผู้ผลิตหลักเกือบ 80% เพื่อสนองต่อความต้องการยางธรรมชาติของโลก (Beilen *et al.*, 2006) โดยประเทศไทยเป็นผู้ผลิตยางธรรมชาติแปรรูปรายใหญ่ที่สุดของโลกในปัจจุบัน คิดเป็นสัดส่วนประมาณ 30% ของผลผลิตยางธรรมชาติแปรรูปรวมของโลก (ทิศทางการผลิตและการส่งออกยางธรรมชาติแปรรูปของไทย, 2548) ยางธรรมชาติแปรรูปที่ไทยส่งออกมากที่สุด คือ ยางพาราแผ่นรมควัน มีสัดส่วน 56% ของปริมาณการส่งออกยางธรรมชาติแปรรูปทั้งหมดคิดเป็น 94.7% ของการค้ายางพาราแผ่นทั่วโลก (ยางพาราและผลิตภัณฑ์ยาง, 2548) ยางพารามีคุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์ ประกอบด้วยความยืดหยุ่น ขยายตัวได้ ทนต่อการเสียดสี และทนต่อการกระแทก เป็นฉนวนกันความร้อน และตัดแปลงได้ง่าย (Collier, 1996; Cornish, 2001) ซึ่งมีผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติถูกแปรรูปเป็นสินค้าเพื่อผู้บริโภคมากกว่า 40,000 ชนิด เช่น อุปกรณ์ทางการแพทย์ ยางพาราแผ่นในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (80% ของผลิตภัณฑ์ทั้งหมด) ถูกกักตุนเก็บไว้เพื่อเพิ่มมูลค่าทางการค้า เมื่อเก็บไว้เป็นเวลานานยางพาราแผ่นจะมีเชื้อราเป็นสาเหตุหลักในการปนเปื้อนผลิตภัณฑ์ ยิ่งในสภาวะที่บรรยากาศโดยรอบมีความชื้นสูง นอกจากนี้ในระหว่างการผลิตยางพาราแผ่นตั้งแต่การกรีดยาง การขนส่ง อีกทั้งอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต เป็นสิ่งที่ควบคุมยากที่จะให้ปราศจากเชื้อ ทำให้มีโอกาสสูงในการปนเปื้อนของเชื้อราที่ก่อให้เกิดความเสียหายบนยางพาราแผ่นได้ (วารกรณ์ ขจรไชยกุล, 2524)

เชื้อราสายเป็นสิ่งมีชีวิตที่สำคัญ เนื่องจากมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายหลักในการย่อยสลายสารอินทรีย์ สามารถเจริญเติบโตบนวัสดุได้หลากหลาย แม้แต่ในวัสดุที่มีน้ำน้อย จะเห็นว่าเชื้อราสามารถเจริญได้ดีมากกว่าแบคทีเรียในสภาวะที่แห้งแล้ง (Kieft, 2000) เนื่องจากลักษณะที่เป็นเส้นสายของเชื้อราซึ่งสามารถแทรกซึมเข้าสู่วัสดุได้เป็นอย่างดี (Brock *et al.*, 2000) ในขณะที่ยางมีองค์ประกอบ 2 ส่วน คือส่วนที่เป็นอนุภาคยางมีชื่อเรียกทางเคมีว่า โพลีไอโซพรีน (Linos *et al.*, 2000; Ohya and Koyama, 2001) ซึ่งส่วนนี้จะถูกหุ้มไว้ด้วยน้ำมันและโปรตีน และส่วนที่ไม่ใช่ยาง

เช่น เชรุ่ม ซึ่งติดอยู่ในยางธรรมชาติเพียงส่วนน้อย พบว่าเป็นสารประเภทเกลืออนินทรีย์ กรดอะมิโน โปรตีน อินโนซิทอล และ คาร์โบไฮเดรต (Ohya and Koyama, 2001) ซึ่งเชื้อราสามารถนำไปใช้เป็นสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและสามารถย่อยสลายได้ ได้แก่ เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* และ *Cladosporium* (Borel et al., 1982) โดยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของยางถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อรา (Linos and Steinbüchel, 2001) ซึ่งยางเป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติที่สามารถย่อยสลายด้วยสิ่งมีชีวิตได้ (Bhatt et al., 2007) มีเชื้อราหลายชนิดที่เจริญบนยางพาราแผ่นนอกจากทำให้คุณภาพของยางพาราแผ่นลดลงแล้วยังเป็นปัญหาสุขภาพในระบบภูมิคุ้มกันต่อเกษตรกร (Deacon, 1997; Chew et al., 2001; Clausen and Yang, 2003) การทำยางพาราแผ่นโดยส่วนมากแล้วชาวสวนยางขนาดเล็กนิยมนำน้ำยางที่กรีดได้ในแต่ละวัน มาทำเป็นยางพาราแผ่น เมื่อได้ยางพาราแผ่นดิบซึ่งลักษณะเป็นแผ่นสีขาว มีความชื้นสูงจะนำไปผึ่งแห้งชั่วคราวหนึ่ง เพื่อให้ความชื้นบนแผ่นยางลดลง โดยทั่วไปพบว่าความประณีตในการทำยางพาราแผ่นของชาวสวนยางแต่ละแห่งจะแตกต่างกัน ทำให้ได้คุณภาพของยางพาราแผ่นแตกต่างกัน (ต่อสูโตร์รักษา, 2536) ยางพาราแผ่นที่มีการเจริญของเชื้อราอยู่เป็นจำนวนมากนั้นทำให้มีราคาต่ำด้วย

ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาถึงชนิดของเชื้อราที่เจริญบนยางพาราแผ่น คัดเลือกสารยับยั้งเชื้อราที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และตรวจสอบหาผลความสามารถของสารยับยั้งเชื้อราที่แยกได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากยางพาราแผ่นได้ เพื่อให้ได้ยางพาราแผ่นที่มีคุณภาพ อันจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรชาวสวนยางโดยตรงและผู้ผลิตยางพาราแผ่นด้วย

การตรวจเอกสาร

1. น้ำยางธรรมชาติ

น้ำยางสดจากต้นยางพารา มีลักษณะเป็นของเหลวสีขาวหรือสีครีม ในทางเคมีจัดเป็น สารแขวนลอย มีความหนาแน่น 0.975-0.980 กรัม/มิลลิลิตร มีพีเอชประมาณ 6.5-7.0 ความหนืด ไม่แน่นอน มีส่วนประกอบของสารต่างๆไม่แน่นอน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น พันธุ์ยาง อายุต้นยาง การกรีด และฤดูกาล (วารกรณ์ ขจรไชยกูล, 2524) นอกจากนี้ น้ำยางธรรมชาติเป็นสาร ที่ไม่บริสุทธิ์ เมื่อกรีดมาจากต้นยาง มีปริมาณของเนื้อยางแห้งอยู่ระหว่าง 25 ถึง 45% (เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรังสี, 2546) สำหรับสมบัติและส่วนประกอบของน้ำยางธรรมชาติโดยปริมาตร แสดงไว้ดังตาราง 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของน้ำยางธรรมชาติ

Table 1. Contents of natural latex.

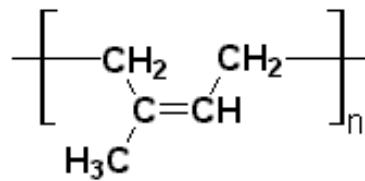
Content	Percent (by weight)
Total solid	27-48
Dry rubber	25-45
Protein	1-1.5
Resin	1-2.5
Ash	1
Sugar	1

ที่มา : เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรังสี (2546)

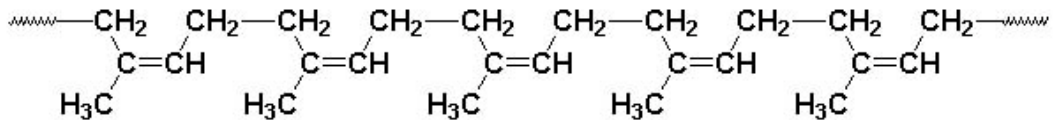
ส่วนประกอบของน้ำยางสดแบ่งได้เป็น 2 ส่วน ดังนี้

(1). ส่วนที่เป็นยาง (dry rubber sheet) ประกอบด้วยอนุภาคยาง โปรตีน และไขมัน โดยอนุภาคยางเป็นสารประกอบไฮโดรเจนที่มีคาร์บอน 5 อะตอม และไฮโดรเจน 8 อะตอม เขียนเป็นสูตรเคมีคือ $(C_5H_8)_n$ เรียกชื่อทางเคมีว่า โพลีไอโซพรีน (polyisoprene) (ภาพที่ 1) (Michalovic, 2007) และมีโครงสร้างสามมิติดังแสดงในภาพที่ 2 รูปร่างของอนุภาคยางเป็นรูปกลม (ภาพที่ 3) ขนาด 0.05-5.0 ไมครอน มีประจุไฟฟ้าที่ผิวเป็นลบ เคลื่อนที่แบบบราวเนียนไปมาตลอดเวลา ยางมีความยืดหยุ่นได้ เนื่องจากโมเลกุลขนาดใหญ่ของยางแต่ละโมเลกุล เป็นของสายโมเลกุลที่เกิดจาก

หน่วยย่อยไอโซพรีนต่อกัน ยางชั้นหนึ่งจะประกอบด้วยขดของสายโมเลกุลที่พันกันอย่างยุ่งเหยิง สายโมเลกุลเหล่านี้มีสมบัติถูกหักงอหรือยืดได้ การดึงหรือยืดชั้นยางก็เท่ากับยืดสายโมเลกุลของยางให้คลายออกแต่เมื่อปล่อยคืนให้ความเป็นอิสระกับชั้นยาง สายโมเลกุลยางก็จะพยายามหดตัวกลับมาอยู่ในสภาพเดิม (ชอบ บุญช่วย, 2541)



a.



b.

ภาพที่ 1 โครงสร้างของ polyisoprene

a. สูตรโครงสร้างของ polyisoprene

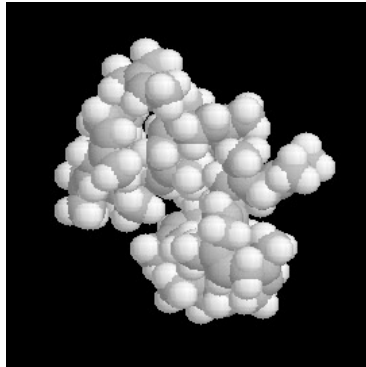
b. โครงสร้างของ polyisoprene แบบสายโซ่ยาว

Figure 1. Structure of polyisoprene.

a. Chemical structure of polyisoprene

b. Long chain structure of polyisoprene

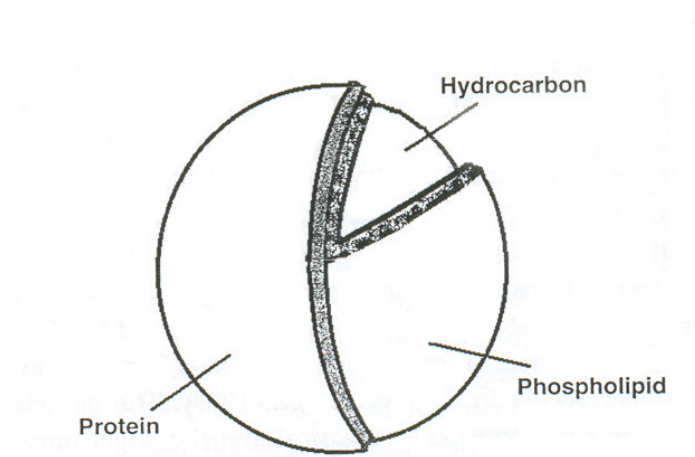
ที่มา : Michalovic (2007)



ภาพที่ 2 โครงสร้างสามมิติของ polyisoprene

Figure 2. 3 D-Model of polyisoprene.

ที่มา : Polymer Science Learning Center (2007)



ภาพที่ 3 ภาพวาดลักษณะผิวโมเลกุลของอนุภาคยาง

Figure 3. Schematic drawing of the rubber molecule surface.

ที่มา : Ohya and Koyama (2001)

อนุภาคยางถูกห่อหุ้มด้วยสารจำพวกไขมันและโปรตีน (ภาพที่ 3) โดยโปรตีนจะอยู่ชั้นนอก และจะมีอยู่ประมาณ 25% ของโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำยาง ส่วนที่เหลือประมาณ 50% จะอยู่ในชั้นน้ำ และอีก 25% จะปะปนอยู่ในส่วนของสารลูทอยด์ (lutoid) และโปรตีนที่อยู่ในน้ำยาง ส่วนใหญ่เป็นชนิดแอลฟาโกลบูลิน (α -globulin) และฮีวิน (hevein) ส่วนของไขมันอยู่ระหว่างผิวของอนุภาคยางและโปรตีน ส่วนใหญ่เป็นสารพวกฟอสโฟลิปิดชนิด α -lecithin เชื่อว่าทำหน้าที่ยึดโปรตีนให้เกาะอยู่บนผิวของอนุภาคยาง (เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรัมย์, 2546)

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของเนื้อยางแห้ง

Table 2. Contents of dry rubber.

Contents	Percent
Hydrocarbon rubber	86
Water in rubber particle	10
Protein	1
Lipid	3

ที่มา : เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรัมย์ (2546)

(2). ส่วนประกอบที่ไม่ใช่ยาง (non rubber content) เป็นส่วนประกอบอื่นๆ ทั้งหมดที่ไม่ใช่ส่วนที่เป็นยาง ซึ่งพบว่าประกอบด้วย

(2.1) ส่วนที่เป็นน้ำ หรือซีรัม (serum) มีความหนาแน่นประมาณ 1.02 กรัมต่อมิลลิเมตร ซึ่งประกอบด้วยสารชนิดต่าง ๆ คือ

ก. คาร์โบไฮเดรต ส่วนใหญ่เป็นพวกแอลเมซิลไลโนซิทอล (L-methylinositol) (ชอบ บุญช่วย, 2541) และ คิวบราซิทอล (quebrachitol) (เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรัมย์, 2546) ส่วนคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ซึ่งมีอยู่จำนวนน้อย ได้แก่ กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส และกาแลคโตส น้ำตาลเหล่านี้เมื่อถูกออกซิไดส์โดยจุลินทรีย์ จะเปลี่ยนสภาพเป็นกรดระเหยได้ (volatile fatty acid) เช่น กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก

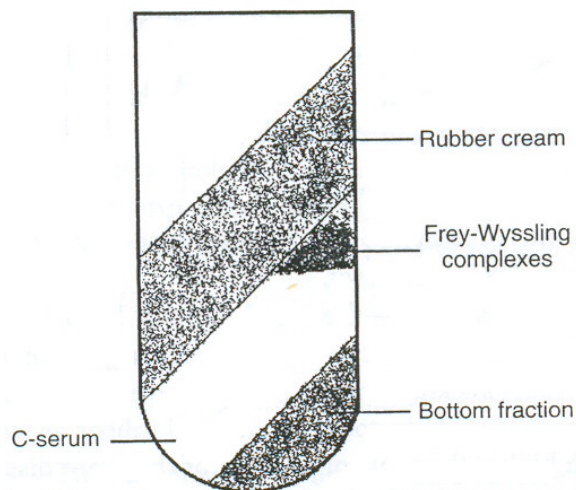
ข. โปรตีนและกรดอะมิโน ส่วนที่อยู่ในซีรัมของน้ำยางโดยมากคือ แอลฟาไกลบูลิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีสมบัติเป็น surface active agent จะอยู่บนรอยต่อระหว่างน้ำและอากาศ และน้ำมันกับน้ำ

(2.2) ส่วนของลูทอยด์และองค์ประกอบอื่นๆ

ก. ลูทอยด์ (lutoid) เป็นอนุภาคค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 ถึง 3.0 ไมครอน ห่อหุ้มด้วยเยื่อบาง ภายในมีทั้งสารละลายและสารแขวนลอย โดยมีโปรตีนที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ นอกจากนี้ยังมีส่วนของสารฟอสโฟลิปิดแขวนลอยประมาณ 0.5% และมีสารโพลีฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ยางมีสีเหลืองหรือสีคล้ำเมื่อสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ (เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรังษี, 2546)

ข. อนุภาคเฟรย์-วิสลิง (Frey-Wessling) อยู่ติดกับเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเป็นอนุภาค เช่นเดียวกับยางแต่มีสีเหลืองเวลาเหยียดแยกมักพบอยู่ในส่วนของเซรัม (ภาพที่ 4) (สุรศักดิ์ สุทธิสงค์, 2532)

ค. องค์ประกอบอื่น ส่วนประกอบของไนโตรเจนอิสระ เช่น โคลีน (choline) เมธิลลามีน (methylamine) กรดอินทรีย์ กรดอนินทรีย์ อนุมูลของสารอินทรีย์โดยเฉพาะพวกฟอสเฟตและคาร์บอนेट และอนุมูลของโลหะ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวกเหล็ก แมกนีเซียม โพแทสเซียม โซเดียม ทองแดง นอกจากนี้ยังมีไซยาไนด์ประมาณ 0.25% (ชอบ บุญช่วย, 2541)



ภาพที่ 4 การปั่นเหวี่ยงแยกชั้นของน้ำยาง *Hevea brasiliensis*

Figure 4. Centrifugation of *Hevea brasiliensis* latex.

ที่มา : Ohya and Koyama (2001)

2. กระบวนการผลิตยางพาราแผ่นในสหกรณ์โรกรมยาง

กระบวนการผลิตยางพาราแผ่นในสหกรณ์โรกรมยาง จะมีขั้นตอนของการดำเนินการ ดังนี้ (สถิติพันธ์์ ธรรมสถิตย์, 2537)

2.1 การรวบรวมน้ำยางจากชาวสวนยาง

2.1.1 น้ำยางที่นำส่งโรกรมยางต้องสด สะอาด ไม่เจือปนสิ่งอื่นใดลงในน้ำยาง ต้องใช้ภาชนะบรรจุที่สะอาดในการบรรจุน้ำยางและใช้เวลานำส่งจากสวนยางถึงโรงงานภายใน 1 ชั่วโมง

2.1.2 ไม่ควรผสมแอมโมเนียเข้มข้นลงในน้ำยาง เพราะเป็นผลให้น้ำยางบูดเสียหายและแผ่นยางแห้งที่ได้จะมีสีคล้ำกว่าปกติ หากจำเป็นต้องใส่สารกันบูดเน่าของน้ำยาง จะใช้ สารกันบูด (โซเดียมซัลไฟท์) ในรูปของสารละลาย 3% ของน้ำหนักต่อปริมาตรในอัตรา 0.02-0.05%

2.1.3 เทน้ำยางจากถังเก็บน้ำยางของสมาชิกที่ส่งยาง ผ่านตะแกรงกรองน้ำยาง เบอร์ 40 เมส ลงสู่ถัง 50 ลิตร แล้วชั่งและจดน้ำหนักน้ำยางสดไว้ในทะเบียนแสดงจำนวนยางของสมาชิก และมีการหาเนื้อยางแห้งจากน้ำยางสดโดยการอบแห้ง เพื่อชั่งน้ำหนักยางที่แท้จริง

2.1.4 เมื่อชั่งน้ำยางของสมาชิกแต่ละคนเสร็จแล้ว เทน้ำยางผ่านตะแกรงเบอร์ 60 เมส ลงในถังรวมน้ำยางของโรงงาน เพื่อหาความเข้มข้นใหม่

2.2 การทำยางพาราแผ่นดิบรมควัน

ปัจจัยสำคัญของการทำยางพาราแผ่นดิบ คือ

2.2.1 ต้องทราบความเข้มข้นของเนื้อยางแห้งในน้ำยางสด (dry rubber content, DRC) ของสมาชิกที่เทรวมกันแล้วว่ามีค่าความเข้มข้นเท่าไร ซึ่งต้องทำให้เร็วที่สุด มีวิธีหา 2 วิธีคือ การใช้เครื่องวัดความถ่วงจำเพาะของน้ำยาง ที่เรียกว่า เมโทรแลค และการใช้สถิติเฉลี่ยความเข้มข้นของน้ำยางที่สมาชิคนำส่งโรกรมยาง

2.2.2 ต้องทราบวิธีการเจือจางน้ำยางสด ให้มีความเข้มข้นถูกต้อง ตรงตามชนิดของยางพาราแผ่นดิบรมควัน แต่เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำยางมีการเปลี่ยนทุกวัน จึงได้มีการกำหนดสัดส่วนของการใช้น้ำยาง และน้ำสะอาดขึ้นตามความผันแปรของความเข้มข้นของน้ำยาง

2.2.3 การคำนวณการใช้กรดฟอร์มิค สำหรับการทำให้ยางพาราแผ่นรมควัน ใช้กรดฟอร์มิค 94% ประมาณ 300 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำสะอาด 3,000 มิลลิลิตร ได้กรดฟอร์มิค 5% ปริมาตร 3,300 มิลลิลิตร (สหกรณ์ยางพิจิตร จำกัด)

2.2.4 ปล่อยน้ำยางจากถังรวมน้ำยางผสมกับน้ำสะอาดตามสัดส่วน ซึ่งจะได้ความจุกะก่งทั้งหมด 38 จิดกะก่ง ใช้ไม้พายกวนให้น้ำยางและน้ำผสมกันอย่างทั่วถึงและรีบเติมน้ำกรด

ผสมที่เตรียมไว้แล้วจำนวน 8.2 ลิตรต่อหนึ่งตะกอง ใช้ไม้พายกวนให้เข้ากันอีกครั้ง กวาดฟองที่เกิดขึ้นบนผิวตะกองออก เพราะฟองนี้จะทำให้เกิดตำหนิในแผ่นยาง หลังจากนั้นให้ใส่แผ่นเสียบให้ตรงกับช่องเสียบแต่ละช่อง (แผ่นเสียบ 49 แผ่น ต่อหนึ่งตะกอง) เมื่อยางแข็งตัวแล้ว (หลังจากใส่น้ำกรดประมาณ 4 ชั่วโมง) ให้ฉีดน้ำสะอาดลงไปบนตะกองให้น้ำท่วมยางทุกส่วน เพื่อป้องกันผิวยางเป็นสีคล้ำ อันเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อรา

2.3 การรีดยาง

หลังจากยางแข็งตัวแล้ว ให้ดึงแผ่นเสียบออกจากตะกอง แล้วนำไปล้างให้สะอาดในรางล้างยาง พร้อมทั้งจะป้อนยางเข้าแท่นจักรรีดต่อไป (ขับเคลื่อนด้วยพลังไฟฟ้า 3.75 กิโลวัตต์) ซึ่งจะได้ความหนาของยางพาราแผ่นประมาณ 2-3 มิลลิเมตร นำยางที่รีดแล้วไปวางพาดบนราวไม้ไผ่ เพื่อให้สะเด็ดน้ำประมาณ 1-2 ชั่วโมง ก่อนนำเข้าห้องรมควัน

2.4 การอบ/รมยาง

นำยางพาราแผ่นที่สะเด็ดน้ำแล้วเข้าห้องรมควัน โดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 50-70 องศาเซลเซียส (สูงสุดไม่เกิน 70 องศาเซลเซียส) โดยใช้การเผาไหม้ของฟืนในเตา โดยปกติจะใช้เวลารมควัน 4 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความชื้นในอากาศด้วย

2.5 การคัดชั้นยาง

การคัดชั้นยางนั้นจะใช้การสังเกตเป็นการตัดสินใจตามหลักการที่กำหนดโดยสถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร ซึ่งมีข้อกำหนดของยางพาราแผ่นรมควันชั้นต่างๆ คือ

2.5.1 ยางพาราแผ่นรมควันชั้นพิเศษ ซึ่งต้องเป็นยางพาราแผ่นรมควันที่ผลิตโดยมีการควบคุมอย่างดี ยางแต่ละแผ่นต้องไม่ขึ้นรา ไม่ปรากฏจุดหรือริ้วรอยค่างดวงของยางถูกรมควันมากเกินไป แผ่นยางต้องแห้งดี สะอาด รมควันสม่ำเสมอทั่วทั้งแผ่น ปราศจากฟองอากาศ สิ่งสกปรก ตลอดจนสิ่งแปลกปลอมอื่นๆ

2.5.2 ยางพาราแผ่นรมควันชั้น 1 ยางแต่ละแผ่นต้องไม่ขึ้นรา ไม่ปรากฏจุดหรือริ้วรอยของยางถูกรมควันมากเกินไป ยางต้องแห้งดี สะอาด รมควันสม่ำเสมอทั่วทั้งแผ่น ปราศจากฟองอากาศ สิ่งสกปรก ตลอดจนสิ่งแปลกปลอมอื่นๆ

2.5.3 ยางพาราแผ่นรมควันชั้น 2 ยางแต่ละแผ่นมีราขึ้นได้บ้าง แต่ต้องไม่เกิน 5% ของยางพาราแผ่น แผ่นยางมีฟองอากาศบ้าง แต่ปราศจากร่องรอยของการถูกรมควันไม่สม่ำเสมอ ยางต้องแห้งดี สะอาด ไม่มีจุดค่างของสิ่งสกปรกหรือสิ่งแปลกปลอม

2.5.4 ยางพาราแผ่นรมควันชั้น 3 ยางแต่ละแผ่นมีราขึ้นได้บ้าง แต่ต้องไม่เกิน 10% ของยางพาราแผ่น แผ่นยางมีจุดค่าง และฟองอากาศบ้าง แต่ต้องไม่มีร่องรอยของยางถูกรมควันไม่สม่ำเสมอ ยางต้องแห้งดี สะอาด ไม่มีสิ่งแปลกปลอม

2.5.5 ยางพาราแผ่นรมควันชั้น 4 ยางแต่ละแผ่นมีราขึ้นได้บ้าง แต่ต้องไม่เกิน 20% ของยางพาราแผ่น แผ่นยางมีจุดดำ ฟองอากาศ และร่องรอยของการรมควันไม่ถูกต้องปานกลาง ยางต้องแห้งดี ไม่มีสิ่งแปลกปลอม

2.5.6 ยางพาราแผ่นรมควันชั้น 5 ยางแต่ละแผ่นมีราขึ้นได้บ้าง แต่ต้องไม่เกิน 30% ของยางพาราแผ่น แผ่นยางมีจุดดำ ฟองอากาศ และร่องรอยของการรมควันไม่ถูกต้องขนาดใหญ่

3. เชื้อรา

เชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในพวก ยูคาริโอท (eukaryote) คือเซลล์ที่นิวเคลียสมีเยื่อหุ้ม (nuclear membrane) มีเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (endoplasmic reticulum) และไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เซลล์ของเชื้อราคล้ายกับเซลล์ของพืชชั้นสูงเพราะมีผนังเซลล์หุ้ม ทำให้เซลล์คงรูปร่างอยู่ได้ และคล้ายกับเซลล์สัตว์ด้วย เพราะมีเชื้อราหลายชนิดที่เซลล์มีเส้นใย (flagella) ทำให้เซลล์เคลื่อนที่ได้แต่ก็ต่างจากพืชคือ ไม่มีคลอโรฟิลล์ จึงไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (นวลจิราภักดิ์รังรอง และ วราภรณ์ วุฑฒะกุล, 2538; Verrecchia, 2000) จัดอยู่ในลำดับที่ 5 ของอาณาจักรสิ่งมีชีวิต ที่พบและรู้จักชื่อมีประมาณ 70,000 สปีชีส์ จาก 1.5 ล้านสปีชีส์ (Hawksworth, 2004; Gonçalves *et al.*, 2006)

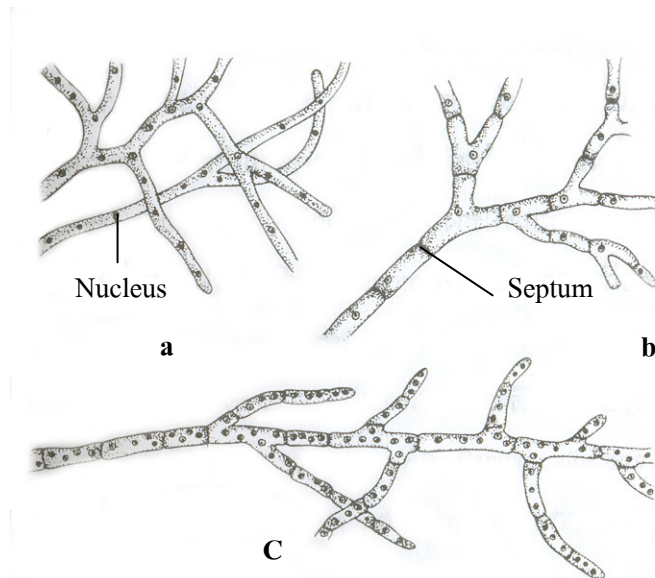
ตามธรรมชาติเชื้อราส่วนใหญ่อยู่ในน้ำ ดิน และสิ่งเน่าเสีย เชื้อราส่วนใหญ่เจริญได้ในภาวะที่มีออกซิเจน มีบ้างที่เจริญได้ในภาวะที่ไม่มีหรือไม่มีออกซิเจนก็ได้ เป็น heterotroph เชื้อราส่วนใหญ่จะปล่อยเอนไซม์ออกมาออกเซลล์ เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ให้เป็นอาหารเหลวแล้วจึงดูดซึมเข้าไปในเซลล์ หรือแอกทีฟทรานสปอร์ต (active transport)

เชื้อรามีทั้งที่ให้คุณและให้โทษ เช่น เชื้อราที่เป็นแซพโทรโฟไฟที่อยู่ในดินช่วยย่อยสลายซากพืชและสัตว์ให้เป็นฮิวมัส ยีสต์หลายชนิดมีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ทำขนมปัง เนยแข็ง และแอลกอฮอล์ เชื้อราหลายชนิดทำให้เกิดโรคพืชซึ่งทำให้สูญเสียทางด้านเศรษฐกิจอย่างมาก

ราสายหรือราฝอยหรือโมลด์ (molds หรือ moulds) เป็นเชื้อราที่มีหลายเซลล์ (multicellular) มีลักษณะเป็นเส้นสาย ประกอบด้วยเส้นใย หรือไฮฟา ซึ่งเป็นท่อทรงกระบอกกลวง กลุ่มของเส้นใยที่รวมตัวกัน เรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) เส้นใยที่เจริญลงไปอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อดูดซึมอาหาร เรียกว่า เวจทิฟไฮฟา (vegetative hypha) หรือซับสเตรทไฮฟา (substrate hypha) อีกชนิดหนึ่งคือ แอเรียลไฮฟา (aerial hypha) ซึ่งแอเรียลไฮฟานี้มักสร้างสปอร์ (spore) เพื่อใช้ในการ

สืบพันธุ์เมื่อเติบโตเต็มที่ จึงมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เส้นใยสืบพันธุ์ (reproductive hypha) เจริญโดยยืดยาวออกทางส่วนปลาย (apical elongation)

เส้นใยของราสายมี 3 แบบคือ (ดังภาพที่ 5) แบบแรกเส้นใยไม่มีผนังกั้น (aseptate หรือ nonseptate หรือ coenocytic hypha) ทำให้มีนิวเคลียสจำนวนมากกระจุกกระจายอยู่ในไซโทพลาซึม แบบที่สองเส้นใยมีผนังกั้นและมีนิวเคลียสอันเดียวในแต่ละเซลล์ แบบที่สามเส้นใยที่มีผนังกั้น และมีนิวเคลียสหลายอันในแต่ละเซลล์ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2541) เส้นใยและคอนิเดีย (conidia) ของราสายบางชนิดจะมีสารสีเมลานิน (melanin pigment) ทำให้สายรามีสีน้ำตาลเรียกเชื้อราพวกนี้ว่า คีมาทีเอเซียส ฟังไจ (dematiaceous fungi) ส่วนเชื้อราที่ไม่มีสารสีเมลานิน สายราจะใสไม่มีสี (hyaline) เรียก โมนิลิเอเซียส ฟังไจ (moniliaceous fungi)



ภาพที่ 5 เส้นใยของรา 3 แบบ

- a) เส้นใยไม่มีผนังกั้น b) เส้นใยที่มีผนังกั้นมีนิวเคลียสอันเดียวต่อเซลล์
c) เส้นใยที่มีผนังกั้นมีนิวเคลียสหลายอันต่อเซลล์

Figure 5. Three types of filamentous fungal hypha.

- a) coenocytic hypha b) uninucleated septate hypha c) multinucleus septate hypha

ที่มา : ดัดแปลงจาก นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ (2541)

เชื้อราส่วนใหญ่จำแนกชนิดได้โดยคุณลักษณะสัณฐานของโคโลนี (macroscopic morphology) และลักษณะจุลสัณฐาน (microscopic morphology) สัณฐานของโคโลนี ได้แก่ ลักษณะที่เป็นเส้นสาย อัตราการเติบโตของโคโลนี รูปร่าง สีของโคโลนี เช่น แบบฟูคล้ายปุยฝ้าย (cottony) คล้ายกำมะหยี่ (velvety) เป็นเม็ด (granular) หรือเป็นผง (powdery)

นอกจากนี้โคโลนีของเชื้อรายังมีลักษณะทางโทโปกราฟี (topography) แตกต่างกันไปหลายแบบ เช่น โคโลนีแบบเรียบ (flat) โคโลนีมีร่องจากตรงกลางเป็นรัศมีไปยังขอบเรียก รูโกส (rugose) โคโลนีลักษณะคล้ายกระดุม คือ ตรงกลางนูนสูงกว่าขอบ เรียก อัมโบเนต (umbonate) ถ้าโคโลนีเหี่ยวขึ้นผิวนูนสูงขึ้นคล้ายหูดเรียก เวอรูโกส (verrucose) และถ้าโคโลนีคล้ายสมองเรียก เซเรบริฟอร์ม (cerebriiform) สีของโคโลนีของเชื้อราหลายชนิดแม้มาจากสายพันธุ์เดียวกันก็อาจแตกต่างกันได้ จึงไม่ควรยึดเป็นหลักในการจำแนกชนิด สืบค้นผิวของโคโลนีมักเกิดจากสีของสปอร์ ส่วนสีทางด้านหลังของโคโลนีเกิดจากสารสีที่ปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อและสีของเวจทิทีฟไฮฟา ส่วนลักษณะจุลทัศน์ฐานของเชื้อรา ได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ชนิดของสปอร์ทั้งแบบมีเพศ (sexual) และแบบไม่มีเพศ (asexual) (นวลจิรา ภัทรรังรอง และ วราภรณ์ วุฑฒะกุล, 2538)

เชื้อราบางชนิดมีเส้นใยที่มีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งช่วยในการจำแนกชนิดของเชื้อราได้ เช่น เส้นใยรูปร่างขดเกลียว (spiral หรือ coiled hyphae) รูปร่างคล้ายเขากวาง (favic chandeliers) รูปร่างคล้ายแรกเกต (racquet hyphae) รูปร่างคล้ายหวี (pectinate hyphae) รูปร่างคล้ายกระดุก (peridial hyphae) และรูปร่างเป็นปม (nodular organ) เป็นต้น

การแยกเชื้อราให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์จำเป็นต้องอย่างยิ่งในการนำเชื้อราเหล่านั้นไปศึกษาลักษณะต่างๆ ทางสัตววิทยา และทางสรีรวิทยา เพื่อนำข้อมูลมาใช้ในการจัดจำแนกหมวดหมู่

ชนิดของจุลินทรีย์ที่เจริญบนยางพาราแผ่น

แบคทีเรียที่เจริญบนยางพาราแผ่นมักอยู่ในพวก Actinomycetes เช่น *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Gordonia* และ *Nocardia* (Linos et al., 2000; Rifaat and Yosery, 2004) แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Xanthomonas* sp. และ *Pseudomonas aeruginosa* (Rifaat and Yosery, 2004) แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Mycobacterium* sp. และ *Bacillus* sp. (Linos et al., 2000) Nette และคณะ (1959 อ้างโดย Linos และ Steinbüche, 2001) กล่าวถึงการแยกเชื้อราและแบคทีเรียได้หลายไอโซเลตจากชิ้นยางพาราแผ่นที่มีการปนเปื้อน และพบว่าน้ำหนักของยางลดลง ซึ่งเชื้อที่พบเป็นเชื้อ Actinomycetes 3 สายพันธุ์ (*Proactinomyces* 1 สายพันธุ์ และ *Actinomyces* 2 สายพันธุ์) ซึ่งทำลายยางไปทำให้น้ำหนักยางหายไป 25.8% และ 43.2% ของน้ำหนักยางเริ่มต้น และเชื้อ *Bacillus*, *Mycobacterium* ทำให้น้ำหนักยางลดลงไป 20.7% และ 17.2% ตามลำดับ

เชื้อราที่พบบนยางพาราแผ่น ได้แก่ *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Paecilomyces* และ *Trichoderma* (Linos and Steinbüche, 2001) นอกจากนี้ Esuruoso (1970) รายงานว่า เชื้อราที่แยกจากยางพาราแผ่นที่ปนเปื้อนเชื้อราในภาคตะวันตกของประเทศไนจีเรีย สายพันธุ์ที่พบคือ *A. fumigatus*, *A. flavus* และ *A. aculeatus* และรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ก็พบว่า *Aspergillus*,

Penicillium และ *Fusarium* เป็นสาเหตุของการเจริญบนยางพาราแผ่นในประเทศที่มีการผลิตยางพาราแผ่น

ยางพาราแผ่นรมควันเป็นแหล่งคาร์บอน (ประกอบด้วยยาง 93%) ให้กับเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าน้ำหนักมวลของเชื้อราเพิ่มขึ้น 6% ของน้ำหนักเดิม และน้ำหนักสุดท้ายของยางหายไป 15.5% หลังบ่มไว้ 19 เดือนผ่านไป หลังจากนั้น 5 ปีน้ำหนักยางหายไป 30.9% ซึ่งเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งพบว่าน้ำหนักยางหายไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Linos and Steinbüche, 2001)

Kwiatkowska และคณะ (1980 อ้างโดย Linos และ Steinbüche, 2001) กล่าวถึงการศึกษา น้ำหนักยางที่หายไปเพิ่มขึ้นเป็น 40% จากเดิม หลังบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 91 วัน โดยพบเชื้อ *Fusarium solani* เป็นเชื้อหลัก การทำลาย cis-1,4-polyisoprene โดยเชื้อราได้มีรายงานระหว่างช่วง ค.ศ. 1982 ซึ่งในการทดลองใช้เชื้อ *Penicillium* และ *Aspergillus* ในการศึกษาการทำลายเนื้อยาง โดยทำเป็น spore suspension เพาะบนยางพาราแผ่นรมควัน แล้วหาน้ำหนักของเซลล์โปรตีนทุก 14 วัน ซึ่งพบว่า น้ำหนักยางหายไปเพิ่มเป็น 13% หลังการเพาะเชื้อราเป็นเวลา 56 วัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนผิวยางพบว่าน้ำหนักยางหายไป 20% และความหนืดลดลง 35% ซึ่งเชื้อราที่ศึกษาได้แก่ *Fusarium solani*, *Cladosporium cladosporioides* และ *Paecilomyces lilacinus* (Borel et al., 1982; Linos and Steinbüche, 2001)

สาเหตุที่เชื้อราเจริญบนยางพาราแผ่น

ยางพาราแผ่นที่มีราเจริญ มีสาเหตุจากการรมน้อยเกินไป การนำยางที่ยังไม่สะอาดน้ำเข้ารมยางมีความชื้นมาก ยังไม่แห้ง ความร้อนเริ่มแรกต่ำเกินไป (ต่อสู โตรักษา, 2536) ยางพาราแผ่นที่มีราเจริญมาก น้ำหนักจะลดลงประมาณ 2% ในเวลา 1 เดือน ยางพาราแผ่นรมแล้วเกิดราสนิมเนื่องจากฝั่งยางไว้นานเกินไปก่อนเข้ารม หรือความชื้นสูง ไม่ได้ทำความสะอาดยางที่เข้ารมและระหว่างรมความร้อนจะมีสารถูกขับออกมาจากแผ่นยาง แล้วแผ่ออกไปเคลือบที่ผิว ราสนิมเกิดจากการแห้งตัวอย่างช้าๆ ในระยะแรกของการรม การแก้ไขทำได้โดยจุ่มยางพาราแผ่นดิบด้วยสารละลายพาราโนโตรฟินอล ควรฝั่งยางให้สะอาดน้ำก่อนนำเข้ารม แล้วรีบนำเข้ารมทันที เตรียมห้องรมให้มีความร้อนพร้อมก่อนนำยางเข้ารมไว้ประมาณ 2 ชั่วโมงก่อนเข้ารม และยางพาราแผ่นดิบที่แขวนบนราวไม้ ไม่ควรวางซ้อนทับกัน (เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรัมย์, 2546; จักริ เลื่อนราม และ สุรศักดิ์ สุทธิสงค์, 2536)

อุณหภูมิ ความชื้น ค่าพีเอช มีผลทำให้เชื้อราเจริญได้เช่นกัน เนื่องจากเชื้อราที่เจริญได้บนยางพาราแผ่นมักเป็นเชื้อราในกลุ่มที่เจริญบนผลิตภัณฑ์ขนมอบ หรือเมล็ดธัญพืช ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้ก็มักเกิดปัญหาจากการเจริญของเชื้อราเช่นกัน Abdullah และคณะ (2000) รายงานถึง

ความชื้นของธัญพืชที่เชื้อราเจริญได้พบว่าที่ค่าน้ำอิสระ (a_w) 0.65 ไม่พบการเจริญของเชื้อราในเวลา 2 เดือน โดยเก็บไว้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65-98% โดยที่ความชื้นเริ่มต้นของข้าวคือ 9.3% ส่วน glutinous rice flour มีค่าความชื้นต่ำสุดที่ 5.8% Lian และคณะ (2008) รายงานว่าช่วงของค่าพีเอชที่เชื้อราสามารถเจริญได้ดี โดยปกติอยู่ระหว่าง พีเอช 5.0-6.0 และ *Aspergillus fumigatus* จะเจริญได้อย่างรวดเร็วในช่วงพีเอช 6.0

4. สารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

4.1 กรดอะซิติก (acetic acid) ความเข้มข้น 5% ในน้ำ สามารถทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ทั้งเชื้อรา *Candida* และ *Pseudomonas aeruginosa* แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นต่ำกว่านี้จะมีฤทธิ์เพียงยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ สารละลายความเข้มข้น 1% ในน้ำ สามารถใช้ทำความสะอาดแผลผ่าตัดได้ (พิชัย เจนจำรัสศรี, 2538) Lind และคณะ (2005) ศึกษาค่า MIC ต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium roqueforti*, *P. commune*, *A. nidulans*, *Fusarium sporotrichoides* พบว่ากรดอะซิติกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ความเข้มข้น 20-120 mM ที่พีเอช 5.0 สำหรับที่พีเอช 7.0 ใช้ความเข้มข้น >500 mM

4.2 แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต (ammonium bicarbonate) มีลักษณะเป็นผงผลึกสีขาวที่อุณหภูมิห้อง สามารถละลายน้ำได้ ทำให้ได้สารละลายต่างและจะเสื่อมสภาพที่อุณหภูมิ 36-60 °C นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Wikipedia, 2005a) นอกจากนี้ Palmer และคณะ (1997) พบว่าแอมโมเนียมไบคาร์บอเนต โพแทสเซียมไบคาร์บอเนต โซเดียมไบคาร์บอเนต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมีขนาด 0.23, 1.01 และ 0.38 เซนติเมตร ตามลำดับ แอมโมเนียมไบคาร์บอเนตสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าเกลือในรูปโพแทสเซียมไบคาร์บอเนต และโซเดียมไบคาร์บอเนต ที่พีเอชในช่วง 7.8 – 8.3 ที่ความเข้มข้นของสาร 50 mM

4.3 กรดเบนโซอิก (benzoic acid) มักนิยมใช้ในรูปของเกลือ เช่น โซเดียมเบนโซเอต (sodium benzoate) หรือ โพแทสเซียมเบนโซเอต (potassium benzoate) ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ดีกว่า เมื่อเปลี่ยนไปอยู่ในรูปกรด และถ้ามีพีเอช 4.0 หรือต่ำกว่า จะทำให้กรดคงรูปซึ่งอยู่ในรูปของ undissociated form ซึ่งเป็นรูปที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด สามารถทำลายจุลินทรีย์พวกยีสต์ แบคทีเรีย และรา ได้ (ศิวาพร ศิวเวช, 2520) Guynot และคณะ (2005a) ทำการศึกษาผลของสารโซเดียมเบนโซเอต, แคลเซียมโพรพิโอเนต และโพแทสเซียมซอร์เบตต่อการเจริญของเชื้อรา ทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ *Eurotium amstelodami*, *Eurotium herbariorum*, *Eurotium rubrum*, *Eurotium repens*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* และ *Penicillium corylophilum* พบว่าสารทั้ง 3 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่ความเข้มข้นของสาร 0.3%

4.4 แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (calcium hydroxide) มีลักษณะเป็นผลึกหรือเป็นผงสีขาว ถ้าอยู่ที่อุณหภูมิสูงจะเสถียรภาพได้ ใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย และสามารถยับยั้งเชื้อราได้ (Wikipedia, 2005b) Bigg และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของกลุ่มเกลือของแคลเซียม ซึ่งพบว่าแคลเซียมไฮดรอกไซด์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Monilinia fructicola*

4.5 กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) เป็นกรดอินทรีย์มีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียและราได้ดีกว่ายีสต์ นิยมใช้ในรูปของเกลือโพรพิโอเนต (propionate) และไม่พบอันตรายที่เกิดจากการใช้โพรพิโอเนตสำหรับมนุษย์ เนื่องจากสามารถถูกย่อยสลายได้เช่นเดียวกับกรดไขมันอื่นๆ และ Biggs (1999) พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. acutatum* ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรค เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งด้วยแคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) แคลเซียมโพรพิโอเนต (calcium propionate) และแคลเซียมซิลิเกต (calcium silicate) ในปริมาณ 1,000 ไมโครกรัมของความเข้มข้นของแคลเซียมต่อลิตร ผลของแคลเซียมคลอไรด์และแคลเซียมโพรพิโอเนตสามารถยับยั้งการงอกและการเจริญของเชื้อราได้ถึง 41 และ 50% ตามลำดับ นอกจากนี้ Mazzani และคณะ (1995) พบว่าโซเดียมโพรพิโอเนตและโพแทสเซียมโพรพิโอเนตสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *Fusarium moniliforme* และ *Penicillium citrinum* ได้ โดย *A. flavus* และ *A. terreus* ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้น 3,000 ppm *P. citrinum* และ *A. ochraceus* สามารถยับยั้งที่ความเข้มข้น 2,000 ppm และ *F. moniliforme* ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้น 1,000 ppm และจากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราคือที่ความเข้มข้น 2,000 ppm

4.6 โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) เป็นเกลือของกรดอะซิติกสีขาว หรืออาจเป็นผลึกสีอ่อน ละลายได้ในน้ำ ethoxyethane และละลายได้ในเอทานอลเล็กน้อย โซเดียมอะซิเตตสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในขนมปังและส่วนผสมของแป้ง และ FDA รับรองว่าสามารถใช้ในการเติมในอาหารได้โดยตรง (Windholz, 1983)

4.7 โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (sodium metabisulphite) มีลักษณะเป็นผง สีขาวจนถึงสีเหลืองอ่อน ใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร (Wikipedia, 2005c) และยังสามารถใช้ป้องกันการเสื่อมเสียของน้ำยาง โดยมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรังษี, 2546; US Patent 6776998, 2001) โดยที่ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO₂) เป็นหนึ่งในสารเติมแต่งที่มีการใช้กันมาตั้งแต่โบราณ หลังจากวิวัฒนาการของสารอนินทรีย์ได้พัฒนามากขึ้นพบว่าซัลเฟอร์ไดออกไซด์และที่อยู่ในรูปเกลือได้ถูกนำมาใช้เป็นสารถนอมอาหารอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีผลในการป้องกันกลไกของเอนไซม์ในการเกิดสีคล้ำ (browning) (Aubourg *et al.*, 2007) และมีผลในการป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรียด้วย (Pateraki *et al.*, 2007)

Aubourg และคณะ (2007) ได้มีการศึกษานำโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 0.5% ในการถนอมอาหารป้องกันการเกิดสีคล้ำในกุ้ง ความเข้มข้นปริมาณ 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถเก็บรักษาความสดได้ถึง 9 วัน ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและมีปริมาณไม่เกินที่กฎหมายได้กำหนดไว้ นอกจากนี้ Joseph และ Akinyosoye (1997) ได้ใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ในการป้องกันการเน่าเสียของมะม่วงและยังใช้เป็นสารป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย Magan (1993) อ้างโดย Pateraki และคณะ (2007) มีการใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในสารละลายเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโต *Aspergillus* และ *Penicillium* ซึ่งมีผลรวมกันกับปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม เช่น ค่าน้ำอิสระซึ่งมีผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของเส้นใยอย่างมีนัยสำคัญ

4.8 กรดซอร์บิก (sorbic acid) ละลายน้ำได้เล็กน้อยจึงนิยมใช้ในรูปของเกลือเช่นกัน โดยเฉพาะโพแทสเซียมซอร์เบต (potassium sorbates) ในการป้องกันการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ เพราะเป็นกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว มีความเป็นอันตรายน้อย เกลือซอร์เบตสามารถทำลายยีสต์และเชื้อรา *Aspergillus* และ *Penicillium* (Vytřasová *et al.*, 2002) ได้ดีกว่าพวกแบคทีเรียและความสามารถในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้จะทำให้ดีที่พีเอชต่ำ โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดคือ 6.5 นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าปริมาณในการใช้สารขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสปอร์ของเชื้อราด้วย ยังมีปริมาณความเข้มข้นของสปอร์โคโคนิเดียมากขึ้น ค่า MIC ของสารยับยั้งก็จะเพิ่มขึ้นด้วย กลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารในกลุ่มของกรด การที่สารในกลุ่มนี้เข้าไปมีผลในการยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยเชื้อรา และพบว่าเมื่อเติมสารในกลุ่ม กรดซอร์บิก 3.0 mM จะทำให้สปอร์ของเชื้อราออกช้ากว่าเดิมอย่างน้อยที่สุด 24 ชั่วโมง และมีผลทำให้น้ำหนักแห้งของเซลล์ลดลง (Plumridge *et al.*, 2004) มีการศึกษาการยับยั้งการเสื่อมเสียของเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* และ *Penicillium* โดยใช้โพแทสเซียมซอร์เบตที่ความเข้มข้น 0.3% (Marín *et al.*, 2002) มีการใช้กรดซอร์บิกและ p-hydroxybenzoic acid esters เติมลงไปในตัวอย่างเสื่อไค้เพื่อศึกษาการป้องกันการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญและต้านทานต่อเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Allaire *et al.*, 2005)

Clausen และ Yang (2003) ศึกษาการยับยั้งเชื้อ *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* และ *Trichoderma viride* บนไม้สน โดยใช้สารเคมีหลายกลุ่ม โดยที่สารในกลุ่มที่ใช้ในการถนอมอาหาร ประกอบไปด้วยโซเดียมเบนโซเอต, โพแทสเซียมซอร์เบต, แคลเซียมโพรพิโอเนต, โพแทสเซียมซอร์เบต, โซเดียมฟอร์มเมต (sodium formate) และ โซเดียมไนไตรท์ (sodium nitrite) พบว่าโซเดียมเบนโซเอตและโพแทสเซียมซอร์เบต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในขณะที่แคลเซียมโพรพิโอเนต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* ได้เท่านั้น

นอกจากนี้ Lennox และ Mcelroy (1984) พบว่าโพแทสเซียมซอร์เบตและโซเดียมโพธิโอเนต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Penicillium expansum* ที่ความเข้มข้น 0.03–0.3% เป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการเติมผสมในอาหารได้ และโซเดียมโพธิโอเนตยับยั้งการเจริญได้น้อยกว่าโพแทสเซียมซอร์เบต แต่สามารถยับยั้งกลไกการสังเคราะห์สารพิษ patulin ของเชื้อราได้ดีกว่า

4.9 น้ำส้มควันไม้ (smoked acid, wood vinegar หรือ pyroligneous acid) เป็นของเหลวที่เป็นผลพลอยได้จากการเผาถ่านไม้ในสภาพอับอากาศ (airless condition) โดยได้จากแก๊ส (ควัน) ที่เกิดขึ้นจากขบวนการการเผาไหม้ เมื่อผ่านความเย็นจะรวมตัวกันเป็นของเหลวมีสีน้ำตาลอ่อนปนแดง มีกลิ่นควันไฟ เป็นกรดอ่อน มีรสเปรี้ยวเล็กน้อย ค่าพีเอชประมาณ 3.0 มีค่าความถ่วงจำเพาะประมาณ 1.015 มีสารประกอบทางเคมีมากกว่า 200 ชนิด องค์ประกอบหลัก คือ กรดอะซิติก ฟอรั่มลดีไฮด์ เมทานอล อะซิโตน ทาร์ เป็นต้น โดยที่องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นกรดอะซิติก (Yatagai *et al.*, 2002) จึงมีประโยชน์ใช้เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เป็นสารช่วยในการปรับปรุงบำรุงดิน เป็นสารช่วยดับกลิ่น (deodorant) และฆ่าเชื้อ (disinfection) และมีผลในการป้องกันการเจริญของเชื้อราบนผิวไม้ได้ (Kartal *et al.*, 2004) เป็นสารควบคุมพืชทางอ้อม มีความปลอดภัยต่อสัตว์และสิ่งแวดล้อม น้ำส้มควันไม้ที่กลั่นแล้วสามารถใช้ในกระบวนการถนอมอาหาร โดยการพ่น หยอด รม เคลือบ หรือเติม เช่น ในเนื้อปลา ไส้กรอก เป็นต้น เพื่อช่วยในการรักษาความสดของเนื้อปลา และเนื้อสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการรักษาไฟไหม้ น้ำร้อนลวก แผลสด บรรเทาอาการเจ็บปวดได้ ลดกลิ่นเหม็นของเหงื่อ ช่วยการไหลเวียนของเลือด (น้ำส้มควันไม้, 2548)

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ (พิชัย เจนจำรัสศรี, 2538)

1. ธรรมชาติของจุลินทรีย์ กล่าวคือชนิดและส่วนประกอบทางเคมีของจุลินทรีย์บางชนิดจะทนสารเคมีบางอย่างได้ดี ระยะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่อยู่ในช่วง log phase จะถูกทำลายได้ง่ายกว่าในช่วงอื่น การมีลักษณะพิเศษอื่นๆ เช่น สปอร์หรือแคปซูล จะถูกทำลายได้ยาก และจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ในระยะเริ่มต้นมีน้อยก็จะถูกทำลายได้ง่าย

2. ระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายจุลินทรีย์ จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารเคมี ความเข้มข้นพีเอช อุณหภูมิ และธรรมชาติของจุลินทรีย์ เมื่อจุลินทรีย์ได้รับสารเคมีในอัตราความเข้มข้นหนึ่งๆ แม้แต่ที่ความเข้มข้นสูงมาก จุลินทรีย์ทุกตัวก็ไม่ได้ตายพร้อมกัน แต่จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตจะค่อยๆ ลดลง ดังนั้นการฆ่าเชื้อ (disinfection) จึงมักจะเป็นขบวนการที่จุลินทรีย์ถูกฆ่าในระยะเวลาที่เหมาะสม ประชากรของจุลินทรีย์ประกอบด้วยเซลล์ที่มีความต้านทานต่างๆ กัน เซลล์ส่วนใหญ่จะมีความต้านทานปานกลาง ส่วนน้อยจะมีความต้านทานสูงและความต้านทานต่ำ เมื่อได้รับสารเคมี

เซลล์ส่วนใหญ่จะตายก่อน แล้วพวกที่มีความต้านทานสูงจึงค่อยๆ ตาย เซลล์ที่มีอายุน้อยและกำลังเจริญเติบโตจะมีความไวต่อสารเคมีมาก ส่วนเซลล์ที่เจริญเต็มที่ หรืออยู่ในระยะพักตัวจะทนทานต่อสารเคมี

3. แรงตึงผิว เป็นสิ่งสำคัญในการฆ่าเชื้อ สารที่ลดแรงตึงผิว (surfactant) จะมีหน้าที่สองอย่าง คือ การเกาะคู่อุณหภูมิและการทำให้คุณสมบัติในด้านการเปียกน้ำและการกระจายของสารฆ่าเชื้อดีขึ้น หน้าที่ทั้งสองอย่างนี้จะส่งผลให้สารฆ่าเชื้อรวมตัวอยู่ที่ผิวเซลล์ จึงฆ่าเซลล์เร็วขึ้น

4. ความเข้มข้นและปริมาณที่ใช้ของสารฆ่าเชื้อ มีอิทธิพลต่ออัตราการตายของจุลินทรีย์ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิด และสถานะที่สารฆ่าเชื่อนั้นถูกใช้ และการใช้สารฆ่าเชื้อปริมาณมาก จะมีประสิทธิภาพฆ่าเชื้อได้ดีกว่าการใช้ในปริมาณที่น้อย แม้ว่าจะมีความเข้มข้นเท่ากัน เนื่องจากสารฆ่าเชื้อปริมาณมากจะถูกทำลายฤทธิ์โดยสารต่างๆ น้อยกว่า

5. พีเอช มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อหลายชนิด ความเข้มข้นของ H^+ จะมีอิทธิพลต่อการทำงานของสารเคมี โดยจะมีผลต่อทั้งจุลินทรีย์ และสารฆ่าเชื้อเอง ถ้าจุลินทรีย์อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 8.0 จุลินทรีย์จะมีประจุลบ หากเพิ่มพีเอชขึ้นประจุก็จะเพิ่มขึ้นและอาจจะทำให้ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อที่ผิวของจุลินทรีย์เปลี่ยนไปด้วย นอกจากนี้พีเอชยังเป็นตัวกำหนดอัตราการแตกตัวของสารฆ่าเชื้อ โดยทั่วไปสารฆ่าเชื้อที่อยู่ในรูปไม่แตกตัวจะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในเซลล์ได้ดีกว่าโมเลกุลที่แตกตัว

6. อุณหภูมิ จะเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของการใช้สารฆ่าเชื้อในการควบคุมจุลินทรีย์ เนื่องจากการตายของจุลินทรีย์เป็นกระบวนการทางเคมีอย่างหนึ่ง และอัตราของปฏิกิริยาเคมีจะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ ดังนั้นการควบคุมจุลินทรีย์จึงเกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงได้รวดเร็วกว่าที่อุณหภูมิต่ำ

7. การเข้าสัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งการออกฤทธิ์ของสารฆ่าเชื้อต้องอาศัยการที่สารจะสัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์ และเชื้อเหล่านี้ดูดน้ำยาเข้าไป ดังนั้นจึงต้องไม่มีสิ่งกีดกั้นการเข้าสัมผัสระหว่างน้ำยาฆ่าเชื้อกับเชื้อจุลินทรีย์

8. การเสื่อมสภาพของสารฆ่าเชื้อบางชนิด จะเกิดขึ้นหลังจากการเตรียมทิ้งไว้หลายวัน ซึ่งจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารฆ่าเชื้อและอุณหภูมิ

9. การคื้อยของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดจะเกิดขึ้นง่าย เมื่อเวลาผ่านไปจะต้องใช้ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อสูงมากขึ้น จึงจะสามารถหยุดยั้งการเจริญของเชื้อได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกและจำแนกชนิดของเชื้อราในระดับจีสที่เจริญบนเบื้อนบนยางพาราแผ่น
2. เพื่อคัดเลือกสารเคมีที่ใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่น
3. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่แยกได้

ขอบเขตการวิจัย

แยกเชื้อราและศึกษาถึงชนิดของเชื้อราที่เจริญบนยางพาราแผ่นในเขตพื้นที่ภาคใต้ ศึกษาสารเคมีที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่น และคัดเลือกสารเคมีที่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา ตลอดจนทดสอบประสิทธิภาพของสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ทราบชนิดของเชื้อราที่เจริญบนเบื้อนบนยางพาราแผ่น
2. ทราบชนิดของสารเคมีที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่แยกได้
3. ทราบประสิทธิภาพของสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. จุลินทรีย์

เชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่น

2. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (ภาคผนวก ก)

2.1 Potato dextrose agar (PDA)

2.2 Malt extract agar (MEA) (HIMEDIA)

2.3 Czapek agar (CZ) (HIMEDIA)

2.4 RPMI 1640 (GIPCO™)

3. วัสดุดิบ

3.1 ยางพาราแผ่นจากชาวบ้านในจังหวัดต่างๆในภาคใต้

3.2 ยางพาราแผ่นจากสหกรณ์พิจิตร อำเภอนาหม่อม จังหวัดสงขลา

4. สารเคมี

4.1 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ข)

4.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก ข)

4.3 สารเคมีสำหรับการทดสอบการยับยั้งเชื้อราเบื้องต้น

- กรดอะซิติก (acetic acid) (LAB-SCAN)
- แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต (ammonium bicarbonate) (UNILAB)
- แคลเซียมโพรพิโอเนต (calcium propionate) (Fluka)
- แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (calcium hydroxide) (UNIVAR)
- โพแทสเซียมซอร์เบต (potassium sorbate) (Fluka)
- โพแทสเซียมเบนโซเอต (potassium benzoate) (Fluka)
- โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) (UNIVAR)
- โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (sodium metabisulphite) (UNIVAR)
- โซเดียมไนเตรท (sodium nitrate) (UNIVAR)
- น้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่

- น้ำส้มควันไม้จากไม้ยูคาลิปตัส
 - น้ำส้มควันไม้จากไม้กระถิน
 - *p*-Nitrophenol (UNIVAR)
 - Amphotericin-B (Bristol-Myers Squibb)
 - Streptomycin (Fluka)
 - Ampicillin (Fluka)
- 4.4 สารเคมีสำหรับการเตรียมความชื้นสัมพัทธ์ (ภาคผนวก ค)
- Ammonium sulfate (LAB-SCAN)
 - Barium chloride (UNIVAR)
 - Cupric chloride (UNIVAR)
 - Sodium bromide (UNILAB)

อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS-320
2. ตู้อบ (hot air oven) ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MOV 212
3. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น W350
4. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Orion รุ่น 420A
5. เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ A&D รุ่น HF-1200
6. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP2105
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ยี่ห้อ Techical Cooperation รุ่น U-2000
8. เครื่องหมุนเหวี่ยง ยี่ห้อ Eppendorf ชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น centrifuge 5415 R
9. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) ยี่ห้อ Hotpack รุ่น 527044
10. เครื่องวัดความเร็วลม Thermo-Anemometer ยี่ห้อ Digicon รุ่น DA-40
11. เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์ (Hygrometer) ยี่ห้อ Testo รุ่น 608-H1
12. เครื่องเขย่าหลอดทดลอง (Vortex mixer) ยี่ห้อ LAB-Line รุ่น 1297
13. กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Olympus รุ่น CX31
14. กล้องสเตอริโอ ยี่ห้อ Olympus รุ่น SZ40

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างยางพาราแผ่นที่อยู่ในช่วงตากระหว่างรอบ และมีเชื้อราเจริญบนแผ่นยางจำนวน 13 แห่ง จากจังหวัดต่างๆทางฝั่งทะเลตะวันออกและฝั่งทะเลตะวันตกของภาคใต้ โดยเก็บตัวอย่างยางพาราแผ่นใส่ในถุงพลาสติก นำกลับมายังห้องปฏิบัติการเพื่อทำการแยกและจำแนกชนิดของเชื้อรา (ตามข้อ 4 และ 5) ในระหว่างการเก็บตัวอย่างทำการตรวจวัดสถานะแวดล้อมบริเวณห้องตากหรือรอบยางพาราแผ่นดังนี้

- 1) ความชื้นสัมพัทธ์ โดยใช้เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์
- 2) อุณหภูมิ โดยใช้เครื่องวัดอุณหภูมิ
- 3) ความเร็วลม โดยใช้เครื่องวัดความเร็วลม

2. การวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่พบในบรรยากาศขณะตากหรือรอบ

นำจานอาหารวุ้น PDA ไปเปิดไว้ในบริเวณที่ทำการตากหรือรอบแผ่นยางเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมายังห้องปฏิบัติการเพื่อบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน แล้วทำการแยกและจำแนกชนิดของเชื้อราตามข้อ 4 และ 5

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของยางพาราแผ่น

นำตัวอย่างยางพาราแผ่นกลับมาห้องปฏิบัติการเพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีดังนี้

- 1) การวิเคราะห์ความชื้น (ภาคผนวก ข) โดยการอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (AOAC, 1990)
- 2) การหาปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก ข) โดยวิธี Lowry method ดัดแปลงจาก ASTM D5712 นำตัวอย่างชิ้นยางชั่งน้ำหนัก 2-3 กรัม หั่นให้เป็นชิ้นเล็ก แล้วเติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร อุ่นพลาสติกในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยเขย่าทุก 30 นาที ครั้งละ 1 นาที แยกส่วนใสโดยการปั่นเหวี่ยงแล้วนำไปหาโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)
- 3) การหาปริมาณน้ำตาล (ภาคผนวก ข) นำส่วนใสจากข้อ 2 ที่ได้ มาทำการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Nelson-Somogyi method (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) และทำการหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol-sulfuric (Dobois *et al.*, 1956)

4) การวัดค่าพีเอช (pH)

ใช้กระดาษวัดพีเอชจุ่มน้ำกลั่นและนำมาแตะกับแผ่นยาง สังเกตการเปลี่ยนสีของกระดาษและนำมาเทียบสีที่ค่าพีเอชต่างๆ

4. การแยกเชื้อราจากตัวอย่างยางพาราแผ่น

นำตัวอย่างยางพาราแผ่นที่เก็บได้มาแยกเชื้อราโดยดัดแปลงจากการแยกตัวอย่างเชื้อราจากดิน ตัดชิ้นส่วนยางพาราแผ่นบริเวณที่มีราเจริญปนเปื้อน ด้วยใบมีดที่จุ่ม 95% แอลกอฮอล์ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ชั่งชิ้นยางพาราแผ่นปริมาณ 10 กรัม ตัดให้ชิ้นตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กขนาด 3x5 มิลลิเมตร ใส่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิตร จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำสารแขวนลอยของสปอร์ของเชื้อรามาทำการเจือจางให้อยู่ในช่วง 10^2 ถึง 10^6 ปีเปิดสารแขวนลอยที่ความเจือจางต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารวุ้น PDA ที่ผสมยาปฏิชีวนะ streptomycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และ ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และทำการกระจายเชื้อโดยวิธี spread plate บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน นับจำนวนโคโลนีเชื้อราในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี hyphal tip isolation โดยใช้เข็มเย็บที่ลนไฟฆ่าเชื้อ ตัดชิ้นวุ้นบริเวณที่มีปลายเส้นใยของเชื้อรา (hyphal tip) ประมาณ 1 มิลลิเมตร นำไปวางไว้บนอาหารวุ้น PDA จานใหม่ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน ทำซ้ำจนได้เชื้อราบริสุทธิ์ จากนั้นเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

5. การจำแนกชนิดของเชื้อรา

5.1 การจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา นำเชื้อราที่แยกได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของโคโลนี (macroscopic morphology) โดยสังเกตลักษณะของโคโลนี สี ขอบ ขนาดของโคโลนี เมื่อเจริญอยู่บนจานอาหาร PDA MEA และ CZ และศึกษาลักษณะทางจุลสัณฐาน (microscopic morphology) ศึกษาในระดับที่มองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ประกอบด้วยการมีหรือไม่มีผนังกั้นของเส้นใย การมีหรือไม่มีการสร้างสปอร์ และการมีสีหรือไม่มีสีของเส้นใย ตามหลักการของ Samson และคณะ (2004)

5.2 การจำแนกโดยวิธีทางชีวโมเลกุล สำหรับเชื้อราที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา จะจำแนกโดยวิธีทางชีวโมเลกุล โดยส่งตัวอย่างตรวจหาลำดับเบส ณ หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

6. การศึกษาผลของสารยับยั้งเชื้อรา

ใช้เชื้อราที่แยกจากยางพาราแผ่นจำนวน 27 ไอโซเลต ที่มีความแตกต่างกันและพบมากกว่า 1 แห่ง มาศึกษาต่อโดย

6.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านราเบื้องต้น

ทำการทดสอบผลของสารยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี hyphal extension-inhibition assay (Huynh *et al.*, 1996) โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อราบนจานอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 20 มิลลิเมตร เจาะรูในจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร และห่างจากขอบโคโลนีรา 5 มิลลิเมตร (Huang *et al.*, 2000) โดยหดยีสานยับยั้งเชื้อราที่นำมาทดสอบ ได้แก่ กรดอะซิติก แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต แคลเซียมโทรฟิโอะเนต แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมซอร์เบต โพแทสเซียมเบนโซเอต โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ โซเดียมไนเตรด โซเดียมอะซิเตต น้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ น้ำส้มควันไม้จากไม้ยูคาลิปตัส และน้ำส้มควันไม้จากไม้กระถิน โดยใช้ที่ระดับความเข้มข้น 1%, 5% และ 10% (w/v) หรือ (v/v) สำหรับน้ำส้มควันไม้ ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10%, 30% และ 100% (v/v) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ชุควบคุม ทดสอบโดยใช้น้ำกลั่นมาเชื้อ ซึ่งเป็นตัวทำลายที่ใช้ละลายสารยับยั้งเชื้อรา นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน สังเกตผลทุกวันถ้ามีรอยเว้าของโคโลนีรา แสดงว่าสารนั้นสามารถยับยั้งเชื้อราได้บันทึกผลโดยให้ระดับคะแนนดังนี้

คะแนน +++ คือ รัศมีความกว้างของการยับยั้งเป็นรอยเว้าวงใสในช่วงมากกว่า 5 มิลลิเมตร

คะแนน ++ คือ รัศมีความกว้างของการยับยั้งเป็นรอยเว้าวงใส ในช่วง 4-5 มิลลิเมตร

คะแนน + คือ ความกว้างของการยับยั้งเป็นรอยเว้าวงใส ในช่วง 1-3.5 มิลลิเมตร

คะแนน - คือ ไม่พบรอยเว้าจากการยับยั้ง

6.2 การทดสอบหา minimal inhibitory concentration (MIC)

นำสารยับยั้งเชื้อราที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ในระดับของวงใสที่กว้างที่สุด และสามารถยับยั้งเชื้อราได้หลายชนิดจากวิธี hyphal extension-inhibition assay ดังการทดลองเบื้องต้น มาทดสอบหาค่า MIC โดยดัดแปลงวิธี broth dilution จาก CLSI (CLSI/NCCLS, 2002) โดยทำการทดลองครั้งนี้ เพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารร่วน PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เก็บเชื้อราโดยการทำ spore suspension ในน้ำเกลือ 0.85% ผสมกับ 0.01% tween 80 ประมาณ 3 มิลลิตร ใช้กลาส-ปิดบอลขนาด 0.3 เซนติเมตร เขย่าคนผสมเพื่อให้สปอร์กระจาย เก็บตัวอย่างด้วย pasture pipette tip โดยคุณเฉพาะส่วนบนและนำไปปั่นด้วย vortex mixer ประมาณ 15 วินาที ตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วย heamacytometer เตรียมสปอร์ของเชื้อราตัวอย่างเริ่มต้นให้อยู่ในช่วง 1×10^4 ถึง 5×10^4

spores/ml (Espinel-InGroff *et al.*, 1996; Serrano *et al.*, 2002) นำสารยับยั้งมาเจือจางโดยวิธี two-fold dilution 10 ระดับความเข้มข้น โดยการเตรียมสารความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการทดสอบ ด้วยอาหารเหลว RPMI 1640 ใน multiwell microdilution plates (96 U-shaped wells) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสปอร์ของเชื้อรา 100 ไมโครมิลลิตร โดยมีชุดควบคุมดังนี้

- negative control เติมสปอร์เชื้อราแต่ไม่เติมสารยับยั้งเชื้อราในอาหาร
- positive control เติมแอมโฟเทริซินบี (amphotericin B) และสปอร์เชื้อรา
- medium control อาหารเพียงอย่างเดียว

ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และใช้สารพาราไนโตรฟินอล (*p*-nitrophenol) เป็นสารเปรียบเทียบ (เดิมเคยมีการแนะนำให้เกษตรกรมีการใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่น) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ตรวจค่า MIC ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลค่า MIC โดยสังเกตการเจริญของเชื้อรารายใต้กล้องสเตอริโอ ให้ผลเป็นคะแนนดังนี้

คะแนน - หลุมที่ไม่มีการเจริญ

คะแนน + หลุมที่มีการเจริญของเชื้อรา

การอ่านผลค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของแต่ละสารยับยั้งที่ให้ผลเป็น -

6.3 การทดสอบค่า minimal fungicidal concentration (MFC)

ตรวจหาค่า MFC ที่เวลาสุดท้ายที่ 72 ชั่วโมง โดยดูดสารละลายในหลุมที่มีค่า MIC ต่ำที่สุดและหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อทุกหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารวุ้น PDA ทำการกระจายเชื้อโดยวิธีการ spread plate บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน และสังเกตการเจริญของเชื้อรา การอ่านผลค่า MFC คือค่าความเข้มข้นของสารยับยั้งต่ำที่สุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อรา

7. การศึกษาการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่น

เลือกเชื้อราที่พบได้บ่อยและมีความคงทนต่อสารยับยั้งเชื้อรามาทดสอบ จำนวน 3 เชื้อ เพื่อทำการศึกษาการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่นดังนี้

- การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่น (อุณหภูมิ 25, 37, 45 และ 65 องศาเซลเซียส ที่ความชื้นสัมพัทธ์บรรยากาศ)
- การศึกษาผลของความชื้นสัมพัทธ์ต่อการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่น (ความชื้นสัมพัทธ์ 57%, 67%, 80% และ 90% ที่อุณหภูมิห้อง)
- การศึกษาผลของอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ต่อการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่น (อุณหภูมิ 25, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 57%, 67%, 80% และ 90%)

โดยตัดยางพาราแผ่นให้มีขนาด 5x5 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่น/ 1 ถ้วย ฆ่าเชื้อที่ผิวหน้าของยางพาราแผ่นโดยการใช้แสง UV เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา 1×10^6 spores/ml ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บนยางพาราแผ่น แล้วนำไปบ่มไว้ที่สภาวะที่ต้องการศึกษาการเจริญของเชื้อราดังกล่าวข้างต้น สังเกตผลการเจริญของเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน

8. การประยุกต์ใช้สารเคมีในการป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่น

นำสารยับยั้งเชื้อราที่มีประสิทธิภาพที่สุดจากข้อ 6 จำนวน 3 ชนิด และใช้เชื้อราทดสอบจากข้อ 7 จำนวน 3 เชื้อ มาทดสอบในขั้นตอนต่อไปนี้

8.1 การศึกษาผลความเข้มข้นของสารยับยั้งต่อการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่น

นำยางพาราแผ่นดิบมาตัดให้มีขนาดประมาณ 5x5 เซนติเมตร โดยใช้ยางพาราแผ่นที่เพิ่งทำการรีดเป็นยางพาราแผ่นดิบใหม่ มาสัมผัสกับสารยับยั้งเชื้อราที่เลือกความเข้มข้นจากค่า MIC (จากการทดลองข้างต้นในข้อ 6) โดยการจุ่มกับสารยับยั้งเชื้อราความเข้มข้นเป็น 1, 2 และ 4 เท่าของค่า MIC ตากยางพาราแผ่นให้แห้งเป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นเพาะเชื้อราโดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 1×10^6 ถึง 5×10^6 spores/ml ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการหยดลงบนชิ้นยางพาราแผ่น และเก็บชิ้นยางพาราแผ่นไว้ในกล่องใส โดยเก็บไว้ที่ความชื้นสัมพัทธ์ที่เชื้อราสามารถเจริญได้ชัดเจนตามผลการทดลองข้อ 7 และที่ความชื้นสัมพัทธ์บรรยากาศ บ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน

8.2 การศึกษาการเติมสารยับยั้งในน้ำยางสด

ทำการเติมสารยับยั้งที่ความเข้มข้นจากการทดลองข้อ 8.1 โดยการผสมสารยับยั้งกับน้ำยางสดในขั้นตอนการตกตะกอนยาง (โดยทำยางพาราแผ่นตามวิธีเดียวกับชาวบ้านที่ผลิตยางพาราแผ่นจากตะกอนชาวบ้าน) การทำยางพาราแผ่นโดยการผสมน้ำยาง 4,280 มิลลิลิตร กับน้ำ 2,290

มิลลิลิตร ผสมน้ำผสมกรดฟอร์มิคที่มีปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity) เท่ากับ 5% ปริมาตร 88.4 มิลลิลิตร ปริมาตรทั้งหมดในตะกอนประมาณ 6,658.4 มิลลิลิตร เติมสารยับยั้งลงไปในตะกอนที่มีน้ำยางและคนผสมสารยับยั้งกับน้ำยางให้เข้ากัน รอให้น้ำยางพาราแผ่นจับตัวเป็นก้อน จากนั้นนำยางที่ตกตะกอนแล้วไปรีดให้เป็นแผ่น ตากให้แห้งเป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นทำการเพาะเชื้อราและสังเกตผลตามวิธีในข้อ 8.1

8.3 Natural infection

นำยางพาราแผ่นดิบที่เพิ่งรีดเป็นแผ่น มาตัดให้มีขนาดประมาณ 5x5 เซนติเมตร นำมาสัมผัสกับสารยับยั้งตามข้อ 8.1 แต่ไม่เพาะเชื้อราบนยางพาราแผ่น ปล่อยให้เชื้อราเจริญเอง จากนั้นทำการเพาะเชื้อราและสังเกตผลตามวิธีในข้อ 8.1 และสังเกตการเจริญต่อไปที่ 15 วัน และ 30 วัน เปรียบเทียบกับยางพาราแผ่นที่ไม่ได้สัมผัสสารยับยั้ง

จำนวนการศึกษาในส่วนการวิเคราะห์ตัวอย่าง

- โดยกำหนดให้จำนวนซ้ำ (replication) การศึกษาทุกขั้นตอนในแต่ละครั้งเท่ากับ 3 ซ้ำ
- ในการวิเคราะห์หาค่าองค์ประกอบทางเคมีบนยางพาราแผ่น วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ตามวิธีของ Duncan โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistic Package for the Social Science) Version 14.0

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการเก็บตัวอย่าง

การสุ่มเก็บตัวอย่างยางพาราแผ่นที่มีเชื้อราเจริญจากแหล่งผลิต โดยได้รับความเอื้อเฟื้อเพื่อวัตถุประสงค์จากเกษตรกรผู้ผลิตที่อาศัยอยู่ในจังหวัดต่างๆ สำหรับในภาคใต้ทางฝั่งทะเลตะวันออก ได้แก่ จังหวัดพัทลุง 4 แห่ง จังหวัดสงขลา 1 แห่ง และจังหวัดสุราษฎร์ธานี 1 แห่ง ทางภาคใต้ฝั่งทะเลตะวันตก ได้แก่ จังหวัดพังงา 4 แห่ง จังหวัดตรัง 2 แห่ง จังหวัดภูเก็ต 1 แห่ง รวม 13 แห่ง โดยส่วนใหญ่เป็นการเก็บตัวอย่างจากบ้านเกษตรกร ยกเว้น 2 แห่ง คือ จังหวัดพัทลุง (TC) และ จังหวัดสุราษฎร์ธานี (ST) เป็นการเก็บตัวอย่างจากโรงงานแปรรูปยางพาราแผ่นที่รับซื้อยางมาจากเกษตรกร ขนาดของตัวอย่างยางพาราแผ่นที่เก็บมีขนาดประมาณ 5x20 เซนติเมตร ตัวอย่างยางพาราแผ่นที่เก็บได้มีอายุและลักษณะแตกต่างกัน เนื่องจากเกษตรกรมีการผลิตและการเก็บที่แตกต่างกัน โดยลักษณะการเก็บยางพาราแผ่นของเกษตรกรสามารถแบ่งออกเป็นสองแบบคือ เก็บในที่มืดชื้นและเก็บในที่มืดมโกรก (ภาพที่ 6) และการเก็บยางพาราแผ่นก่อนจำหน่ายขึ้นอยู่กับราคาในตลาดยาง ถ้าหากมีราคาสูงเกษตรกรจะขายอย่างรวดเร็วและจะเก็บยางไว้ในบ้านไม่นานแต่ถ้าหากราคาไม่สูงมากนักก็มักจะเก็บยางพาราแผ่นไว้เพื่อรอให้มีราคาสูงจึงจะจำหน่ายยางที่ผลิตได้

จากการตรวจวัดสภาวะแวดล้อม คือ ความชื้น ความเร็วลม และปริมาณจุลินทรีย์ในอากาศ บริเวณที่ทำการตากยางหรือที่เก็บยางพาราแผ่นของสถานที่เก็บตัวอย่าง แสดงผลดังตารางที่ 3 พบว่าความชื้นสัมพัทธ์มีค่าตั้งแต่ 52.1% ถึง 83.2% ซึ่งโดยส่วนใหญ่ความชื้นสัมพัทธ์ที่ตรวจวัดได้ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากช่วงระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างเป็นช่วงปลายฤดูฝน ช่วงของความชื้นสัมพัทธ์ที่วัดได้นี้มีค่าต่ำกว่าความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยตลอดปีของภาคใต้คือ 79-80% และในฤดูฝนทางภาคใต้ฝั่งตะวันออก และภาคใต้ฝั่งตะวันตกมีความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยที่ 79% และ 84% ตามลำดับ (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2551ก) ในขณะที่ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยในเดือนที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างของจังหวัดพัทลุง จังหวัดสงขลา จังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัดภูเก็ต และจังหวัดตรัง มีค่าเท่ากับ 77.8, 88.7, 85.9, 77.3 และ 77.8% ตามลำดับ (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2551ข) เป็นค่าความชื้นสัมพัทธ์ที่สูงกว่าค่าที่ได้ตรวจวัดในวันที่ทำการเก็บตัวอย่างยางพาราแผ่น ซึ่งจัดว่าเป็นค่าความชื้นสัมพัทธ์ที่สูงเหมาะแก่การเจริญของเชื้อรา ดังจะสังเกตเห็นว่ามีเชื้อราที่เจริญอยู่บนตัวอย่างยางพาราแผ่นที่ได้เก็บมาอย่างชัดเจน (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 6 ลักษณะการเก็บยางพาราแผ่นของเกษตรกร

A = ยางพาราแผ่นที่เก็บในที่มิดชิด B = ยางพาราแผ่นที่เก็บในที่มลมโกรก

Figure 6. Storage of para rubber sheets by farmers.

A = Indoor para rubber sheets B = Wind chill para rubber sheets



ภาพที่ 7 ลักษณะการเจริญของเชื้อราบนตัวอย่างยางพาราแผ่นที่ใช้ในการทดลอง

Figure 7. Growth of fungi on collected para rubber sheets in this experiment.

นอกจากนี้ยังพบว่ามีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 28-31°C (ตารางที่ 3) และอุณหภูมิเฉลี่ยของเดือนที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างของจังหวัดพัทลุง จังหวัดสงขลา จังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัดภูเก็ต และจังหวัดตรัง คือ 27.7, 26.0, 26.4, 27.0 และ 26.7°C (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2551ข) เป็นสภาพบรรยากาศที่ค่อนข้างแห้ง และสถานที่ทำการเก็บตัวอย่างมีความเร็วลมไม่มาก ไม่มีกระแสลมอย่างต่อเนื่อง ลมพัดเป็นช่วงเท่านั้น ซึ่งลักษณะการเก็บยางพาราแผ่นของชาวบ้าน ที่เก็บไว้ในที่ค่อนข้างมิดชิด จึงทำให้กระแสลมค่อนข้างอ่อน และบางส่วนก็จัดเก็บยางใน โรงเก็บยางเป็นสัดส่วนแยกจากตัวบ้านของเกษตรกร ซึ่งทำให้มีโอกาสสัมผัสกับลมได้มากกว่ายางที่เก็บในที่มิดชิด (ภาพที่ 7) ซึ่งจะทำให้การมีโอกาสสัมผัสสปอร์ของเชื้อรามีเพิ่มมากขึ้น แต่ในที่มิดชิดเองนั้นหากบริเวณที่เก็บยางมีความชื้นสูงก็จะทำให้การเจริญของเชื้อรามากเช่นกัน ทั้งนี้การเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่นมีปัจจัยหลายอย่างที่จัดการควบคุมได้ยาก อาทิ โรงเก็บยางพาราแผ่นมีการเลี้ยงสัตว์ควบคู่ไปด้วย หรือการเก็บภายในบ้านที่มีบ่อน้ำอยู่ภายในห้องเก็บยาง ซึ่งบริเวณนั้นก็มีการใช้น้ำและทำให้พื้นเปียก ซึ่งลักษณะสภาพแวดล้อมแบบนี้จะทำให้มีการเจริญของเชื้อรามากด้วย

ตารางที่ 3 ค่าความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วลม และอุณหภูมิของสถานที่เก็บตัวอย่างยางพาราแผ่น

Table 3. Humidity, wind velocity and temperature from locations of para rubber sheets sampling.

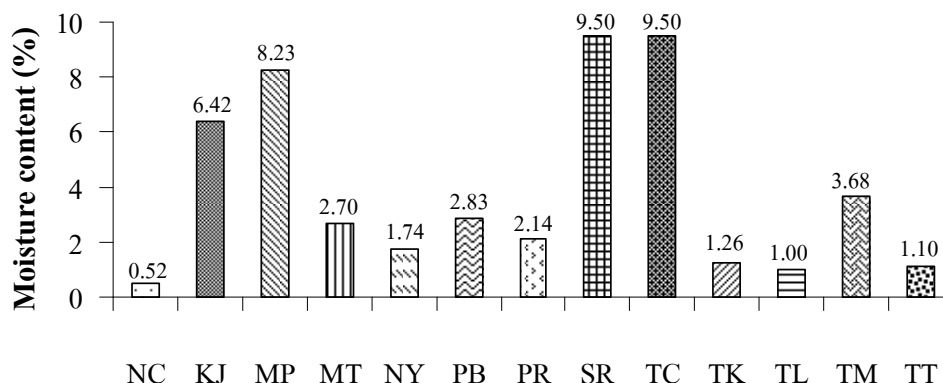
Source	Code	Point of locations	Relative humidity (%RH)	Wind velocity (Km/h)	Temp. (°C)	Date, Time
1. Khok Changai, Mueang, Phatthalung	KJ	East	77.0	0.3-5.0	28.2	9/1/49, 5.40 pm.
2. Mueang, Phang Nga	MP	West	53.9	0.0-5.0	31.6	27/1/49, 1.00 pm.
3. Mueang, Trang	MT	West	72.3	0.0-2.8	28.2	14/1/49, 10.30 am.
4. Nayong, Trang	NY	West	62.8	0.0-2.1	32.4	14/1/49, 2.00 pm.
5. Pha Bon, Phatthalung	PB	East	63.4	0.0	31.2	14/12/48, 3.00 pm.
6. Phraek Ha, Khuan Khanun, Phatthalung	PR	East	73.8	0.7-2.5	28.5	9/1/49, 5.00 pm.
7. Songkla Rubber Research Center, Hat Yai, Songkhla	SR	East	83.2	0.0-1.2	26.9	18/11/48, 4.00 pm.
8. Mueang, Surat Thani	ST	East	65.6	0.0-0.3	28.5	15/11/48, 4.00 pm.
9. Thai-Indo Rubber Co., Phabon, Phatthalung	TC	East	73.0	0.0-3.9	28.9	29/12/48, 11.20 am.
10. Takua Pa, Phang Nga	TK	West	73.1	0.0-2.1	29.1	26/1/49, 6.15 pm.
11. Thalang, Phuket	TL	West	52.1	0.0-1.4	32.7	27/1/49, 4.00 pm.
12. Thai Muang, Phang Nga	TM	West	68.3	0.3-1.4	27.5	27/1/49, 11.00 am.
13. Takua Thung, Phang Nga	TT	West	60.2	0.0-1.4	30.6	27/1/49, 12.50 am.

2. ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของยางพาราแผ่น

2.1 ความชื้น

จากตัวอย่างยางพาราแผ่นที่นำมาวิเคราะห์หาความชื้น พบว่ายางพาราแผ่นที่มีการเจริญของเชื้อราจากแหล่งต่างๆ มีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงตั้งแต่ 1.0% ถึง 9.5% (ดังภาพที่ 8) ซึ่งมีค่าสูงกว่ายางพาราแผ่นที่ไม่มีราเจริญที่เป็นยางพาราแผ่นแห้งที่มีความชื้นเพียง 0.52% ส่วนยางพาราแผ่นดิบที่ยังไม่แห้งสนิท (ตากไม่ถึง 1 วัน) มีความชื้นอยู่ที่ 18.52% จากค่าความชื้นที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างยางพาราแผ่น จะเห็นได้ว่าเชื้อราสามารถเจริญได้บนยางพาราแผ่นที่มีความชื้นอยู่ในช่วงกว้าง

โดยทั่วไปเชื้อราสามารถเจริญบนเมล็ดพืชที่เก็บไว้และมีความชื้นประมาณ 13.5% (Fronzolin *et al.*, 1999) โดยที่ Abdullah และคณะ (2000) รายงานถึงความชื้นของธัญพืชที่เชื้อราเจริญได้พบที่ค่า a_w 0.65 ไม่พบการเจริญของเชื้อราในเวลา 2 เดือน โดยเก็บไว้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65-98% โดยที่ความชื้นเริ่มต้นของข้าวคือ 9.3% ส่วนแป้งข้าวเหนียว (glutinous rice flour) มีค่าความชื้นต่ำสุดที่ 5.8% ในส่วนของงานวิจัยของ Wicklow และคณะ (1998) ได้ศึกษาการเจริญของเชื้อราบนเมล็ดข้าวโพดภายใต้อุณหภูมิและความชื้นต่างๆ ก็พบว่าเมล็ดข้าวโพดมีความชื้นหลากหลายและมีค่าอยู่ระหว่าง 9.4 - 17.5% เก็บไว้เป็นเวลา 348-751 วัน พบว่ามีการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus*, *Fusarium* และ *Penicillium* โดยที่ Block (1953) อ้างโดย Chang *et al.*, 1995) รายงานว่าความชื้น 10% เป็นความชื้นต่ำสุดที่เชื้อราเจริญบนวัสดุพวกไม้ สาลี และเนยแข็ง แต่ยางพาราแผ่นมีความชื้นเพียง 1.0 - 9.5% เท่านั้นเชื้อราก็ยังสามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Chang และคณะ (1995) ที่ได้ศึกษาถึงความชื้นของฝ้ายดีเพดาน พบว่ามีความชื้น 2.2-5.8% ซึ่งมีความชื้นต่ำกว่า 10% ก็สามารถพบการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* และ *Penicillium* บนฝ้ายดีเพดานได้ ดังนั้นวัสดุที่แม้จะมีความชื้นต่ำ เชื้อราก็ยังสามารถเจริญบนวัตถุนั้นและนำมาเป็นสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตต่อไปได้ แต่ถ้าหากยางพาราแผ่นแห้งและมีความชื้นต่ำถึง 0.52% จะไม่พบการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่น ซึ่งงานวิจัยของ Pasanen และคณะ (2000) ได้รายงานว่าความชื้น 0.6% เป็นความชื้นที่ปลอดภัยจากความเสียหายที่จะมีการเจริญของเชื้อราบนวัสดุก่อสร้างประเภทยิบซั่ม (gypsum) อย่างไรก็ตาม ปัจจัยแวดล้อมภายนอกอื่นๆ ก็มีผลต่อการเจริญของเชื้อราด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศ ซึ่งพื้นที่ในภาคใต้จะมีความชื้นสัมพัทธ์สูงเกือบตลอดปี



Para rubber sheets samples

ภาพที่ 8 ปริมาณความชื้นของตัวอย่างยางพาราแผ่นจากแหล่งต่างๆ

- | | |
|-------------------------------------|---------------------------|
| (NC) ยางพาราแผ่นที่ไม่มีการปนเปื้อน | (KJ) ต.โคกชะงาย จ.พัทลุง |
| (MP) อ.เมืองพังงา จ.พังงา | (MT) อ.เมืองตรัง จ.ตรัง |
| (NY) อ.นาโยง จ.ตรัง | (PB) อ.ป่าบอน จ.พัทลุง |
| (PR) ต.แพรกหา จ.พัทลุง | (SR) อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา |
| (TC) บ.สยามอินโด จำกัด จ.พัทลุง | (TK) อ.ตะกั่วป่า จ.พังงา |
| (TL) อ.ถลาง จ.ภูเก็ต | (TM) อ.ท้ายเหมือง จ.พังงา |
| (TT) อ.ตะกั่วทุ่ง จ.พังงา | |

Figure 8. Moisture content of fungal contaminated para rubber sheets from different sources.

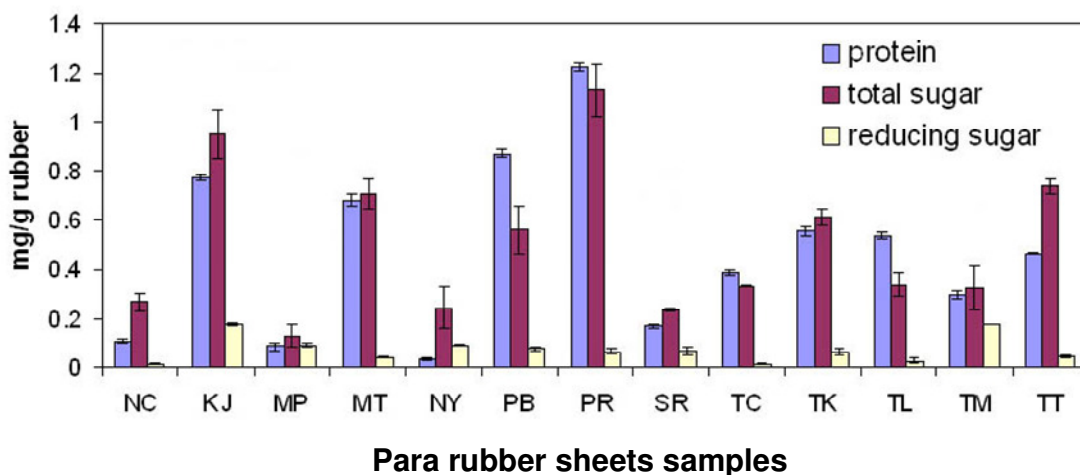
- | | |
|--|--------------------------------|
| (NC) None fungal contaminated para rubber sheets | (KJ) Khok Changai, Phatthalung |
| (MP) Mueang Phang Nga, Phang Nga | (MT) Mueang, Trang |
| (NY) Nayong, Trang | (PB) Pha Bon, Phatthalung |
| (PR) Phraek Ha, Phatthalung | (SR) Hat Yai, Songkhla |
| (TC) Thai-Indo rubber Co., Phatthalung | (TK) Takou Pa, Phang Nga |
| (TL) Thalang, Phuket | (TM) Thai Muang, Phang Nga |
| (TT) Takua Thung, Phang Nga | |

2.2 องค์ประกอบทางเคมี

ยางพาราแผ่นที่มีการปนเปื้อนของเชื้อราเมื่อนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีได้แก่ ปริมาณ โปรตีน น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงผลดังภาพที่ 9 พบว่ายางพาราแผ่นมีปริมาณ โปรตีนอยู่ในช่วง 0.032-1.225 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำตาลทั้งหมด 0.127-1.130 มิลลิกรัมต่อกรัม และ น้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วง 0.015-0.175 มิลลิกรัมต่อกรัม ยางพาราแผ่นที่มีปริมาณ โปรตีนและน้ำตาล ทั้งหมดที่มีค่าสูงที่สุดคือตัวอย่างที่เก็บจากตำบลแพรกหา จังหวัดพัทลุง (PR) โดยพบโปรตีนและ น้ำตาลในปริมาณ 1.225 ± 0.018 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 1.130 ± 0.109 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ยางพาราแผ่นที่โปรตีนต่ำสุดมีปริมาณ 0.032 ± 0.006 มิลลิกรัมต่อกรัม มาจากอำเภอไทรโย่งจังหวัดตรัง (NY) ยางพาราแผ่นจากอำเภอเมืองพังงา จังหวัดพังงา (MP) พบปริมาณน้ำตาลทั้งหมดต่ำสุดคือ 0.127 ± 0.046 มิลลิกรัมต่อกรัม และยางพาราแผ่นจากตำบลโคกชะงาย จังหวัดพัทลุง (KJ) พบน้ำตาล รีดิวซ์สูงสุดที่ 0.175 ± 0.008 มิลลิกรัมต่อกรัม

ดังนั้นจะเห็นว่าการวิเคราะห์โปรตีนที่พบในยางพาราแผ่นมีปริมาณอยู่ในช่วงเดียวกันกับการ ทดลองของ Yip และคณะ (1997 อ้างโดย ศรัญญา ตุกชูแสง (2548) ที่ได้วิเคราะห์โปรตีนในถุงมือยาง ซึ่งอยู่ในช่วง 0.02 - 1.290 มิลลิกรัมต่อกรัม และ นุชนาฏ ณ ระนอง (2541) พบปริมาณโปรตีนในถุงมือ ยางธรรมชาติตั้งแต่ 0.220-1.620 มิลลิกรัมต่อกรัม สำหรับในงานวิจัยของ ศรัญญา ตุกชูแสง (2548) ได้ ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในถุงมือยางโดยวิธี Modified Lowry Method พบโปรตีนมีปริมาณ ในช่วง 0.478 - 0.931 มิลลิกรัมต่อกรัม

การเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา พบว่าอัตราส่วนของ C:N มีความสำคัญมากกว่า ความเข้มข้นของคาร์บอน ซึ่ง *Paecilomyces liacinus* มีมวลชีวภาพในอาหารที่มี C:N ที่ 10:1-40:1 มากกว่า ที่ C:N 80:1 และ 100:1 (Gao *et al.*, 2007) สำหรับการหาองค์ประกอบทางเคมีในการทดลองนี้ พบว่าได้ปริมาณโปรตีนที่ต่ำกว่าปริมาณน้ำตาล แต่ในบางตัวอย่างก็พบว่ามีปริมาณของโปรตีนสูงกว่า น้ำตาล อาจเป็นเพราะมีโปรตีนของเชื้อราที่เจริญอยู่บนยางพาราแผ่นปะปนอยู่ด้วย ซึ่งค่าองค์ประกอบ ทางเคมีทั้งสามที่วิเคราะห์ได้นี้ อาจไม่มีผลโดยตรงต่อปริมาณของเชื้อราที่แยกได้ (ซึ่งจะอภิปรายผลใน หัวข้อต่อไป) นอกจากนี้ปัจจัยที่น่าจะส่งผลต่อปริมาณของโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดคือองค์ประกอบ ของพันธุ์ยางที่ต่างกัน ทำให้องค์ประกอบทางชีวเคมีแตกต่างกันด้วย (นภาพรรณและคณะ, 2008) นอกจากนี้แหล่งที่ทำการปลูกต้นยางที่ต่างกัน การดูแลบำรุงต้นยางแต่ละแห่งอาจจะไม่เหมือนกัน จึงอาจมีผลทำให้โปรตีน น้ำตาลทั้งหมด มีความแปรผันไปด้วย



ภาพที่ 9 ปริมาณ โปรตีน น้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลรีดิวซ์ของยางพาราแผ่นจากแหล่งต่างๆ

- | | |
|-------------------------------------|---------------------------|
| (NC) ยางพาราแผ่นที่ไม่มีการปนเปื้อน | (KJ) ต.โคกชะงาย จ.พัทลุง |
| (MP) อ.เมืองพังงา จ.พังงา | (MT) อ.เมืองตรัง จ.ตรัง |
| (NY) อ.นาโยง จ.ตรัง | (PB) อ.ป่าบอน จ.พัทลุง |
| (PR) ต.แพรกหา จ.พัทลุง | (SR) อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา |
| (TC) บ.สยามอินโด จำกัด จ.พัทลุง | (TK) อ.ตะกั่วป่า จ.พังงา |
| (TL) อ.ถลาง จ.ภูเก็ต | (TM) อ.ท้ายเหมือง จ.พังงา |
| (TT) อ.ตะกั่วทุ่ง จ.พังงา | |

Figure 9. Protein, total sugar and reducing sugar contents of para rubber sheets from different sources.

- | | |
|--|--------------------------------|
| (NC) None fungal contaminated para rubber sheets | (KJ) Khok Changai, Phatthalung |
| (MP) Mueang Phang Nga, Phang Nga | (MT) Mueang, Trang |
| (NY) Nayong, Trang | (PB) Pha Bon, Phatthalung |
| (PR) Phraek Ha, Phatthalung | (SR) Hat Yai, Songkhla |
| (TC) Thai-Indo rubber Co., Phatthalung | (TK) Takou Pa, Phang Nga |
| (TL) Thalang, Phuket | (TM) Thai Muang, Phang Nga |
| (TT) Takua Thung, Phang Nga | |

2.3 ค่าพีเอช (pH)

สำหรับค่าพีเอชของตัวอย่างยางพาราแผ่นที่สุ่มเก็บมา พบว่ายางพาราแผ่นที่มีเชื้อราเจริญมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 6.0-8.0 แต่ยางพาราแผ่นโดยทั่วไป (มากกว่า 90% ของตัวอย่าง) ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 (ดังตารางที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบกับยางพาราแผ่นที่ไม่มีการเจริญของเชื้อรา (NC) ซึ่งมีค่าพีเอช 5.5 ในขณะที่ยางพาราแผ่นที่มีเชื้อราเจริญมากและมีสีน้ำตาลเข้มและยางเริ่มมีลักษณะเยิ้มมีค่าพีเอช 8.0 ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูง อาจเป็นเพราะยางพาราแผ่นมีอายุในการเก็บเป็นเวลานานที่อุณหภูมิห้องและมีสภาพที่ค่อนข้างอับชื้น ทำให้มีการเจริญของเชื้อราเป็นจำนวนมาก แต่โดยเฉลี่ยแล้วยางพาราแผ่นที่มีเชื้อราเจริญอยู่มากมีค่าพีเอช 6.5 ซึ่งค่าที่ได้เป็นค่าพีเอชที่สอดคล้องกันกับค่าพีเอช 6.5-6.8 ซึ่งเป็นช่วงการเจริญที่ดีที่สุดของเชื้อราในกลุ่ม xerophiles (Beuchat and Hocking, 1990 อ้างโดย Guynot *et al.*, 2002) นอกจากนี้ Lian และคณะ (2008) รายงานว่าช่วงของค่าพีเอชที่เชื้อราสามารถเจริญได้ดี โดยปกติอยู่ระหว่างพีเอช 5.0-6.0 และ *Aspergillus fumigatus* จะเจริญได้อย่างรวดเร็วในช่วงค่าพีเอช 6.0 ซึ่งพบว่าเชื้อราที่เจริญบนยางพาราแผ่นส่วนใหญ่เจริญบนยางพาราแผ่นที่มีค่าพีเอช 6.0 ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราได้ (Harold *et al.*, 1994)

ตารางที่ 4 ค่าพีเอชของตัวอย่างยางพาราแผ่นที่ปนเปื้อนเชื้อราจากแหล่งต่างๆ

Table 4. pH values of fungal contaminated para rubber sheets from different sources.

Source	Code	pH
1. Khok Changai, Mueang, Phatthalung	KJ	6.0±0.0
2. Mueang, Phang Nga	MP	8.0±0.0
3. Mueang, Trang	MT	6.0±0.0
4. Nayong, Trang	NY	6.0±0.0
5. Pha Bon, Phatthalung	PB	6.0±0.0
6. Phraek Ha, Khuan Khanun, Phatthalung	PR	6.0±0.0
7. Songkla Rubber Research Center, Hat Yai, Songkhla	SR	6.0±0.0
8. Mueang, Surat Thani	ST	6.0±0.0
9. Thai-Indo Rubber Co., Phabon, Phatthalung	TC	6.0±0.0
10. Takua Pa, Phang Nga	TK	6.0±0.0
11. Thalang, Phuket	TL	6.0±0.0
12. Thai Muang, Phang Nga	TM	6.5±0.7
13. Takua Thung, Phang Nga	TT	6.0±0.0
14. None fungal contaminated para rubber sheets	NC	5.5±0.7

3. ผลการวิเคราะห์ปริมาณและการจำแนกชนิดของเชื้อราจากตัวอย่างและบริเวณที่ตากหรือเก็บยางพาราแผ่น

การนับจำนวนเชื้อราจากตัวอย่างยางพาราแผ่นทั้ง 13 แห่งในภาคใต้ (พังงา 4 แห่ง พัทลุง 4 แห่ง ตรัง 2 แห่ง สงขลา 1 แห่ง สุราษฎร์ธานี 1 แห่ง และ ภูเก็ต 1 แห่ง) พบว่า ปริมาณของเชื้อราที่พบบนยางพาราแผ่นมีค่าอยู่ในช่วง 5×10^4 - 9.05×10^6 CFU/g โดยมีค่าเฉลี่ย 1.86×10^6 CFU/g (ภาพที่ 10) ซึ่งปริมาณเชื้อราที่พบมากที่สุดเป็นตัวอย่างยางพาราแผ่นจากอำเภอเมืองตรัง จังหวัดตรัง (MT) พบในปริมาณ 9.05×10^6 CFU/g รองลงมาได้แก่ ตัวอย่างยางพาราแผ่นจากอำเภอเมือง จังหวัดพังงา (MP) พบในปริมาณ 4.95×10^6 CFU/g ในขณะที่เดียวกันยางพาราแผ่นที่มีปริมาณเชื้อราที่พบน้อยที่สุดพบที่ อำเภอนาโยง (NY) ซึ่งอยู่ในจังหวัดตรังเช่นเดียวกัน พบในปริมาณ 5×10^4 CFU/g

ในขั้นตอนการแยกเชื้อรา สำหรับตัวอย่างเชื้อราที่แยกจากยางพาราแผ่นแหล่งเดียวกันที่มีลักษณะโคโลนีและมีสีเหมือนกันจะจัดเป็นเชื้อราชนิดเดียวกัน (ภาพที่ 11-12) พบว่ามีจำนวนของเชื้อราทั้งหมดที่แยกได้ 150 ไอโซเลต โดยพบว่ายางพาราแผ่นป็นเชื้อราจากบริษัทสยามอินโด จำกัด จังหวัดพัทลุง (TC) มีจำนวนไอโซเลตของเชื้อราที่แยกได้มากที่สุด 18.7% (ตารางที่ 5) แต่มีปริมาณของเชื้อที่ปนเปื้อนในตัวอย่างปานกลาง (1.51×10^6 CFU/g) ส่วนตัวอย่างยางพาราแผ่นจากอำเภอเมืองตรัง จังหวัดตรัง (MT) พบว่ามีปริมาณเชื้อรามากที่สุด (9.05×10^6 CFU/g) แต่มีจำนวนชนิดของเชื้อราที่แยกได้เพียง 9.3% ของเชื้อทั้งหมด

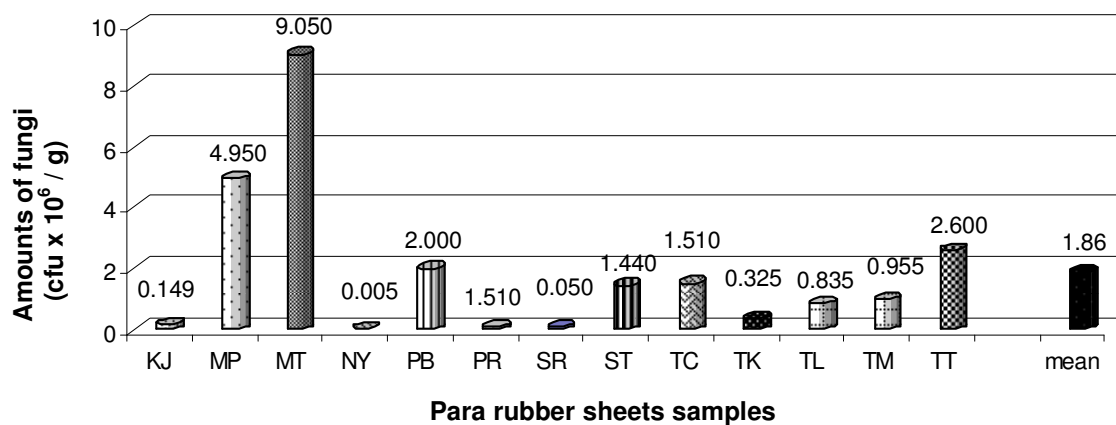
เมื่อพิจารณาถึงความหลากหลายของเชื้อ โดยการใช้นับจำนวน ไอโซเลตที่แยกได้เป็นตัวเปรียบเทียบ จะเห็นว่าตัวอย่างยางพาราแผ่นจากบริษัทสยามอินโด จำกัด จังหวัดพัทลุง (TC) มีความหลากหลายของเชื้อมากที่สุด อาจเป็นเพราะบริษัทซื้อยางพาราแผ่นจากร้านที่รับซื้อจากเกษตรกรผู้ผลิตยางพาราแผ่นจากหลายๆ ที่ และได้ความอนุเคราะห์จากบริษัทให้เก็บตัวอย่างยางพาราแผ่นได้ถึง 4 ชั้น ตัวอย่าง ซึ่งน่าจะทำให้มีความหลากหลายของเชื้อรามากกว่าการเก็บจากแหล่งอื่นที่ได้ตัวอย่างมาวิเคราะห์ โดยที่ตัวอย่างยางพาราแผ่นจากอำเภอเมืองตรัง จังหวัดตรัง (MT) ซึ่งมีปริมาณเชื้อรามากที่สุด น่าจะมีความหลากหลายของเชื้อรามากกว่า แต่กลับพบจำนวนไอโซเลตน้อยกว่าที่บริษัทสยามอินโด จำกัด จังหวัดพัทลุง (TC) ถึง 2 เท่า สำหรับตัวอย่างยางพาราแผ่นจากอำเภอเมือง จังหวัดพังงา (MP) และ ตำบลโคกชะงาย อำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง (KJ) พบชนิดของเชื้อราเพียง 4% ของเชื้อราทั้งหมด โดยตัวอย่างยางพาราแผ่นจากตำบลโคกชะงาย อำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง (KJ) นั้นมีความสอดคล้องกันระหว่างชนิดของเชื้อราที่แยกได้น้อย กับปริมาณของเชื้อราที่พบเพียง 0.149×10^6 CFU/g แต่สำหรับที่ อำเภอเมือง จังหวัดพังงา (MP) มีปริมาณเชื้อรา 4.95×10^6 CFU/g ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีจำนวนเชื้อรามาก

เป็นอันดับที่สอง (จากการแยกทั้งหมด 13 แหล่ง) แต่กลับมีจำนวนไอโซเลตเพียง 6 ไอโซเลต (4%) เท่านั้น (ตารางที่ 5) จากผลการทดลองที่ได้ พบว่ายางพาราแผ่นจากอำเภอเมือง จังหวัดพังงา (MP) มีความหลากหลายของเชื้อราน้อยมาก ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากจากลักษณะของยางพาราแผ่นที่มีค่าของพีเอชสูง (พีเอชเท่ากับ 8.0) มากกว่าพีเอชของยางพาราแผ่นจากสถานที่อื่น (พีเอชเท่ากับ 6.0) และยังมีปริมาณของโปรตีนและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ต่ำที่สุดด้วย จึงน่าจะเป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อราเจริญได้น้อยชนิด โดยที่ไม่มีผลต่อจำนวนของเชื้อราที่เจริญบนยางพาราแผ่นเพราะแม้ว่าจะมีน้อยชนิด แต่ก็ยังคงมีจำนวนเชื้อราในปริมาณมาก

ตารางที่ 5 จำนวนไอโซเลตของเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างยางพาราแผ่นจากแหล่งต่างๆ

Table 5. Numbers of fungi isolated from contaminated para rubber sheets from different sources.

Locations	Code	No. of isolates	%
1. Khok Changai, Mueang, Phatthalung	KJ	6	4
2. Mueang, Phang Nga	MP	6	4
3. Mueang, Trang	MT	14	9.3
4. Nayong, Trang	NY	7	4.7
5. Pha Bon, Phatthalung	PB	9	6
6. Phraek Ha, Khuan Khanun, Phatthalung	PR	9	6
7. Songkla Rubber Research Center, Hat Yai, Songkhla	SR	21	14
8. Mueang, Surat Thani	ST	15	10
9. Thai Indo Rubber Co., Phabon, Phatthalung	TC	28	18.7
10. Takua Pa, Phang Nga	TK	7	4.7
11. Thalang, Phuket	TL	9	6
12. Thai Muang, Phang Nga	TM	8	5.3
13. Takua Thung, Phang Nga	TT	11	7.3
total		150	100

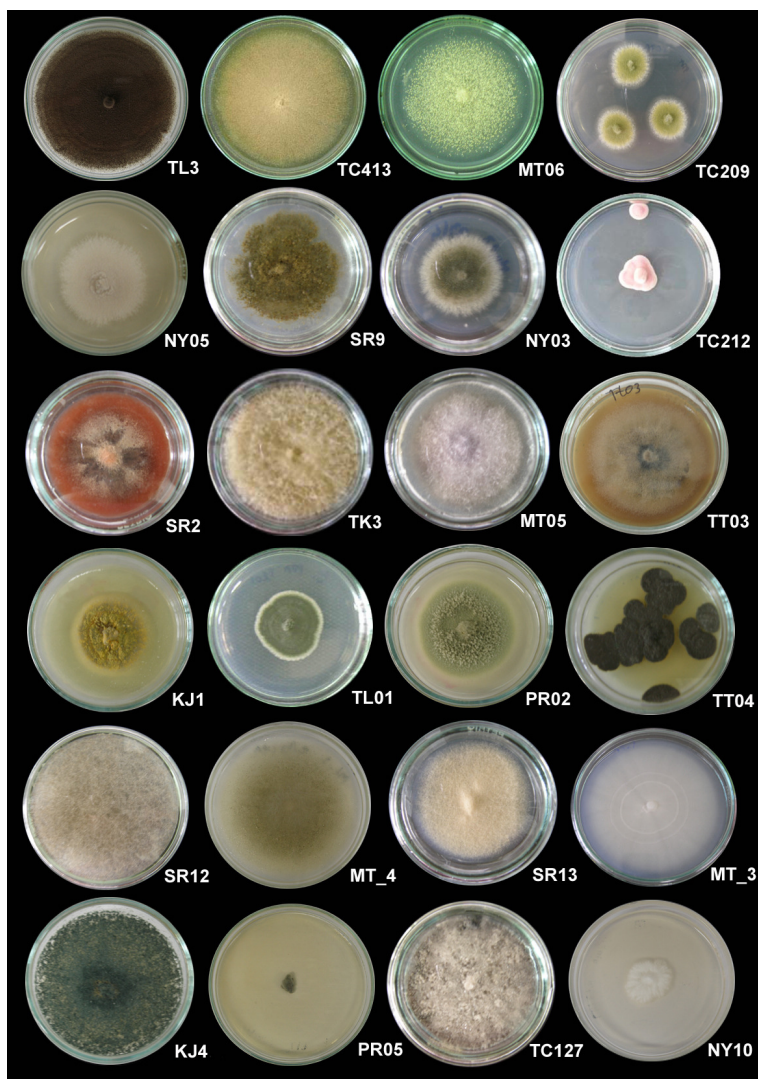


ภาพที่ 10 ปริมาณเชื้อราของตัวอย่างยางพาราแผ่นจากแหล่งต่างๆ

(KJ) ต.โคกชะงาย จ.พัทลุง	(MP) อ.เมืองพังงา จ.พังงา
(MT) อ.เมืองตรัง จ.ตรัง	(NY) อ.นาโยง จ.ตรัง
(PB) อ.ป่าบอน จ.พัทลุง	(PR) ต.แพรกหา จ.พัทลุง
(SR) อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	(TC) บ.สยามอินโด จำกัด จ.พัทลุง
(TK) อ.ตะกั่วป่า จ.พังงา	(TL) อ.ถลาง จ.ภูเก็ต
(TM) อ.ท้ายเหมือง จ.พังงา	(TT) อ.ตะกั่วทุ่ง จ.พังงา
(mean) ปริมาณเฉลี่ยของเชื้อรา	

Figure 10. Total mold counts of contaminated para rubber sheets from different sources.

(KJ) Khok Changai, Phatthalung	(MP) Mueang Phang Nga
(MT) Mueang, Trang	(NY) Nayong, Trang
(PB) Pha Bon, Phatthalung	(PR) Phraek Ha, Phatthalung
(SR) Hat Yai, Songkhla	(TC) Thai-Indo rubber Co., Phatthalung
(TK) Takou Pa, Phang Nga	(TL) Thalang, Phuket
(TM) Thai Muang, Phang Nga	(TT) Takua Thung, Phang Nga
(mean) Average of total mold counts	

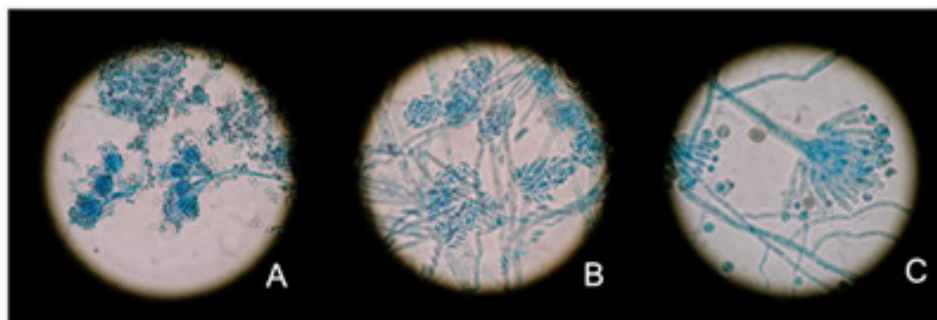


ภาพที่ 11 ลักษณะ โคลนินของเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่นที่ปนเปื้อนเชื้อรา

(*Aspergillus* spp. = TL3, TC413, MT06, TC209, NY05, SR9, NY03), (*Tritirachium* sp. = TC212),
 (*Fusarium* sp. = SR2, TK3, MT05, TT03), (*Penicillium* sp. = KJ1, TL01, PR02, TT04),
 (*Rhizopus* spp. = SR12, MT_4), (*Mucor himalis* = SR13), (*Geotrichum* sp. = MT_3),
 (*Trichoderma* sp. = KJ4), (*Cladosporium* spp. = TT013, PR05) และ (Unidentified = TC127, NY10)

Figure 11. Colonial characteristics of fungi isolated from contaminated para rubber sheets.

(*Aspergillus* spp. = TL3, TC413, MT06, TC209, NY05, SR9, NY03), (*Tritirachium* sp. = TC212),
 (*Fusarium* sp. = SR2, TK3, MT05, TT03), (*Penicillium* sp. = KJ1, TL01, PR02, TT04),
 (*Rhizopus* spp. = SR12, MT_4), (*Mucor himalis* = SR13), (*Geotrichum* sp. = MT_3),
 (*Trichoderma* sp. = KJ4), (*Cladosporium* spp. = TT013, PR05) and (Unidentified = TC127, NY10)



ภาพที่ 12 ลักษณะจุลทัศน์ฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อราที่พบได้บ่อยบนยางพาราแผ่น

(A) *Penicillium* sp. (B) *Fusarium* sp. และ (C) *Aspergillus* sp.

Figure 12. Microscopic observation of frequently found fungi from contaminated para rubber sheets.

(A) *Penicillium* sp. (B) *Fusarium* sp. and (C) *Aspergillus* sp.

ปริมาณเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่นพบว่ามีมากกว่าปริมาณเชื้อราที่มีในรายงานที่แยกได้จากเมล็ดข้าวโพด 1.3×10^6 CFU/g ที่มีการบ่มไว้ที่ 30°C ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 85% เป็นเวลา 30 วัน (Franzolin *et al.*, 1999) นอกจากนี้ Somasheker และคณะ (2004) รายงานว่าพบเชื้อราที่แยกได้จากข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาร ถั่วลิสง พริกแดง เมล็ดคาแฟ อาหารเลี้ยงสัตว์ปีก ถั่วลิสงบด และเมล็ดฝ้าย ในช่วงปริมาณ $0.3\text{-}260 \times 10^3$ CFU/g กล่าวได้ว่าปริมาณเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่นจึงมีมากกว่า จะเห็นว่าการที่เชื้อราเจริญได้ดีบนยางพาราแผ่นที่มีความชื้นในช่วง 1.0-9.5% (ความชื้นสัมพัทธ์ตั้งแต่ 52.1% ถึง 83.2%) เป็นค่าความชื้นที่ต่ำกว่า 13.5% ที่พบในกลุ่มของเมล็ดธัญพืช และในเมล็ดข้าวโพด น่าจะมีสารอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญบนเชื้อรามากกว่าด้วย แต่ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเป็นไปได้ว่า ยางพาราแผ่นส่วนใหญ่ที่ชาวบ้านผลิตนั้นมีขนาดใหญ่และมีผิวหน้าเป็นร่องทำให้สปอร์ของเชื้อราเกาะและฝังตัวอยู่ได้ง่ายกว่าเมล็ดข้าวโพดที่มีขนาดเล็กกว่ามากและมีผิวเรียบลื่น

ในส่วนของชนิดเชื้อราที่พบในอากาศในบริเวณที่มีการตากและเก็บยางพาราแผ่น พบว่ามีเชื้อราทั้งหมด 81 ไอโซเลต (ดังตารางที่ 6) โดยสถานที่ที่พบเชื้อราในอากาศมากที่สุดคือ อำเภอป่าบอน จังหวัดพัทลุง (PB) มีเชื้อราจำนวน 10 ไอโซเลต และสถานที่ที่พบเชื้อราน้อยที่สุดคือ อำเภอเมืองตรัง จังหวัดตรัง (MT) และ อำเภอนาโยง จังหวัดตรัง (NY) พบเป็นจำนวน 3 ไอโซเลต จะเห็นว่าชนิดของเชื้อราในอากาศพบในปริมาณที่ไม่มากนัก หากเปรียบเทียบกับกระแสลมในตารางที่ 3 จะพบว่าแต่ละสถานที่ที่มีความเร็วลมต่ำ ดังนั้นการกระจายของสปอร์ในอากาศอาจจะน้อยลง อย่างไรก็ตาม การ

ตรวจพบชนิดของเชื้อราในอากาศก็พบว่าเป็นเชื้อรากลุ่มเดียวกันกับที่พบในยางพาราแผ่น (ภาพที่ 13-14) เนื่องจากเมื่อนำเชื้อราที่แยกจากยางพาราแผ่น 150 ไอโซเลต มาจัดจำแนกชนิดพบว่าเป็นเชื้อราอยู่ใน 9 จินัส โดยมีการกระจายตัวดังนี้ *Aspergillus* spp. 47 ไอโซเลต (31.3%), *Penicillium* spp. 35 ไอโซเลต (23.3%), *Fusarium* spp. 32 ไอโซเลต (21.3%), *Cladosporium* spp. 8 ไอโซเลต (5.3%), *Rhizopus* sp. 4 ไอโซเลต (2.7%), *Mucor* sp. 2 ไอโซเลต (1.3%), *Geotrichum* sp. 2 ไอโซเลต (1.3%), *Trichoderma* sp. 2 ไอโซเลต (1.3%), *Tritirachium* sp. 1 ไอโซเลต (0.7%), และยังมีเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ (unidentified) 17 ไอโซเลต (11.3%) (ภาพที่ 13) เชื้อราที่แยกได้จากอากาศ (ภาพที่ 14) พบว่าเป็น *Aspergillus* spp. 19 ไอโซเลต (23.5%), *Fusarium* spp. 21 ไอโซเลต (25.9%) และ *Penicillium* spp. 14 ไอโซเลต (17.3%), *Rhizopus* spp. 8 ไอโซเลต (9.9%), *Cladosporium* spp. 5 ไอโซเลต (6.2%) และ unidentified 14 ไอโซเลต (17.2%) ซึ่งสอดคล้องกับชนิดของเชื้อราที่พบมากในตัวอย่างยางพาราแผ่น งานวิจัยของ Khosravi และคณะ (2008) รายงานว่าพบ *Aspergillus* 56%, *Mucor* 17%, *Penicillium* 15%, *Fusarium* 6%, *Cladosporium* 2% โดยแยกจากเมล็ดข้าวโพด ขนมะปราง รำข้าว ฟาง หญ้าแห้ง กากฝ้าย และ อาหารสัตว์ นอกจากนี้ Somasheker และคณะ (2004) รายงานว่าพบเชื้อราที่แยกได้จากข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาร ถั่วลิสง พริกแดง เมล็ดกาแฟ อาหารเลี้ยงสัตว์ปีก ถั่วลิสงบด เมล็ดฝ้าย โดยพบว่าเชื้อที่แยกได้คือ *Aspergillus flavus*, *A. glaucus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Alternaria* sp. และ *Cladosporium* sp. เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Abdel-Mallek และคณะ (1993) พบเชื้อรา *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Fusarium* จากเมล็ดข้าวโพดและเมล็ดทานตะวันในอียิปต์ และงานวิจัยของ Esuruoso (1970) รายงานว่า เชื้อราที่แยกจากยางพาราแผ่นที่ปนเปื้อนเชื้อราในภาคตะวันตกของประเทศไนจีเรีย สายพันธุ์ที่พบคือ *A. fumigatus*, *A. flavus* และ *A. aculeatus* และรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ก็พบว่า *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Fusarium* เป็นสาเหตุของการเจริญบนยางพาราแผ่นในประเทศที่มีการผลิตยางพาราแผ่น และ *Aspergillus* เป็นจันัสที่เป็นเชื้อก่อโรคที่พบได้ทั่วไปบนเมล็ดข้าวโพด ถั่ว ข้าว และ ธัญพืชอื่นๆ ในประเทศไนจีเรีย ดังนั้นยืนยันได้อีกว่า *Aspergillus* เป็นเชื้อราที่มีการเจริญเด่นมากกว่าเชื้อราในสายพันธุ์อื่นในสิ่งแวดล้อมไม่เว้นแม้กระทั่งในยางพาราแผ่น หากพิจารณาจากพฤติกรรมของสปอร์ของเชื้อราในอากาศ ซึ่งมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลในการส่งเสริมการแพร่กระจายเช่น อิทธิพลของลม แรงแม่เหล็กและปริมาณน้ำฝน แรงที่กระทำต่อสปอร์ เช่น ขนาด รูปร่าง คุณสมบัติของผิวหน้าของตัวสปอร์เอง และธรรมชาติของตัววัตถุที่สปอร์จะเข้าไปเกาะอยู่ จะพบว่าสปอร์ที่มีขนาดใหญ่กว่าจะสามารถเกาะติดกับวัตถุได้ดีกว่าสปอร์เชื้อราที่มีขนาดเล็ก นอกจากนี้ยังมีอิทธิพลของความเข้มข้นของ

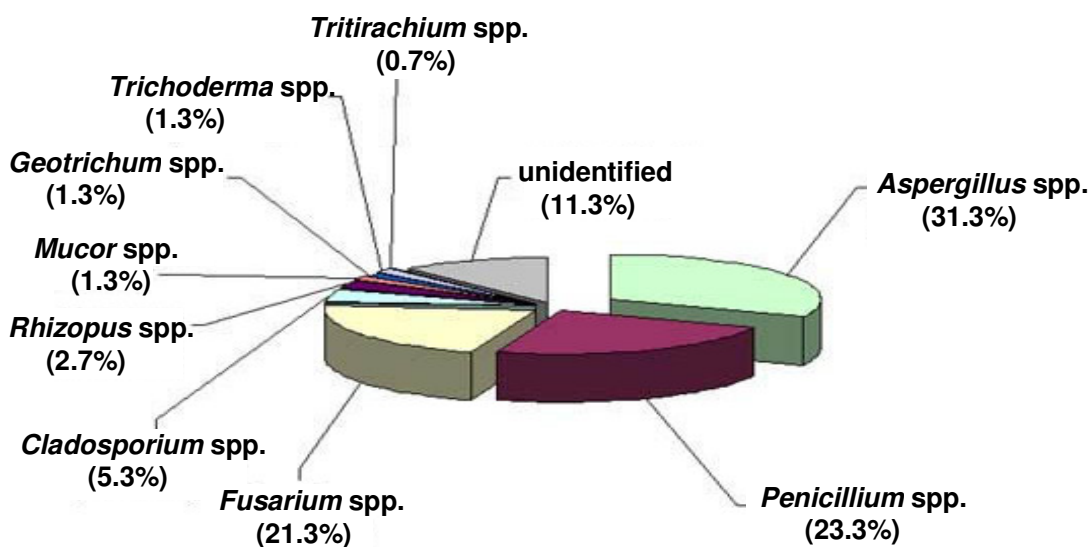
สปอร์ในอากาศบริเวณนั้นมีผลต่อการปนเปื้อนด้วย นอกจากนี้ยังมีเรื่องของฤดูกาล วัน และเวลา ด้วย เช่นในช่วงกลางวัน สปอร์ของ *Cladosporium* และ *Alternaria* จะโคตเด่นมาก การที่ฝนตกยังช่วยกำจัด สปอร์เชื้อราในเวลากลางวันได้อีกด้วย แต่จะไปกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยหรือการกระจายของสปอร์ โดยเฉพาะ ascospore ซึ่งเป็นกลุ่มที่เป็นสปอร์สาเหตุของโรคพืชและก่อให้เกิดอาการแพ้ในผู้ป่วยโรค หอบหืดที่ได้รับสปอร์เชื้อราในอากาศ (Webster, 1996)

ดังนั้นเชื้อราส่วนใหญ่ที่พบบนยางพาราแผ่นเป็นชนิดเดียวกับเชื้อราที่พบในอากาศ เนื่องจากมี ลักษณะและชนิดของเชื้อราที่ซ้ำกัน ดังจะพบว่าในวัตถุคืบทั่วไปนั้นสามารถปนเปื้อนและมีการเจริญ ของเชื้อราเป็นสาเหตุสำคัญการปนเปื้อนจากอากาศภายในบริเวณนั้นนั่นเอง (Chang *et al.*, 1995)

ตารางที่ 6 จำนวนไอโซเลตของเชื้อราที่แยกได้จากอากาศจากแหล่งต่างๆ ที่เก็บตัวอย่าง

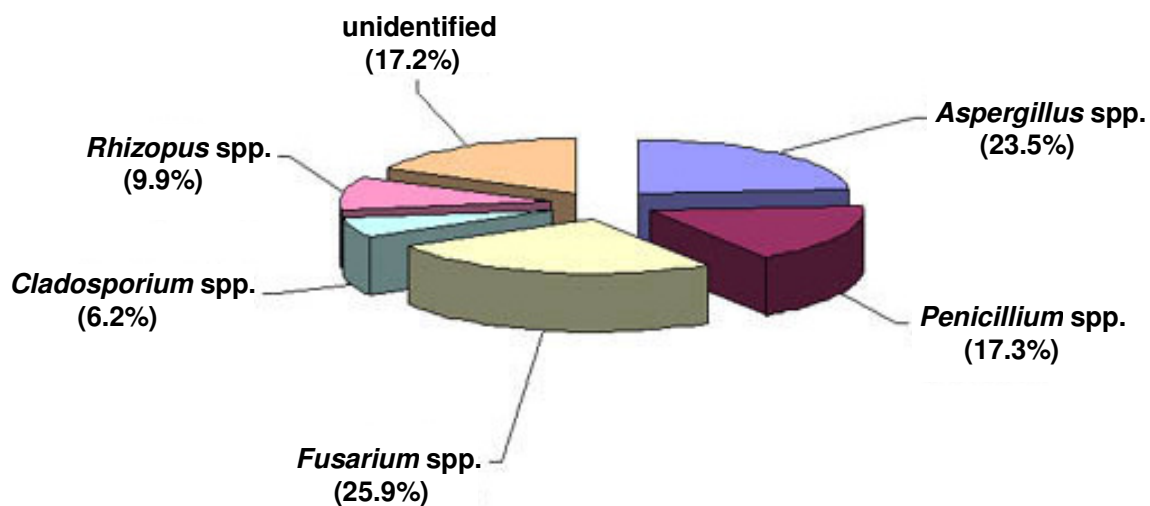
Table 6. Number of fungi isolated from air samples from different sampling sources.

Locations	Code	No. of isolates	%
1. Khok Changai, Mueang, Phatthalung	KJ	8	9.9
2. Mueang, Phang Nga	MP	8	9.9
3. Mueang, Trang	MT	3	3.7
4. Nayong, Trang	NY	3	3.7
5. Pha Bon, Phatthalung	PB	10	12.3
6. Phraek Ha, Khuan Khanun, Phatthalung	PR	7	8.6
7. Songkla Rubber Research Center, Hat Yai, Songkhla	SR	6	7.4
8. Mueang, Surat Thani	ST	6	7.4
9. Thai-Indo Rubber Co., Phabon, Phatthalung	TC	6	7.4
10. Takua Pa, Phang Nga	TK	9	11.1
11. Thalang, Phuket	TL	5	6.2
12. Thai Muang, Phang Nga	TM	5	6.2
13. Takua Thung, Phang Nga	TT	5	6.2
total		81	100



ภาพที่ 13 การกระจายชนิดของเชื้อรา (150 ไอโซเลต) ที่แยกได้จากยางพาราแผ่นที่ปนเปื้อน

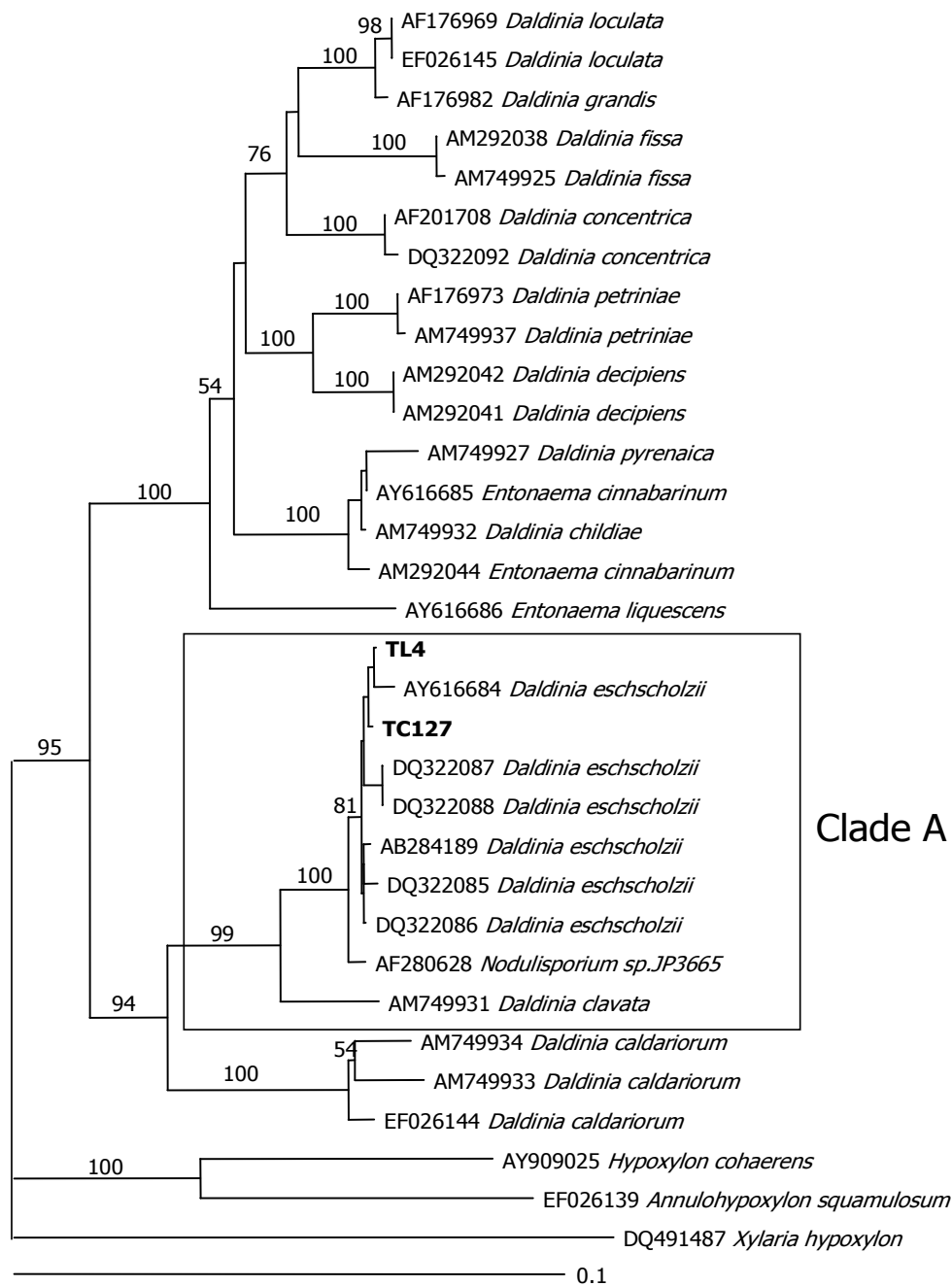
Figure 13. Distribution of fungal genera (150 isolates) isolated from contaminated para rubber sheets.



ภาพที่ 14 การกระจายชนิดของเชื้อรา (81 ไอโซเลต) ที่แยกได้จากอากาศจากแหล่งที่เก็บตัวอย่างยางพาราแผ่นในที่ต่างๆ กัน

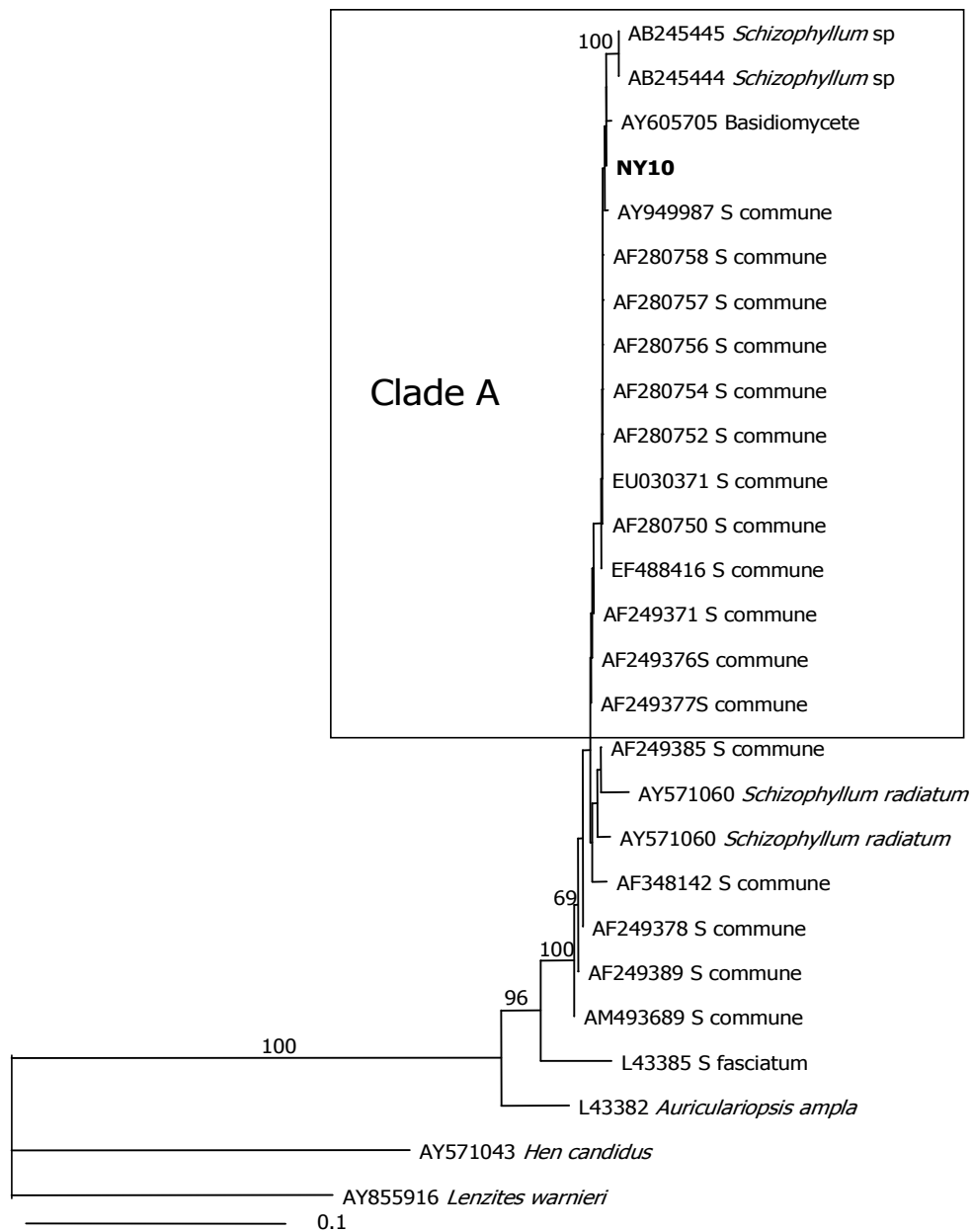
Figure 14. Distribution of air borne fungi (81 isolates) from different sources of para rubber sheets.

ในส่วนของเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ ทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ (unidentified) จึงได้ส่งตัวอย่างเชื้อราเพื่อหาลำดับเบส ณ หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เพื่อจำแนกโดยวิธีทางชีวโมเลกุล พบว่าเชื้อราไอโซเลต TL4 และ TC127 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ *Daldinia eschscholzii* หลายไอโซเลตมี % sequence identity อยู่ที่ 99.5-100% (Clade A) (ภาพที่ 15) และเชื้อราไอโซเลต NY10 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ Unidentified Basidiomycetes และ *Schizophyllum commune* อีกทั้งผลจาก Phylogenetic tree จาก branch length ที่สั้น โดยมี % sequence identity อยู่ที่ 99.6-99.2% (Clade A) (ภาพที่ 16) *Daldinia eschscholzii* เป็นเชื้อราที่พบได้บนไม้ผุ และ *Schizophyllum commune* คือ เห็ดแครงที่มักขึ้นบนไม้ยางพารา ซึ่งการที่ตรวจพบเชื้อราชนิดนี้บนยางพาราแผ่น เนื่องจากการกระจายของสปอร์ของเชื้อราที่มีการเจริญอยู่บนไม้ยางพาราในบริเวณสวนยางนั่นเอง และนอกจากนี้ การตากยางก็มักจะแขวนไว้กับไม้ไผ่ที่อาจมีเชื้อราเหล่านี้ปนเปื้อน ทำให้มีโอกาสที่จะปนเปื้อนมากับตัวอย่างยางพาราแผ่นด้วย



ภาพที่ 15 Phylogenetic tree ของเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ : *Daldinia eschschoizii* (TL4 และ TC127)

Figure 15. Phylogenetic tree of non spore forming fungi : *Daldinia eschschoizii* (TL4 and TC127).



ภาพที่ 16 Phylogenetic tree ของเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ : *Schizophyllum commune* (NY10)

Figure 16. Phylogenetic tree of non spore forming fungi : *Schizophyllum commune* (NY10).

จากเชื้อรา 150 ไอโซเลตนั้น ได้ทำการเลือกมา 27 ไอโซเลต (*Aspergillus* spp. 10 ไอโซเลต, *Penicillium* spp. 6 ไอโซเลต, *Fusarium* spp. 4 ไอโซเลต, *Cladosporium* spp. 3 ไอโซเลต, *Rhizopus* spp. 2 ไอโซเลต, *Mucor* sp. 1 ไอโซเลต และ *Geotrichum* sp. 1 ไอโซเลต) จากแต่ละแหล่งโดยที่เป็นเชื้อที่มีลักษณะที่เหมือนกันกับเชื้อที่แยกได้จากแหล่งอื่น และมีการพบมากกว่า 1 แหล่ง เพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนการทดสอบกับสารยับยั้งเชื้อราในขั้นต่อไป ซึ่งเชื้อทั้ง 27 ไอโซเลตนี้มีลักษณะทางสัณฐานของโคโลนี ดังตารางที่ 7 พบว่าเชื้อราที่แยกได้นี้เป็นเชื้อราที่พบได้บ่อยในสภาพแวดล้อมทั่วไปและยังจัดเป็นกลุ่มของเชื้อ xerophilic fungi ซึ่งเป็นเชื้อราที่สามารถเจริญได้บนวัตถุที่มีความชื้นไม่สูงมากนักและมีค่าน้ำอิสระต่ำ (a_w) (Gock *et al.*, 2003; Hocking, 2003) และยางพาราแผ่นที่มีค่าพีเอชเฉลี่ยที่ 6.5 ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่เชื้อราในกลุ่มนี้สามารถเจริญได้ดี (Guynot *et al.*, 2002) Gock และคณะ (2003) ได้ศึกษาการเจริญของเชื้อในกลุ่มของ xerophilic fungi ได้แก่ เชื้อ *Aspergillus* และ *Penicillium* บนขนมปังอบแห้ง ซึ่ง Abellana และคณะ (1997) อ้างโดย Guynot และคณะ (2002) ยังกล่าวว่า *Aspergillus* และ *Penicillium* เป็นเชื้อราที่พบมากโดยทั่วไปและเป็นเชื้อราที่สำคัญเป็นสาเหตุของการทำให้เกิดความเสียหายบนผลิตภัณฑ์อาหารอบ ซึ่งเชื้อราเหล่านี้ก็เป็นเชื้อราในจินัสเดียวกันกับเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่นในการศึกษาครั้งนี้โดยพบเชื้อรา *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. และ *Fusarium* spp. เป็นส่วนใหญ่ซึ่งเป็นเชื้อราในกลุ่มจินัสเดียวกันกับงานวิจัยก่อนหน้า ซึ่ง Linos และ Steinbüche (2001) ได้รายงานไว้ว่า *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* และ *Trichoderma* เป็นเชื้อที่สามารถเจริญบนยางพาราแผ่นและทำให้แผ่นยางธรรมชาติเกิดความเสียหาย นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Borel และคณะ (1982) ที่มีการศึกษาการย่อยสลายยางธรรมชาติโดยตรวจวัดปริมาณน้ำหนักของโพลีไอโซพรีนที่ลดลงไป โดยการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อรา *Fusarium* และ *Cladosporium* ยิ่งไปกว่านั้น Kalinenko (1938) อ้างโดย Rook (1955) รายงานว่า *Aspergillus oryzae* และ *Penicillium* สามารถใช้ยางเป็นแหล่งอาหารได้

ตารางที่ 7 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของ โคลนีเชื้อราที่พบได้บ่อยบนยางพาราแผ่น

Table 7. Morphological characteristics of commonly found fungal isolated from para rubber sheets.

Isolates	Characteristics		Growth	Identification
	Surface	Reverse		
KJ1	Powdery, yellow	Yellow	s	<i>Penicillium</i> sp.
MT04	Velvety, cream brown to green	Cream brown	s	<i>Cladosporium</i> sp.
MT05	Cottony, white to purple	Purple	f	<i>Fusarium</i> sp.
MT06	Granular, cream to yellow	Cream	f	<i>Aspergillus chraceus</i>
MT_3	Wrinkle, white (wet)	White	f	<i>Geotrichum</i> sp.
MT_4	Cottony, cream brown	Cream brown	vf	<i>Rhizopus</i> sp.
NY03	Granular, dark green	Green	f	<i>Aspergillus</i> sp.
NY05	Granular, white	White	s	<i>Aspergillus candidus</i>
PB02	Powdery, green	Brown to black	s	<i>Penicillium</i> sp.
PB03	Granular, green to orange	Orange	s	<i>Aspergillus</i> sp.
PR02	Powdery, green to yellow	Yellow	s	<i>Penicillium</i> sp.
PR05	Velvety, dark brown	Dark brown	s	<i>Cladosporium</i> sp.
SR2	Velvety, pink to red	Red	f	<i>Fusarium</i> sp.
SR9	Big granular, dark green	Green	f	<i>Aspergillus</i> sp.
SR12	Cottony, white and black	Yellow	vf	<i>Rhizopus</i> sp.
SR13	Cottony, cream to yellow	Cream to yellow	f	<i>Mucor himalis</i>
ST01	Powdery, light green	Yellow	s	<i>Penicillium</i> sp.
TC209	Small granular, green	White to green	f	<i>Aspergillus</i> sp.
TC211	Granular, green	Brown	s	<i>Aspergillus</i> sp.
TC413	Granular, brown	Brown	s	<i>Aspergillus terreus</i>
TK3	Powdery, brown to yellow	Brown	f	<i>Fusarium</i> sp.
TL01	Powdery, green	White	s	<i>Penicillium</i> sp.
TL3	Granular, black	Yellow	f	<i>Aspergillus niger</i>
TM012	Granular, green	Pink	s	<i>Aspergillus</i> sp.
TT03	Velvety, brown	Brown	f	<i>Fusarium</i> sp.
TT04	Powdery, green	Yellow	s	<i>Penicillium</i> sp.
TT013	Velvety, Green	Dark green	s	<i>Cladosporium</i> sp.

s = slow , f = fast, vf = very fast

4. การศึกษาผลของสารยับยั้งเชื้อรา

4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านราเบื้องต้น

การทดสอบฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นของสารเคมียับยั้งเชื้อราทั้ง 12 ชนิด กับเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่นจำนวน 27 ไอโซเลต (เชื้อราที่พบบ่อยบนยางพาราแผ่นตามตารางที่ 7) พบว่าสารที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีคือ โปแทสเซียมซอร์เบต โปแทสเซียมเบนโซเอต โซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ กรดอะซิติก และน้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ในระดับของวงใสที่ ++ ซึ่งสารทั้ง 5 ชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบดังตารางที่ 8 และภาพที่ 17 (ในที่นี้แสดงผลการทดสอบของสารยับยั้งกับเชื้อราบางชนิด ซึ่งผลการทดสอบทั้งหมด 27 ไอโซเลตแสดงในตารางที่ 18 ในภาคผนวก ง) โดยที่สาร โปแทสเซียมซอร์เบต โปแทสเซียมเบนโซเอต และโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ยับยั้งได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นสาร 10% (w/v) กรดอะซิติกยับยั้งได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 10% (v/v) และน้ำส้มควันไม้ยับยั้งได้ดีที่ความเข้มข้น 100% (v/v) ส่วนงานวิจัยของ Guynot และคณะ (2005b) ได้รายงานถึงการใช้ โปแทสเซียมซอร์เบตที่ความเข้มข้น 0.3% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราในกลุ่ม xerophilic ได้ที่ค่า น้ำอิสระ 0.8-0.9 ซึ่งจะเห็นว่าความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ทดสอบในการศึกษานี้มีค่าสูงกว่างานวิจัยของ Guynot และคณะ (2005b) ถึง 33.3 เท่า ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงมาก

ในส่วนของสารพาราโนโตรฟินอลที่เป็นสารเปรียบเทียบพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราดีมาก ดังจะเห็นว่าสารพาราโนโตรฟินอลมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราครอบคลุมทั้งโคโลนีของเชื้อรา และในทำนองเดียวกันก็พบว่าโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ให้ผลการยับยั้งเช่นเดียวกันกับพาราโนโตรฟินอล จากฤทธิ์ของสารยับยั้งทำให้เชื้อราหยุดการเจริญเติบโตต่อไปจนไม่พบการเว้าของโคโลนีเชื้อราเหมือนกับสารยับยั้งชนิดอื่น (ภาพที่ 18) แต่โซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ไม่ได้ยับยั้งการเจริญของเชื้อราเหมือนกับพาราโนโตรฟินอลกับเชื้อราทุกไอโซเลต แต่ก็พบว่าเป็นสารที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราใกล้เคียงกับพาราโนโตรฟินอล (ภาพที่ 19)

นอกจากนี้การเจริญของเชื้อแต่ละชนิดมีระยะเวลาไม่เท่ากัน การอ่านผลจึงทำการตรวจที่ ชั่วโมงการยับยั้งที่เหมาะสมของอัตราการเจริญของเชื้อชนิดนั้น จากผลการทดลองพบว่าเชื้อที่มีความไวต่อสารยับยั้งเชื้อรามากที่สุดคือ เชื้อ *Rhizopus* spp. ซึ่งเชื้อราชนิดนี้เจริญอย่างรวดเร็วมากใช้เวลาเพียง 6 ชั่วโมง ก็เจริญได้ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี 20 มิลลิเมตร ในขณะที่เชื้อราชนิดอื่นใช้เวลาประมาณ 3 วัน ดังนั้นในการตรวจผลของเชื้อ *Rhizopus* spp. จึงต้องลดระยะเวลาในการตรวจผลเป็นที่ชั่วโมงที่ 12 และ 24 ในทางกลับกันเชื้อรา *Cladosporium* เป็นเชื้อราที่โตช้าต้องใช้ระยะ

เวลานานถึง 216-240 ชั่วโมง (9-10 วัน) ในการตรวจผลเพราะเป็นเชื้อที่เจริญได้ช้า อย่างไรก็ตาม แม้จะใช้เวลาในการตรวจสอบฤทธิ์ของสารยับยั้งมากกว่าเชื้อราไอโซเลตอื่น แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารยับยั้งให้ผลในทิศทางเดียวกันกับการทดสอบกับเชื้อราไอโซเลตอื่นที่พบว่า มีประสิทธิภาพดีที่ความเข้มข้นสูงสุดเช่นกัน โดยพบว่าโพแทสเซียมซอร์เบต โพแทสเซียมเบนโซเอต โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ใช้ความเข้มข้นเท่ากันคือ 10% (w/v) กรดอะซิติกความเข้มข้น 10% (v/v) และน้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ความเข้มข้น 100% (v/v) สำหรับแคลเซียมโพรพิโอเนต โซเดียมไนเตรตและแคลเซียมไฮดรอกไซด์นั้น พบว่ามีประสิทธิภาพต่ำต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่น อย่างไรก็ตาม Droby และคณะ (2003) รายงานว่าแคลเซียมโพรพิโอเนต สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของ *Botrytis cinerea* ที่ความเข้มข้น 5% (w/v)

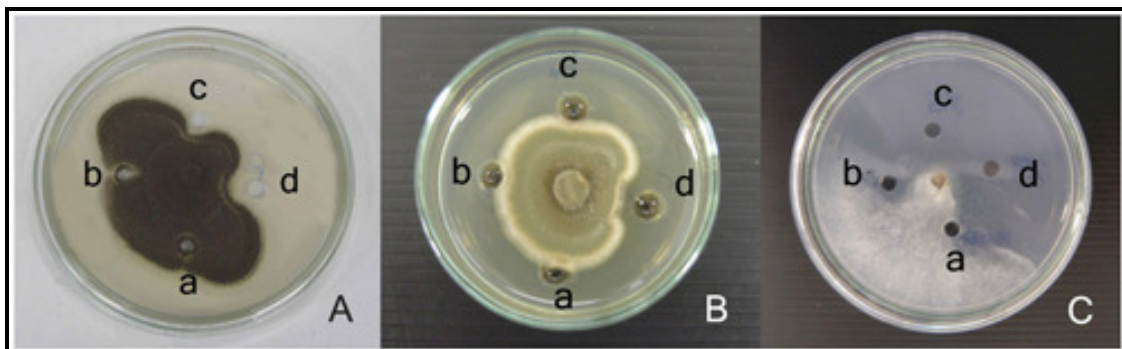
ตารางที่ 8 ผลของชนิดและความเข้มข้นสารยับยั้งเชื้อราต่อการเจริญของเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่น

Table 8. Effect of types and concentrations of antifungal agents on the growth of fungal isolated from para rubber sheets.

Antifungal agents	Concentration	MT05*		TT03*		SR9*		TL3*		TM012*		TC211*		PR02*		TT04*		PR05*		SR12*	
		48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	96h	120h	72h	96h	48h	72h	216h	240h	12h	24h
Acetic acid	1% (w/v)	-	-	±	-	-	-	-	-	±	-	±	±	-	-	±	±	++	++	-	-
	5% (v/v)	±	-	+	+	-	-	++	++	+	+	+	+	++	+	++	++	++	++	+	±
	10% (v/v)	++	±	+	+	+	-	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
Sodium metabisulphite	1% (w/v)	-	-	±	-	+	+	++	++	+	+	++	++	+	+	++	++	++	++	+	+
	5% (w/v)	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	10% (w/v)	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++
Potassium sorbate	1% (w/v)	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	±	-	+	+	++	++	+	-
	5% (w/v)	-	-	++	++	++	++	+	+	++	++	+	+	+	±	++	++	++	++	++	+
	10% (w/v)	-	-	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+	±	++	++	++	++	+++	+++
Potassium benzoate	1% (w/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	+	-	++	++	-	-
	5% (w/v)	-	-	+	-	+	±	++	+	-	-	-	-	±	-	+	-	++	++	++	-
	10% (w/v)	-	-	+	-	+	+	++	++	+	-	±	+	±	-	++	+	++	++	+++	-
Smoke acid (bamboo)	10% (w/v)	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	-	-
	30% (w/v)	±	-	+	-	-	-	±	-	+	±	+	+	+	-	+	+	+	+	±	-
	100% (w/v)	+	±	+	+	+	±	+	±	++	+	++	++	++	+	++	++	+	+	++	±

- No inhibition, ± Little inhibition zone, + Inhibition zone between 1-3.5 mm., ++ Inhibition zone between 4-5 mm., +++ inhibition zone >5 mm.

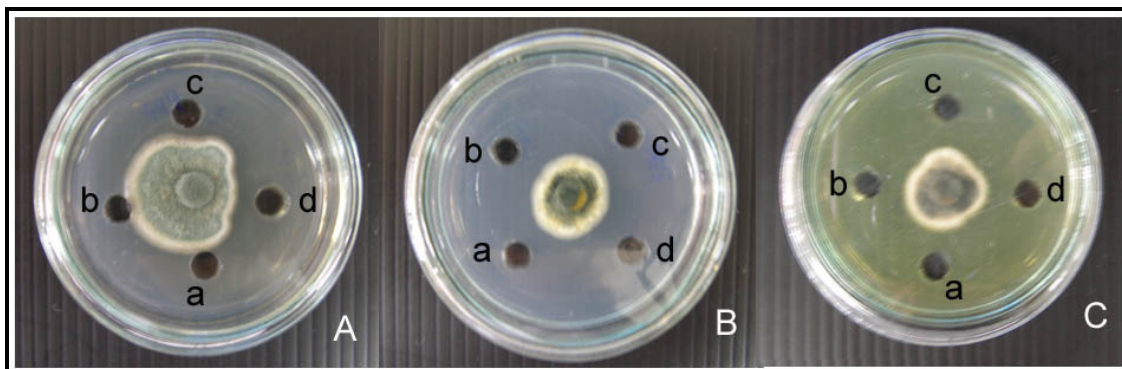
* see in table 7



- ภาพที่ 17 ผลของสารยับยั้งต่อการเจริญของเชื้อราโดยวิธี hyphal extension-inhibition assay
- (A) ผลของโพแทสเซียมเบนโซเอตต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* (TL3)
 (a, b, c, d = 0%, 1%, 5%, 10% (w/v) โพแทสเซียมเบนโซเอต)
- (B) ผลของน้ำส้มควันไม้ต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* (TC211)
 (a, b, c, d = 0%, 10%, 30%, 100% (v/v) น้ำส้มควันไม้)
- (C) ผลของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่อการเจริญของเชื้อรา *Rhizopus* (SR12)
 (a, b, c, d = 0%, 1%, 5%, 10% (w/v) โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์)

Figure 17. Effect of antifungal agents on fungal growth by hyphal extension-inhibition assay.

- (A) effect of sodium benzoate on the growth of *Aspergillus niger* (TL3)
 (a, b, c, d = 0%, 1%, 5%, 10% (w/v) sodium benzoate)
- (B) effect of smoked acid from bamboo on the growth of *Aspergillus* (TC211)
 (a, b, c, d = 0%, 10%, 30%, 100% (v/v) smoked acid from bamboo)
- (C) effect of sodium metabisulphite on the growth of *Rhizopus* (SR12)
 (a, b, c, d = 0%, 1%, 5%, 10% (w/v) sodium metabisulphite)



ภาพที่ 18 ผลของสารยับยั้งต่อการเจริญของ *Aspergillus* (PB03) โดยวิธี hyphal extension-inhibition assay

(A) ผลของน้ำส้มควันไม้ไฟต่อการเจริญของเชื้อรา

(a, b, c, d = 0%, 10%, 30%, 100% (v/v) น้ำส้มควันไม้ไฟ)

(B) ผลของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่อการเจริญของเชื้อรา

(a, b, c, d = 0%, 1%, 5%, 10% (w/v) โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์)

(C) ผลของพาราไนโตรฟินอลต่อการเจริญของเชื้อรา

(a, b, c, d = 0%, 1%, 0%, 5% (w/v) พาราไนโตรฟินอล)

Figure 18. Effect of antifungal agents on the growth of *Aspergillus* (PB03) by hyphal extension-inhibition assay.

(A) effect of smoke acid from bamboo on the growth of fungi

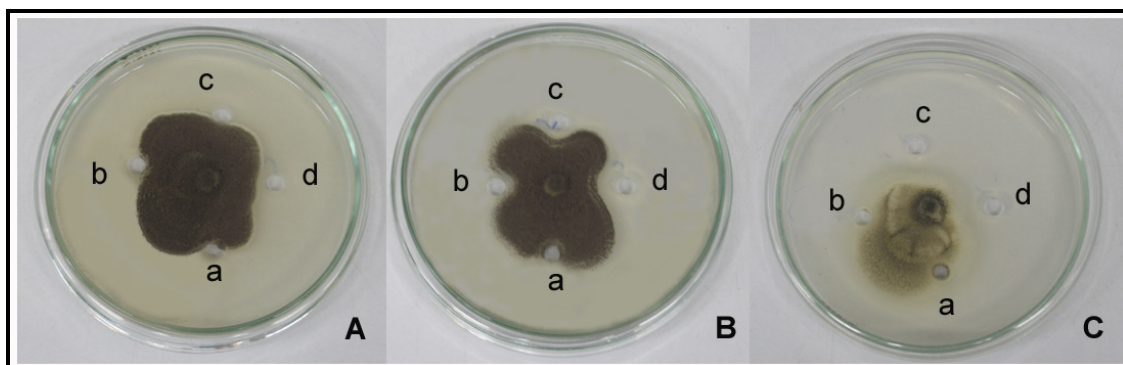
(a, b, c, d = 0%, 10%, 30% and 100% (v/v) smoked acid from bamboo)

(B) effect of sodium metabisulphite on the growth of fungi

(a, b, c, d = 0%, 1%, 5%, 10% (w/v) sodium metabisulphite)

(C) effect of *p*-Nitrophenol on the growth of fungi

(a, b, c, d = 0%, 1%, 0%, 5% (w/v) *p*-Nitrophenol)



ภาพที่ 19 ผลของสารยับยั้งต่อการเจริญของ *Aspergillus niger* (TL3) โดยวิธี hyphal extension-inhibition assay

(A) ผลของแคลเซียมโพรพิโอเนตต่อการเจริญของเชื้อรา

(a, b, c, d = 0%, 1%, 5%, 10% (w/v) แคลเซียมโพรพิโอเนต)

(B) ผลของโพแทสเซียมซอร์เบตต่อการเจริญของเชื้อรา

(a, b, c, d = 0%, 1%, 5%, 10% (w/v) โพแทสเซียมซอร์เบต)

(C) ผลของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่อการเจริญของเชื้อรา

(a, b, c, d = 0%, 1%, 5%, 10% (w/v) โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์)

Figure 19. Effect of antifungal agents on the growth of *Aspergillus niger* (TL3) by hyphal extension-inhibition assay.

(A) effect of calcium propionate on the growth of fungi

(a, b, c, d = 0%, 1%, 5%, 10% (w/v) calcium propionate)

(B) effect of potassium sorbate on the growth of fungi

(a, b, c, d = 0%, 1%, 5%, 10% (w/v) potassium sorbate)

(C) effect of sodium metabisulphite on the growth of fungi

(a, b, c, d = 0%, 1%, 5%, 10% (w/v) sodium metabisulphite)

4.2 การหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal fungicidal concentration (MFC)

นำสารยับยั้งเชื้อรา ได้แก่ โพลแทสเซียมซอร์เบต โพลแทสเซียมเบนโซเอต โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ กรดอะซิติก และน้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ ที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ในระดับของวงใสที่กว้างที่สุด (++) หรือ (+++) และสามารถยับยั้งเชื้อราได้หลายชนิดจากวิธี hyphal extension-inhibition assay ดังการทดลองเบื้องต้น มาทดสอบหาค่า MIC โดยดัดแปลงวิธี broth dilution จาก CLSI standard M38-A (CLSI/NCCLS, 2002) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 9 (นอกจากนี้ค่า MIC ต่อเชื้อราทั้ง 27 ไอโซเลต แสดงไว้ในภาคผนวก ง ตารางที่ 19-23) เชื้อรา *Aspergillus* spp. ทั้ง 10 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบกับสารยับยั้งเชื้อรา 5 ชนิด พบว่าโพลแทสเซียมซอร์เบต โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ โพลแทสเซียมเบนโซเอต กรดอะซิติกน้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ และพาราโนโตรฟินอลมีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 10% (w/v), 5% (w/v), 10% (w/v), 0.313% (v/v), 6.25% (v/v) และ 0.156% (w/v) ตามลำดับ ในขณะที่แอมโฟเทริซินบีมีค่า MIC ที่ความเข้มข้น > 0.8 mg/ml และพบว่าเชื้อ *Aspergillus* ที่ให้ค่า MIC สูงที่สุดคือ *Aspergillus* (SR9) (ภาพที่ 20) เมื่อทดสอบหาค่า MFC เพื่อศึกษาถึงความสามารถของสารยับยั้งเชื้อราในการทำลายสปอร์ของเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่น โดยการนำสารละลายที่ได้จากการทดสอบ MIC ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้มา spread บนอาหารวุ้น PDA และสังเกตการเจริญของเชื้อราพบว่า เชื้อรา *Aspergillus* spp. ทั้ง 10 ไอโซเลต ที่ทดสอบกับสารยับยั้งเชื้อรา โพลแทสเซียมซอร์เบตมีค่า MFC สูงสุดที่ความเข้มข้น > 10% (w/v) โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์และโพลแทสเซียมเบนโซเอตความเข้มข้น 10% (w/v) กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.625% (v/v) น้ำส้มควันไม้ไผ่ความเข้มข้น 25% (v/v) พาราโนโตรฟินอลความเข้มข้น 0.156% (w/v) และแอมโฟเทริซินบีความเข้มข้น > 0.8 mg/ml โดยเชื้อราที่ให้ค่า MFC สูงที่สุดคือ *Aspergillus* (SR9) เช่นเดียวกับค่า MIC

จากงานวิจัยของ Combina และคณะ (1999) รายงานว่าโซเดียมเบนโซเอตและโพลแทสเซียมซอร์เบต สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. alteruata* ที่ความเข้มข้นมากกว่า 10 mg/kg ในขณะที่ Joseph และ Akinyosoye (1997) ได้รายงานการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้สารโพลแทสเซียมเบนโซเอตใน African soft cheese ที่ความเข้มข้น 0.8% พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Brettanomyces* sp. และ *Rhodotorula* sp. ได้ ในส่วนของหลักการการทำงานของกรดอ่อนที่ใช้ถนอมอาหารมีความเชื่อกันว่ามีกรร่งผ่านของสารประกอบที่ไม่แตกตัวเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ กรดที่ไม่แตกตัวนี้เป็นสาเหตุของการสะสม protons และ anions ซึ่งไม่สามารถข้ามกลับเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ (Brul and Coote,

1999 อ้างโดย Mills *et al.*, 2004) นอกจากนี้ Lind และคณะ (2005) มีการทดสอบการใช้กรดอินทรีย์ โดยมีการใช้กรดอะซิติก ทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *A. fumigatus*, *A. roqueforti*, *P. commune*, *A. nidulans* และ *F. sporotrichoides* พบว่าต้องใช้ความเข้มข้น > 500 mM หรือ 3% ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่พีเอช 7.0 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงในการใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา นอกจากนี้ Kang และคณะ (2003) รายงานว่ากรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 50 mM หรือ 0.3% ไม่พบการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum* sp. โดยที่กรดอะซิติกมีผลในการยับยั้งกระบวนการหายใจมากกว่าการเข้าทำลายโครงสร้างของเซลล์ ในขณะที่ Pateraki และคณะ (2007) รายงานถึงการใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ในการควบคุมการงอกและการเจริญเติบโตของ *Aspergillus carbonarius* ที่แยกได้จากผลองุ่น พบว่าโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้นมากกว่า 1,000 mg/l คิดเป็น 0.1% (w/v) จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ และหลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบการงอกของสปอร์ที่หลากหลายความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์โดยพบว่าค่า MIC ที่ยับยั้งการงอกของเชื้อรา *A. carbonarius* คือที่ความเข้มข้น 750 mg/l หรือ 0.075% (w/v) ในทำนองเดียวกัน Joseph และ Akinyosoye (1997) ที่รายงานถึงการใช้สารเดียวกันนี้ใน African soft cheese ที่ความเข้มข้น 0.2% ก็ให้ผลยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus flavus*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Brettanomyces* sp. และ *Rhodotorula* sp. ทั้งนี้เนื่องจากโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์มีผลการยับยั้งในระบบกลไกการผลิตพลังงานภายในเซลล์ การสังเคราะห์โปรตีน การสังเคราะห์ DNA และเยื่อหุ้มเซลล์ (Mills *et al.*, 2004) ส่วนผลของแอมโฟเทริซินบีต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ก็พบว่าค่า MIC อยู่ในช่วง 0.06-16 µg/ml (Serrano *et al.*, 2003; Therese *et al.*, 2006; Widmer *et al.*, 2006) และค่า MIC เท่ากับ 0.001 mg/ml ที่เวลา 48 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus ustus* ที่แยกได้จากปอดของผู้ป่วย (Vagefi *et al.*, 2008) นอกจากนี้ Masoko และคณะ (2007) รายงานว่าค่า MIC ของสารแอมโฟเทริซินบีต่อเชื้อ *A. fumigatus* มีค่า MIC 0.02 mg/ml และยังพบว่า *Aspergillus* เป็นจลินัสที่ทนทานต่อสารยับยั้งเชื้อราที่สกัดจากพืช โดยมีค่า MIC เฉลี่ยที่ความเข้มข้น 0.34 mg/ml

การยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Fusarium* spp. จำนวน 4 ไอโซเลต พบว่าโพแทสเซียมซอร์เบต โพแทสเซียมเบนโซเอต โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ กรดอะซิติก น้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ และพาราโนโตรฟินอล มีค่า MIC สูงสุดที่ความเข้มข้น 0.625% (w/v), 2.5 % (w/v), 0.156% (w/v), 0.156% (v/v), 1.563% (v/v) และ 0.039% (w/v) ตามลำดับ และพบว่าค่า MFC ที่สูงสุดของแต่ละสารมีค่าดังนี้ โพแทสเซียมซอร์เบต 1.25% (w/v) โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 0.156% (w/v) โพแทสเซียมเบนโซเอต

2.5% (w/v) กรดอะซิติก 0.156% (v/v) น้ำส้มควันไม้ 3.125% (v/v) ส่วนสารที่ใช้เปรียบเทียบคือ พาราโนโตรฟินอลมีค่า MFC เท่ากับ 0.078% (w/v) และ แอมโฟเทริซินบีมีค่า MFC เท่ากับ 0.2 mg/ml ซึ่ง *Fusarium* ไอโซเลต MT05 เป็นเชื้อที่มีความคงทนต่อสารยับยั้งที่สุดในเชื้อรากลุ่มนี้ (ภาพที่ 21) โดยที่ค่า MIC ในงานวิจัยนี้มีค่าต่ำกว่าในงานวิจัยของ Mecteau และคณะ (2002) ที่รายงานค่า MIC ของเกลือของโซเดียมเบนโซเอต โซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ โพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.2 M หรือประมาณ 3% (w/v) สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ของ *Fusarium sambucinum* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mills และคณะ (2004) ที่รายงานว่าโพลีแซคคาไรด์และโซเดียมเบนโซเอต ความเข้มข้น 0.2 M สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Fusarium sambucinum* ส่วนงานวิจัยของ Widmer และคณะ (2006) รายงานค่า MIC และ MFC ของแอมโฟเทริซินบีต่อการยับยั้งการเจริญของ *Fusarium solani* มีค่าอยู่ระหว่าง 1.0-8.0 และ 4.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

สำหรับ *Penicillium* spp. 6 ไอโซเลต ที่แยกได้จากตัวอย่างยางพาราแผ่นเมื่อนำมาทดสอบความไวต่อสารยับยั้งเชื้อราทั้ง 7 ชนิด ได้ผลดังภาพที่ 22 พิจารณาค่าที่สูงที่สุด พบว่าค่า MIC และ MFC ของโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 1.25% (w/v) และ 2.5% (w/v) ตามลำดับ โซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ที่ความเข้มข้น 0.156% (w/v) และ 0.313% (w/v) พาราโนโตรฟินอลที่ความเข้มข้น 0.078% (w/v) และ 0.313% (v/v) ในขณะที่โพลีแซคคาไรด์ กรดอะซิติก น้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่และแอมโฟเทริซินบีมีค่า MIC และ MFC ที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 5 % (w/v), 0.156% (v/v), 3.125% (v/v) และ 0.1 mg/ml ตามลำดับ และพบว่า *Penicillium* ที่มีความทนทานต่อสารยับยั้งได้สูงที่สุดคือไอโซเลต TT04

ในส่วนของ *Cladosporium* spp. จำนวน 3 ไอโซเลต พบว่าโพลีแซคคาไรด์มีค่า MIC สูงสุดที่ 1.25% (w/v) โซเดียมเมตาไบซัลไฟด์และโพลีแซคคาไรด์มีค่า MIC ต่อเชื้อราที่ใช้ทดสอบเท่ากันทั้ง 3 ไอโซเลต คือ 0.313% (w/v) และ 1.25% (w/v) ตามลำดับ ส่วนกรดอะซิติกมีค่า MIC เท่ากับ 0.313% (v/v) น้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ 6.25% (v/v) พาราโนโตรฟินอลมีค่า MIC เท่ากับ 0.039% (w/v) และ แอมโฟเทริซินบี 0.1 mg/ml (ภาพที่ 23)

สำหรับ *Rhizopus* spp., *Mucor* sp. และ *Geotrichum* sp. พบว่าโพลีแซคคาไรด์มีค่า MIC 1.25% (w/v) และค่า MFC 2.5% (w/v) (ภาพที่ 24) โซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ต่อการยับยั้ง *Rhizopus* spp. และ *Mucor* sp. และมีค่า MIC เท่ากับ 0.313% (w/v) ค่า MFC เท่ากับ 0.625% (w/v) สำหรับ *Geotrichum* sp. และ *Mucor* sp. พบว่าโพลีแซคคาไรด์มีค่า MIC เท่ากับ 1.25% (w/v) ค่า MIC

ของกรดอะซิติกต่อ *Rhizopus* spp. และ *Geotrichum* sp. เท่ากับ 0.313% (w/v) แต่น้ำส้มควันไม้ไผ่เมื่อทดสอบกับ *Rhizopus* spp., *Mucor* sp. และ *Geotrichum* sp. มีค่า MIC เท่ากับ 3.125% (v/v)

Kartal และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาผลการยับยั้งเชื้อรา *Fomitopsis palustris* และ *Trametes versicolor* ด้วยน้ำส้มควันไม้จากไม้สนพิกุล (*Cryptomeria japonica*) กระถินเทพา (*Acacia mangium*) พบว่ามีผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองชนิดได้ที่ความเข้มข้น 0.1% (v/v) ได้ 48.50% และ 58.50% เมื่อเปรียบเทียบแล้วความเข้มข้นจากน้ำส้มควันไม้ไผ่ในการศึกษาคั้งนี้มีค่า MIC 6.25% (v/v) แม้ว่าจะใช้ในปริมาณที่สูงกว่าแต่สามารถยับยั้งการเจริญได้ 100%

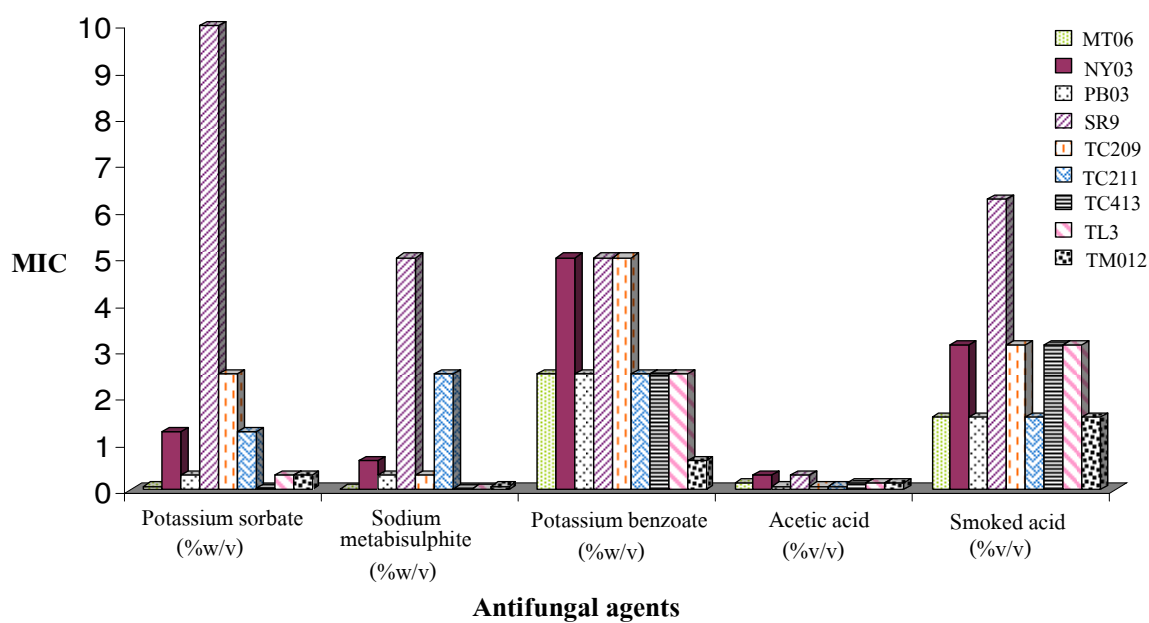
เมื่อพิจารณาผลการยับยั้งของสารยับยั้งเชื้อราแต่ละสารต่อเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่นจำนวน 27 ไอโซเลต ได้ช่วงการยับยั้งของค่า MIC และ MFC ดังตารางที่ 9 ความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดของเชื้อแต่ละจีโนส พบว่าค่า MIC และ MFC ของสารยับยั้งโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่อเชื้อ *Aspergillus* มีค่า < 0.0195-5% (w/v) และ 0.0195-10% (w/v) ตามลำดับ เทียบกับเชื้อในจีโนสอื่นแล้วแม้ว่าจะมีความสามารถในการยับยั้งในช่วงกว้างกว่า แต่เชื้อราส่วนใหญ่ที่ใช้ทดสอบก็มีความไวต่อสารยับยั้งที่ความเข้มข้นต่ำ ในส่วนของกรยับยั้งการเจริญที่ความเข้มข้นสูงเนื่องจากเชื้อรา *Aspergillus* ที่พบมีความหลากหลายมาก ดังนั้นแต่ละไอโซเลตก็มีความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งได้แตกต่างกัน โดยที่กรดอะซิติกและโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญได้ดี (ภาพที่ 20) สำหรับเชื้อ *Aspergillus* SR9 ลักษณะของสปอร์นั้นมีความหนา ผิวขรุขระ และขนาดใหญ่กว่าเชื้อราไอโซเลตอื่น จึงอาจเป็นผลให้มีสภาพในการทนต่อสารยับยั้งเชื้อราได้ดี (ภาพที่ 25) สำหรับเชื้อรา *Fusarium* นั้นมีค่า MIC และ MFC ของกรดอะซิติกและโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์เท่ากันคือ 0.078-0.156% (w/v) (ตารางที่ 10) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ *Fusarium* แต่ละไอโซเลตก็พบว่ามี ความไวต่อสารทั้งสองชนิดนี้เป็นอย่างดี (ภาพที่ 21) ดังจะเห็นว่าผลการยับยั้งของสารยับยั้งเชื้อราอยู่ในช่วงที่ค่อนข้างกว้าง แต่ก็พบว่าโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์มีค่า MIC ต่ำกว่าสารยับยั้งชนิดอื่นต่อเชื้อราส่วนใหญ่ ส่วนกรดอะซิติกที่มีช่วงการยับยั้งที่แคบกว่าสารยับยั้งชนิดอื่น และจะเห็นว่าน้ำส้มควันไม้มีช่วงของค่า MIC และ MFC ของการยับยั้งเชื้อราที่เท่ากันแต่ก็เป็นค่าที่สูง สำหรับโพแทสเซียมซอร์เบตและโพแทสเซียมเบนโซเอต มีช่วงการยับยั้งที่กว้างกว่ากรดอะซิติก เนื่องจากการที่ใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นในความเข้มข้นสูงคือ 1×10^4 - 5×10^4 spores/ml จึงมีส่วนในการทำให้ค่า MIC ของสารยับยั้งเชื้อราในงานวิจัยนี้มีค่าสูงด้วย จากรายงานการวิจัยของ Lass-Flörl และคณะ (2003) ศึกษาความเข้มข้นของปริมาณสปอร์ของเชื้อราที่มีผลต่อสารยับยั้งเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* ต่อแอมโฟเทริซินบี เช่น *A. flavus* ที่ความเข้มข้นสปอร์ 1×10^3 - 5×10^3 , 1×10^4 - 5×10^4 และ 1×10^5 - 5×10^5 CFU/ml มีค่า MIC 1.25, 5 และ

7.5 mg/l ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง ดังจะเห็นว่าเมื่อปริมาณความเข้มข้นของสปอร์เริ่มต้นสูงขึ้น ทำให้ค่า MIC สูงตามไปด้วย อิทธิพลของปริมาณสปอร์มีผลเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการยับยั้งของสาร ถึงแม้ว่าแอมโฟเทริซินบี มีผลการขัดขวาง ergosterol ในเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรง มากกว่าไปมีผลกับระบบของเอนไซม์ แต่การที่มีปริมาณความเข้มข้นสปอร์สูงมีผลทำให้กลไกในการยับยั้งของแอมโฟเทริซินบีอ่อนกำลังลง จึงส่งผลให้การยับยั้งในระบบเอนไซม์ของสารแอมโฟเทริซินบีไปมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เช่นกัน ดังนั้นการจะยับยั้งเชื้อราในปริมาณความเข้มข้นสปอร์ที่สูงจึงนำไปสู่การที่ทำให้มีค่า MIC สูงกว่าเดิม (Gehrt *et al.*, 1995 ; Lass-Flörl *et al.*, 2003)

นอกจากนี้ Leon และคณะ (2005) ได้รายงานว่าแอมโฟเทริซินบีความเข้มข้นระหว่าง 0.01 และ 0.05 mg/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *A. fumigatus* ที่เลี้ยงในเซลล์ไตของมนุษย์ (FZ และ HFZ) จะเห็นได้ว่าในงานวิจัยดังกล่าวมีค่า MIC ของแอมโฟเทริซินบีต่อการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus* ที่ก่อโรคในคนมีค่าน้อยกว่าเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่น ดังนั้นเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่นในงานวิจัยนี้ น่าจะมีความสามารถในการทนทานต่อสารยับยั้งเชื้อราได้มากกว่าเชื้อราของงานวิจัยก่อนหน้านี้ ดังนั้นหากมีการฟุ้งกระจายของสปอร์เชื้อราในบรรยากาศ เกษตรกรที่มีสถานะเสี่ยงต่อการติดเชื้อได้ง่าย เช่น ผู้ที่มีความบกพร่องในระบบภูมิคุ้มกันหรือเป็นโรคหอบหืด เมื่อสปอร์ของเชื้อราเหล่านี้เข้าสู่ร่างกายจะก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพเกษตรกรเป็นอย่างมาก (Webster, 1996) นอกจากนี้ Rajabi และคณะ (2005) รายงานค่า MIC ของพาราไทรฟีนอล 2,880 μM ต่อเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งสารพาราไทรฟีนอลเป็นสารในกลุ่มฟีนอลมีผลในการเปลี่ยนสภาพของโปรตีนของ DNA และทำให้เอนไซม์ nucleases ไม่ทำงาน (Suzuki *et al.*, 2006) และยังมีผลรบกวนต่อเยื่อหุ้มเซลล์หรือมีผลยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา (Ejechi *et al.*, 1999) จึงทำให้มีค่า MIC ที่ต่ำกว่าสารยับยั้งในกลุ่มอื่นมาก และเคยเป็นสารที่มีการแนะนำใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อราในยางพาราแผ่นในอดีตแต่เนื่องจากเป็นสารที่เป็นพิษระดับ 6 ซึ่งเป็นสารที่อันตรายมากต่อสิ่งมีชีวิตและมีผลต่อสุขภาพของเกษตรกรผู้ผลิตยางพาราแผ่นก็จะได้รับสารพิษนี้ด้วย จึงไม่เหมาะจะนำมาใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อราบนยางพาราแผ่น

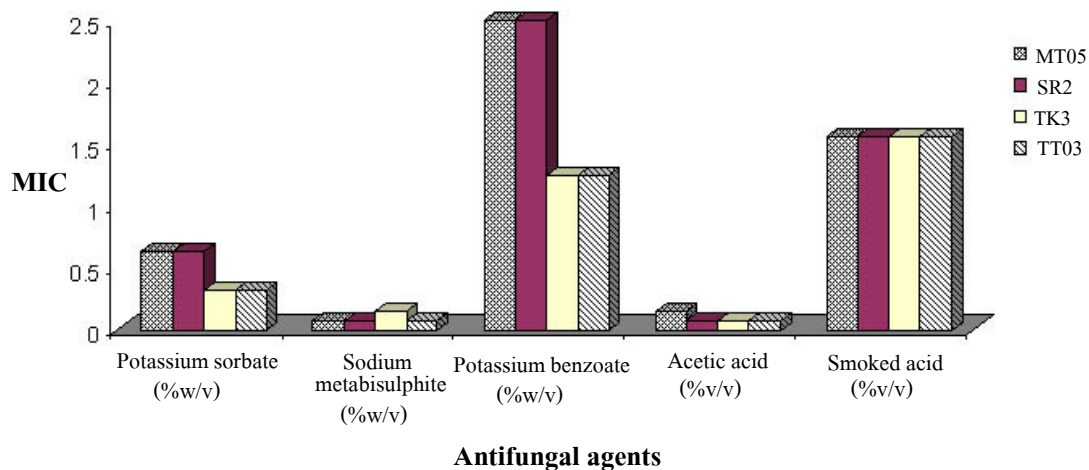
จากผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Fusarium* เป็นเชื้อที่พบได้บ่อยบนยางพาราแผ่นและมีความทนทานต่อสารยับยั้งเชื้อราที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้ดีคือกรดอะซิติกและโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ นอกจากนี้ Masoka และคณะ (2007) ยังพบว่า *Aspergillus* เป็นจีโนสที่ทนทานต่อสารยับยั้งเชื้อราที่สกัดจากพืช ดังนั้นจึงเลือกเชื้อราเหล่านี้เพื่อนำไปทดสอบในการทดลองขั้นตอนต่อไป ส่วนน้ำส้มควันไม้ไม่เหมาะจะใช้ความเข้มข้นในการยับยั้งสูง แต่ก็ยังเป็นสารที่

ปลอดภัยและมีผลในการยับยั้งได้ในระดับดีในระดับหนึ่งและมีเกษตรกรบางกลุ่มนิยมนำมาใช้ในการป้องกันเชื้อราจึงได้นำมาทดสอบในขั้นต่อไปด้วย



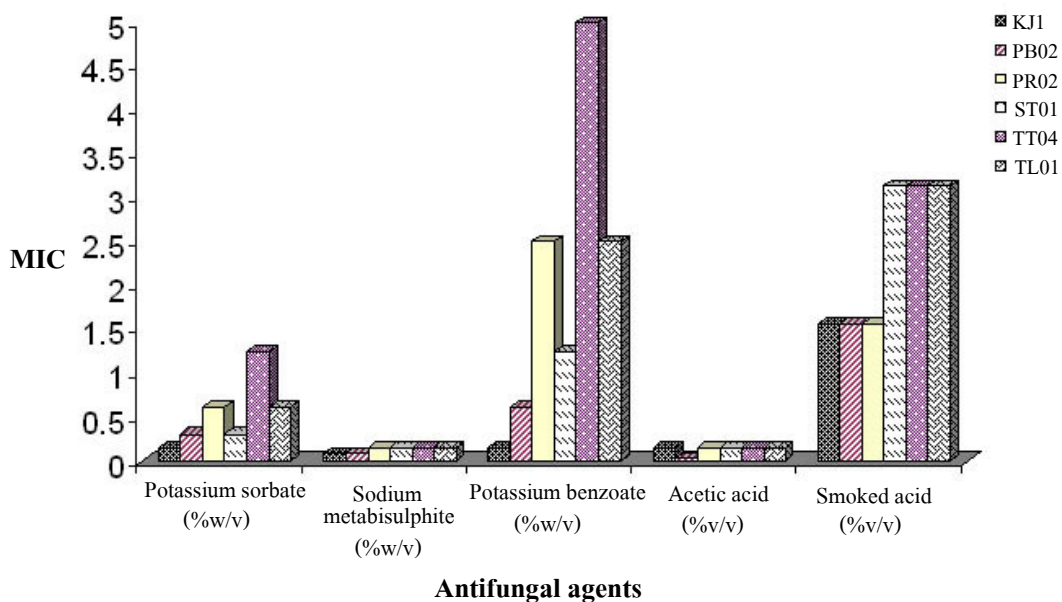
ภาพที่ 20 ค่า MIC ของสารยับยั้งเชื้อรา 5 ชนิดต่อ *Aspergillus* spp.

Figure 20. MIC values of 5 antifungal agents against *Aspergillus* spp.



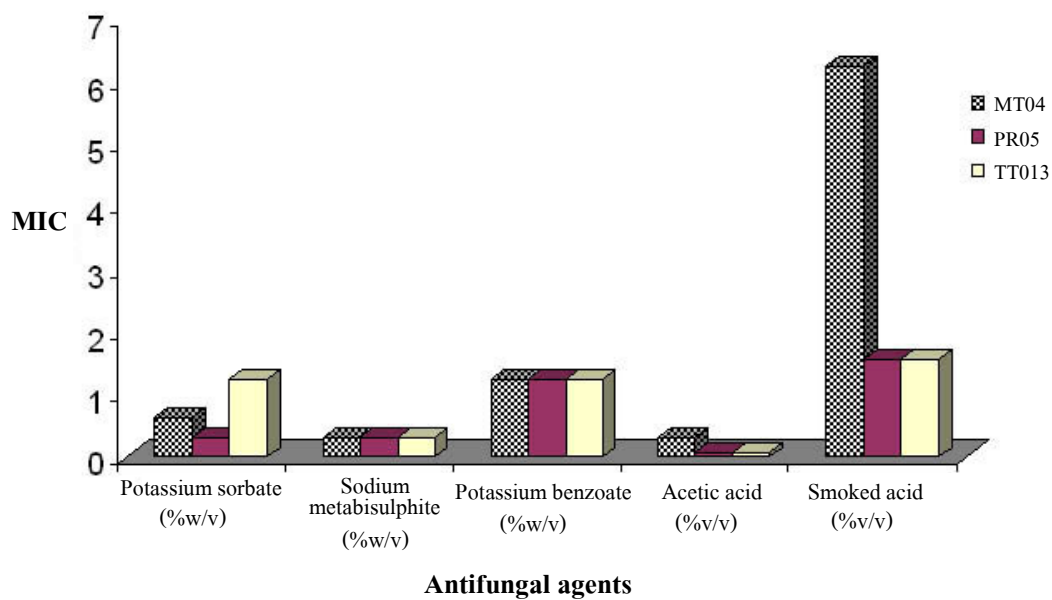
ภาพที่ 21 ค่า MIC ของสารยับยั้งเชื้อรา 5 ชนิดต่อ *Fusarium* spp.

Figure 21. MIC values of 5 antifungal agents against *Fusarium* spp.



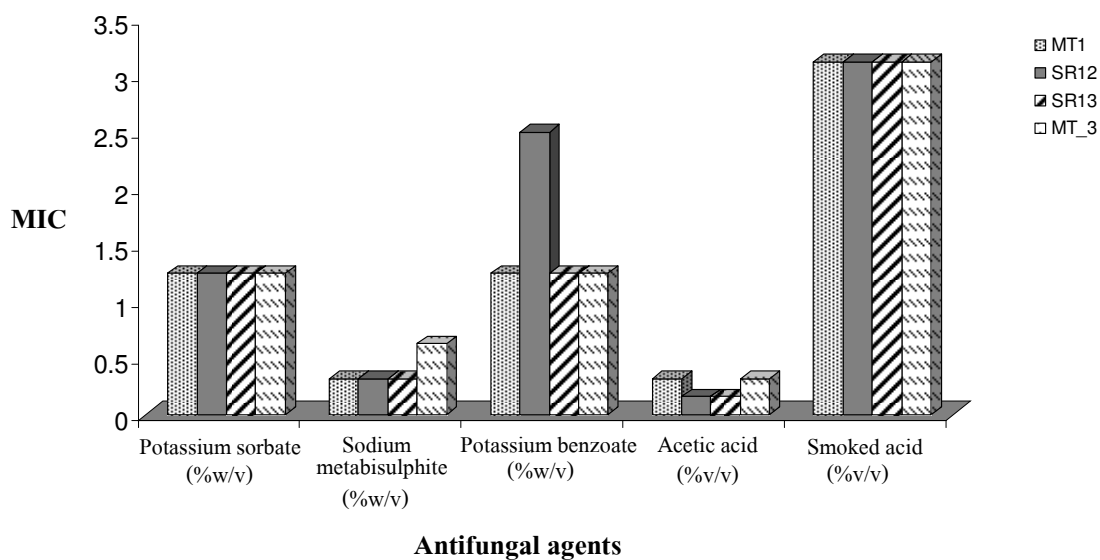
ภาพที่ 22 ค่า MIC ของสารยับยั้งเชื้อรา 5 ชนิดต่อ *Penicillium* spp.

Figure 22. MIC values of 5 antifungal agents against *Penicillium* spp.



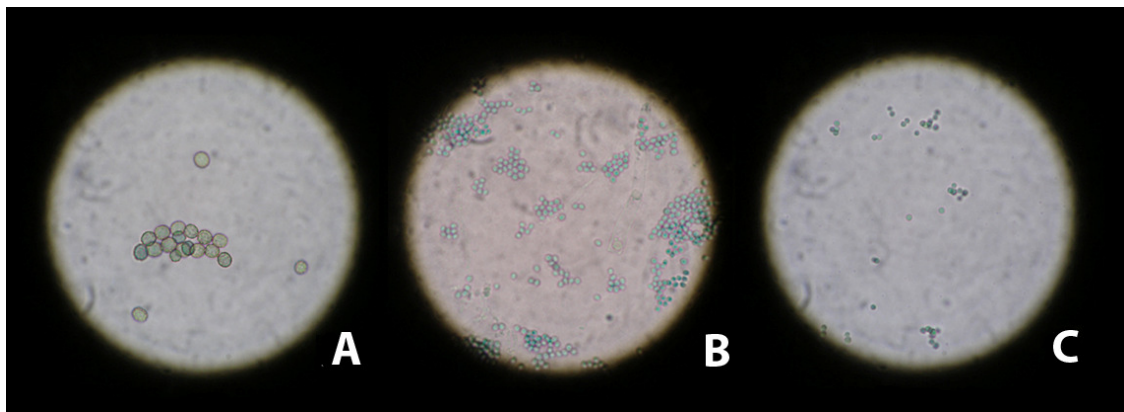
ภาพที่ 23 ค่า MIC ของสารยับยั้งเชื้อรา 5 ชนิดต่อ *Cladosporium* spp.

Figure 23. MIC values of 5 antifungal agents against *Cladosporium* spp.



ภาพที่ 24 ค่า MIC ของสารยับยั้งเชื้อรา 5 ชนิดต่อ *Rhizopus* spp., *Mucor* sp. และ *Geotrichum* sp.

Figure 24. MIC values of 5 antifungal agents against *Rhizopus* spp., *Mucor* sp. and *Geotrichum* sp.



ภาพที่ 25 สปอร์ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

A = *Aspergillus* (SR9), B = *Aspergillus* (TC413), C = *Penicillium* (TT04)

Figure 25. Fungal spore under light microscope (40X).

A = *Aspergillus* (SR9), B = *Aspergillus* (TC413), C = *Penicillium* (TT04)

ตารางที่ 9 ช่วงของค่า MIC และ MFC ของสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราต่อเชื้อราที่พบบ่อยบนยางพาราแผ่น

Table 9. Ranges of MIC and MFC values of various antifungal agents against fungal isolates commonly found on para rubber sheets.

Fungal species (n*)	MIC/MFC	Acetic acid (%v/v)	Sodium metabisulphite (%w/v)	Potassium sorbate (%w/v)	Potassium benzoate (%w/v)	Smoked acid (%v/v)	p-Nitrophenol (%w/v)	Amphotericin B (mg/ml)
<i>Aspergillus</i> spp. (10)	MIC	0.039-0.313	<0.0195-5	0.078-10	0.625-10	1.563-25	0.0195-0.156	0.0125->0.8
	MFC	0.078-0.625	0.0195-10	0.039->10	0.625-10	1.563-25	0.0195-0.156	0.025->0.8
<i>Penicillium</i> spp. (6)	MIC	0.039-0.156	0.078-0.156	0.156-0.625	0.156-5	1.563-3.125	0.0093-0.078	0.025-0.1
	MFC	0.156-0.313	0.078-0.313	0.156-2.5	0.313-5	1.563-3.125	0.0093-0.078	0.05-0.1
<i>Fusarium</i> spp. (4)	MIC	0.078-0.156	0.078-0.156	0.313-0.625	1.25-2.5	1.563	0.039	0.025-0.2
	MFC	0.078-0.156	0.078-0.156	0.313-1.25	1.25-2.5	1.563-3.125	0.039	0.025-0.2
<i>Cladosporium</i> spp. (3)	MIC	0.078-0.313	0.313	0.313-1.25	1.25	1.563-6.25	0.0195-0.039	0.1
	MFC	0.156-0.625	0.313-0.625	0.625-1.25	1.25-2.5	1.563-6.25	0.039	0.2-0.4
<i>Rhizopus</i> spp. (2)	MIC	0.156-0.313	0.313	1.25	1.25-2.5	3.125	0.039-0.078	0.2
	MFC	0.313	0.625	2.5	1.25-2.5	3.125	0.078-0.156	0.2-0.4
<i>Mucor</i> sp. (1)	MIC	0.156	0.313	1.25	1.25	3.125	0.039	0.05
	MFC	0.156	0.313	1.25	1.25	3.125	0.039	0.1
<i>Geotrichum</i> sp. (1)	MIC	0.313	0.625	1.25	1.25	3.125	0.039	0.2
	MFC	0.313	0.625	1.25	1.25	3.125	0.039	0.2

(n*) Number of fungal isolates tested

ตารางที่ 10 ช่วงของค่า MIC และ MFC ต่อเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่น

Table 10. Ranges of MIC and MFC values of antifungal agents against fungal isolated from para rubber sheets.

Antifungal agents	Range of MIC	Range of MFC
Acetic acid (%v/v)	0.039-0.313	0.078-0.625
Sodium metabisulphite (%w/v)	<0.0195-5	0.0195-10
Potassium sorbate (%w/v)	0.039-10	0.039->10
Potassium benzoate (%w/v)	0.156-10	0.313-10
Smoked acid (%v/v)	1.563-25	1.563-25
<i>p</i> -Nitrophenol (%w/v)	0.0093-0.156	0.0093-0.156
Amphotericin B (mg/ml)	0.0125- >0.8	0.025- >0.8

5. การศึกษาผลการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่น

เริ่มจากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อรา โดยการนำสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus* (SR9), *Penicillium* (TT04) และ *Fusarium* (MT05) ที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น 1×10^6 - 5×10^6 spores/ml ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เพาะลงบนยางพาราแผ่นดิบขนาด 5x5 เซนติเมตร ที่ตากแล้ว 1 วัน แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25°C, 37°C, 45°C และ 65°C ตรวจสอบวัดที่ความชื้นสัมพัทธ์บรรยากาศของแต่ละตู้พบว่ามีความชื้นสัมพัทธ์ 85%, 62.7%, 50.8% และ 25.8% ตามลำดับ สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อรา (ภาพที่ 26) พบว่าเชื้อราทั้ง 3 ชนิด สามารถเจริญบนยางพาราแผ่นได้ตั้งแต่วันที่ 2 ของการเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C สำหรับที่อุณหภูมิ 37°C มีเพียง *Aspergillus* (SR9) เท่านั้นที่มีการเจริญบนยางพาราแผ่น และนอกจากนี้ที่อุณหภูมิ 45°C และ 65°C ไม่พบการเจริญของเชื้อราเลย (ตารางที่ 11) ในงานวิจัยของ Mitchell และคณะ (2003) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *A. carbonarius* อยู่ในช่วงระหว่าง 25°C และ 35°C อย่างไรก็ตาม *A. fumigatus* ซึ่งเป็น thermophilic fungus เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45°C ก็มีการเจริญได้ดี (Lian et al., 2007) นอกจากนี้ Deacon (1997) กล่าวว่า *Fusarium* จัดเป็นเชื้อ mesophilic fungi อุณหภูมิที่สูงที่สุดในการเจริญคือ 40°C โดยสามารถพบการเจริญบนวัสดุที่เชื้อราเกาะได้ภายใน 2-3 วัน ซึ่ง *Cladosporium* และ *Fusarium* spp. สามารถเจริญบนข้าวโพดที่เก็บไว้ในที่แห้งได้ แต่ thermophilic fungi ก็สามารถพบได้ใน 2-3 วันแรกเช่นกัน ส่วน *A. fumigatus* อุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 52-55°C สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือที่ 37-40°C นอกจากนี้ Davis และคณะ (1975) รายงานว่า *A. fumigatus* เป็นเชื้อ thermotolerant fungus ที่สามารถทนและเจริญได้ถึงที่ระดับอุณหภูมิ 50°C

เมื่อพิจารณาผลการทดลองนี้พบว่า ที่อุณหภูมิ 25°C นั้นเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราและความชื้นสัมพัทธ์ที่วัดได้ในตู้บ่มยังพบว่ามีความชื้นสัมพัทธ์ที่สูงมาก คือ 85% ดังนั้นจึงส่งผลให้เชื้อราทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถเจริญบนยางพาราแผ่นได้ไม่ต่างจากการเจริญบน substrate อื่น สำหรับที่อุณหภูมิ 37°C นั้น ความชื้นสัมพัทธ์ในตู้บ่มวัดได้ 62.7% แม้ว่าเป็นความชื้นที่ค่อนข้างแห้ง แต่ก็ยังพอมีความชื้นในอากาศให้เชื้อรา *Aspergillus* เจริญได้ ซึ่งต่างจากอุณหภูมิที่ 45°C และ 65°C ทั้งสองอุณหภูมินี้เป็นอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูงไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราที่เป็น mesophilic fungi และยังมี ความชื้นสัมพัทธ์บรรยากาศที่ต่ำมาก โดยวัดความชื้นสัมพัทธ์ของตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 45°C และ 65°C ได้ที่ 50.8% และ 25.8% ตามลำดับ จึงส่งผลให้ทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตได้ อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิก็เป็นปัจจัยที่มีผลอย่างชัดเจนต่อการเจริญของเชื้อรา (Chew et al., 2001)

ตารางที่ 11 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อรา 3 ชนิดบนยางพาราแผ่นตากที่ความชื้นสัมพัทธ์ต่างๆ
Table 11. Effect of temperature on growth of 3 fungal isolates on dry para rubber sheets at different relative humidities.

Fungi	25 °C				37°C				45°C				65°C			
	(85% RH)				(62.7% RH)				(50.8% RH)				(25.8% RH)			
	2d	3d	4d	7d	2d	3d	4d	7d	2d	3d	4d	7d	2d	3d	4d	7d
<i>Penicillium</i> (TT04)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium</i> (MT05)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus</i> (SR9)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

d = day , - = No growth, + = Visible fungal growth

เมื่อศึกษาในส่วนของความชื้นสัมพัทธ์ต่อการเจริญของเชื้อรา โดยทำการทดลอง เช่นเดียวกันแต่มีการควบคุมความชื้นสัมพัทธ์และเก็บยางพาราแผ่นไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) แล้วสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อรา (ตารางที่ 12) พบว่าวันที่ 3 เชื้อราทั้ง 2 ชนิด คือ *Aspergillus* และ *Fusarium* สามารถเจริญบนยางพาราแผ่นที่ความชื้นสัมพัทธ์ 57% ณ อุณหภูมิห้อง สำหรับเชื้อ *Penicillium* ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 57% เริ่มสังเกตเห็นการเจริญของเชื้อราในวันที่ 5 สำหรับที่ความชื้นสัมพัทธ์ 67%, 80% และ 90% มีการเจริญของเชื้อราในวันที่ 3 และเชื้อรา *Aspergillus* และ *Fusarium* ที่ทุกความชื้นสัมพัทธ์มีการเจริญในวันที่ 3

เมื่อพิจารณาผลการทดลองนี้พบว่า ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 57% แม้ว่าจะเป็นความชื้นสัมพัทธ์ที่ต่ำแล้ว แต่ก็พบว่าเชื้อราทั้ง *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Fusarium* ยังสามารถเจริญได้บนยางพาราแผ่นที่อุณหภูมิห้อง แต่ก็พบว่าความชื้นสัมพัทธ์ 57% นั้นเป็นความชื้นที่ไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่น เนื่องจากเจริญได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น การควบคุมการเจริญของเชื้อราที่ความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่า 65% จะทำให้ลดความเสี่ยงต่อการเจริญของเชื้อราได้ (BCCDC Laboratory Services, 2003) ในส่วนของงานวิจัยของ Coppock และ Cookson (1951) พบว่าที่ความชื้นสัมพัทธ์ 70% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนอิฐ ไม้ ไม้ที่ทาสีแล้ว และภาพที่ทำด้วยสีกาวน้ำ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับยางพาราแผ่นแล้ว ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 70% ก็ยังไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ทั้งนี้อาจ

เนื่องจากสารอาหาร เช่น โปรตีนและน้ำตาล ที่มีในยางพาราแผ่นเพียงพอที่เชื้อราจะใช้เป็นอาหารในการเจริญได้ ในขณะที่อัฐ ไม้ หรือไม้ที่ทาสีแล้ว มีสารอาหารที่ต่ำกว่าหรือไม่มีเลย

ตารางที่ 12 ผลของความชื้นสัมพัทธ์ต่อการเจริญของเชื้อรา 3 ชนิดบนยางพาราแผ่นตากที่อุณหภูมิห้อง

Table 12. Effect of relative humidity on growth of 3 fungal isolates on para rubber sheets at room temperature.

Relative humidity (% RH)	<i>Aspergillus</i> (SR9)				<i>Penicillium</i> (TT04)				<i>Fusarium</i> (MT05)			
	1d	3d	5d	7d	1d	3d	5d	7d	1d	3d	5d	7d
57%	-	±	±	±	-	-	±	±	-	+	+	+
67%	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
80%	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
90%	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+

d = day , - = No growth, ± = Little growth, + = Heavy growth

และเมื่อทำการศึกษาผลของของอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ต่อเจริญของเชื้อราที่อุณหภูมิ 25°C, 37°C และ 45°C และควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ 57%, 67%, 80% และ 90% แล้วสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อราพบว่าที่อุณหภูมิ 37°C ความชื้นสัมพัทธ์ 80% เชื้อรา *Aspergillus* (SR9) และ *Fusarium* (MT05) เริ่มมีการเจริญในวันที่ 3 สำหรับที่อุณหภูมิ 45°C ทุกความชื้นสัมพัทธ์ที่ทดสอบเริ่มมีการเจริญของเชื้อราในวันที่ 7 แต่เชื้อราสามารถเจริญได้เพียงเล็กน้อย สังเกตเห็นเป็นเส้นใยบางๆ เท่านั้น ส่วนที่อุณหภูมิที่ 25°C ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80% และ 90% เชื้อรา *Fusarium* มีการเจริญของเชื้อราในวันที่ 3 สำหรับเชื้อ *Aspergillus* (SR9) และ *Penicillium* (TT04) เริ่มมีการเจริญในวันที่ 5 (ตารางที่ 13)

ที่อุณหภูมิ 25°C พบว่าเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราดังผลการทดลองในตารางที่ 11 แต่เมื่อนำมาศึกษาร่วมกันกับความชื้นสัมพัทธ์ ที่อุณหภูมิ 25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 90% ไม่ได้มีการเจริญเติบโตของเชื้อราเร็วขึ้นแต่อย่างใด อาจเนื่องจากเชื้อราสามารถเจริญได้ในช่วงความชื้นสัมพัทธ์ที่กว้างตั้งแต่ 60-90% ดังนั้นในอุณหภูมิที่เหมาะสมจึงไม่เห็นความแตกต่างของความชื้นสัมพัทธ์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Pardo และคณะ (2005) ที่พบว่า *A. ochraceus* เจริญได้ดีที่

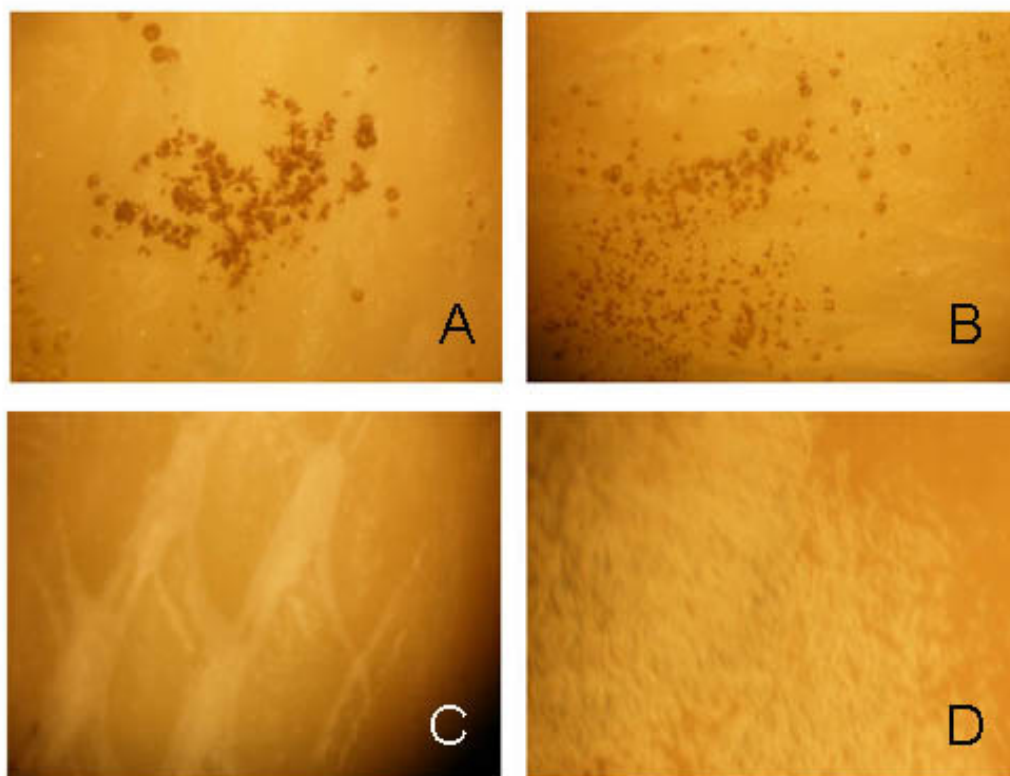
อุณหภูมิ 30°C ความชื้นสัมพัทธ์ 80-90% แต่ที่อุณหภูมิ 10°C ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 90% ไม่มีการเจริญของเชื้อรา *A. ochraceus* และได้ให้เหตุผลว่าอุณหภูมิจะมีผลมากกว่าความชื้นสัมพัทธ์ที่ระดับวิธีการตรวจวัดนี้ ดังนั้นที่อุณหภูมิ 45°C แม้เชื้อราจะอยู่ในความชื้นสัมพัทธ์ที่สูงอย่าง 90% แล้วก็ให้ผลเหมือนความชื้นสัมพัทธ์ 57%, 67% และ 80% เมื่อศึกษาพร้อมกันระหว่างอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิ 45°C ที่ทุกความชื้นสัมพัทธ์จึงเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา

ตารางที่ 13 ผลของอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ต่อการเจริญของเชื้อรา 3 ชนิด บนยางพาราแผ่น

Table 13. Effect of temperature and relative humidity on growth of 3 fungal isolates on para rubber sheets.

Temp.	Humidity (%RH)	<i>Aspergillus</i> (SR9)				<i>Penicillium</i> (TT04)				<i>Fusarium</i> (MT05)				Negative control*																																																																																																																																																																																																																																																							
		1d	3d	5d	7d	1d	3d	5d	7d	1d	3d	5d	7d	1d	3d	5d	7d																																																																																																																																																																																																																																																				
		25°C	57%	-	-	±	±	-	-	±	±	-	-	+	+	-	-	-	-		67%	-	-	±	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-		80%	-	+	+	+	-	±	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-		90%	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	37°C	57%	-	-	±	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		67%	-	-	±	±	-	-	±	±	-	-	+	±	-	-	-	-		80%	-	±	±	±	-	-	±	+	-	±	+	+	-	-	-	-		90%	-	+	+	+	-	-	±	+	-	+	+	+	-	-	-	-	45°C	57%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		67%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		80%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		90%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	Positive control																	at room		-	±	+	+	-	±	±	+	-	±	+	+	(28.4°C, 75.2% RH)												
	67%	-	-	±	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-		80%	-	+	+	+	-	±	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-		90%	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	37°C	57%	-	-	±	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		67%	-	-	±	±	-	-	±	±	-	-	+	±	-	-	-	-		80%	-	±	±	±	-	-	±	+	-	±	+	+	-	-	-	-		90%	-	+	+	+	-	-	±	+	-	+	+	+	-	-	-	-	45°C	57%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		67%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		80%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		90%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	Positive control																	at room		-	±	+	+	-	±	±	+	-	±	+	+	(28.4°C, 75.2% RH)																																
	80%	-	+	+	+	-	±	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-		90%	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	37°C	57%	-	-	±	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		67%	-	-	±	±	-	-	±	±	-	-	+	±	-	-	-	-		80%	-	±	±	±	-	-	±	+	-	±	+	+	-	-	-	-		90%	-	+	+	+	-	-	±	+	-	+	+	+	-	-	-	-	45°C	57%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		67%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		80%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		90%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	Positive control																	at room		-	±	+	+	-	±	±	+	-	±	+	+					(28.4°C, 75.2% RH)																																														
	90%	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	37°C	57%	-	-	±	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		67%	-	-	±	±	-	-	±	±	-	-	+	±	-	-	-	-		80%	-	±	±	±	-	-	±	+	-	±	+	+	-	-	-	-		90%	-	+	+	+	-	-	±	+	-	+	+	+	-	-	-	-	45°C	57%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		67%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		80%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		90%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	Positive control																	at room		-	±	+	+	-	±	±	+	-	±	+	+					(28.4°C, 75.2% RH)																																																																
37°C	57%	-	-	±	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		67%	-	-	±	±	-	-	±	±	-	-	+	±	-	-	-	-		80%	-	±	±	±	-	-	±	+	-	±	+	+	-	-	-	-		90%	-	+	+	+	-	-	±	+	-	+	+	+	-	-	-	-	45°C	57%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		67%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		80%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		90%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	Positive control																	at room		-	±	+	+	-	±	±	+	-	±	+	+					(28.4°C, 75.2% RH)																																																																																		
	67%	-	-	±	±	-	-	±	±	-	-	+	±	-	-	-	-		80%	-	±	±	±	-	-	±	+	-	±	+	+	-	-	-	-		90%	-	+	+	+	-	-	±	+	-	+	+	+	-	-	-	-	45°C	57%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		67%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		80%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		90%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	Positive control																	at room		-	±	+	+	-	±	±	+	-	±	+	+					(28.4°C, 75.2% RH)																																																																																																				
	80%	-	±	±	±	-	-	±	+	-	±	+	+	-	-	-	-		90%	-	+	+	+	-	-	±	+	-	+	+	+	-	-	-	-	45°C	57%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		67%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		80%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		90%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	Positive control																	at room		-	±	+	+	-	±	±	+	-	±	+	+					(28.4°C, 75.2% RH)																																																																																																																						
	90%	-	+	+	+	-	-	±	+	-	+	+	+	-	-	-	-	45°C	57%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		67%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		80%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		90%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	Positive control																	at room		-	±	+	+	-	±	±	+	-	±	+	+					(28.4°C, 75.2% RH)																																																																																																																																								
45°C	57%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		67%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		80%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		90%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	Positive control																	at room		-	±	+	+	-	±	±	+	-	±	+	+					(28.4°C, 75.2% RH)																																																																																																																																																										
	67%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		80%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		90%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	Positive control																	at room		-	±	+	+	-	±	±	+	-	±	+	+					(28.4°C, 75.2% RH)																																																																																																																																																																												
	80%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-		90%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	Positive control																	at room		-	±	+	+	-	±	±	+	-	±	+	+					(28.4°C, 75.2% RH)																																																																																																																																																																																														
	90%	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	Positive control																	at room		-	±	+	+	-	±	±	+	-	±	+	+					(28.4°C, 75.2% RH)																																																																																																																																																																																																																
Positive control																																																																																																																																																																																																																																																																					
at room		-	±	+	+	-	±	±	+	-	±	+					+																																																																																																																																																																																																																																																				
(28.4°C, 75.2% RH)																																																																																																																																																																																																																																																																					

d = day, - = No growth, ± = Little growth, + = Heavy growth, * distilled water



ภาพที่ 26 ลักษณะการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่นส่องด้วยกล้องสเตอริโอในวันที่ 7

A และ B = *Aspergillus* (SR9), C = *Fusarium* (MT05) และ D = *Penicillium* (TT04)

Figure 26. Appearance of fungal growth on para rubber sheets after 7 days of inoculation under stereo microscopy.

A and B = *Aspergillus* (SR9), C = *Fusarium*(MT05) and D = *Penicillium* (TT04)

6. การประยุกต์ใช้สารเคมีในการป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่น

6.1 ผลของความเข้มข้นของสารยับยั้งต่อการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่น

เมื่อนำยางพาราแผ่นที่ตากแล้วเป็นเวลา 1 วัน มาจุ่มในสารเคมีที่เลือกความเข้มข้นจากค่า MIC สูงสุดในผลการทดลองข้อที่ 5.3 (ได้แก่ สารโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 5% (w/v) กรดอะซิติก 0.313% (v/v) และน้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ 6.25% (v/v) โดยใช้สารความเข้มข้นเป็น 1 เท่า 2 เท่า และ 4 เท่าของ MIC ของสารแต่ละชนิด ซึ่งโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 1 MIC 2 MIC และ 4 MIC มีค่าเท่ากับ 5, 10 และ 20% (w/v) ตามลำดับ ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 1 MIC 2 MIC และ 4 MIC มีค่าเท่ากับ 0.313, 0.626 และ 1.252% (v/v) และความเข้มข้นของน้ำส้มควันไม้ 1 MIC 2 MIC และ 4 MIC มีค่าเท่ากับ 6.25, 12.5 และ 25% (v/v) แล้วเพาะเชื้อรา *Aspergillus* (SR9), *Penicillium* (TT04) และ *Fusarium* (MT05) ลงบนยางพาราแผ่นโดยใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่ 1×10^6 ถึง 5×10^6 spores/ml ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำยางพาราแผ่นไปเก็บไว้ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80% และที่ความชื้นสัมพัทธ์บรรยากาศห้อง (เฉลี่ย 70.7%) บ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองดังตารางที่ 14 และ 15 ซึ่งพบว่ายางพาราแผ่นที่จุ่มด้วยโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ไม่มีการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ชนิด จนถึงวันที่ 7

Joseph และ Akinyosoye (1996) รายงานว่ามีการใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 0.2% และ 0.8% เป็นสารถนอมอาหารใน African soft cheese ที่ความเข้มข้น 0.2% โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus*, *Mucor*, *Brettanomyces* sp. และ *Rhodotorula* sp. และที่ความเข้มข้น 0.8% สามารถยับยั้ง *A. flavus*, *Mucor cacosmosus*, *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Brettanomyces* sp. และ *Rhodotorula* sp. จากงานวิจัยนี้พบว่าสารโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต้องใช้ในปริมาณที่มากกว่าคือความเข้มข้น 5% (w/v) แต่เนื่องจากการป้องกันการเชื้อราในยางพาราแผ่น ดังนั้นความเข้มข้นที่สูงในระดับนี้จึงไม่เป็นผลต่อความปลอดภัยในระดับเข้มงวดอย่างการควบคุมปริมาณสารโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ในอาหาร

เมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะซิติกที่ทุกความเข้มข้น 0.313, 0.626 และ 1.252% (v/v) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus* (SR9) และ *Fusarium* (MT05) ได้เป็นเวลา 2 วัน และ 4 วัน ตามลำดับ ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80% และที่ความชื้นสัมพัทธ์ห้อง (เฉลี่ย 70.7%) สำหรับที่ความเข้มข้น 0.626% (v/v) และ 1.252% (v/v) กรดอะซิติกสามารถยับยั้ง *Fusarium* (MT05) ได้จนถึงวันที่ 7 ในชุดการทดลองที่เก็บยางพาราแผ่นไว้ที่ความชื้นสัมพัทธ์ห้อง ซึ่งในชุดควบคุมพบว่าเชื้อ *Fusarium* (MT05) มีการเจริญตั้งแต่วันที่ 2 ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80% แต่ในชุดการทดลองที่เก็บยางพาราแผ่นไว้ที่ความชื้น

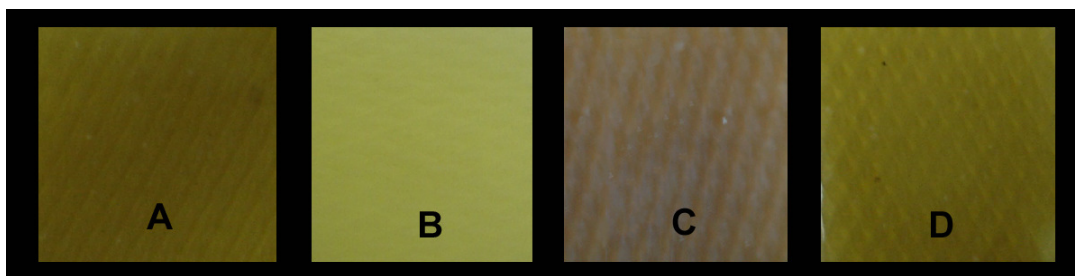
สัมพัทธ์ห้อง (เฉลี่ย 70.7%) ที่อุณหภูมิห้อง (เฉลี่ย 27.3°C) พบการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* (MT05) ในวันที่ 4

ในส่วนของน้ำส้มควันไม้ไผ่ความเข้มข้น 25% (v/v) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus* (SR9) และ *Fusarium* (MT05) ได้ 6 และ 7 วัน ที่ความชื้นสัมพัทธ์ห้อง (เฉลี่ย 70.7%) ส่วนความเข้มข้น 12.5% (v/v) ควบคุมการเจริญของ *Fusarium* (MT05) ได้ 4 วัน และที่ความเข้มข้น 6.25% (v/v) ยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus* (SR9) ได้ 2 วัน สำหรับยางพาราแผ่นที่เก็บไว้ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80% ทุกความเข้มข้นของน้ำส้มควันไม้มีผลยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus* (SR9) ได้ 2 วัน เมื่อเปรียบเทียบชุดควบคุมที่ไม่ได้หุบสารยับยั้งเชื้อรา (positive control) ที่พบว่ามีการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* (SR9) และ *Fusarium* (MT05) ได้ตั้งแต่วันที่ 3 และวันที่ 2 ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *Penicillium* (TT04) นั้นในชุดทดสอบพบการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่นในวันที่ 7 ซึ่งมีการเจริญเพียงเล็กน้อยเท่านั้นในชุดควบคุม (positive control) ที่เก็บยางพาราแผ่นไว้ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80% และ ที่ความชื้นสัมพัทธ์บรรยากาศห้อง (70.7%)

ถึงแม้ว่าโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 5% (w/v) (1 MIC) จะสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อราได้ แต่เมื่อมีการทดลองซ้ำพบว่าหากสภาพบรรยากาศในช่วงที่ทำการทดลองมีความชื้นสัมพัทธ์สูงในช่วงที่มีฝนตกหนักติดต่อกัน จะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ เนื่องจากในช่วงฝนตกลงมาทำให้ความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิของบรรยากาศห้องอยู่ในช่วงประมาณ 82-99% และ 26-27°C จากปัญหาของปัจจัยจากสภาพแวดล้อมภายนอกที่ควบคุมได้ยาก น่าจะมีผลส่งเสริมช่วยให้เชื้อราสามารถเจริญได้ ในขณะที่เดียวกันพบว่าที่ความเข้มข้น 10% (w/v) (2 MIC) มีประสิทธิภาพมากกว่าที่ความเข้มข้น 5% (w/v) ที่ความชื้นสัมพัทธ์สูง (ประมาณ 82-99%) เพราะยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ดังนั้นโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 10% (w/v) น่าจะเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด

นอกจากนี้ในเรื่องของการยับยั้งเชื้อราบนยางพาราแผ่นแล้ว ยังพบว่ายางพาราแผ่นที่ผ่านการหุบด้วยสารโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์มีสีขาวมากกว่ายางพาราแผ่นที่หุบด้วยกรดอะซิติกและน้ำส้มควันไม้ (ภาพที่ 27) เนื่องจากโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์มีฤทธิ์ในการฟอกสีของยางด้วย เช่นเดียวกับที่มีรายงานวิจัยของ Aubourg และคณะ (2007) ที่ได้ศึกษาการป้องกันการเกิดสีคล้ำโดยใช้สารโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ความเข้มข้น 0.5% ในการถนอมอาหารป้องกันการเกิดสีคล้ำในกุ้งทำให้กุ้งมีสีขาวยิ่งขึ้น นอกจากนี้ Brennan และคณะ (1999) รายงานว่าค่าการฟอกสีในเห็ดระหว่างความเข้มข้น 1-4 g/l หรือ 0.1-0.4% (w/v) ของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับเห็ดที่แช่ในน้ำ พบว่ามีระดับความ

ขาวไม่แตกต่างกัน ซึ่งในงานวิจัยนี้จะพบว่าระหว่างชุดควบคุมที่จุ่มน้ำ กับที่จุ่มสาร โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ให้สีของยางพาราแผ่นแตกต่างกัน ดังภาพที่ 28 และสำหรับความเข้มข้นของ โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์กับสีของยางพาราแผ่นสอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้นที่เปรียบเทียบสีของเห็ดเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์พบว่าไม่มีสีไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกันเมื่อชุบยางพาราแผ่นกับ โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20% (w/v) ก็ไม่พบความแตกต่างของระดับความขาวของยางพาราแผ่นเช่นกัน



ภาพที่ 27 การเปรียบเทียบสีของยางพาราแผ่นเมื่อชุบสารยับยั้งเชื้อราชนิดต่างๆ

A = ชุดควบคุม (น้ำ)

B = โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์

C = น้ำส้มควันไม้

D = กรดอะซิติก

Figure 27. Comparison of color of para rubber sheets dipping with different antifungal agents.

A = Control (water)

B = Sodium metabisulphite

C = Bamboo smoked acid

D = Acetic acid

ตารางที่ 14 การเจริญของ *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Fusarium* บนยางพาราแผ่นที่จุ่มด้วยสารยับยั้งเชื้อราชนิดต่างๆ ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80%

Table 14. Growth of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* on para rubber sheets dipping with different antifungal agents at 80% relative humidity.

Antifungal agents	Concentration	<i>Aspergillus</i> (SR9)							<i>Penicillium</i> (TT04)							<i>Fusarium</i> (MT05)							Negative control **						
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
Acetic acid	0.313% (v/v)	-	-	±	±	±	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	0.626% (v/v)	-	-	±	±	±	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	1.252% (v/v)	-	-	±	±	±	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
Sodium	5% (w/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
metabisulphite	10% (w/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	15% (w/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Smoked acid (bamboo)	6.25% (v/v)	-	-	±	±	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	12.5% (v/v)	-	-	±	±	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	25% (v/v)	-	-	±	±	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
Positive control *		-	-	±	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	±	-	±	±	+	+	+	+							

d = day , - = No growth, ± = Little visible fungal growth, + = Heavy visible fungal growth

* no antifungal agent

** no fungal spore (distilled water)

ตารางที่ 15 การเจริญของ *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Fusarium* บนยางพาราแผ่นที่จุ่มด้วยสารยับยั้งเชื้อราชนิดต่างๆ ที่ความชื้นสัมพัทธ์ห้อง (70.7%RH)

Table 15. Growth of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* on para rubber sheets dipping with different antifungal agents at room relative humidity (70.7%RH).

Antifungal agents	Concentration	<i>Aspergillus</i> (SR9)							<i>Penicillium</i> (TT04)							<i>Fusarium</i> (MT05)							Negative control **						
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
Acetic acid	0.313% (v/v)	-	-	±	±	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-
	0.626% (v/v)	-	-	±	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.252% (v/v)	-	-	±	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sodium metabisulphite	5% (w/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10% (w/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15% (w/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Smoked acid (bamboo)	6.25% (v/v)	-	-	±	±	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	12.5% (v/v)	-	-	±	±	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-
	25% (v/v)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Positive control *		-	-	±	±	+	+	+	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	±	+	+	+							

d = day , - = No growth, ± = Little visible fungal growth, + = Heavy visible fungal growth

* no antifungal agent

** no fungal spore (distilled water)

6.2 ผลการเติมสารยับยั้งในระหว่างการทำยางพาราแผ่น

การศึกษาการเติมสารยับยั้งเชื้อราโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ที่ความเข้มข้น 2 เท่าของ MIC [2 MIC=10% (w/v)] ในขั้นตอนการตกตะกอนยางของการทำยางพาราแผ่น พบว่าสารโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ในความเข้มข้น 10% (w/v) เป็นระดับความเข้มข้นที่สูงทำให้ต้องใช้ปริมาณของสารยับยั้งมากตามไปด้วย และเมื่อเทียบกับวิธีการแบบจุ่มต้องใช้สารในปริมาณที่สูงกว่ามาก เพราะยาง 1 แผ่นตกตะกอนยางด้วยตะกอนชาวบ้าน ใช้ปริมาตรของน้ำและน้ำยางรวมทั้งหมด 6,570 มิลลิลิตร (ยังไม่รวมปริมาตรของน้ำกรด) ซึ่งจะต้องใช้สารโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์มากถึง 657 กรัม/1 แผ่น ซึ่งเป็นปริมาณที่มากเกินไป ไม่เหมาะจะนำมาตกตะกอนได้ แต่ในการทดลองในขั้นตอนนี้จึงได้ลดสัดส่วนลงครึ่งหนึ่ง โดยการลดจำนวนน้ำและน้ำยางลงจาก 2,290 และ 4,280 มิลลิลิตร เป็น 1,245 และ 2,140 มิลลิลิตรตามลำดับ รวมไปถึงสารยับยั้งในการตกตะกอนผสมลงไป ในขั้นตอนการทำยางพาราแผ่นจึงต้องลดจำนวนลงครึ่งหนึ่งเป็น 328.5 กรัม/1 แผ่น จากนั้นจึงรอให้น้ำยางจับตัวกัน ซึ่งโดยปกติยางจะตกตะกอนจับตัวเป็นน้ำยางใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง แต่ปรากฏว่ายางไม่จับตัวกันภายในเวลาที่ควรจะเป็น เมื่อตั้งทิ้งไว้เพื่อปล่อยให้ น้ำยางจับตัวกันเป็นเวลา 1 คืน พบว่าน้ำยางยังไม่จับตัวกัน ในการศึกษาการเติมสารยับยั้งเชื้อราในน้ำยางจึงไม่เป็นผล ดังนั้นจึงไม่มียางพาราแผ่นเพื่อนำมาทดสอบกับเชื้อราในห้องปฏิบัติการต่อไปได้ ประกอบกับการใช้สารในปริมาณที่มากเกินไปจึงไม่คุ้มกับการจะนำมาทำการศึกษาต่อไป

6.3 Natural infection

จากผลการทดลองในข้อ 6.1 ซึ่งพบว่าโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ที่ความเข้มข้น 10% (w/v) เป็นสารที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดจึงนำมาศึกษาถึงประสิทธิภาพการยับยั้งต่อไป โดยการนำยางพาราแผ่นที่สัมผัสกับสารยับยั้งโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ที่ความเข้มข้น 10% (w/v) ด้วยการจุ่ม แล้วศึกษาการยับยั้งของเชื้อราต่อโดยการไม่เพาะเชื้อราบนยางพาราแผ่น แต่เป็นการปล่อยให้เชื้อราเจริญตามธรรมชาติ (natural infection) แล้วสังเกตการเจริญของเชื้อรา 7 วัน, 15 วัน และ 30 วัน เปรียบเทียบกับแผ่นยางที่ไม่ได้สัมผัสสารยับยั้ง ซึ่งผลที่ได้พบว่าที่ความชื้นสัมพัทธ์ห้อง (ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 73.4%) อุณหภูมิห้อง (เฉลี่ย 29.2 °C) มีการเจริญของเชื้อราที่วางไว้ในสภาวะธรรมชาติเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ยางพาราแผ่นสัมผัสกับอากาศภายนอกโดยตรง) (ตารางที่ 17) อาจเป็นเพราะได้ตากยางพาราแผ่นไว้ในบริเวณที่มีโอกาสปนเปื้อนของเชื้อราได้ง่าย (ตากไว้ในระดับต่ำสูงจากพื้นประมาณ 10 เซนติเมตร) การที่ตากยางพาราแผ่นไว้ในภายนอก ยังเพิ่มโอกาสการสัมผัสกับสปอร์ของเชื้อราจากภายนอกอยู่ตลอด

เวลา นอกจากนี้บรรยากาศภายนอกยังทำให้มีการเจริญของเชื้อราซึ่งเป็นจุลชีวบนยางพาราแผ่นในวันที่ 5 สำหรับยางพาราแผ่นที่เก็บไว้ในกล่องพลาสติกใสพบว่าไม่มีการเจริญของเชื้อราจนถึงวันที่ 30 (ตารางที่ 16)

เมื่อเปรียบเทียบกับสารทางการค้าในท้องตลาดคือ ไฮโปฮิปโป (Hipo Hippo®) พบว่าโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเนื่องจากที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80% พบว่าสารทางการค้ามีการเจริญของเชื้อราตั้งแต่วันที่ 2 ในขณะที่โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 10% (w/v) ไม่มีการเจริญของเชื้อรา (ตารางที่ 17) ดังนั้นสารยับยั้งเชื้อราโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ที่ความเข้มข้น 10% (w/v) สามารถป้องกันการเจริญของเชื้อราได้ประมาณ 4 วันที่สภาวะธรรมชาติ และถ้าเก็บในกล่องพลาสติกใสสามารถเก็บไว้ได้นาน 30 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาในการป้องกันการเจริญของเชื้อราของผลผลิตอื่นกับสารต่างชนิด เช่น การใช้โซเดียมไบคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 2% ลดการเจริญของเส้นใยของ *Alternaria alternate*, *Fusarium spp.* และ *Rhizopus stolonifer* บนผลเมลอนที่มีการเคลือบด้วยแว็กซ์โดยเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 3°C เป็นเวลา 14 วัน และที่ 20°C เป็นเวลา 4 วัน จากการที่สามารถยับยั้งได้นานถึง 14 วันเนื่องจากเก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำถึง 3°C (Aharoni *et al.*, 1997) ในขณะที่งานวิจัยนี้เก็บยางพาราแผ่นไว้ที่อุณหภูมิทั่วไปซึ่งมีค่าสูงกว่าและเป็นอุณหภูมิที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรามากกว่า ยิ่งไปกว่านั้นผลเมลอนมีการเคลือบด้วยแว็กซ์ จึงทำให้โอกาสยืดยาดและเข้าทำลายบนผลเมลอนของเชื้อราในอากาศลดลงด้วย ซึ่งต่างจากการเก็บยางพาราแผ่นในงานวิจัยนี้ที่ไม่มีการห่อหุ้มยางพาราแผ่นแต่อย่างใด จึงทำให้ยังพบการเจริญของเชื้อราได้

นอกจากนี้ได้ทำการวิจัยเพิ่มเติมโดยได้ศึกษาถึงวิธีการและระยะเวลาในการสัมผัสกับสารยับยั้งเชื้อรากับยางพาราแผ่นต่อสารโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 10% (w/v) ระหว่างวิธีการจุ่มกับการแช่สารที่ระยะเวลาต่างกัน (แช่ยางพาราแผ่นกับสารยับยั้งเป็นเวลา 5, 10, 15 และ 30 นาที) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่นได้เหมือนกัน วิธีการจุ่มจึงเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วกว่าเมื่อนำไปปฏิบัติจริง และพบว่าชนิดสารยับยั้งระหว่าง analytical grade และ commercial grade สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ไม่แตกต่างกัน (ไม่ได้แสดงผลการทดลองในที่นี้) ดังนั้นความเป็นไปได้ในการจะนำไปใช้จริงก็มีมากขึ้น ในอนาคตถ้ามีเกษตรกรนิยมนำสารชนิดนี้ไปใช้กันอย่างแพร่หลาย ราคาของสารโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ก็อาจจะราคาถูกลงกว่าเดิมซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตยางพาราแผ่นที่มีคุณภาพมากขึ้น ในส่วนของยางพาราแผ่นเมื่อผ่านการใช้สารโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราแล้วนั้นจะมีสีขาวลักษณะคล้ายขางไม่สุก ในที่นี้ยังไม่ได้ทำการสำรวจในส่วนของการยอมรับในการซื้อขายในตลาดกลางยางพาราว่าจะมีการยอมรับมาก

น้อยเพียงใด ตลอดจนในส่วนของผลทางกายภาพภายนอกในเรื่องของสียางพาราเปลี่ยนไปทำให้ยางพาราแผ่นมีสีขาวนั้น ยังไม่อาจทราบว่าการใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟด์มีผลกระทบต่อลักษณะภายในของโมเลกุลยางหรือมีการทำให้คุณสมบัติของยางพาราแผ่นเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่ เนื่องจากในงานวิจัยนี้ไม่ได้พิสูจน์ถึงคุณสมบัติของยางหลังจากผ่านการจุ่มสารยับยั้งเชื้อราชนิดนี้

ตารางที่ 16 ประสิทธิภาพของสารยับยั้งเชื้อราบนยางพาราแผ่นโดยการไม่เพาะสปอร์ของเชื้อรา (natural infection) ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80% และอุณหภูมิห้อง (29.2°C)

Table 16. Effect of antifungal agents on para rubber sheets by non fungal spore inoculation (natural infection) at 80% relative humidity and room temperature (29.2°C).

Antifungal agents	Methods	Natural infect								
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	15d	30d
Sodium metabisulphite	Dipping	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[2MIC=10% (w/v)]	Soak 15 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipo Hippo®*	Soak 15 min	-	±	±	+	+	+	+	+	+
Control (H ₂ O)		-	±	+	+	+	+	+	+	+

d = day, - = No growth, ± = Little growth, += Heavy growth

* Concentration used as recommended by the manufacturer [~ 1.5% (w/v)]

ตารางที่ 17 ประสิทธิภาพของสารยับยั้งเชื้อราบนยางพาราแผ่นโดยการไม่เพาะสปอร์ของเชื้อรา (natural infection) ที่ความชื้นสัมพัทธ์ห้อง (73.4%RH) และอุณหภูมิห้อง (29.2°C)

Table 17. Effect of antifungal agents on para rubber sheets by non fungal spore inoculation (natural infection) at room relative humidity (73.4%) and room temperature (29.2°C).

Antifungal agents	Methods	Natural infect								
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	15d	30d
Sodium metabisulphite	Dipping	-	-	-	-	±	±	±	+	+
[2MIC=10% (w/v)]	Soak 15 min	-	-	-	-	±	±	±	+	+
Hipo Hippo®*	Soak 15 min	-	-	-	±	±	±	±	+	+
Control (H ₂ O)		-	-	-	±	±	±	±	+	+

d = day, - = No growth, ± = Little growth, += Heavy growth

* Concentration used as recommended by the manufacturer [~ 1.5% (w/v)]

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างขางพาราแผ่นที่มีเชื้อราปนเปื้อนจากเกษตรกรในภาคใต้ทางฝั่งทะเลตะวันตกและทางฝั่งทะเลตะวันออก จำนวน 13 แห่ง และทำการตรวจวัดสภาพแวดล้อมบริเวณตากขางพบว่าความชื้นสัมพัทธ์มีค่าตั้งแต่ 52.1 % ถึง 74.2 % อุณหภูมิอยู่ในช่วง 28-31 องศาเซลเซียส ความเร็วลม 0.0-5.0 Km/h เมื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบบนขางพาราแผ่นพบว่า มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 0.032-1.225 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำตาลทั้งหมด 0.127-1.130 มิลลิกรัมต่อกรัม และน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วง 0.015-0.175 มิลลิกรัมต่อกรัม เมื่อแยกเชื้อราบนขางพาราแผ่นสามารถแยกเชื้อราได้ 150 ไอโซเลต ประกอบด้วย *Aspergillus* spp. 47 ไอโซเลต (31.3%), *Penicillium* spp. 35 ไอโซเลต (23.3%), *Fusarium* spp. 32 ไอโซเลต (21.3%), *Cladosporium* spp. 8 ไอโซเลต (5.3%), *Rhizopus* sp. 4 ไอโซเลต (2.7%), *Mucor* sp. 2 ไอโซเลต (1.3%), *Geotrichum* sp. 2 ไอโซเลต (1.3%), *Trichoderma* sp. 2 ไอโซเลต (1.3%), *Tritirachium* sp. 1 ไอโซเลต (0.7%) และ unidentified 17 ไอโซเลต (11.3%) โดยส่วนใหญ่แล้วเชื้อราที่พบบนขางพาราแผ่นเป็นชนิดเดียวกันกับเชื้อราที่ตรวจพบในอากาศ คือ *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Cladosporium* spp. และเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์เมื่อส่งตัวอย่างตรวจหาลำดับเบสและจำแนกชนิดของเชื้อราโดยวิธีทางชีวโมเลกุลพบว่า เป็นเชื้อรา *Daldinia eschscholzii* และ *Schizophyllum commune*

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นด้วยวิธี hyphal extension-inhibition assay โดยนำเชื้อราที่แยกได้จากขางพาราแผ่นจำนวน 27 ไอโซเลต ซึ่งเป็นเชื้อราที่พบบ่อยบนขางพาราแผ่น มาทดสอบฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นกับสารเคมีที่เป็นสารยับยั้งเชื้อรา 12 ชนิด พบว่า สารที่ยับยั้งในเบื้องต้นคือ โปแทสเซียมซอร์เบท โปแทสเซียมเบนโซเอต โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ กรดอะซิติก ที่ความเข้มข้น 10% (w/v) หรือ (v/v) และน้ำส้มควันไม้ไฟความเข้มข้น 100% (v/v) จากนั้นนำสารทั้ง 5 ชนิดที่ได้ไปทดสอบหาค่า MIC และ MFC กับเชื้อราทั้ง 27 ไอโซเลต (*Aspergillus* spp. 10 ไอโซเลต, *Penicillium* spp. 6 ไอโซเลต, *Fusarium* spp. 4 ไอโซเลต, *Cladosporium* spp. 3 ไอโซเลต, *Rhizopus* spp. 2 ไอโซเลต, *Mucor* sp. 1 ไอโซเลต และ *Geotrichum* sp. 1 ไอโซเลต) โดยเตรียมเชื้อราให้มีปริมาณความเข้มข้นของสปอร์ตั้งต้น 10^6 spores/ml บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า MIC ของกรดอะซิติก โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ โปแทสเซียมซอร์เบท โปแทสเซียมเบนโซเอต และน้ำส้มควันไม้ไฟ มีค่าอยู่ในช่วง 0.039-0.313% (v/v), <0.0195-5% (w/v), 0.039-10%

(w/v), 0.156-10% (w/v) และ 1.563-25% (v/v) ตามลำดับ และค่า MFC อยู่ในช่วงระหว่าง 0.078-0.625% (v/v), 0.0195-10% (w/v), 0.039- >10% (w/v), 0.313-10% (w/v) และ 1.563-25% (v/v) ตามลำดับ ซึ่งสารยับยั้งเชื้อราที่พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่นได้ดีคือ กรดอะซิติกและโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *Aspergillus* ไอโซเลต SR9 มีความคงทนต่อสารยับยั้งที่สุด

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่น พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90% เชื้อราเจริญได้ดี แต่ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 57% พบว่ามีการเจริญของเชื้อราได้ แต่เจริญได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อศึกษาร่วมกันระหว่างอุณหภูมิกับความชื้นสัมพัทธ์ ที่อุณหภูมิ 37°C ต่อความชื้นสัมพัทธ์ 80% เริ่มมีการเจริญของเชื้อราในวันที่ 3 และเมื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อราของสารเคมี โดยการศึกษาผลความเข้มข้นของสารยับยั้งต่อยางพาราแผ่นพบว่าโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 5% (w/v) (1 MIC) เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่ากรดอะซิติกและน้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ ซึ่งการศึกษาวิธีการและระยะเวลาสัมผัสกับสารโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 10% (w/v) กับยางพาราแผ่นระหว่างวิธีการจุ่มกับการแช่สารที่ระยะเวลาต่างกัน พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่นได้เหมือนกัน วิธีการจุ่มจึงเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วกว่าเมื่อนำไปปฏิบัติจริง แต่ในขั้นตอนการเติมสารยับยั้งเชื้อราลงในระหว่างการทำยางพาราแผ่นนั้นพบว่าใช้สารยับยั้งในปริมาณมากเกินไปทำให้ยางไม่สามารถจับตัวและตกตะกอนเป็นยางพาราแผ่นได้ และเมื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราต่อโดยการปล่อยให้เชื้อราเจริญเองโดยไม่ได้เพาะสปอร์ของเชื้อราลงบนยางพาราแผ่น (Natural infection) พบว่ามีการเจริญของเชื้อราที่วางไว้ในสภาวะธรรมชาติเพียงเล็กน้อยในวันที่ 5 สำหรับยางพาราแผ่นที่เก็บไว้ในกล่องใสไม่มีการเจริญของเชื้อราใดๆ ในวันที่ 7 เมื่อเปรียบเทียบกับสารทางการค้าในท้องตลาดคือ ไฮโปฮิปโป (Hipo Hippo®) พบว่าสารโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์มีประสิทธิภาพที่ดีกว่า ซึ่งเมื่อเก็บยางพาราแผ่นที่ชุบด้วยโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 10% (w/v) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สภาวะธรรมชาติ (ยางพาราแผ่นสัมผัสกับอากาศภายนอกโดยตรง) ได้ 4 วัน และเมื่อเก็บในกล่องใส สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ถึง 30 วัน

ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาถึงการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่น ในโอกาสต่อไปอาจศึกษาถึงการผสมของสารยับยั้งต่างๆที่มีประสิทธิภาพดีในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อเป็นประโยชน์ในการควบคุมการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่นต่อไปได้
2. ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อราของสารเคมี ในขั้นตอนที่มีการเติมสารยับยั้งเชื้อราลงไปขั้นตอนระหว่างการทำยางพาราแผ่น (การตกตะกอนยาง) หากศึกษาการลดปริมาณของสารโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ลง อาจจะได้ข้อมูลเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้
3. จากการศึกษาความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อราบนยางพาราแผ่น ในการทดลองนี้ได้ใช้ความเข้มข้น MIC จากเชื้อที่คงทนที่สุดคือ *Aspergillus* (SR9) หากมีการศึกษาในการเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซิติก และน้ำส้มควันไม้ อาจจะสามารถให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดีขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- กรมอุตุนิยมวิทยา 2551ก. ความชื้นสัมพัทธ์ (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://www.tmd.go.th/info/knowledge_weather02_n.html (13 มกราคม 2551)
- กรมอุตุนิยมวิทยา. 2551ข. อุณหภูมิ ความชื้น ความเร็วลม (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <http://www.weather.go.th/service/service.php> (11 มีนาคม 2551)
- คณะผู้จัดทำภาควิชาจุลชีววิทยา. 2544. คู่มือปฏิบัติการ molds and yeasts 321-361. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- จักรี เลื่อนราม และ สุรศักดิ์ สุทธิสงค์. 2536. ว. ข้าวทองนึ่งสงเคราะห์การทำสวนยาง. 124 : 19-22.
- ชอบ บุญช่วย. 2541. การบำบัดน้ำเสียจากการทำยางพาราแผ่น โดยระบบไม่ใช้ออกซิเจน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 5-10.
- ต่อสู โตรักษา. 2536. โรงอบรมยาง. ว.ข้าวสวนยาง. 122: 28-31.
- ทิศทางการผลิตและการส่งออกยางธรรมชาติแปรรูปของไทย (ออนไลน์). 2548. สืบค้นจาก : http://www.xaap.com/thai/resource/article/main_list_article.asp?catid=512&rid=9977 (23 พฤษภาคม 2548)
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2541. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. พิมพ์ครั้งที่ 2. หน้า 323-325.
- นุชนาฏ ณ ระนอง. 2541. ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์จากน้ำยางธรรมชาติ. สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- นภาพรรณ เลขะวิวัฒน์, รัชณี รัตนวงศ์ และ อนุสรณ์ แรมลี. 2008. การศึกษาชีวเคมีของยางพันธุ์แลกเปลี่ยนระหว่างประเทศในเขตภูมิอากาศที่ 1 (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <http://www.rubberthai.com/research/year/44/5.htm> (2 มีนาคม 2551)
- นวลจิรา ภัทรรังรอง และ วราภรณ์ วุฑฒะกุล. 2538. ราวิทยาการแพทย์. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 2-5.
- น้ำส้มควันไม้ (ออนไลน์). 2548. สืบค้นจาก : <http://www.rta.mi.th/23000u/golden/Wood%20Vinegar.htm> (14 กันยายน 2548)
- พิชัย เจริญราษฎร์. 2538. ผลของความเข้มข้นของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อระบบบำบัดน้ำเสียโดยวิธีชีววิทยาแบบใช้อากาศ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

- ยางพาราและผลิตภัณฑ์ยาง (ออนไลน์). 2548. สืบค้นจาก : http://www.thaifita.com/ascn_rubber.doc (23 พฤษภาคม 2548)
- วารสารณ์ ขจรไชยกูล. 2524. คุณสมบัติและส่วนประกอบของน้ำยางธรรมชาติ. ว.ยางพารา. 2 : 19-27.
- ศรีัญญา ตุกชูแสง. 2548. โปรีตีนก่อภูมิแพ้ในถุงมือยาง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 49.
- ศิวาพร ศิวเวทช. 2520. วัตถุเจือปนในอาหาร. เอกสารการบรรยายวิชา วทอ.578. ภาควิชา- วิทยาศาสตร์การอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สถิตย์พันธ์ ชนมสถิตย์. 2537. คู่มือกำกับกรรมวิธีการผลิตในโรงงานอบ/รมยาง. กองพัฒนาการผลิตและการตลาด ฝ่ายพัฒนาสวนสงเคราะห์ สำนักงานกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง.
- สุรศักดิ์ สุทธิสงค์. 2532. วิทยาศาสตร์ของน้ำยางธรรมชาติ. เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการ. สถาบันวิจัยยาง. หน้า 5.
- เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรัมย์. 2546. การผลิตยางธรรมชาติ. ภาควิชาเทคโนโลยียางและพอลิเมอร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Abdel-Mallek, A. Y., El-Maraghy, S. S. M. and Hasan, H. A. H. 1993. Mycotoxin-producing potential of some *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* isolates found on corn grains and sunflower seeds in Egypt. J. Islamic Acad. Sci. 6 : 189-192.
- Abdullah, N., Nawawi, A. and Othman, I. 2000. Fungal spoilage of starch-based foods in relation to its water activity (a_w). J. Stored Prod. Res. 36 : 47-54.
- Aharoni, Y., Fallik, E., Copel, A., Gil, M., Grinberg, S. and Klein, J. D. 1997. Sodium bicarbonate reduces postharvest decay development on melons. Postharvest Biol. Tec. 10 : 201-206.
- Allaire, R.A., Baca, A. S., Chien, C.K., Powell-Johnson, A.M., Schissel, D. N, Sever, E. J., Shi, Y., 2005 . Two-layer Protective Coating System for LCD Glass. (Online) Available [http:// appft1.uspto.gov/netacgi/nph](http://appft1.uspto.gov/netacgi/nph) (2005. July 3)
- A.O.A.C. 1990. Official Method of Association of Analysis of the Association of Official Analysis Chemists. 5th ed. Inc. Arlinton, Verginia.

- Aubourg, S. P., Losada, V., Prado, M. Miranda, J. M. and Barros-Velázquez, J. 2007. Improvement of the commercial quality of chilled Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) stored in slurry ice: Effects of a preliminary treatment with an antimelanogenic agent on enzymatic browning. *Food Chem.* 103 : 741-748.
- BCCDC Laboratory Services. 2003. A Guide to Selection and Use of Disinfectants. The British Columbia Centre for Disease Control. p. 8.
- Beilen, J. V., Poirier, Y., and Orts, B. 2006. Alternative sources of natural rubber, EPOBIO, University of York, CPL Press, Berks RG14 1RZ, UK, p iii-11.
- Bhatt, R., Shah, D., Patel, K. C. and Trivedi, U. 2007. PHA-rubber blends: Synthesis, characterization and biodegradation. *Bioresource Technol.* (In Press).
- Biggs, A. R., El-Kholi, M. M., El-Neshawy, S. and Nickerson, R. 1997. Effects of calcium salts on growth, polygalacturonase activity, and infection of peach fruit by *Monilinia fructicola*. *Plant Dis.* 81 : 399-403.
- Biggs, A.R. 1999. Effects of Calcium salt on apple bitter rot caused by two *Collectotrichum* spp. *Plant Dis.* 83 : 1001-1005.
- Borel, M., Kergomard, A., Renard, M. F. 1982. Degradation of natural rubber by Fungi Imperfecti. *Agr. Biol. Chem. Tokyo.* 46 : 877-881.
- Brennan, M. Port, G. L. Pulvirenti, A. and Gormley, R. 1999. The effect of sodium metabisulphite on the whiteness and keeping quality of sliced mushrooms. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 32 : 460-463.
- Brock, M., Fischer, R., Linder, D. and Buckel, W. 2000. Methylcitrate synthase from *Aspergillus nidulans*: implications for propionate as an antifungal agent. *Mol. Microbiol.* 35 : 961-973.
- Chang, J. C. S., Foarde, K. K. and Vanosdell, D. W. 1995. Growth evaluation of fungi (*Penicillium* and *Aspergillus* spp.) on ceiling tiles. *Atmos. Environ.* 29 : 2331-2337.
- Chew, G. L., Douwes, J., Doekes, G., Higgins, K. M., Strien, R. V., Spithoven, J. and Brunekreef, B. 2001. Fungal Extracellular polysaccharides, $\beta(1\rightarrow3)$ -glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust. *Indoor Air.* 11 : 171-178.

- Clausen C. A. and Yang V. W. 2003. Mold inhibition on unseasoned southern pine. *In* Paper prepared for the 34th Annual meeting: The international research group on wood preservation. Brisbane, Australia. 23-18 May 2003. IRG/WP 03-10465.
- Collier, P. F. 1996. Rubber. A division of newfield publications, Inc. (Online). Available <http://www.slac.com/tree/reseach/styrene/rubber.html> (2006. July 30)
- Combina, M., Dalcero, A. M., Varsavsky, E., Chulze, S. 1999. Effects of food preservatives on *Alternaria alternata* growth and tenuazonic acid production. *Food Addit. Contam.* 16 : 433-437.
- Coppock, J. B. M. and Cookson, E. D. 1951. The effect of humidity on mould growth on constructional materials. *J. Sci. Food Agr.* 2 : 534-537.
- Cornish, K. (2001) Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. *Phytochemistry.* 57 : 1123-1134.
- CLSI/NCCLS. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard M38-A. Wayne Pennsylvania USA.
- Davis, N. D., Wagener, R. E., Morgan-Jones, G. and Diener, U. L. 1975. Toxigenic thermophilic and thermotolerant fungi. *Appl. Microbiol.* 29 : 455-457.
- Deacon, J. W. 1997. *Modern Mycology*. 3rd ed. Blackwell science. University Press, Cambridge.
- Doboys, M., Gilles, K.A., Hamiton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substraces. *Anal. Chem.* 28 : 350-356.
- Droby, S., Wisniewski, M., Ghaouth, A. E. and Wilson, C. 2003. Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. *Postharvest Biol. Tec.* 27 : 127-135.
- Ejechi, B. O., Nwafor, O. E. and Okoko, F. J. 1999. Growth inhibition of tomato-rot fungi by phenolic acids and essential oil extracts of pepperfruit (*Dennetia tripetala*). *Food Res. Int.* 32 : 395-399.
- Espinel-InGroff, A., Bartlett, M., Bowden, R., Chin, N. X., Cooper, C., Fothergill, JR., McGinnis, M. R., Menezes, P., Messer, S. A., Nelson, P. W., Odds, F. C., Pasarell, L., Peter, J., Pfaller, M. A., Rwx, J. H., Rinaldi, M. G., Shanklnd, G. S., Walsh, T. J. and Weitzman, I. 1996. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol.* 35 : 139-143.

- Esuruoso, O. F. 1970. Fungi that cause mouldiness of processed sheet rubber in western Nigeria. *Mycopath. Mycol. Appl.* 42 : 187-189.
- Ferreira, V. S., Rêgo, I. N. C., Jr, F. P., Mandai, M. M., Mendes, L. S., Santos, K. A. M., Rubim, J. C. and Suarez, P. A. Z. 2005. The use of smoke acid as an alternative coagulating agent for natural rubber sheets' production. *Bioresource Technol.* 96 : 605-609.
- Franzolin, M. R., Gambale, W., Cuero, R. G. and Correa, B. 1999. Interaction between toxigenic *Aspergillus flavus* Link and mites (*Tyrophagus putrescentiar* Schrank) on maize grains: effects on fungal growth and aflatoxin production. *J. Stored Prod. Res.* 35 : 215-224.
- Gao, L., Sun, M. H., Liu, X. Z. and Che, Y. S. 2007. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycol. Res.* 3 : 87-92.
- Gehrt, A., Peter, J., Pizzo, P. A. and Walsh, T. J. 1995. Effect of increasing inoculum sizes of pathogenic filamentous fungi on MICs of antifungal agents by broth microdilution method. *J. Clini. Microbiol.* 33 : 1302-1307.
- Gock, M. A., Hocking, A. D., Pitt, J. I. and Poulos, P. G. 2003. Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 2481 : 11-19.
- Gonçalves A. B., Paterson, R.-Russell. M. and Lima, N. 2006. Survey and significance of filamentous fungi from tap water, *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 209 : 257-264.
- Guynot, M. E., Ramos, A. J., Sala, D., Sanchis, V. and Marín, S. 2002. Combined effects of weak acid preservatives, pH and water activity on growth of *Eurotium* species on a sponge cake. *Int. J. Food Microbiol.* 76 : 39-46.
- Guynot, M.E., Ramos, A.J., Sanchis, V. and Marín, S. 2005a. Study of Benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5-5.5). *Int. J. Food Microbiol.* 101 : 161-168.
- Guynot, M. E., Marín, S., Sanchis, V. and Ramos, A. J. 2005b. An attempt to optimize potassium sorbate use to preserve low pH (4.5-5.5) intermediate moisture bakery products by modeling *Eurotium* spp., *Aspergillus* spp. and *Penicillium corylophilum* growth. *Int. J. Food Microbiol.* 101 : 169-177.

- Hawksworth, D.L. 2004. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Stud. Mycol.* 50 : 9-80.
- Harold, C. B., Alexopoulos, C. J. and Delevoryas, T. 1994. Fungi with absorption nutrition. *In Morphology of Plants and Fungi.* 5th ed. (Harold, C. B., Alexopoulos, C. J. and Delevoryas, T., eds). p. 701. Harper & Row, Publishers, New York.
- Hocking, . A. D. 2003. Microbiological facts and fictions in grain storage. *In Proceeding of the Australian Postharvest Technical Conference, Canberra, E. J. Wright, M. C. Webb and E. Highley (ed.) CSIRO Stroed Grain Research Laboratory, Canberra, Australia. 25-27 June 2003.* p. 55-58.
- Huang, X., Xie, W. and Gong, Z. 2000. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. *FEBS Lett.* 478 : 123-126
- Huynh, Q.K., Borgmeyer, J. R., Smith, C.E., Bell, L. D. and Shah, D.M. 1996. Isolation and characterization of a 30 kDa protein with antifungal activity from leaves of *Engelmannia pinnatifida*. *J. Biochem.* 316 : 723-727
- Joseph, J. K. and Akinyosoye, F. A. 1997. Comparative studies on red sorghum extracts and other chemical as preservatives for west African soft cheese. *Int. Dairy J.* 7 : 193-198.
- Kang H. -C., Park, Y. -H. and Go, S. -J. 2003. Growth inhibition of a phytopathogenic fungus, *Colletotrichum* species by acetic acid. *Microbiol. Res.* 158 : 321-326.
- Kartal, S. N., Imamura, Y., Tsuchiya, F. and Ohsato, K. 2004. Preliminary evaluation of fungicidal and termiticidal activities of filtrates from biomass slurry fuel production. *Bioresource Technol.* 95 : 41-47.
- Khosravi, A. R., Dakhili, M. and Shokri, H. 2008. A mycological survey on feed ingredients and mixed animal feeds in Ghom province, Iran. *Pakistan J. Nutr.* 7 : 31-34.
- Kieft, T. L. 2000. Size Matters: Dwarf cells in soil and subsurface terrestrial environments. *In Nonculturable Microorganisms in the Environment.* 1st ed. (Colwell, R. R. and Grimes, D. J. eds.) p. 22. ASM Press. Washington D. C.
- Lass-Flörl, C., Speth, C., Kofler, G., Dierch, M. P., Gunsilius, E. and Würzner, R. 2003. Effect of increasing inoculum sizes of *Aspergillus* hyphae on MICs and MFCs of antifungal agents by broth microdilution method. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 21 : 229-233.

- Lennox, J. E. and Mcelroy L. J. 1984. Inhibition of growth and patulin synthesis in *Penicillium expansum* by potassium sorbate and sodium propionate in culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 : 1031-1033.
- Leon, C. Taylor, R., Bartlett, K. H. and Wasan, K. M. 2005. Effect of heat-treatment and the role of phospholipases on Fungizone®-induced cytotoxicity within human kidney proximal tubular (HK-2) cells and *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Pharm.* 298 : 211-218.
- Lian, B., Wang, B., Pan, M., Liu, C., and Teng, H. H., 2008. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 72 : 87-98.
- Lind, H., Jonsson, H. and Schnürer, J. 2005. Antifungal effect of dairy propionibacteria—contribution of organic acids. *Int. J. Food Microbiol.* 98 : 157-165.
- Linos, A., Berekaa, M. M., Reichelt, R., Keller, U., Schmitt, J., Flemming, H-C., Kroppensted, R. M., and Steinbüchel, A. 2000. Biodegradation of cis-1,4-polyisopren rubber by distinct *Actinomycetes*: Microbial strategies and detailed surface analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 1639-1645.
- Linos, A. and Steinüchel, A. 2001. Biodegradation of natural and synthetic rubbers. *In* *Biopolymers*. Vol. 2. 1st ed. (Koyama, T. and Steinbüchel, A. eds.) pp. 321-359. Wiley-VCH. Weinheim.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- Marín, S., Guynot, M. E., Sanchis, V., Arboñs, J. and Ramos, A. J. 2002. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, and *Penicillium corylophilum* spoilage prevention of bakery products by means of weak-acid preservatives. *J. Food Sci.* 67 : 2271-2277.
- Masoko, P., Picard, J. and Eloff, J. N. 2007. The antifungal activity of twenty-four southern African *Combretum* species (Combretaceae). *S. Afr. J. Bot.* 73 : 173-183.
- Mazzani, C., Luzón, O., González, N. and Quijada, P. 1995. Effect of shield-Na plus (sodium propionate and potassium sorbate) on in vitro growth and sporulation of five toxigenic fungi in Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 8 : 33-36.

- Mecteau, M. R., Arul, J. and Tweddell, R. J. 2002. Effect of organic and inorganic salt on the growth and development of *Fusarium sambucinum*, a causal agent of potato dry rot. *Mycol. Res.* 106 : 688-696.
- Michalovic, M. 2007. Meet polyisopren (Online). Available <http://pslc.ws/macrog/exp/rubber/sepisode/meet.htm> (2007. July 12)
- Mills, A. A. S., Platt, H. W. and Hurta, R. A. R. 2004. Effect of salt compounds on mycelial growth, sporulation and spore germination of various potato pathogens. *Postharvest Biol. Tec.* 34 : 341-350.
- Mitchell, D., Aldred, D. and Magan, N. 2003. Impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* from different regions of Europe. *Asp. Appl. Biol.* 68 : 109-116.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Samogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153 : 375-380.
- Ohya, N. and Koyama, T. 2001. Biodegradation of natural and synthetic rubbers. *In Biopolymers*. Vol. 2. 1st ed. (Koyama, T. and Steinbüchel, A., eds.) Wiley-VCH, Weinheim.
- Palmer, C. L., Horst, R. K., and Langhans, R. W. 1997. Use of bicarbonates to inhibit in vitro colony growth of *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 81 : 1432-1438.
- Pardo, E., Marín, S., Sanchis, V. and Ramos, A. J. 2005. Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes. *Food Microbiol.* 22 : 383-389.
- Pasanen, A.-L., Kasanen, J.-P., Rautiala, S., Ikäheimo, M., Rantamäki, J. Kääriäinen, H. and Kalliokoski, P. 2000. Fungal growth and survival in building materials under fluctuating moisture and temperature conditions. *Int. Bioder. Biodegr.* 46 : 117-127.
- Pateraki, M., Dekanea, A., Mitchell, D., Lydakis, D. and Magan, N. 2007. Influence of sulphur dioxide, controlled atmospheres and water availability on *in vitro* germination, growth and ochratoxin A production by strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *Postharvest Biol. Tec.* 44 : 141-149.
- Plumridge, A., Hesse, S. J. A., Watson, A.J., Lowe, K. C., Stratford M. and Archer, D.B. 2004. The weak acid preservative sorbic acid inhibits conidial germination and mycelial growth

- of *Aspergillus niger* through intracellular acidification. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 : 3506-3511.
- Polymer Science Learning Center. 2007. Rubber (Online). Available <http://www.pslc.ws/macrog/kidsmac/rubber.htm> (2007. August 1)
- Rajabi, L., Courreges, C., Montoya, J., Aguilera, R. J. and Primm, T. P. 2005. Acetophenones with selective antimycobacterial activity. *Lett. Appl. Microbiol.* 40 : 212-217.
- Rifaat, H. M. and Yosery, M. A. 2004. Identification and characterization of rubber degrading actinobacteria. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 2 : 63-70.
- Rockland, L. B. 1960. Saturated salt solutions for static control of relative humidity between 5° and 40°C. *Anal. Chem.* 32 : 1375.
- Rook, J. J. 1955. Microbiological Deterioration of vulcanized rubber, *Appl. Microbiol.* 3 : 302-309.
- Samson, R.A. Hoekstra, E.S. and Frisvad, J.C. 2004. Introduction to food and airborne fungi. An institute of the royal Netherland academy of arts and science. The Netherland.
- Samogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195 : 19-23.
- Serrano, M-del C., Valverde-Conde, A., Onica Chávez, M., Bernal, S., Claro, R. M., Pemán, J., Ramirez, M. and Martín-Mazuelos, E. 2002. *In vitro* activity of voriconazole, itraconazole, caspofungin, anidulafungin (VER002, LY303366) and amphotericin B against *Aspergillus* spp. *J. Diag. Microbl. Inf. Dis.* 45 : 241-244
- Serrano, M-del C., Valverde-Conde, A., Chávez, M., Bernal, S., Claro, R. M., Pemán, J., Ramirez, M. and Martín-Mazuelos, E. 2003. *In vitro* activity of voriconazole, itraconazole, caspofungin, anidulafungin (VER002, LY303366) and amphotericin B against *Aspergillus* spp. *J. Diag. Microbl. Inf. Dis.* 45 : 131-135.
- Somashekar, D., Rati, E. R., Anand, S. and Chandrashekar, A. 2004. Isolation, enumeration and PCR characterization of aflatoxigenic fungi from food and feed samples in India. *Food Microbiol.* 21 : 809-813.
- Suzuki, S., Taketani, H., Kusumoto, K.-I. and Kashiwagi, Y. 2006. High-throughput genotyping of filamentous fungus *Aspergillus oryzae* based on colony direct polymerase chain reaction. *J. Biosci. Bioeng.* 102 : 572-574.

- Therese, K. L., Bagyalakshmi, R., Madhavan, H. N. and Deepa, P. 2006. *In-vitro* susceptibility testing by agar dilution method to determine the minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, fluconazole and ketoconazole against ocular fungal isolates. *Indian J. Med. Microbiol.* 24 : 273-279.
- US Patent 6776998. 2004. Biocidal packaging system.
- Vagefi, P. A., Cosimi, A. B., Ginns, L. C. and Kotton, C. N. 2008. Cutaneous *Aspergillus ustus* in a lung transplant recipient: emergence of a new opportunistic fungal pathogen. *J. Heart Lung Transpl.* 27 : 131-134.
- Verrecchia, E. P. 2000. Fungi and sediments. *In* *Microbial Sediments*. 1st ed. (Riding, R. E. and Awramik, S. M., eds.) p. 68-75. Springer-Verlag, Berlin.
- Vytřasová, J., Přebáňová, P. and Marvanová, L. 2002. Occurrence of xerophilic fungi in bakery gingerbread production. *Int. J. Food Microbiol.* 72 : 91-96.
- Webster, J. 1996. A century of British mycology. *In* *A Century of Mycology*. 1st ed. (Sutton, B. C., ed.) p.8-9. Cambridge University Press, Cambridge CB2 8RU, UK.
- Wicklow, D. T., Weaver, D. K. and Throne, J. E. 1998. Fungal colonists of maize grain conditioned at constant temperatures and humidities. *J. Stored Prod. Res.* 34 : 355-361.
- Widmer, F., Wright, L. C., Obando, D., Handke, R., Ganendren, R., Ellis, D. H. and Sorrell, T. C. 2006. Hexadecylphosphocholine (Miltefosine) had broad-spectrum fungicidal activity and is efficacious in a mouse model of Cryptococcosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 : 414-421.
- Wikipedia, the free encyclopedia. 2005a. Ammonium bicarbonate (Online). Available http://en.wikipedia.org/wiki/Ammonium_bicarbonate (2005. September 20)
- Wikipedia, the free encyclopedia. 2005b. Calcium hydroxide (Online). Available http://en.wikipedia.org/wiki/Calcium_hydroxide (2005. December 1)
- Wikipedia, the free encyclopedia. 2005c. Sodium metabisulfite (Online). Available http://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_metabisulfite (2005. September 20)
- Windholz, M. 1983. *The Merck Index : An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*. Merck & Co.,Inc. Rahway N.J. U.S.A.
- Yatagai, M., Nishimoto, M. and Hori, K. 2002. Termiticidal activity of wood vinegar, its components and their homologues. *J. Wood. Sci.* 48 : 338-342.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Potato dextrose agar (PDA) (คณะผู้จัดทำภาควิชาจุลชีววิทยา, 2544)

ประกอบด้วย

น้ำมันฝรั่งต้ม	200	มิลลิลิตร
Glucose	20	กรัม
Agar	15	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดเพื่อให้ผงวุ้นละลาย จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

2. Malt extract agar (MEA)

ประกอบด้วย

Malt extract	30	กรัม
Mycological peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้วุ้นละลายแต่อย่าให้เดือด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที $pH \approx 5.4 \pm 0.2$ ปรับด้วยกรดแลกติกความเข้มข้น 10%

3. RPMI 1640

RPMI 1640 (powder with L-glutamine, with out sodium bicarbonate) 10 กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 ด้วยกรดแลกติก กรองด้วยกระดาษกรอง milipore ที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร (อุปกรณ์ทุกอย่างต้องปราศจากเชื้อ)

4. Czapek agar (CZ)

ประกอบด้วย

Sucrose	30	กรัม
Sodium nitrate	2	กรัม
Dipotassium phosphate	1	กรัม
Magnesium sulphate	0.5	กรัม
Potassium chloride	0.5	กรัม
Ferrous sulphate	0.1	กรัม
Agar	15	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดเพื่อให้ผงวุ้นละลาย จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที Final pH 7.3 ± 0.2

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์หาความชื้น

วิธีการ

1. นำกระป๋องอลูมิเนียมและฝาที่ล้างสะอาดแล้วมาอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ในเตาเคเตอร์จนเย็น ซึ่งจนได้น้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างยางพาราแผ่นให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ใส่กระป๋องอลูมิเนียมในข้อ 1
3. นำกระป๋องอลูมิเนียม ที่มีตัวอย่างไปอบในตู้อบแห้งอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 8-12 ชั่วโมง
4. นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในเตาเคเตอร์จนเย็นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก
5. นำกระป๋องอลูมิเนียมกลับเข้าไปอบต่อในตู้อบแห้ง ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 2-4 จนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่

การคำนวณ ความชื้น (ร้อยละ) = $\frac{(A-B)}{W} \times 100$

W

A = น้ำหนักกระป๋องอลูมิเนียม + ตัวอย่างก่อนเข้าอบแห้ง

B = น้ำหนักกระป๋องอลูมิเนียม + ตัวอย่างหลังการอบ

W = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

2. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Nelson-Somogyi method (Nelson, 1944; Somogyi, 1952)

สารเคมี

1. สารละลายคอปเปอร์ (Copper reagent)

เตรียมโดยละลาย $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71 กรัม และ Sodium potassium tartate 40 กรัม ใน น้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม 1 นอร์มอล NaOH 100 มิลลิลิตร เติมสารละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 8 กรัม (ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากัน อุณหภูมิให้ร้อน เติม NaSO_4 180 กรัม

คนจนสารละลายหมด ปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นตั้งทิ้งไว้ 1-2 วันก่อนนำไปใช้ (ต้องผ่านการกรองด้วยหอกมีตะกอน) เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2. สารละลายเนลสัน (Nelson reagent)

เตรียมโดยละลาย $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ละลาย $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 กรัม ในน้ำ 25 มิลลิลิตร แล้วนำมาผสมกัน ปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (ต้องผ่านการกรองก่อนใช้หอกมีตะกอน) เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

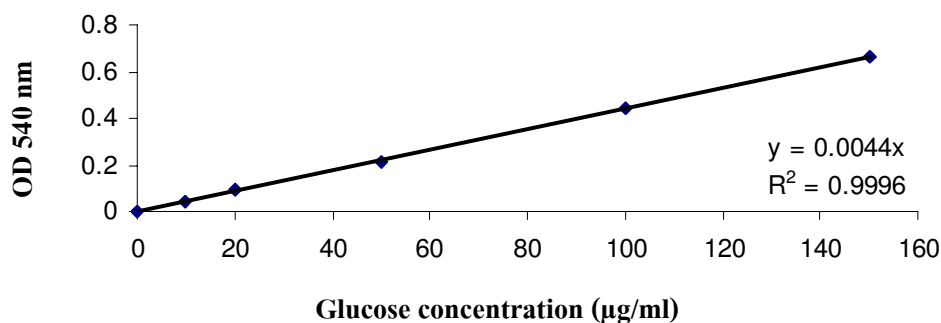
วิธีการ

1. วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

- 1.1 เตรียมสารละลายของน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น
- 1.2 ปิเปตสารละลายในข้อ 1.1 มาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (สำหรับ blank ใช้ น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาลกลูโคส)
- 1.3 เติมสารละลายคอปเปอร์ 1 มิลลิลิตร ต้มจนเดือด 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที
- 1.4 เติมสารละลายเนลสัน 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที
- 1.5 เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 1.6 วัดค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร
- 1.7 นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2. วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกับวิธีการข้อ 1



ภาพที่ 19 กราฟมาตรฐานของกลูโคสสำหรับการหาค่าน้ำตาลรีดิวซ์

Figure 19. Standard curve of glucose for reducing sugar determination.

2. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric method (Dobois *et al.*, 1956)

สารเคมี

1. สารละลายฟีนอลร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

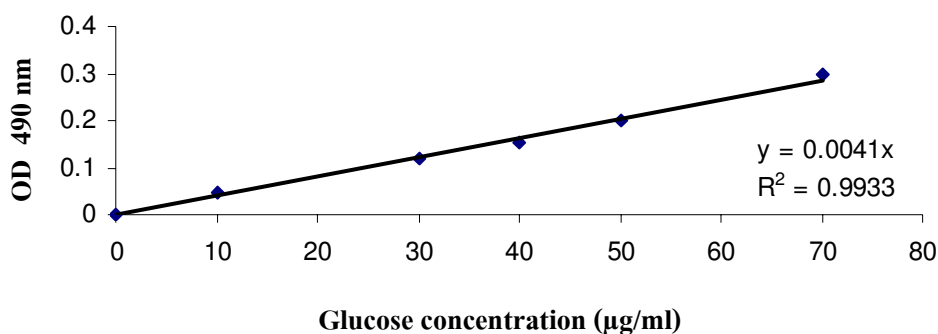
วิธีการ

1. วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

- 1.1 เตรียมสารละลายของน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 60, 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น
- 1.2 ปิเปตสารละลายในข้อ 1.1 ความเข้มข้นละ 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง (สำหรับ blank ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาลกลูโคส)
- 1.3 เติมสารละลายฟีนอล ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 1.4 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร อย่างรวดเร็ว โดยเติมให้สัมผัสสารละลายโดยตรง (ไม่สัมผัสข้างหลอด)
- 1.5 ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ก่อนเขย่าแรงๆ และตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที ผสมให้เข้ากัน
- 1.6 วัดค่าการดูดกลืนแสง 490 นาโนเมตร
- 1.7 นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

2. วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปีเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเช่นเดียวกับวิธีการข้อ 1



ภาพที่ 20 กราฟมาตรฐานของกลูโคสสำหรับการหาค่าน้ำตาลทั้งหมด

Figure 20. Standard curve of glucose for total sugar determination.

3. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด ตามวิธีการของ A.O.A.C (1990)

สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล
2. ฟีนอล์ฟทาลีน

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. เติมฟีนอล์ฟทาลีนจำนวน 3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์
3. ไทเตรตสารละลายด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ถึงจุดยุติเมื่อสารละลายกลายเป็นสีชมพูอ่อน
4. บันทึกปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้และคำนวณค่าความเป็นกรดโดยเทียบกับกรดไฮโดรคลอริก

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

สารเคมี

1. โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate; Na_2CO_3)
2. คอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
3. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Rochelle salt; $\text{KNaC}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide; NaOH)
5. โฟลินฟีโนลรีเอเจนต์ (Folin-Ciocalteu's phenol reagent)
6. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin; BSA)

วิธีการเตรียมสาร

1. เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล
2. เตรียมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 0.1 เปอร์เซ็นต์
3. เตรียมสารละลาย alkali copper โดยผสมสารละลายในข้อ 1 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร กับสารละลายในข้อ 2 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้)
4. เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent โดยเจือจางโฟลินฟีโนลรีเอเจนต์กับน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 (เตรียมก่อนใช้)

วิธีการวิเคราะห์

2.1 วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน

ก. เตรียมสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมินให้มีความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ข. ปิเปตสารละลายในข้อ ก. มาความเข้มข้นละ 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (blank ใช้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร แทน)

ค. เติมสารละลาย alkali copper ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

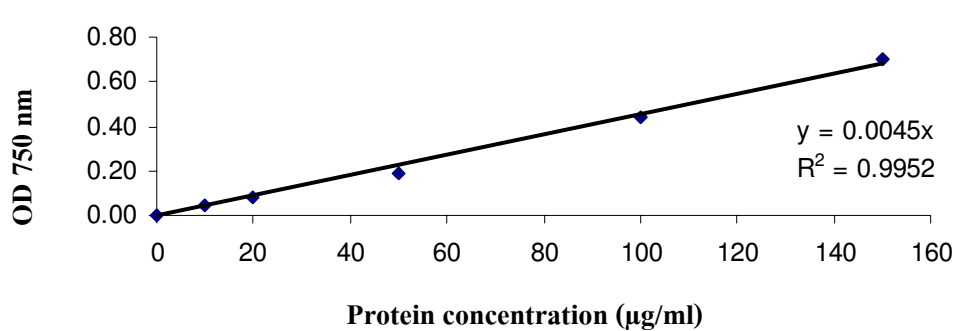
ง. เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

จ. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ฉ. นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

2.2 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปีเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเช่นเดียวกับข้อ 3.1



ภาพที่ 21 กราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมินสำหรับการหาค่าโปรตีน

Figure 21. Standard curve of bovine serum albumin for protein determination.

ภาคผนวก ค
การเตรียมความชื้นสัมพัทธ์ (Rockland, 1960)

ละลายเกลือในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 23 มิลลิลิตร ที่บรรจุในแก้วใส เก็บไว้ในภาชนะที่มีปริมาตร 1 ลิตร โดยใช้พาราฟิล์ม (parafilm) ผนึกฝาภาชนะไว้เพื่อให้สารละลายเกลืออิ่มตัวอยู่ภายในก่อนใช้งานเป็นเวลา 2 วัน

เกลือ	g/ml	ความชื้นสัมพัทธ์
Sodium bromide (NaBr)	1.16	57%
Cupric chloride (CuCl ₂)	0.76	67%
Ammonium sulfate ((NH ₄) ₂ SO ₄)	0.79	79%
Barium chloride (BaCl ₂)	0.38	90%

* หมายเหตุ ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 79% ในการทดลองนี้คิดเป็น 80% เนื่องจากสามารถตรวจวัดค่าความชื้นสัมพัทธ์ได้ในระดับความชื้นสัมพัทธ์ 80%

ภาคผนวก ง ผลการทดลอง

ตารางที่ 18 ผลของสารยับยั้งเชื้อราที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่น

Table 18. Effect of antifungal agents to fungal isolated from para rubber sheets at different concentrations.

Antifungal agents	Concentration	KJ1		MT04		MT05		MT06		MT_3		MT_4		NY03		NY05		PB02		PB03			
		48h	72h	96h	120	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	24h	48h	72h	96h	48h	72h	48h	72h	120h	144h
1. Acetic acid	1% (w/v)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±	+	+	+	+	+	+
	5% (v/v)	++	++	±	-	±	-	±	±	-	-	±	+	+	±	±	+	+	++	++	++	++	++
	10% (v/v)	++	++	+	±	++	±	±	±	±	±	+	++	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++
2. Ammonium bicarbonate	1% (w/v)	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±	+	+	+	+	+	+
	5% (w/v)	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±	+	+	+	+	+	+
	10% (w/v)	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±	+	+	+	+	+	+
3. Calcium hydroxide	1% (w/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±	+	±	±	-	-	-
	5% (w/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±	+	±	±	-	-	-
	10% (w/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±	+	±	±	-	-	-
4. Calcium propionate	1% (w/v)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±	+	++	+	-	-	-
	5% (w/v)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±	+	++	+	-	-	-
	10% (w/v)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±	+	++	+	-	-	-
5. Potassium sorbate	1% (w/v)	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-
	5% (w/v)	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±	+	++	++	±	±	±
	10% (w/v)	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±	+	++	++	±	±	±

- No inhibition, ± Little inhibited zone (bad inhibition), + Inhibited zone between 1-3.5 mm., ++ Inhibited zone between 4-5 mm.

ตารางที่ 18 (ต่อ)

Table 18. (Cont.)

Antifungal agents	Concentration	KJ1		MT04		MT05		MT06		MT_3		MT_4		NY03		NY05		PB02		PB03			
		48h	72h	96h	120	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	24h	48h	72h	96h	48h	72h	48h	72h	120h	144h
6. Potassium benzoate	1% (w/v)	+	+	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	5% (w/v)	++	++	++	+	-	-	-	-	++	++	±	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-
	10% (w/v)	++	++	++	+	-	-	-	-	++	++	±	-	-	-	-	-	++	++	±	±	±	±
7. Smoke acid (bamboo)	10% (v/v)	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	30% (v/v)	++	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	+	+	+	+	+	+	+
	Conc.	++	++	+	±	+	±	+	±	±	±	±	+	±	+	+	±	+	+	+	+	++	++
8. Smoke acid (eucalyptus)	10% (v/v)	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	±	±	±	-
	30% (v/v)	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	Conc.	++	+	+	±	±	±	±	±	±	±	±	+	±	±	±	+	+	+	+	+	++	+
9. Smoke acid (koa haole)	10% (v/v)	±	±	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+	+
	30% (v/v)	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	+	++	+	+	+	+	+
	Conc.	++	++	+	±	-	-	-	-	±	±	±	±	±	±	±	+	++	++	++	++	++	+
10. Sodium acetate	1% (w/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
	5% (v/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
	10% (v/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-

- No inhibition, ± Little inhibited zone (bad inhibition), + Inhibited zone between 1-3.5 mm., ++ Inhibited zone between 4-5 mm.

ตารางที่ 18 (ต่อ)

Table 18. (Cont.)

Antifungal agents	Concentration	KJ1		MT04		MT05		MT06		MT_3		MT_4		NY03		NY05		PB02		PB03	
		48h	72h	96h	120	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	24h	48h	96h	120	48h	72h	48h	72h
11. Sodium metabisulphite	1% (w/v)	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	+	+
	5% (w/v)	++	++	++	+	++	+	++	+	-	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	10% (w/v)	++	++	++	+	++	+	++	++	±	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
12. Sodium nitrate	1% (w/v)	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+	-	-
	5% (w/v)	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+	-	-
	10% (w/v)	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+	-	-
13. <i>p</i> -Nitrophenol	1% (w/v)	++	++	++	++	+	+	++	+	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
	5% (w/v)	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++

- No inhibition, ± Little inhibited zone (bad inhibition), + Inhibited zone between 1-3.5 mm., ++ Inhibited zone between 4-5 mm.

ตารางที่ 18 (ต่อ)

Table 18. (Cont.)

Antifungal agents	Concentration	PR02		PR05		SR2		SR9		SR12		SR13		ST01		TC209		TC211		TC413			
		72h	96h	216h	240h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	12h	24h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	96h	120h	48h	72h
1. Acetic acid	1% (w/v)	-	-	++	++	N	N	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-
	5% (v/v)	++	+	++	++	N	N	-	-	±	±	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	±	±
	10% (v/v)	++	++	++	++	N	N	-	+	++	+	+	+	+	+	-	-	++	++	-	++	++	++
2. Ammonium bicarbonate	1% (w/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5% (w/v)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	-	-	-	-	-
	10% (w/v)	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	±	-
3. Calcium hydroxide	1% (w/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5% (w/v)	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	-	-	-	±	-
	10% (w/v)	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	-	-	-	+	+
4. Calcium propionate	1% (w/v)	±	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5% (w/v)	+	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10% (w/v)	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5. Potassium sorbate	1% (w/v)	±	-	++	++	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	±	-
	5% (w/v)	+	±	++	++	+	+	++	++	++	++	+	+	±	±	-	-	+	+	-	+	+	±
	10% (w/v)	+	±	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	++	++	++	+	±

- No inhibition, ± Little inhibited zone (bad inhibition), + Inhibited zone between 1-3.5 mm., ++ Inhibited zone between 4-5 mm., N No test
 +++ Inhibited zone exceed 5 mm

Table 18. (Cont.)

Antifungal agents	Concentration	PR02		PR05		SR2		SR9		SR12		SR13		ST01		TC209		TC211		TC413	
		72h	96h	216h	240h	48h	72h	48h	72h	12h	24h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	96h	120h	48h	72h
6. Potassium benzoate	1% (w/v)	±	-	++	++	-	-	-	-	-	-	++	++	±	±	-	-	-	-	±	-
	5% (w/v)	±	-	++	++	+	±	±	++	-	-	++	++	+	+	+	+	-	-	±	-
	10% (w/v)	±	-	++	++	+	+	+	+++	-	-	++	++	+	++	+	+	±	±	+	±
7. Smoke acid (bamboo)	10% (v/v)	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	30% (v/v)	+	-	+	+	±	-	-	±	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	±	-
	Conc.	++	+	+	+	++	+	+	++	±	±	++	+	++	++	+	+	++	++	++	+
8. Smoke acid (eucalyptus)	10% (v/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	30% (v/v)	±	-	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	±	±	+	-
	Conc.	++	+	+	±	+	+	±	+	±	±	-	-	+	±	-	±	+	+	+	+
9. Smoke acid (koa haole)	10% (v/v)	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	30% (v/v)	±	-	+	±	+	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-
	Conc.	+	+	+	±	+	±	±	+	±	±	-	-	+	+	-	±	-	-	+	+
10. Sodium acetate	1% (w/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5% (v/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10% (v/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- No inhibition, ± Little inhibited zone (bad inhibition), + Inhibited zone between 1-3.5 mm., ++ Inhibited zone between 4-5 mm.

ตารางที่ 18 (ต่อ)

Table 18. (Cont.)

Antifungal agents	Concentration	PR02		PR05		SR2		SR9		SR12		SR13		ST01		TC209		TC211		TC413	
		72h	96h	216h	240h	48h	72h	12h	24h	72h	48h	96h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h
11. Sodium metabisulphite	1% (w/v)	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	++	++	-	-
	5% (w/v)	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++	+	±	-	+	+	++	++	++	+
	10% (w/v)	++	++	++	++	++	+++	+++	++	++	++	++	+	±	-	+	+	++	++	++	+
12. Sodium nitrate	1% (w/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5% (w/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10% (w/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13. <i>p</i> -Nitrophenol	1% (w/v)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	+	+
	5% (w/v)	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

- No inhibition, ± Little inhibited zone (bad inhibition), + Inhibited zone between 1-3.5 mm., ++ Inhibited zone between 4-5 mm.

+++ Inhibited zone exceed 5 mm

ตารางที่ 18 (ต่อ)

Table 18. (Cont.)

Antifungal agents	Concentration	TK3		TL01		TL3		TM012		TT03		TT04		TT013	
		48h	72h	96h	120	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	72h	96h
1. Acetic acid	1% (w/v)	-	-	+	+	±	-	-	-	±	-	±	±	±	±
	5% (v/v)	±	-	++	++	+	+	++	++	+	+	++	++	++	+
	10% (v/v)	++	+	++	++	++	+	++	++	+	+	++	++	++	++
2. Ammonium bicarbonate	1% (w/v)	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5% (w/v)	-	-	+	±	-	-	-	-	±	-	±	±	±	±
	10% (w/v)	-	-	+	±	±	-	-	-	±	±	±	±	±	±
3. Calcium hydroxide	1% (w/v)	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5% (w/v)	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10% (w/v)	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4. Calcium propionate	1% (w/v)	-	-	++	++	±	±	-	-	-	-	±	-	-	-
	5% (w/v)	-	-	++	++	+	±	-	-	-	-	+	+	+	+
	10% (w/v)	-	-	++	++	+	+	-	-	±	-	+	+	+	+
5. Potassium sorbate	1% (w/v)	-	-	++	++	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+
	5% (w/v)	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
	10% (w/v)	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

- No inhibition, ± Little inhibited zone (bad inhibition), + Inhibited zone between 1-3.5 mm., ++ Inhibited zone between 4-5 mm.

ตารางที่ 18 (ต่อ)

Table 18. (Cont.)

Antifungal agents	Concentration	TK3		TL01		TL3		TM012		TT03		TT04		TT013	
		48h	72h	96h	120	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	72h	96h
6. Potassium benzoate	1% (w/v)	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	5% (w/v)	-	-	++	++	++	+	-	-	+	-	+	-	+	-
	10% (w/v)	-	-	++	++	++	-	-	-	+	-	++	+	+	-
7. Smoke acid (bamboo)	10% (v/v)	-	-	+	+	-	-	-	-	±	-	±	±	-	-
	30% (v/v)	±	-	+	+	±	-	+	±	+	-	+	+	+	±
	Conc.	+	±	++	++	+	±	++	+	+	+	++	++	++	+
8. Smoke acid (eucalyptus)	10% (v/v)	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-
	30% (v/v)	-	-	+	+	-	-	+	+	±	-	+	+	±	-
	Conc.	+	-	++	+	+	±	++	++	+	±	++	++	+	±
9. Smoke acid (koa haole)	10% (v/v)	-	-	+	+	±	-	-	-	-	-	±	±	-	-
	30% (v/v)	-	-	+	+	±	-	+	+	+	-	+	+	±	-
	Conc.	±	-	++	++	+	±	++	++	+	±	++	++	+	±
10. Sodium acetate	1% (w/v)	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5% (v/v)	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10% (v/v)	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- No inhibition, ± Little inhibited zone (bad inhibition), + Inhibited zone between 1-3.5 mm., ++ Inhibited zone between 4-5 mm.

ตารางที่ 18 (ต่อ)

Table 18. (Cont.)

Antifungal agents	Concentration	TK3		TL01		TL3		TM012		TT03		TT04		TT013	
		48h	72h	96h	120	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	72h	96h
11. Sodium metabisulphite	1% (w/v)	-	-	++	++	±	-	++	++	±	-	++	++	+	±
	5% (w/v)	+	+	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++
	10% (w/v)	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++
12. Sodium nitrate	1% (w/v)	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5% (w/v)	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10% (w/v)	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13. <i>p</i> -Nitrophenol	1% (w/v)	++	++	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++
	5% (w/v)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

- No inhibition, ± Little inhibited zone (bad inhibition), + Inhibited zone between 1-3.5 mm., ++ Inhibited zone between 4-5 mm.

ตารางที่ 19 ค่า MIC และ MFC ของสารยับยั้งเชื้อราต่อเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่แยกได้จากยางพาราแผ่น

Table 19. MIC and MFC values of antifungal agents against *Aspergillus* spp. isolated from para rubber sheets.

Fungal isolates	MIC(MFC)							
	Potassium sorbate (%w/v)	Sodium metabisulphite (%w/v)	Potassium benzoate (%w/v)	Acetic acid (%v/v)	Smoked acid (Bamboo) (%v/v)	p-Nitrophenol (%w/v)	Amphotericin B (mg/ml)	
MT06	0.078(0.078)	<0.0195(0.0195)	2.5(2.5)	0.156(0.156)	1.563(3.125)	0.0195(0.039)	>0.8(>0.8)	
NY03	1.25(2.5)	0.625(0.625)	5(10)	0.313(0.313)	3.125(6.25)	0.0195(0.039)	0.0125(0.025)	
NY05	0.625(5)	1.25(5)	10(10)	0.156(0.625)	25(25)	0.0195(0.078)	0.025(0.1)	
PB03	0.313(0.625)	0.313(0.313)	2.5(2.5)	0.078(0.156)	1.563(1.563)	0.0195(0.0195)	0.025(0.1)	
SR9	10(>10)	5(10)	5(5)	0.313(0.313)	6.25(6.25)	0.156(0.156)	0.0125(0.1)	
TC209	2.5(5)	0.313(0.313)	5(5)	0.078(0.156)	3.125(12.5)	0.039(0.039)	0.05(0.1)	
TC211	1.25(2.5)	2.5(2.5)	2.5(2.5)	0.078(0.078)	1.563(3.125)	0.039(0.039)	0.0125(0.025)	
TC413	0.039(0.039)	<0.0195(0.0195)	2.5(2.5)	0.156(0.313)	3.125(12.5)	0.0195(0.039)	0.05(0.1)	
TL3	0.313(0.313)	<0.0195(0.0195)	2.5(2.5)	0.156(0.156)	3.125(3.125)	0.0195(0.039)	0.05(0.05)	
TM012	0.313(1.25)	0.078(0.078)	0.625(0.625)	0.156(0.156)	1.563(1.563)	0.039(0.039)	0.05(0.1)	

ตารางที่ 20 ค่า MIC และ MFC ของสารยับยั้งเชื้อราต่อเชื้อรา *Penicillium* spp. ที่แยกได้จากยางพาราแผ่น

Table 20. MIC and MFC values of antifungal agents against *Penicillium* spp. isolated from para rubber sheets.

Fungal isolates	MIC(MFC)						
	Potassium sorbate (%w/v)	Sodium metabisulphite (%w/v)	Potassium benzoate (%w/v)	Acetic acid (%v/v)	Smoked acid (Bamboo) (%v/v)	<i>p</i> -Nitrophenol (%w/v)	Amphotericin B (mg/ml)
KJ1	0.156(0.156)	0.078(0.078)	0.156(0.313)	0.156(0.156)	1.563(1.563)	0.0195(0.0195)	0.05(0.05)
PB02	0.313(2.5)	0.078(0.078)	0.625(0.625)	0.039(0.313)	1.563(3.125)	0.0093(0.0098)	0.05(0.05)
PR02	0.625(0.625)	0.156(0.156)	2.5(2.5)	0.156(0.156)	1.563(3.125)	0.0195(0.039)	0.1(0.1)
ST01	0.313(0.313)	0.156(0.156)	1.25(1.25)	0.156(0.156)	3.125(3.125)	0.039(0.078)	0.05(0.1)
TT04	1.25(1.25)	0.156(0.313)	5(5)	0.156(0.156)	3.125(3.125)	0.078(0.156)	0.05(0.05)
TL01	0.625(0.625)	0.156(0.156)	2.5(2.5)	0.156(0.156)	3.125(3.125)	0.078(0.078)	0.025(0.05)

ตารางที่ 21 ค่า MIC และ MFC ของสารยับยั้งเชื้อราต่อเชื้อรา *Fusarium* spp. ที่แยกได้จากยางพาราแผ่น

Table 21. MIC and MFC values of antifungal agents against *Fusarium* spp. isolated from para rubber sheets.

Fungal isolates	MIC(MFC)							
	Potassium sorbate (%w/v)	Sodium metabisulphite (%w/v)	Potassium benzoate (%w/v)	Acetic acid (%v/v)	Smoked acid (Bamboo) (%v/v)	p-Nitrophenol (%w/v)	Amphotericin B (mg/ml)	
MT05	0.625(1.25)	0.078(0.078)	2.5(2.5)	0.156(0.156)	1.563(1.563)	0.039(0.039)	0.2(0.2)	
SR2	0.625(0.625)	0.078(0.078)	2.5(2.5)	0.078(0.078)	1.563(1.563)	0.039(0.039)	0.05(0.05)	
TK3	0.313(0.625)	0.156(0.156)	1.25(1.25)	0.078(0.078)	1.563(3.125)	0.039(0.078)	0.025(0.1)	
TT03	0.313(0.313)	0.078(0.078)	1.25(1.25)	0.078(0.078)	1.563(1.563)	0.039(0.039)	0.025(0.025)	

ตารางที่ 22 ค่า MIC และ MFC ของสารยับยั้งเชื้อราต่อเชื้อรา *Cladosporium* spp. ที่แยกได้จากยางพาราแผ่น

Table 22. MIC and MFC values of antifungal agents against *Cladosporium* spp. isolated from para rubber sheets.

Fungal isolates	MIC(MFC)						
	Potassium sorbate (%w/v)	Sodium metabisulphite (%w/v)	Potassium benzoate (%w/v)	Acetic acid (%v/v)	Smoked acid (Bamboo) (%v/v)	p-Nitrophenol (%w/v)	Amphotericin B (mg/ml)
MT04	0.625(0.625)	0.313(0.313)	1.25(1.25)	0.313(0.625)	6.25(6.25)	0.039(0.039)	0.1(0.2)
PR05	0.313(0.625)	0.313(0.625)	1.25(2.5)	0.078(0.156)	1.563(1.563)	0.0195(0.039)	0.1(0.4)
TT013	1.25(1.25)	0.313(0.313)	1.25(1.25)	0.078(0.156)	1.563(1.563)	0.039(0.039)	0.1(0.2)

ตารางที่ 23 ค่า MIC และ MFC ของสารยับยั้งเชื้อราต่อเชื้อรา *Rhizopus* spp. *Mucor* sp. และ *Geotrichum* sp. ที่แยกได้จากยางพาราแผ่น

Table 23. MIC and MFC values of antifungal agents against *Rhizopus* spp. *Mucor* sp. and *Geotrichum* sp. isolated from para rubber sheets.

Fungal isolates	MIC(MFC)							
	Potassium sorbate (%w/v)	Sodium metabisulphite (%w/v)	Potassium benzoate (%w/v)	Acetic acid (%v/v)	Smoked acid (Bamboo) (%v/v)	<i>p</i> -Nitrophenol (%w/v)	Amphotericin B (mg/ml)	
MT1	1.25(2.5)	0.313(0.625)	1.25(1.25)	0.313(0.313)	3.125(3.125)	0.078(0.078)	0.2(0.2)	
SR12	1.25(2.5)	0.313(0.625)	2.5(2.5)	0.156(0.313)	3.125(3.125)	0.039(0.156)	0.2(0.4)	
SR13	1.25(1.25)	0.313(0.313)	1.25(1.25)	0.156(0.156)	3.125(3.125)	0.039(0.039)	0.05(0.1)	
MT_3	1.25(1.25)	0.625(0.625)	1.25(1.25)	0.313(0.313)	3.125(3.125)	0.039(0.039)	0.2(0.2)	

MT1 and SR12 = *Rhizopus* spp., SR13 = *Mucor* sp., MT_3 = *Geotrichum* sp.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวสุพรรณษา ชาญด้วยกิจ	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	4882033	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีวะวิทยา)	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2547

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนอุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ จากคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีการศึกษา 2548

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Supansa Chanduaykit, Souwalak Phongpaichit and Aran H-Kittikun. 2006. Isolation of fungi from para rubber sheets and effect of antifungal agents on their growth. Program & Abstracts of the 18th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “Biotechnology: Benefits&Bioethics”, The Montien Riverside Hotel, Bangkok, Thailand, 2-3 November, 2006. pp 171.

Supansa Chanduaykit, Souwalak Phongpaichit and Aran H-Kittikun. 2007. Growth inhibition of fungi isolated from para rubber sheets by antifungal agents. Program & Abstracts of the 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “TSB2007: Biotechnology for Gross National Happiness”, Thammasat University, Pathumthani, Thailand, 9-12 October, 2007. pp 51.