รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่นอบแห้ง (Air Dried Sheet, ADS) โดยใช้สารต้านเชื้อราประสิทธิภาพสูงจากเชื้อแอคติโนมัยสิท”

สัญญาเลขที่ RDG5650072

โดย ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว และคณะ

กันยายน 2557

สัญญาเลขที่ RDG5650072

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่นอบแห้ง (Air Dried Sheet, ADS) โดยใช้สารต้านเชื้อราประสิทธิภาพสูงจากเชื้อแอคติโนมัยสิท”

สัญญาเลขที่ RDG5650072

คณะผู้วิจัย		สังกัด	
1. ดร. นารีลักษณ์	นาแก้ว	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์	มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. น.ส. ปรางค์ทิพย์	อินทรไพจิตร์	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์	มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย วช.-สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปย่อรายงานสำหรับผู้บริหาร

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่นอบแห้ง (Air Dried Sheet, ADS) โดยใช้สารต้านเชื้อราประสิทธิภาพสูงจากเชื้อแอคติโนมัยสิท

(ภาษาอังกฤษ) Prevention of fungal growth on para rubber air dried sheet (ADS) by high potential antifungal from actinomycetes

ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

ชื่อ-สกุล ดร.นารีลักษณ์ นาแก้ว

หน่วยงาน ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ที่อยู่ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

โทรศัพท์/โทรสาร (055) 964622/ 964770 **E-mail**: nnakaew@hotmail.com

ผู้ร่วมโครงการ

1. **น.ส. ปรางค์ทิพย์ อินทรไพจิตร์** มหาวิทยาลัยนเรศวร

ระยะเวลาดำเนินการ 12 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน 2556 – 31 สิงหาคม 2557

ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญ

ยางแผ่นเป็นการแปรรูปยางขั้นพื้นฐานจากน้ำยางดิบเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมขั้นต่อไป เช่น ยางแท่ง ยางรถยนต์ ท่อยาง ยางรัดของ ยางแผ่น แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ยางแผ่นรมควัน (Ribbed Smoked Sheet; RSS) และยางแผ่นอบแห้ง (Air Dried Sheet) ซึ่งได้มาจากการแปรรูปยางแผ่นดิบ (Unsmoked sheet, USS) ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกยางธรรมชาติอันดับหนึ่งของโลก โดยร้อยละ 95 ของผลผลิตที่ส่งออกส่วนใหญ่เป็นยางแผ่นรมควันถึงร้อยละ 52

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างยาง ADS กับ RSS แล้วพบว่า ยาง ADS มีข้อดีกว่าตรงที่มีสีเหลืองสดใสกว่า ขายได้ราคาสูงกว่า และใช้พลังงานในการผลิตต่ำกว่ายาง RSS เนื่องจากการผลิตยางแผ่น ADS จะใช้อุณหภูมิในการอบต่ำกว่าและใช้ระยะเวลาสั้นกว่ายางแผ่น RSS (ADS ใช้อุณหภูมิ 45-55 °C นาน 3-4 วัน, RSS ใช้อุณหภูมิ 50-65 °C นาน 5-7 วัน) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าส่วนใหญ่นิยมผลิตยาง RSS มากกว่าเนื่องจากในขั้นตอนการผลิตยาง RSS จะมีการอบด้วยควันไม้ ซึ่งจะมีสารกันเชื้อราจึงช่วยรักษาเนื้อยางไม่ให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อราในอากาศทำให้สามารถเก็บรักษาได้นานกว่ายาง ADS

การปนเปื้อนของเชื้อราในยางแผ่นจะทำให้ยางแผ่นราคาตก และเชื้อรายังมีผลเสียต่อสุขภาพของผู้เกี่ยวข้อง การผลิตยางแผ่นอาจจะมีการเติม หรือ จุ่มสารเคมีป้องกันเชื้อราเช่น พาราไนโตฟีนอล ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อผู้ใช้ และถูกห้ามใช้ในอุตสาหกรรมยางบางประเภท

จากข้อมูลดังกล่าว จึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้ ซึ่งเป็นการวิจัยเพื่อมุ่งไปสู่การผลิตยาง ADS ที่มีคุณภาพดีเก็บรักษาได้นาน และปลอดภัยต่อผู้ใช้ โดยพัฒนาการผลิตยางแผ่น ADS ที่มีคุณสมบัติในการ

ทนต่อเชื้อรา โดยใช้สารต้านเชื้อราประสิทธิภาพสูงที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยสิท ซึ่งเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบว่ามีรายงานการผลิตสารต้านเชื้อราได้ดีที่สุด ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้คาดว่าจะทำให้ยาง ADS สามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น ช่วยให้เกษตรกรจำหน่ายยางแผ่นที่มีคุณภาพดี ได้ราคาสูง และลดต้นทุนการผลิต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อราที่เจริญบนแผ่นยาง ADS ได้ดีที่สุด
2. เพื่อทราบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนที่ได้จากแอคติโนมัยสิทสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีชนิดอื่นๆที่เคยมีรายงานการศึกษา

ผลการดำเนินงาน

1. แยกเชื้อราที่ปนเปื้อนบนยางแผ่นผึ่งแห้งได้ทั้งหมด 14 ไอโซเลท โดยจัดเป็นเชื้อ *Aspergillus* จำนวน 5 ไอโซเลท (35.7 %) และเชื้อ *Penicillium* จำนวน 9 ไอโซเลท (64.3%) ซึ่งทั้ง 14ไอโซเลทที่แยกได้ถูกใช้เป็นเชื้อราทดสอบร่วมกับเชื้อราอีก 6 สายพันธ์ที่มีรายงานว่ามีการปนเปื้อนบนแผ่นยางดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงใช้เชื้อราทดสอบทั้งหมด 20 สายพันธุ์

2. เชื้อ *Streptomyces* TMR032 ให้ผลการยับยั้งเชื้อราทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนการยับยั้งมากกว่า 30 มิลลิเมตร

3. สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ดีกว่าพาราไนโตรฟีนอลโดยพบว่ามีค่า MFC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนพาราไนโตรฟีนอลมีค่า MFC เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. เมื่อนำสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 ไปใช้ โดยมีการเปรียบเทียบการใช้งาน 2 รูปแบบ คือ การผสมลงไปในแผ่นยางและการจุ่มแผ่นยางในสารสกัดที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มก./มล. (มากกว่าค่า MFC 2 เท่า) พบว่าสามารถป้องกันเชื้อราได้นาน 20 วัน ในขณะที่ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมหรือจุ่มในสารสกัด) จะพบการปนเปื้อนของเชื้อราในวันที่ 5 ของการทดลอง

5. การจุ่มแผ่นยางในสารสกัดหยาบนอกจากจะให้ผลการป้องกันเชื้อราในแผ่นยางเทียบเท่าการผสมลงไปแล้ว ยังไม่ทำให้ยางเปลี่ยนสีและเกิดการจับตัวกันของเนื้อยางอีกด้วยและคาดว่าสารสกัดที่เตรียมได้จะสามารถนำมาจุ่มแผ่นยางได้มากกว่า 1 ครั้ง ซึ่งทำให้มีต้นทุนต่ำกว่า การผสมลงไป

6. ต้นทุนการผลิตเมื่อคิดจากการนำไปใช้โดยคำนึงถึงค่า MFC ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ พบว่า สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 มีต้นทุนสูงกว่าพาราไนโตรฟีนอล 119.304 บาท (สารสกัดหยาบและพาราไนโตรฟีนอลมีต้นทุนการผลิตเท่ากับ 193.304 และ 37 บาท/กรัม ตามลำดับ)

สรุปผลการวิจัย

เชื้อ *Streptomyces* TMR032 ให้ผลการยับยั้งเชื้อราทดสอบ 20 สายพันธุ์ได้ดีมากในห้องปฏิบัติการ เมื่อนำสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* TMR032 มาทดสอบหาค่า MFC

เปรียบเทียบกับพาราไนโตรนอลพบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดสูงกว่าพาราไนโตรฟีนอลโดยให้ค่า MFC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารสกัดหยาบของเชื้อ *Streptomyces* TMR032 ไปใช้ในในยางแผ่น โดยมีรูปแบบการใช้งาน 2 รูปแบบ คือ แบบจุ่มและแบบผสมลงไปในยางแผ่น พบว่าทั้ง 2 แบบ สามารถป้องกันเชื้อราได้นาน 20 วัน เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมสารใดเลยจะพบเชื้อราปนเปื้อนภายใน 5 วัน โดยการจุ่มแผ่นยางในสารสกัดหยาบไม่ทำให้ยางเปลี่ยนสีและเกิดการจับตัวกันของเนื้อยางเหมือนการผสมลงไป

ข้อเสนอแนะที่คาดว่าควรวิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

เชื้อ *Streptomyces* TMR 032 มีศักยภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา เมื่อนำไปใช้ในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราในแผ่นยางยังพบว่ามีปัญหาหลายประการ ซึ่งต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมดังนี้

1. ต้องมีการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ใช้ในสภาวะที่มีความชื้นระดับต่างๆ เนื่องจากความชื้นในแผ่นยางและความชื้นสัมพัทธ์เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อรา จากการวิจัยครั้งนี้ได้ทำในสภาวะที่มีความชื้นค่อนข้างสูง คือ ใน moist chamber สารสกัดยังสามารถป้องกันการปนเปื้อนในแผ่นยางได้นานถึง 20 วัน ถ้ามีการศึกษาในระดับความชื้นที่ต่ำกว่านี้เชื่อว่าจะสามารถป้องกันเชื้อราได้นานยิ่งขึ้น

2. การปรับสูตรอาหารและรูปแบบในการผลิตและการนำไปใช้เพื่อลดต้นทุนการผลิต

2.1 การปรับสูตรอาหารที่ใช้การเลี้ยง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูก และเหมาะสมสามารถผลิตได้ปริมาณมากแต่ใช้ต้นทุนต่ำ เช่นคัดเลือกหาของเสียหรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหรืออุตสาหกรรมมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

2.2 การปรับรูปแบบการผลิตและการนำไปใช้ เช่น การทดลองเอาน้ำเลี้ยงเชื้อไปใช้โดยตรง เพื่อลดขั้นตอนและต้นทุนในการสกัด ซึ่งอาจจะง่ายและสะดวกต่อเกษตรกรที่จะนำไปผลิตใช้ได้เอง

3. รูปแบบการนำไปใช้ในแผ่นยาง ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่า การผสมสารสกัดที่ละลายด้วยเมทานอลลงไปในยางแผ่นทำให้เนื้อยางจับตัวกัน ครั้งนี้ได้หาแนวทางการนำไปใช้ในลักษณะอื่น เช่น การจุ่มลงในสารสกัด ซึ่งนอกจากจะทำให้ยางยังคงคุณสมบัติแล้ว การจุ่มยังช่วยลดต้นทุนการผลิตเนื่องจากใช้สารปริมาณที่น้อยกว่าการผสมลงไป อย่างไรก็ตาม ต้องมีการศึกษาจำนวนครั้งของการจุ่ม ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อไป

ผลงานทางวิชาการที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ “The 10th International Mycological congress 2014” เมื่อวันที่ 3-8 สิงหาคม 2557 ณ. ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิตต์ กรุงเทพฯ

รหัสโครงการ: RDG5650072
ชื่อโครงการ การป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่นอบแห้ง (Air Dried Sheet, ADS) โดยใช้สารต้านเชื้อราประสิทธิภาพสูงจากเชื้อแอคติโนมัยสิท
ชื่อนักวิจัย: ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว
สังกัด: ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ม. นเรศวร
โทรศัพท์: 055 964622
E-mail: nnakaew@hotmail.com
ระยะเวลาดำเนินโครงการ: 1 กันยายน 2556 – 31 สิงหาคม 2557

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนของเชื้อราบนยางแผ่นผึ่งแห้ง (air dried rubber sheet (ADS)) นอกจากจะทำให้คุณภาพของยางแผ่นด้อยลงและส่งผลถึงราคาขายแล้ว เชื้อรายังมีผลเสียต่อสุขภาพของที่ผู้เกี่ยวข้องอีกด้วย งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะนำสารยับยั้งเชื้อราซึ่งได้จากแบคทีเรียแอคติโนมัยสิทมาใช้ในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราบนแผ่นยางเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา โดยได้นำเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการทั้งหมด 180 สายพันธุ์มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Dual culture bioassay โดยใช้เชื้อราสายพันธุ์ที่เคยมีรายงานว่ามีการปนเปื้อนในยางแผ่นร่วมกับเชื้อที่แยกได้จากแผ่นยางที่มีการปนเปื้อน รวมทั้งสิ้น 20 สายพันธุ์เป็นเชื้อราทดสอบ ผลการทดสอบพบว่า เชื้อ *Streptomyces* TMR032 สามารถยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนการยับยั้งมากกว่า 30 มิลลิเมตรในทุกสายพันธุ์ และเมื่อนำสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 มาทำการเปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรากับพาราไนโตฟีนอลโดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (MFC) ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทุกสายพันธุ์ได้ดีกว่าพาราไนโตรฟีนอล โดยพบว่ามีค่า MFC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในแผ่นยางโดยเปรียบเทียบรูปแบบการนำไปใช้ระหว่างการผสมลงไปในขั้นตอนการทำยางแผ่นกับการจุ่มแผ่นยางลงไป โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มก./มล. พบว่าทั้ง 2 วิธีสามารถป้องกันเชื้อราได้นานถึง 20 วัน เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อราตั้งแต่วันที่ 5 ของการทดลอง การจุ่มแผ่นยางในสารสกัดหยาบมีข้อดีกว่าการผสมสารสกัดหยาบลงในแผ่นยางตรงที่ไม่ทำให้คุณภาพของแผ่นยางเปลี่ยนแปลงไป จากผลการวิจัยที่ได้ครั้งนี้พบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำเอาสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 มาใช้ป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราบนยางแผ่นทดแทนการใช้สารเคมี แต่จะต้องมีการศึกษาวิจัยในด้านอื่นๆ เช่น การลดต้นทุนการผลิต, รูปแบบการผลิตและนำไปใช้ และ ผลกระทบต่อคุณสมบัติยางต่อไป เพื่อให้มีความสะดวกและปลอดภัยในการนำไปใช้จริง

Project code: RDG5650072

Project title: Prevention of fungal growth on para rubber air dried sheet (ADS) by high potential antifungal from actinomycetes

Investigator: Dr. Nareeluk Nakaew

E-mail Address: nnakaew@hotmail.com

Project Period: 1 September 2013 – 31 August 2014

Abstract

Fungal contamination of air dried rubber sheet (ADS) is often occurred and diminishes quality and value of this product. This contamination also affects the health of workers who involve with ADS production. In this work, we aim to evaluate antifungal agents produced by actinobacteria for biological control of fungal contamination on ADS and to extend the shelf life of ADS. A total of 180 actinobacterial isolates was screened for antifungal activity against fungal contaminants by dual culture bioassay. A total of 20 fungal strains isolated from contaminated ADS was used as tested fungal contaminants in dual culture bioassay. It was found that *Streptomyces* TMR032 gave the highest antagonistic activity against all fungal contaminants with relatively large inhibition zone (> 30 mm). When we compared the minimal fungicidal concentration (MFC) of the crude extract derived from strain TMR032 (ethyl acetate extraction and evaporation of cell-free culture broth) and *p*-nitrophenol, the crude extract exhibited greater MFC value (0.5 mg mL^{-1}) than *p*-nitrophenol (1 mg mL^{-1}). When we compare the treating approaches between adding and soaking with the crude extract at the final concentration of 1 mg mL^{-1}, the fungal contamination was suppressed the same for 20 days. Both treating approaches for the fungal contamination also revealed greater than the control (without applying the crude extract) that appeared the contamination in 5 days. Interestingly, soaking ADS with the crude extract exhibited greater quality of ADS than the adding approach that appeared darkened color and incomplete consolidation of ADS. This may due to the reaction between latex and the solvent (methanol) that was used for dissolving the crude extract. Based on the results of this study, we propose that antifungal agents produced by strain TMR032 could be further applied effectively in production of ADS with the benefits of reduced chemical uses. Other investigations regarding to the reduced cost and the optimal conditions for production of such antifungal agents shall be studied for economically effective use in ADS production.

1. ความสำคัญและความเป็นมาของการวิจัย

ยางแผ่นเป็นการแปรรูปยางขั้นพื้นฐานจากน้ำยางดิบเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมขั้นต่อไป เช่น ยางแท่ง ยางรถยนต์ ท่อยาง ยางรัดของ ยางแผ่น แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ยางแผ่นรมควัน (Ribbed Smoked Sheet; RSS) และยางแผ่นอบแห้ง (Air Dried Sheet) ซึ่งได้มาจากการแปรรูปยางแผ่นดิบ (Unsmoked sheet, USS) ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกยางธรรมชาติอันดับหนึ่งของโลก โดยร้อยละ 95 ของผลผลิตที่ส่งออกส่วนใหญ่เป็นยางแผ่นรมควันถึงร้อยละ 52

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างยาง ADS กับ RSS แล้วพบว่า ยาง ADS มีข้อดีกว่าตรงที่มีสีเหลืองสดใสกว่า ขายได้ราคาสูงกว่า และใช้พลังงานในการผลิตต่ำกว่ายาง RSS เนื่องจากการผลิตยางแผ่น ADS จะใช้อุณหภูมิในการอบต่ำกว่าและใช้ระยะเวลาสั้นกว่ายางแผ่น RSS (ADS ใช้อุณหภูมิ 45-55 °C นาน 3-4 วัน, RSS ใช้อุณหภูมิ 50-65 °C นาน 5-7 วัน) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าส่วนใหญ่นิยมผลิตยาง RSS มากกว่าเนื่องจากในขั้นตอนการผลิตยาง RSS จะมีการอบด้วยควันไม้ ซึ่งจะมีสารกันเชื้อราจึงช่วยรักษาเนื้อยางไม่ให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อราในอากาศทำให้สามารถเก็บรักษาได้นานกว่ายาง ADS

การปนเปื้อนของเชื้อราในยางแผ่นจะทำให้ยางแผ่นราคาตก และเชื้อรายังมีผลเสียต่อสุขภาพของผู้เกี่ยวข้อง การผลิตยางแผ่นอาจจะมีการเติม หรือ จุ่มสารเคมีป้องกันเชื้อราเช่น พาราไนโตฟีนอล ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อผู้ใช้ และถูกห้ามใช้ในอุตสาหกรรมยางบางประเภท

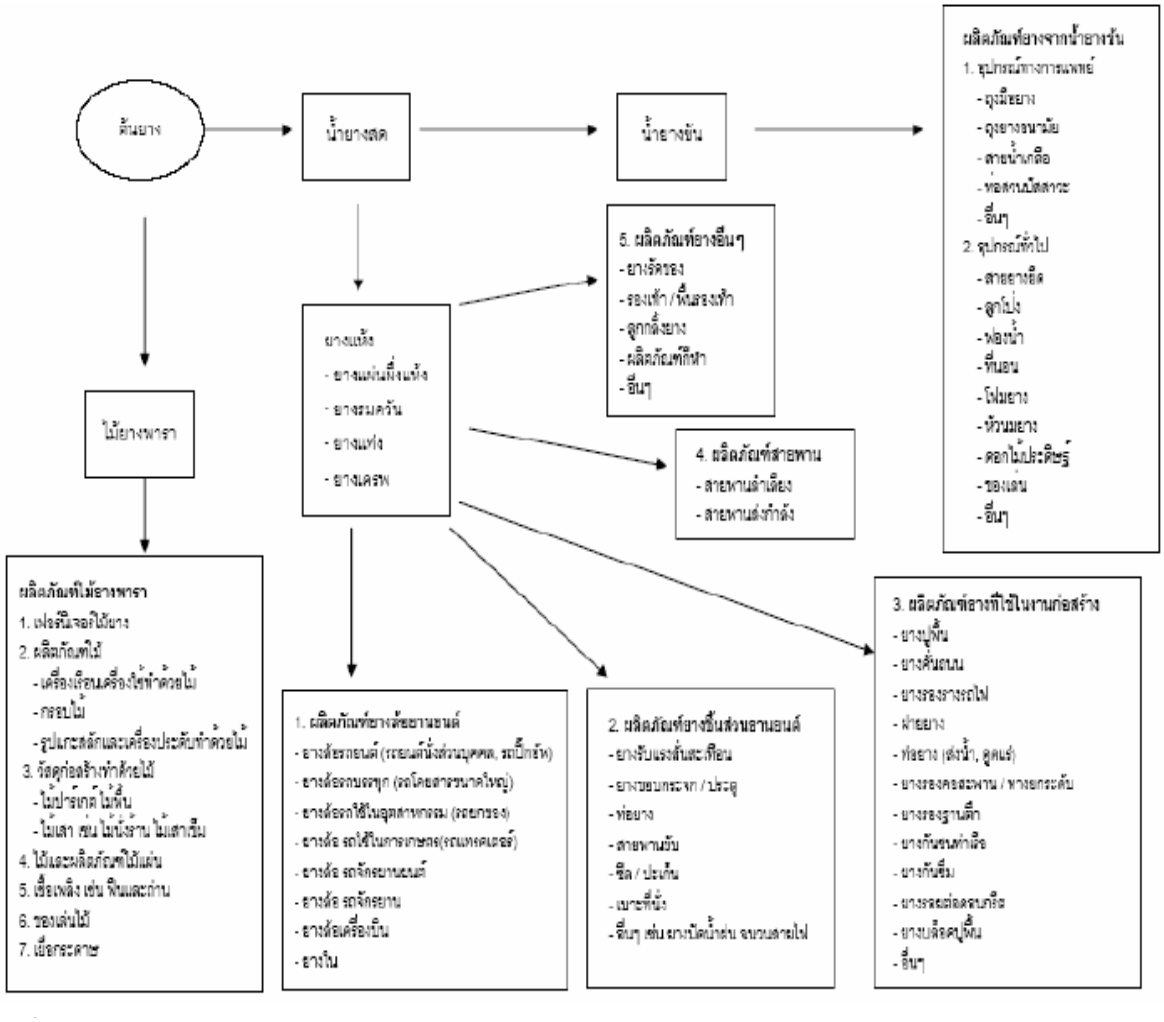
จากข้อมูลดังกล่าว จึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้ ซึ่งเป็นการวิจัยเพื่อมุ่งไปสู่การผลิตยาง ADS ที่มีคุณภาพดีเก็บรักษาได้นาน และปลอดภัยต่อผู้ใช้ โดยพัฒนาการผลิตยางแผ่น ADS ที่มีคุณสมบัติในการทนต่อเชื้อรา โดยใช้สารต้านเชื้อราประสิทธิภาพสูงที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยสิท ซึ่งเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบว่ามีรายงานการผลิตสารต้านเชื้อราได้ดีที่สุด ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้คาดว่าจะทำให้ยาง ADS สามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น ช่วยให้เกษตรกรจำหน่ายยางแผ่นที่มีคุณภาพดี ได้ราคาสูง และลดต้นทุนการผลิต

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อราที่เจริญบนแผ่นยาง ADS ได้ดีที่สุด
2. เพื่อทราบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนที่ได้จากแอคติโนมัยสิทสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีชนิดอื่นๆที่เคยมีรายงานการศึกษา

3. ทฤษฎี แนวคิดในการวิจัย และผลงานที่เกี่ยวข้อง

ยางแผ่นเป็นการแปรรูปยางขั้นพื้นฐานจากน้ำยางดิบเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมขั้นต่อไป เช่น ยางแท่ง ยางรถยนต์ ท่อยาง ยางรัดของ ยางแผ่น เป็นต้น (รูป 1) ยางแผ่นแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ยางแผ่นรมควัน (Ribbed Smoked Sheet; RSS) และยางแผ่นผึ่งแห้ง (Air Dried Sheet) ซึ่งได้มาจากการแปรรูปยางแผ่นดิบ (Unsmoked sheet, USS) ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกยางธรรมชาติอันดับหนึ่งของโลก โดยร้อยละ 95 ของผลผลิตที่ส่งออกส่วนใหญ่เป็นยางแผ่นรมควันถึงร้อยละ 52



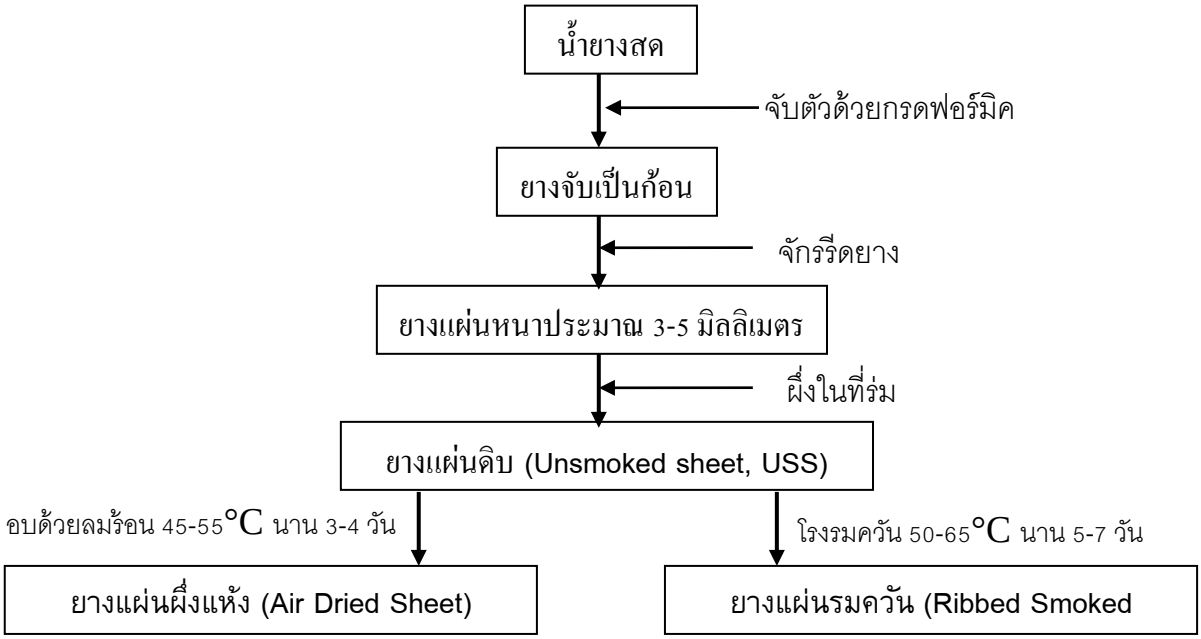
รูป 1 แผนผังผลิตภัณฑ์จากยางชนิดต่างๆ

ที่มา: แผนแม่บทอุตสาหกรรมยางพาราและผลิตภัณฑ์ กระทรวงอุตสาหกรรม

การผลิตยางแผ่น ADS และ RSS

การผลิตยางแผ่นดิบเกษตรกรจะนำน้ำยางที่กรีดได้ในแต่ละวันซึ่งมีปริมาณไม่มากนักมาทำเป็นแผ่นยางโดยวิธีการง่ายๆ แบบชาวบ้าน เมื่อได้ยางแผ่นดิบที่มีความชื้นสูงก็จะเอาไปผึ่งแห้งเพื่อให้ความชื้นในแผ่นยางลดลง เมื่อรวบรวมได้ปริมาณมากพอก็จะเอาออกขาย ซึ่งกระบวนการผลิตแบบชาวบ้านอาจจะไม่ได้คำนึงถึงความชื้นที่ยังคงมีในแผ่นยาง อาจนำเอาแผ่นยางที่ยังชื้นอยู่มาซ้อนทับกันทำให้เกิดการเจริญของเชื้อราบนแผ่นยางได้

นอกจากวิธีการแบบชาวบ้านแล้วยังมีวิธีการเชิงอุตสาหกรรมได้แก่การทำยางแผ่นผึ่งแห้ง และยางแผ่นรมควัน (รูป 2) โดยการรวบรวมน้ำยางจากสวนยางต่างๆมาผลิตยางแผ่นดิบ แล้วเอายางแผ่นดิบมารมควันเพื่อป้องกันเชื้อราเพื่อให้เก็บรักษาได้นานๆ หรือนำมาผลิตยางแผ่นผึ่งแห้งซึ่งไม่มีการรมควันแต่มีการทำให้แห้งโดยใช้ลมร้อน แต่อาจจะมีการเติมสารเคมีป้องกันเชื้อราเช่น พาราไนโตรฟีนอล แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บไว้นานๆ หรือ โดยเฉพาะในฤดูฝนซึ่งมีความชื้นค่อนข้างสูงแผ่นยางที่เก็บไว้จะมีการปนเปื้อนของเชื้อราอยู่ดี



รูป 2 ขั้นตอนการผลิตยางแผ่น ADS และ RSS (ปรีดิ์เปรม, 2556)

ชนิดของเชื้อราที่เจริญบนแผ่นยางและการศึกษาเรื่องการป้องกันเชื้อรา

ปัญหาเรื่องการปนเปื้อนของเชื้อราเกิดขึ้นได้ในยางแผ่นทุกประเภท โดยเกิดในยางแผ่นที่มีความชื้นมากกว่า 0.8 % การปนเปื้อนของเชื้อราบนแผ่นยางนอกจากจะทำให้ยางแผ่นที่เก็บไว้ราคาตกแล้วยังมีผลต่อสุขภาพของผู้ที่เกี่ยวข้องอีกด้วย ในปี 2001 Linos และ Steinbuchel ศึกษาพบเชื้อราหลายชนิดที่สามารถเจริญได้บนยางแผ่น เช่น *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces* ในประเทศในจีเรียEsuruoso (1970) ศึกษาเชื้อราที่เจริญบนยางพาราแผ่น พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus* 3 สายพันธุ์ คือ *A. fumigatus, A. flavus* และ *A. aculeatus*

ในประเทศไทย อรัญ (2553) ทำการแยกเชื้อราจากยางแผ่นที่ผลิตโดยเกษตรกรจาก 13 แหล่งในภาคใต้ ได้เชื้อรา 150 ไอโซเลต อยู่ใน 9 จีนัส คือ *Aspergillus* (31.3%), *Penicillium* (23.3%), *Cladosporium* (5.3%), *Rhizopus* (2.7%), *Mucor* (1.3%), *Geotrichum* (1.3%), *Trichoderma* (1.3%) และ *Tritirachium* (0.7%) บริเวณที่เก็บยางแผ่นมีความชื้นสัมพัทธ์ 52.1-83.2% มีอุณหภูมิ 26.9-32.70 องศาเซลเซียสโดยยางแผ่นที่เก็บมามีความชื้น 1.0-9.5% ใน พ.ศ. 2555 สายสมร และคณะ ทำการแยกและบ่งบอกชนิดของเชื้อราที่ปนเปื้อนบนยางแผ่นดิบจาก 12 ตัวอย่าง จากเกษตรกรในพื้นที่ตำบลทุ่งกล้วย อำเภอภูซาง จังหวัดพะเยา จำนวน 12 ตัวอย่าง พบว่าแยกเชื้อราได้ 37 ไอโซเลท เชื้อราที่พบส่วนใหญ่จัดอยู่ในจีนัส *Aspergillus* spp. 15 ไอโซเลท (40.5%), *Fusarium* spp. 11 ไอโซเลท (29.7%), *Penicillium* spp. 7 ไอโซเลท (18.9%) ในสถานที่เก็บตัวอย่างมีความชื้นสัมพัทธ์มีค่าตั้งแต่ 71 ถึง 88 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาเรื่องการป้องกันเชื้อราบนแผ่นยาง

จากการศึกษาการทดสอบการยับยั้งเชื้อราในแผ่นยางด้วยสารเคมีชนิดต่างๆ ของอรัญ ในปี 2553 พบว่า กรดอะซิติก โปแตสเซียมซอร์เบต โปแตสเซียมเบนโซเอต โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ และ

น้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ โดยมีค่าการยับยั้งที่ความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารเคมี 5 ชนิดนี้ ต่อ *Aspergillus* ที่แยกได้ 10 ไอโซเลต คือ 0.313, 10, 5, 5 และ 6.25% ตามลำดับ โดย *Aspergillus* SR09 จะเป็นเชื้อราที่ทนต่อสารเคมีดีที่สุด สำหรับค่า MIC ของสารเคมีทั้ง 5 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญ *Fusarium* 4 ไอโซเลต มีค่า MIC เท่ากับ 1.5, 0.625, 2.5, 0.156 และ 1.5% ตามลำดับ และในการยับยั้ง *Penicilium* 6 ไอโซเลต พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 0.156, 1.25, 5.0, 0.156 และ 3.125% ตามลำดับ การศึกษาของ ณพรัตน์ และคณะ(2536) โดยใช้ แคปแทน ซีแนบ คูปราวิท ในอัตราส่วน 15 30 45 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ในยางที่ผลิตโดยใช้อัตราส่วนน้ำยาง:น้ำเท่ากับ 2:2 ตามคำแนะนำของสถาบันวิจัยยาง เปรียบเทียบกับการชุบแผ่นยางดิบตามคำแนะนำของสถาบันวิจัยยาง โดยใช้สารเคมีพวกพาราไนโตรฟีนอล อัตรา 0.1%W/V พบว่าให้ผลดีใกล้เคียงกับพาราไนโตรฟีนอลแต่อย่างไรก็ตามในฤดูฝนที่มีความชื้นในอากาศสูงก็ยังคงพบการปนเปื้อนของเชื้อรา

สารเคมีหลายๆชนิดที่เคยมีการศึกษาเพื่อนำมายับยั้งเชื้อราในแผ่นยาง เช่น พาราไนโตรฟีนอล แคปแทน พบว่ามีความเป็นพิษต่อผู้ใช้ แม้แต่นาโนซิงค์ออกไซด์ มีรายงานการศึกษาในปี 2552 ก็ยังพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของคนเมื่อใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม (Dechsakulthorn และคณะ (2007)) การใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรานอกจากมีผลต่อสุขภาพของผู้ใช้แล้ว ยางที่มีการเติมสารเคมีพวกพาราไนโตรฟีนอลยังไม่นิยมนำมาใช้ในการผลิตยางเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การทำฝากาวติดขวดบรรจุอาหาร รวมไปถึงการผลิตกระเป๋าน้ำร้อน หมวกว่ายน้ำ อุตสาหกรรมการทำรองเท้า

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น งานวิจัยในครั้งนี้ จึงมุ่งที่จะค้นหาสารยับยั้งเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงจากแอคติโนมัยสิทซึ่งเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุด พบว่า 45.6% ของสารต้านจุลินทรีย์ในฐานข้อมูล ABL ได้มาจากเชื้อแอคติโนมัยสิทโดยเฉพาะเชื้อในสกุล Streptomycete (Takizawa และคณะ, 1993) สารยับยั้งเชื้อราที่ได้จากแอคติโนมัยสิทได้แก่ นิกโกมัยซิน (nikkomycin) และ โพลีออกซิน (polyoxin) (Nolan และ Cross, 1988) แคนดิซิดิน (candicidin) (Lechevalier และคณะ, 1953) Blasticidin S ผลิตโดย *S. griseochromogenes* (Takeuchi และคณะ, 1958) Kasugamycin ค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 1965 โดย Umezawa และคณะ ผลิตโดย *S. kasugaensis* และ Validamycin A ผลิตโดย *S. hygroscopicus* var. *limoneus* (Iwasa และคณะ, 1970)

ในปัจจุบันยังไม่พบรายงานการใช้สารสกัดจากแอคติโนมัยสิทในการยับยั้งเชื้อราในผลิตภัณฑ์ยางหรือวัสดุใกล้เคียงเลย แต่มีรายงานว่าเชื้อแอคติโนมัยสิทสามารถยับยั้งเชื้อรากลุ่มที่เจริญบนแผ่นยางได้ เช่น สารสกัดจาก แอคติโนมัยสิทหลายสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* ได้ (Thenmozhi และ Kannabiran, 2011; Devi และคณะ 2006; Ayari และคณะ 2012; Alimuddin และคณะ 2011; Baniya และ Vaidya, 2011;) Lim และ คณะ (2000) พบว่าเชื้อ *Streptomyces humidus* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Fusarium oxysporum* ได้ มีรายงานพบว่าสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทหลายสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทั้ง *Aspergillus* และ *Fusarium* (Sharma และ Paruhar, 2010; Aghighi และคณะ, 2004; Bonjar และคณะ, 2005; El-mehalawy และคณะ, 2005; Gebreel และคณะ, 2008; Anitha และ Rebeeth, 2009; Kavitha และคณะ, 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยที่พบว่าสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทหลายสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรากลุ่มเดียวกับที่เจริญบนแผ่นยางได้ทั้ง 3 จีนัส คือ *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Fusarium* เช่น Atta (2009) พบว่าสารสกัดจากเชื้อ

Streptomyces olivaceiscleroticus, AZ-SH514 สามารถยับยั้งเชื้อ *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus* ATCC 16424 และ *Aspergillus flavus* ได้ โดยใช้วิธี paper method assay พบว่าให้ค่า MIC (mg/ml) เท่ากับ 31.25, 31.25, 46.9 และ 52.7 ตามลำดับ Oskay (2009) พบว่าสารสกัดจากเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ KEH23 สามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger, Aspergillus alternata*, *Penicillium* sp. จากรายงานต่างๆ ที่กล่าวมาทำให้สามารถสรุปได้ว่าแอคติโนมัยสิทจีนัส Streptomyces หลายสายพันธุ์ ในหนึ่งสายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อราได้หลายชนิดดังนั้นจึงน่าจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราที่เจริญบนแผ่นยางได้ ซึ่งเชื้อราที่เจริญบนแผ่นบางก็ประกอบไปด้วยเชื้อราหลายชนิด และสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* และ *Penicillium* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความทนทานต่อสารปฏิชีวนะ หรือ สารที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อราได้ดี ก็น่าจะสามารถยับยั้งเชื้อราชนิดอื่นๆ ได้ด้วย

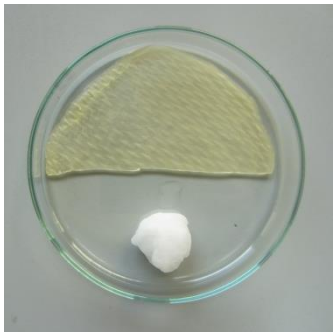
ในประเทศไทยได้มีรายงานเกี่ยวกับการใช้เชื้อแอคติโนมัยสิทยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เจริญบนแผ่นยาง แต่ยังไม่มีรายงานว่าได้นำไปทดสอบในแผ่นยางจริงๆ เช่น สายสมรและคณะ (2555) พบว่าสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท NKS-3 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* sp NKF-7 และ *Aspergillus* sp NKF-9 ได้ดีที่สุด โดยให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ (MIC) เท่ากับ 0.156 mg/ml เมื่อทดสอบด้วยวิธี Paper disc agar diffusion assay ศิรินุช (2553) ทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus s*p. SR9, *Aspergillus sp*. NY05, *Fusarium* sp. SR2 และ *Penicillium* sp. PR02 ด้วยวิธี broth microdilution method พบว่าเชื้อ *Streptomyces* AC41 และ AC51 สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด โดยให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 16-64 µg/ml เมื่อเทียบกับ ρ-nitrophenol ซึ่งให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 32-128 µg/ml นอกจากนี้ Khamna (2009) พบว่าสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทหลายสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus flavus* และ *Fusarium oxysporum* นารีลักษณ์ (2552) ทำการทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus* sp. สาเหตุของโรครากขาวในยางพาราด้วยวิธี Dual culture bioassay พบว่าเชื้อ *Streptomyces* TMR032 ได้ดีโดยให้ขนาดของ Inhibition zone เท่ากับ 25 มม. ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับ cycloheximmide (26 มม.) ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อรา นารีลักษณ์ (2556) ทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* สาเหตุโรคเส้นดำยางพาราในระดับห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี Dual culture bioassay พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 55 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

จากรายงานวิจัยต่างๆ ที่กล่าวมาทำให้สามารถมีความเชื่อมั่นว่าสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทน่าจะมีศักยภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อราบนแผ่นยางได้ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จะนำเชื้อแอคติโนมัยสิทสายพันธุ์ต่างๆ มาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา เพื่อหาสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดโดยเทียบกับสารที่เคยมีรายงานการศึกษา และศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดที่ได้จากเชื้อไปใช้ในการยับยั้งเชื้อราบนแผ่นยางจริง โดยเน้นเรื่องของการป้องกันเชื้อราในระยะยาว ไม่ทำให้คุณสมบัติของยางเปลี่ยนไปและมีความปลอดภัยในการนำไปใช้โดยการศึกษาผลความเป็นพิษของสารร่วมด้วย

4. วิธีการวิจัย

1. การแยกเชื้อราที่ปนเปื้อนบนแผ่นยาง

ทำการแยกเชื้อราที่ปนเปื้อนในยางแผ่นผึ่งแห้ง โดยนำยางแผ่นผึ่งแห้งมาใส่ไว้ใน Moist chamber ซึ่งทำได้โดยนำก้อนสำลีชุบน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ วางในจานอาหารที่มีแผ่นยางอยู่ดังรูป 3 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาสเซลเซียส จนสังเกตเห็นเชื้อราเจริญบนยางแผ่น ทำการแยกเชื้อราที่ขึ้นบนยางแผ่นให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี cross streak บนอาหาร water agar ที่เติม rose Bengal และ chloramphenicol จากนั้นเก็บรักษาเชื้อราบริสุทธิ์ไว้อาหารวุ้นเอียงเพื่อนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของโดยเชื้อแอคติโนมัยสิทต่อไป



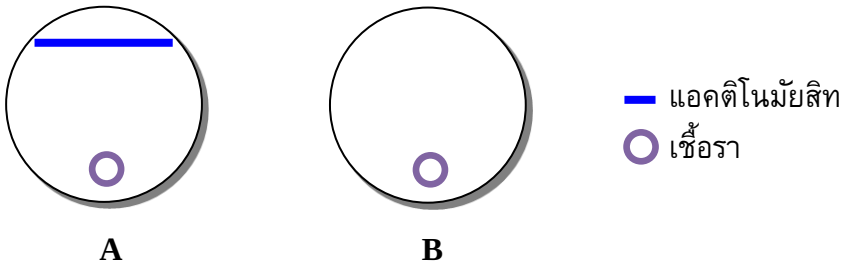
รูป 3 ยางแผ่นใน Moist chamber

2. จัดจำแนกเชื้อราบนแผ่นยางโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำเชื้อราที่แยกได้จากแผ่นยางมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนสไลด์ (slide culture technique) จนเชื้อรามีการสร้างสปอร์ จากนั้นจึงนำสไลด์ที่มีเชื้อรามาตรวจดูลักษณะของสปอร์ภายกล้องจุลทรรศน์

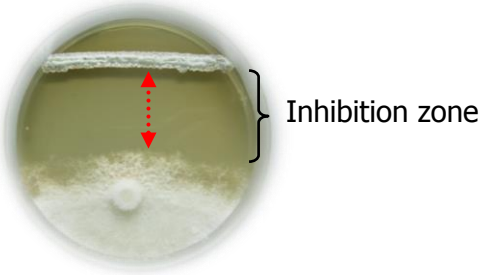
3. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราในห้องปฏิบัติการ

ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสิทที่มีในห้องปฏิบัติการ (เชื้อ *Streptomyces* TMR 032 ที่เคยทดสอบกับเชื้อรา *Rigidoporus* sp. โครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา (RDG5250036) และเชื้อไอโซเลท A31 และ A30 ที่เคยทดสอบกับเชื้อรา *Phytophthora* sp. ในโครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา (RDG 5550073) ร่วมกับเชื้อที่แยกได้ใหม่จากดินด้วยวิธี Dual culture bioassay (Bennett et al., 1996) โดยเพาะเชื้อแอคติโนมัยสิทลงบนด้านใดด้านหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเพาะเชื้อราลงไปในด้านตรงข้ามกับเชื้อแอคติโนมัยสิท ชุดควบคุมเป็นจานอาหารที่เพาะแต่เชื้อราอย่างเดียว (รูป 4) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ



รูป 4 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Dual culture bioassay A: ชุดทดสอบ B: ชุดควบคุม

บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มเพลท ดังรูป 5 สังเกตและวัดขนาดของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้น เลือกแอคติโนมัยสิทที่มีบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดเพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

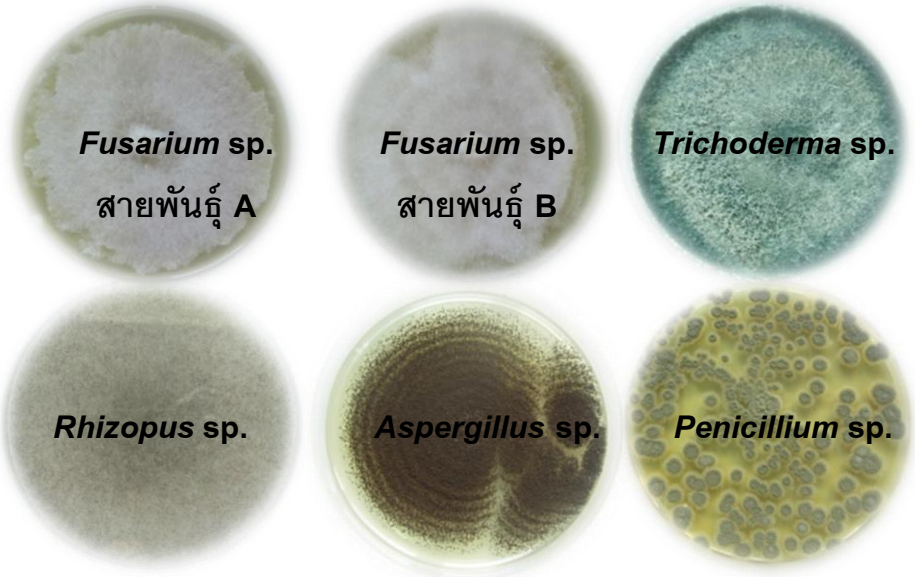


รูป 5 การวัดขนาดของโซนยับยั้ง (Inhibition Zone)ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Dual culture bioassay

โดยเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบเป็นเชื้อราที่แยกได้จากยางแผ่นผึ่งแห้ง 14 สายพันธุ์ และเชื้อราที่พบว่ามีรายงานว่าปนเปื้อนในยางแผ่นที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการอีก 6 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่

1. *Trichoderma* sp.
2. *Aspergillus* sp.
3. *Penicillium* sp.
4. *Fusarium* sp. สายพันธุ์ A (*F. moniliforme*) โคโลนีสีม่วง
5. *Fusarium* sp. สายพันธุ์ B (*F. oxysporum*) โคโลนีสีส้ม
6. *Rhizopus* sp.

ซึ่งเชื้อราทั้ง 6 สายพันธุ์มีลักษณะโคโลนีดังรูป 6



รูป 6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์

4. เปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสิทกับสารเคมี

สกัดสารยับยั้งเชื้อราจากเชื้อแอคติโนมัยสิทสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

1) เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสิทในอาหารเหลว ISP2 บนเครื่องเขย่า บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน
2) เติมตัวทำละลาย (ethyl acetate) ลงไปในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เขย่า ทุก 15 นาที
3) แยกส่วนของ ethyl acetate ออกมาแล้วทำการระเหย ethyl acetate ออกด้วยเครื่อง evaporator เก็บส่วนที่เหลือ (crude extract) เพื่อนำไปทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (Minimum Fungicidal Concentration, MFC)

การทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและค่า MFC

1) เจือจางสารสกัดหยาบในเมทานอลและพาราไนโตรฟีนอลในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ กัน จากนั้นนำไปเติมลงในอาหาร PDA เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.05, 0.1, 0.5, 0.7 และ 1 มก./มล. จากนั้นนำอาหาร PDA ที่ได้เทลงในจานอาหาร
2) เพาะเชื้อราลงไปในจานอาหารที่มีสารสกัดหยาบและพาราไนโตรฟีนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ มีชุดควบคุมคือจานอาหารที่ไม่ได้เติมสาร
3) เมื่อเชื้อราในจานอาหารควบคุมเจริญเต็มจาน ให้ทำการวัดขนาดของโคโลนีของเชื้อราที่เจริญในอาหารทดสอบ เพื่อนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (percent inhibition of radial growth: PIRG) ค่า MFC คือ ความเข้มข้นที่ให้ค่า PIRG เท่ากับ 100% การคำนวณค่า PIRG มีสูตรคำนวณดังนี้

PIRG = [(R1-R2)/R1x100]

R1 = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อในจานอาหารควบคุม

R2 = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อในจานอาหารทดสอบ

สำหรับเชื้อราที่มีการเจริญโดยมีการกระจายของโคโลนี เช่น *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. จะไม่สามารถวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ได้ ยกเว้น 100% นั่นคือไม่พบการเจริญของเชื้อราในจานอาหาร

เปรียบเทียบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ของสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทกับสารพาราไนโตฟีนอลที่เคยมีรายงานการศึกษาว่าใช้ป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราในแผ่นยางอบแห้งถึงแม้ว่าปัจจุบันจะไม่มีการใช้สารพาราไนโตฟีนอลในยางแผ่นแล้วก็ตาม เพื่อประเมินศักยภาพของสาร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (ค่า MIC ยิ่งน้อยเท่าไหร่แสดงว่าสารมีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราดีมาก นั่นคือ สารปริมาณที่น้อยมากสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี)

5. การทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่น

นำสารสกัดจากแอคติโนมัยสิทมาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อราในแผ่นยางโดยทำการทดลองสองวิธี คือ

5.1 แบบที่มีการผสมสารสกัดหยาบลงในแผ่นยาง

เตรียมยางแผ่นที่ใช้ในการทดสอบการป้องกันการเจริญของเชื้อรา โดยมีชุดทดสอบที่เติมสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสิทที่คัดเลือกได้ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้เติม ดังตาราง 1

ตาราง 1 การเตรียมแผ่นยางเพื่อใช้ในการทดสอบการป้องกันการเจริญของเชื้อรา

ชุดการทดลอง	ปริมาณสารที่เติม			
	น้ำยาง (กรัม)	น้ำกลั่น (มล.)	กรดอะซีติก 2 % (มล.)	สารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสิทที่คัดเลือกได้ (มล.)
ชุดทดสอบ	20	10	8	2
ชุดควบคุม	20	12	8	0

หมายเหตุ: ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดหยาบที่ใช้ในชุดทดสอบเท่ากับ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าค่า MIC ของสาร (0.5มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เตรียมโดยละลายสารสกัดหยาบ 40 มิลลิกรัม ด้วยตัวทำละลาย เมทานอล 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำลงไป 10 มิลลิลิตร

นำยางแผ่นชุดทดสอบและชุดควบคุมมาตัดเป็น 4 ส่วน นำแต่ละส่วนมาใส่ใน moist chamber ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตดูการปนเปื้อนของเชื้อราบนแผ่นยาง บันทึกภาพ

5.2 การจุ่มแผ่นยางลงในสารสกัด

นำแผ่นยางมาทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราโดยเปรียบระหว่างการจุ่มแผ่นยางลงในสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทที่ละลายด้วยเมทานอลและน้ำ โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 4 ชุด ดังนี้

- ชุดทดสอบ1 : จุ่มแผ่นยางในสารสกัดจากแอคติโนมัยสิทที่ละลายด้วยเมทานอล (ความเข้มข้น 1 มก./มล.)
- ชุดทดสอบ 2 : จุ่มในสารสกัดจากแอคติโนมัยสิทที่ละลายด้วยน้ำ (ความเข้มข้น 1 มก./มล.)
- ชุดควบคุม 1 : จุ่มเมทานอล
- ชุดควบคุม 2 : จุ่มในน้ำ

นำยางแผ่นที่ได้มาใส่ใน moist chamber สังเกตดูการปนเปื้อนของเชื้อราบนแผ่นยาง บันทึกภาพ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ

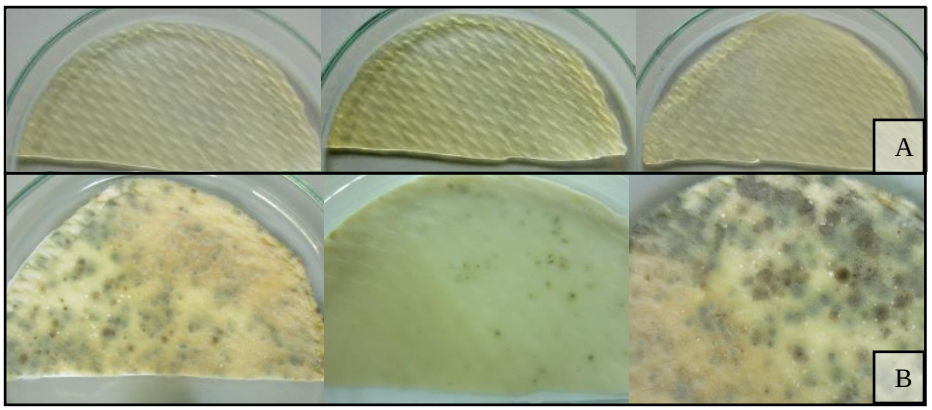
6. เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท TMR032 กับพาราไนโตรฟีนอล

เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท TMR032 และ พาราไนโตรฟีนอล โดยการผลิตสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยสิททำโดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP2 ปริมาณ 1000 มล. (สูตร ISP2: yeast extract 4 กรัม, malt extract 10 กรัม, glucose 4 กรัม และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย Ethyl acetate 2000 ml (ethyl acetate สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก จะมีการสูญเสียเนื่องจากมีการระเหยระหว่างการสกัดไม่เกิน 50 มิลลิลิตร) ทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง evaporator นำตัวทำละลายกลับไปทำการสกัดสารใหม่อีก 9 รอบ

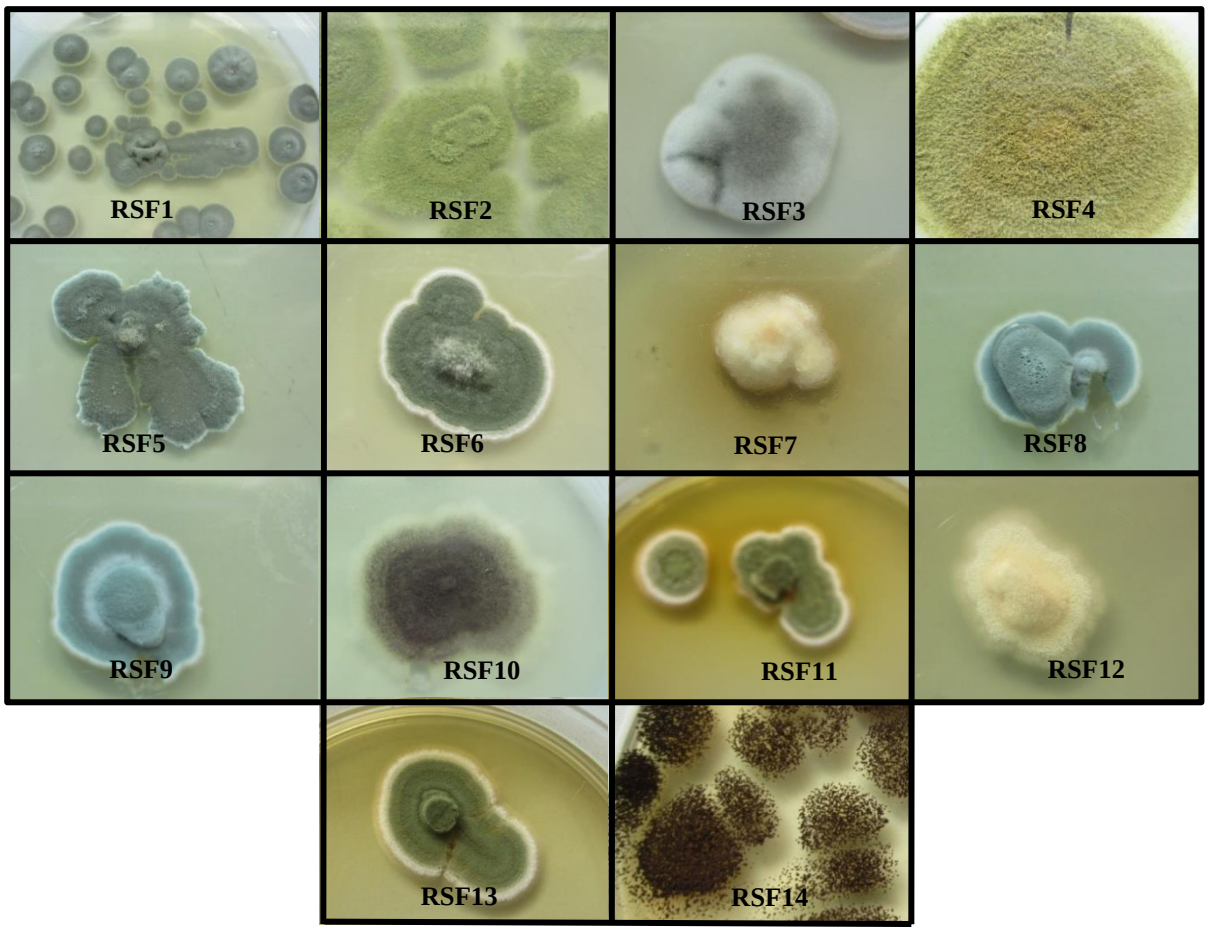
ผลการวิจัย

1. การแยกเชื้อราที่ปนเปื้อนบนแผ่นยาง

ผลจากการนำยางแผ่นผึ่งแห้งมาใส่ไว้ใน Moist chamber เป็นเวลา 5 วัน พบว่ามีเชื้อราเจริญบนยางแผ่น (รูป 7) จากนั้นทำการแยกเชื้อราให้อยู่ในรูปเชื้อบริสุทธิ์ พบว่าได้เชื้อราทั้งหมด 14 ไอโซเลท โดยแต่ละไอโซเลทมีลักษณะโคโลนีดังรูป 8



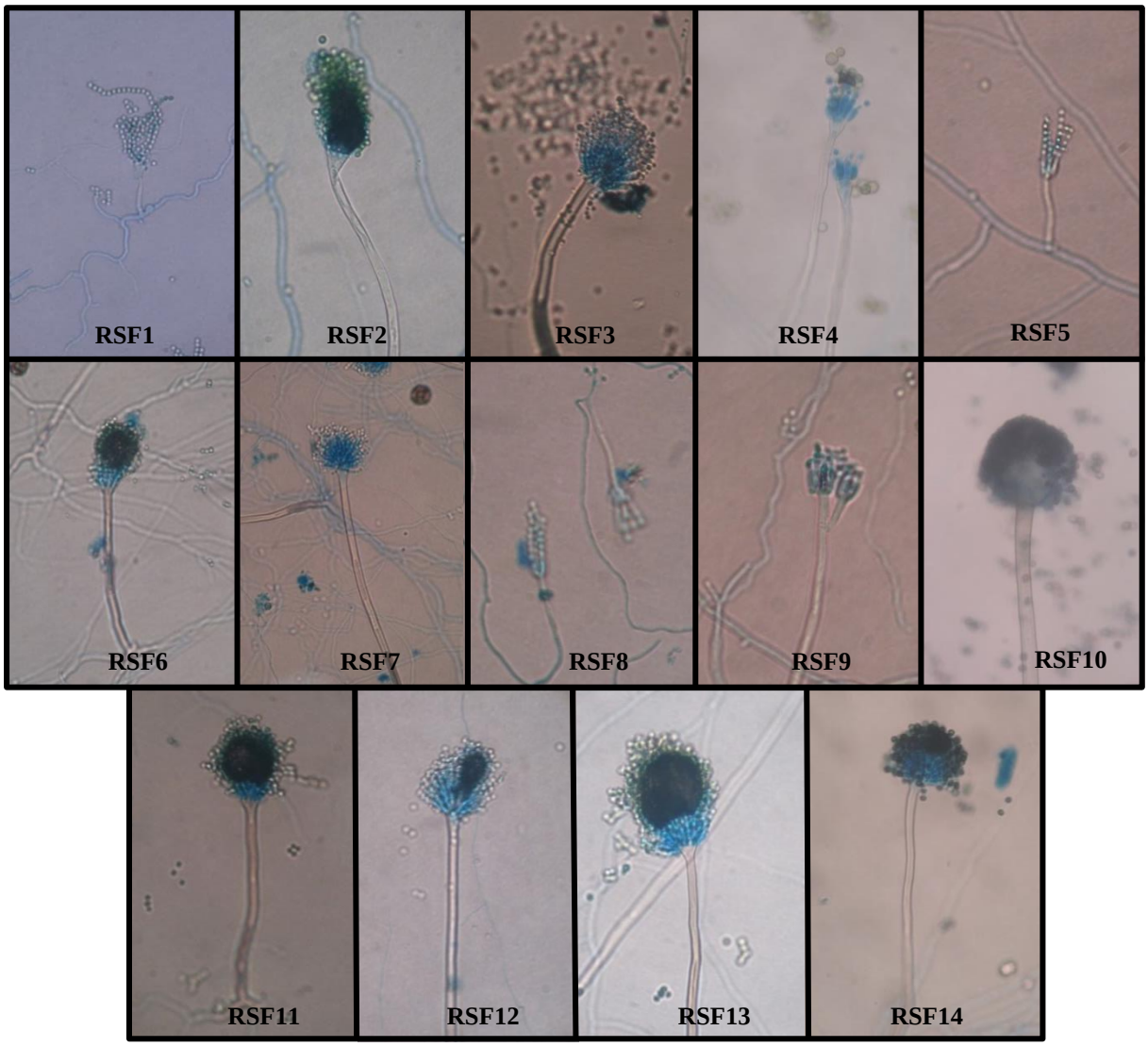
รูป7 A: ยางแผ่นผึ่งแห้งใน moist chamber วันแรกของการทดลอง
B: ยางแผ่นผึ่งแห้งใน moist chamber หลังจากทิ้งไว้ 5 วัน



รูป 8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้จากแผ่นยาง

2. การจัดจำแนกเชื้อราที่แยกได้จากยางแผ่น

การจัดจำแนกเชื้อราโดยอาศัยลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เชื้อราที่แยกได้ไอโซเลท RSF2, RSF3, RSF7, RSF10 และ RSF14 มีเส้นใยที่มีผนังกั้นตามขวาง สร้างสปอร์รูปร่างกลมต่อกันเป็นสาย ปลายก้านชูสปอร์จะโป่งออกเป็นเวสสิเคิล (vesicle) และมีส่วนที่ยื่นออกมาเรียกสเตอริกมา ซึ่งสปอร์จะอยู่กับส่วนปลายของสเตอริกมา ดังนั้นเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลทนี้จึงจัดอยู่ในจีนัส *Aspergillus* ส่วนเชื้อราที่แยกได้อีก 9 ไอโซเลทสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายเช่นกัน แต่ก้านชูสปอร์ซึ่งเรียกว่า phialide จะมีการแตกแขนงเหมือนไม้กวาด จึงจัดอยู่ในจีนัส *Penicillium* ดังรูป 9



รูป 9 ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา 14 สายพันธุ์ที่แยกได้จากยางแผ่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์

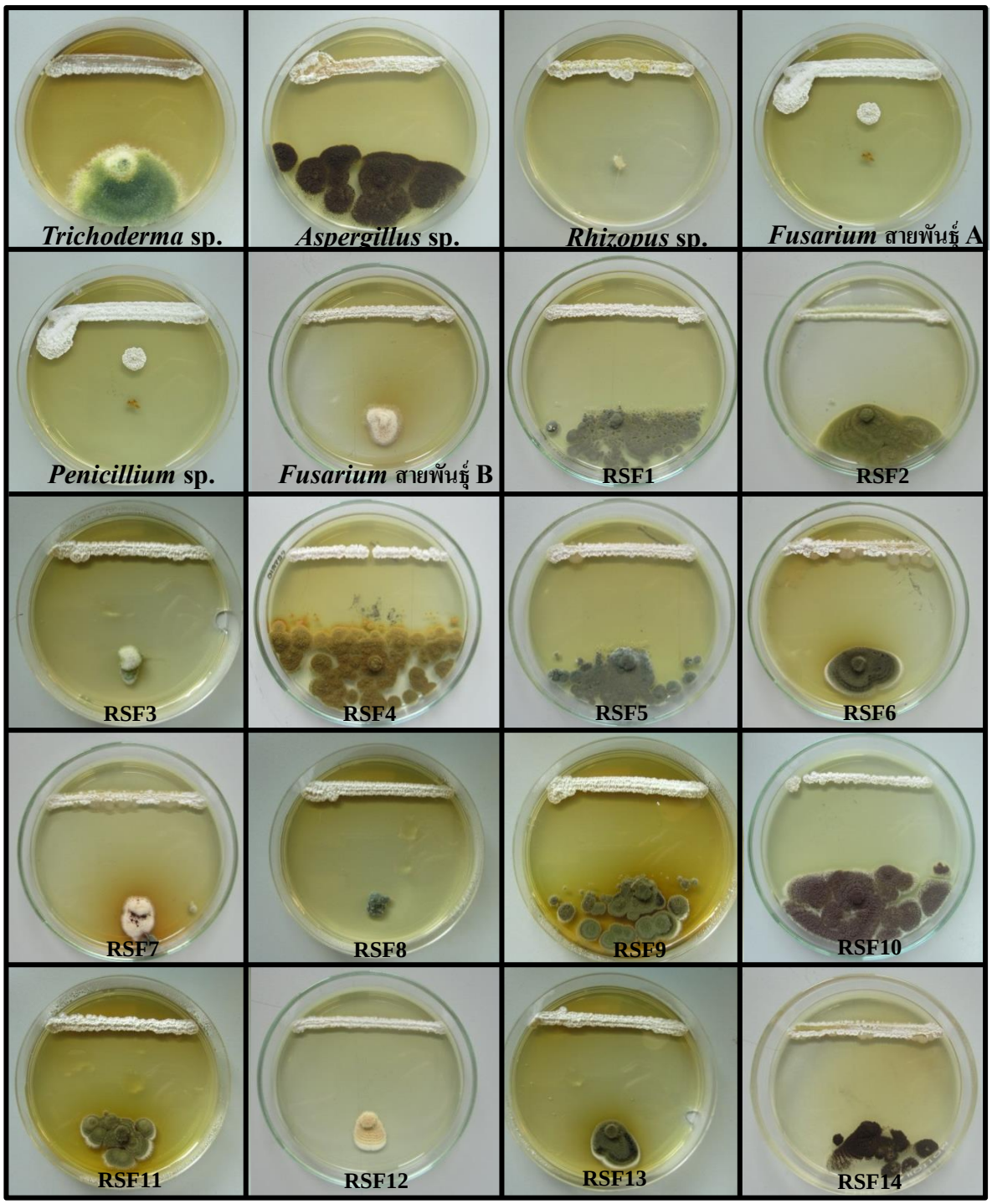
3. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราในห้องปฏิบัติการ

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Dual culture bioassay โดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสิทที่มีในห้องปฏิบัติการทั้งหมด 180 สายพันธุ์ ใช้เชื้อราที่เก็บรักษาในห้องปฏิบัติการ ที่เคยมีรายงานการปนเปื้อนบนแผ่นยาง และเชื้อราที่แยกได้จากแผ่นยางทั้งหมด 20 สายพันธุ์ เป็นเชื้อราทดสอบ ผลการวิจัยพบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสิททั้งหมด 72 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้ ดังตาราง 2

จากตาราง 2 พบว่าเชื้อ *Streptomyces* TMR032 ให้ผลการยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนการยับยั้งในเชื้อราทดสอบทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ มากกว่า 30 มิลลิเมตรในทุกสายพันธุ์ ดังรูป 10

ตาราง 2 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทั้ง8 สายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการ

ขนาดของโซนยับยั้ง (มม.)	จำนวน	ไอโซเลท
≥30	1	TMR032
20-29	3	A31, 8-2-1, F2
10-19	29	F1, A75, F4, B5, D1, D2, D3,D9,E1 E4, E5, E8, E9, G1, G6, G10, G11, G19, H1, H2, , H4, H5, H6, H7, I4, I5, I9, I10, J1
0-9	39	F5, F7, B2, B3, B4, B6, D4, D5, D6, D7, D8, E2, E3,E6, E7, G2, G3, G4, G5, G7, G8, G9, G12, G13, G14, G15, G16, G17, G18, H3, H8, H9, H10, I1, I2, I3, I6, I7, I8



รูป 10 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 20 สายพันธุ์ของเชื้อ *Streptomyces* TMR032 (ด้านบน: *Streptomyces* TMR032, ด้านล่าง : เชื้อราทดสอบ)

4. เปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* TMR032 กับสารเคมี

เมื่อทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราระหว่างสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 และสารพาราไนโตฟีนอลพบว่าสารสกัดหยาบจาก*Streptomyces* TMR032 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ 100 % ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนพาราไนโตรฟีนอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ 100 % ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตาราง 3

ตาราง 3 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR 032 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

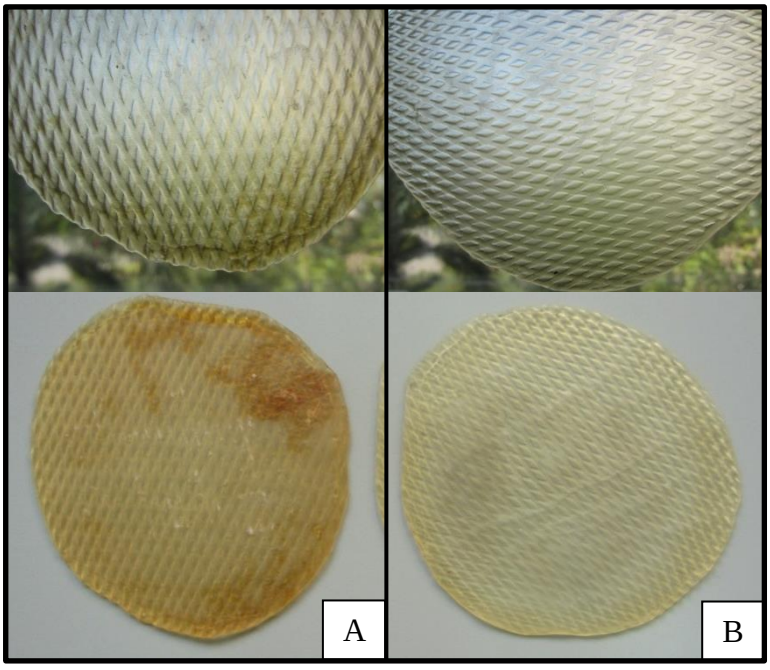
เชื้อราทดสอบ	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ**									
	0.05 มก./มล.		**0.1 มก./มล.**		**0.5 มก./มล.**		**0.7 มก./มล.**		**1 มก./มล.**	
	TMR 032	**PNP**	**TMR 032**	**PNP**	**TMR 032**	**PNP**	**TMR 032**	**PNP**	**TMR 032**	**PNP**
Rhizopus sp.	100	10.23	100	58.14	100	100	100	100	100	100
Penicillium sp.	0	0	0	0	100	0	100	100	100	100
Trichoderma sp.	57.12	12.30	75.29	46.12	100	100	100	100	100	100
Aspergillus sp.	0	0	0	0	100	0	100	100	100	100
Fusarium sp. A	100	21.06	100	57.98	100	100	100	100	100	100
Fusarium sp. B	100	15.17	100	68.75	100	100	100	100	100	100
RSF1	0	0	100	0	100	100	100	100	100	100
RSF2	0	0	100	0	100	0	100	100	100	100
RSF3	0	0	0	0	100	0	100	100	100	100
RSF4	0	0	100	0	100	0	100	0	100	100
RSF5	0	0	100	0	100	0	100	0	100	100
RSF6	0	0	100	0	100	0	100	0	100	100
RSF7	0	0	100	0	100	0	100	100	100	100
RSF8	0	0	0	0	100	100	100	100	100	100
RSF9	0	0	0	0	100	100	100	100	100	100
RSF10	0	0	100	0	100	100	100	100	100	100
RSF11	0	0	0	0	100	0	100	100	100	100
RSF12	0	0	0	0	100	0	100	100	100	100
RSF13	0	0	100	0	100	0	100	0	100	100
RSF14	0	0	0	0	100	0	100	100	100	100

หมายเหตุ: TMR 032 คือ สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR 032; PNP คือ paranitrophenol**;**

5. การทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่น

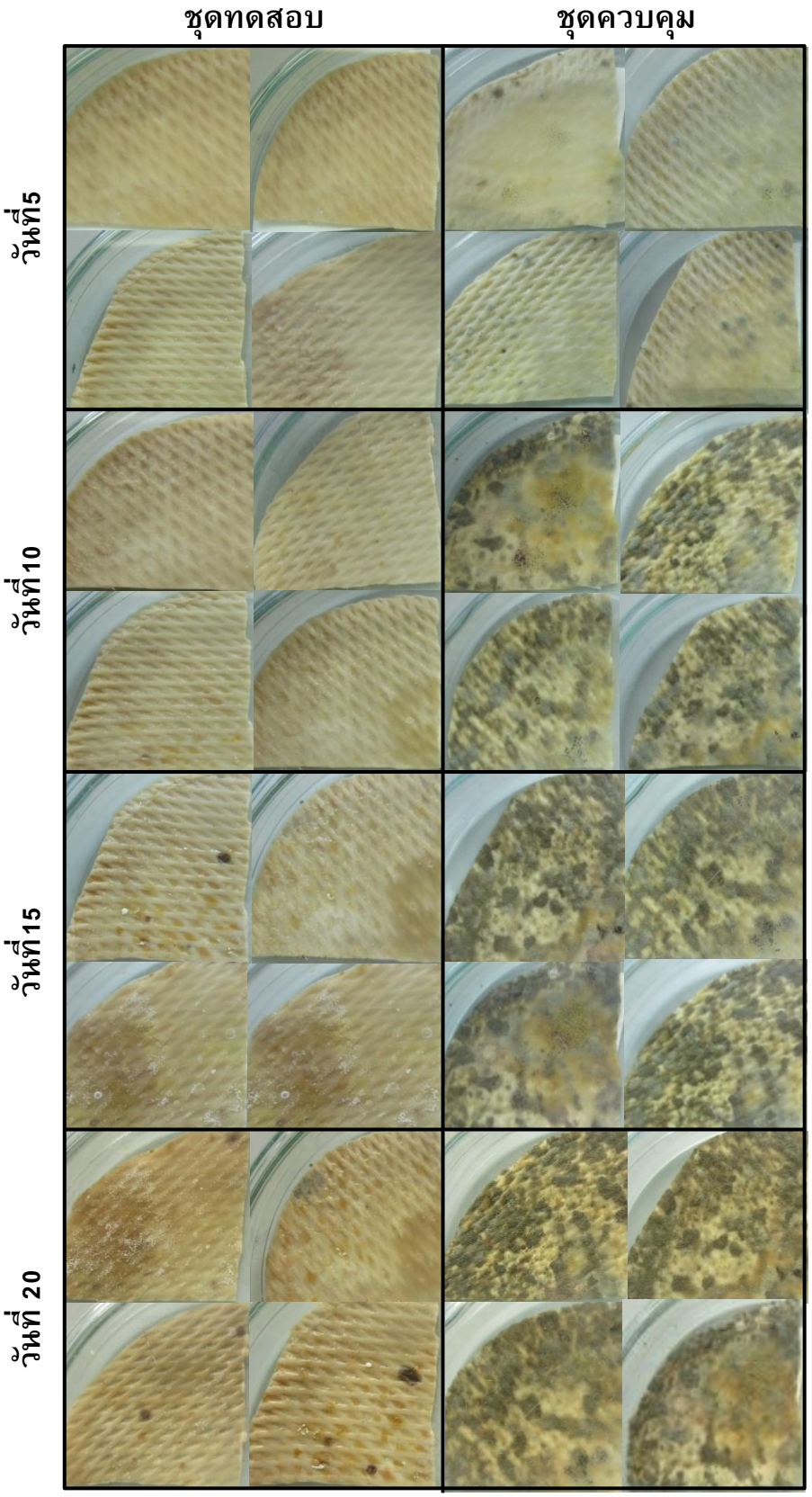
5.1 **แบบที่มีการผสมสารสกัดลงในแผ่นยาง**

การทดสอบการป้องกันการเจริญของเชื้อราในยางแผ่นโดยใช้สารสกัดหยาบเติมลงในแผ่นยางเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ แผ่นยางที่ไม่ได้เติมสารสกัด ในด้านคุณภาพของแผ่นยางพบว่าการเติมสารสกัดลงไปจะทำให้ยางแผ่นมีสีเข้มขึ้น และในขั้นตอนการเตรียมพบว่ามีการจับกันของเนื้อยางซึ่งอาจจะเนื่องมาจากการใช้เมทานอลเป็นตัวละลายสารสกัดหยาบ (รูป 11) ในด้านของประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อราพบว่ายางแผ่นที่มีการเติมสารสกัดลงไปจะสามารถป้องกันเชื้อราได้นานถึง 20 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมจะเริ่มสังเกตพบการปนเปื้อนของเชื้อราได้เมื่อวันที่ 5 ของการทดลอง (รูป 12)



รูป 11 การเปรียบเทียบสีและความใสของยางแผ่นที่มีการเติมสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* TMR 032 และยางแผ่นชุดควบคุม (ไม่ได้เติมสารสกัด)

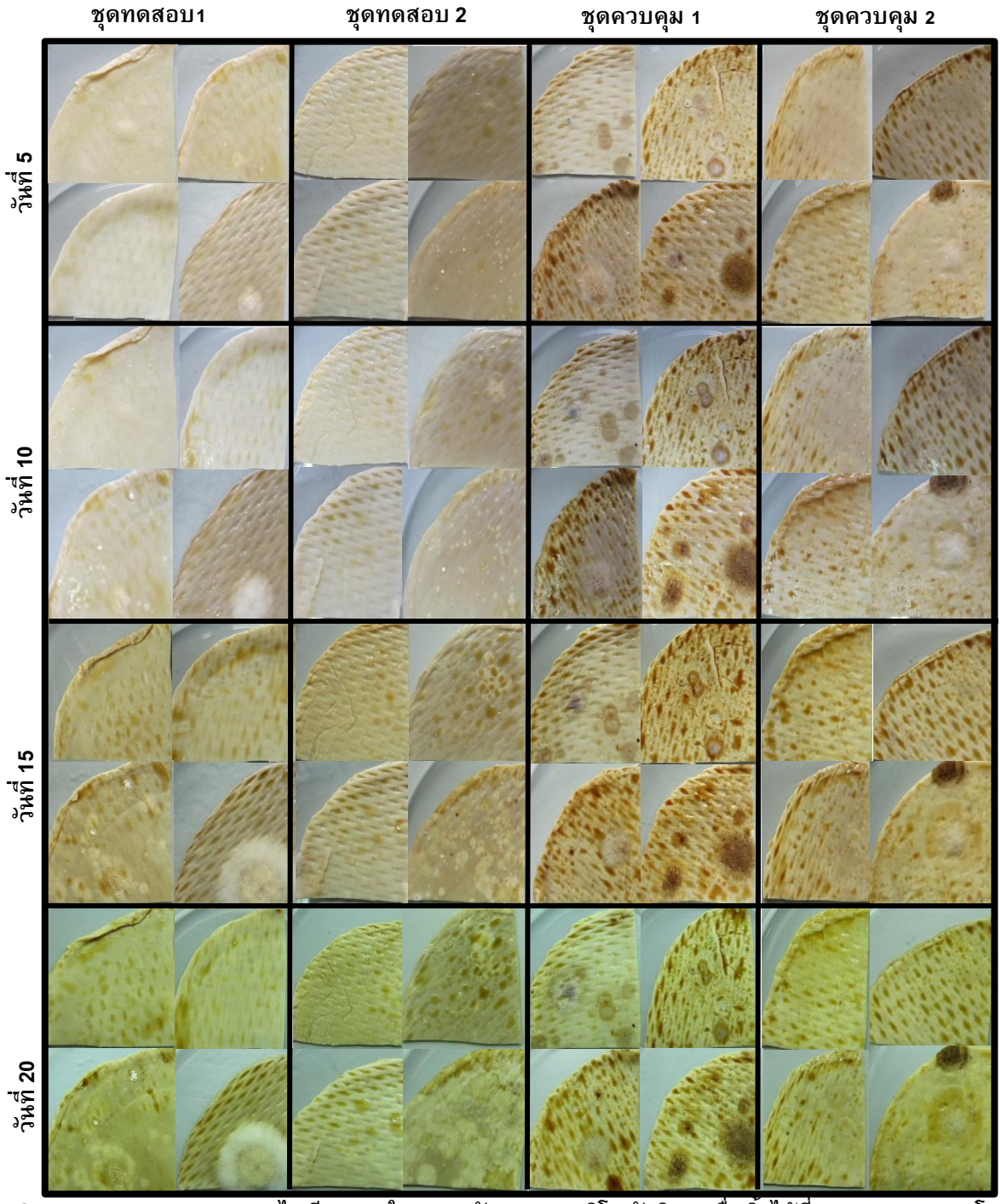
A: ยางแผ่นที่เติมสารสกัดจาก *Streptomyces* TMR 032 , B: ยางแผ่นที่ไม่ได้เติมสารสกัด



รูป 11 เปรียบเทียบการปนเปื้อนของเชื้อราบนแผ่นยางชุดทดสอบ (เติมสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR 032) และยางแผ่นชุดควบคุม (ไม่ได้เติมสาร) ที่เวลาต่างๆ โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ

5.2 การจุ่มแผ่นยางลงในสารสกัด

การทดสอบการป้องกันการเจริญของเชื้อราในยางแผ่นโดยการจุ่มแผ่นยางลงในสารสกัดหยาบที่ละลายด้วยเมทานอล และ น้ำ (ชุดทดสอบ 1 และ 2 ตามลำดับ) โดยมีความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1 mg/ml โดยมีชุดควบคุม 1 และ 2 คือ การจุ่มในน้ำ และ เมทานอล ตามลำดับ ในด้านคุณภาพของแผ่นยาง พบว่าคุณภาพแผ่นยางก่อนจุ่มและหลังจุ่มไม่มีความแตกต่างกันเลย ในด้านของประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อราพบว่ายางแผ่นที่มีการจุ่มในสารสกัดจะสามารถป้องกันเชื้อราได้นานถึง 20 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมจะเริ่มสังเกตพบการปนเปื้อนของเชื้อราได้เมื่อวันที่ 5 ของการทดลอง (รูป 12)



รูป 12 แผ่นยางชุดควบคุม (ไม่มีการจุ่มในสารสกัดจากแอคติโนมัยสิท) เมื่อทิ้งไว้ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ

6. เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 กับ พาราไนโตรฟีนอล

จากตาราง 4 พบว่า สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 ปริมาณ 1 กรัม มีต้นทุนการผลิตเท่ากับ 193.304 บาท เมื่อเปรียบเทียบกับพาราไนโตรฟีนอลซึ่งมีราคา 37 บาท/กรัม เมื่อนำไปใช้กับแผ่นยางเมื่อดูจากค่า MFC ที่ได้จากผลการทดลองข้อ 4 พบว่าต้องใช้พาราไนโตรฟีนอลในปริมาณที่มากกว่า สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 ถึง 2 เท่า ซึ่งอย่างไรก็ตามการใช้พาราไนโตรฟีนอลจะมีต้นทุนถูกกว่าสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 119.304 บาท

ตาราง 4 ต้นทุนการผลิตสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 ปริมาณ 1 กรัม

ลำดับ	รายการ	ราคา(บาท)/หน่วย	ปริมาณที่ใช้	คิดเป็นเงิน (บาท)
1	Yeast extract	990/500กรัม	4กรัม	7.92
2	Malt extract	1750/500กรัม	10 กรัม	35
3	glucose	96/1000กรัม	4 กรัม	0.384
4	Ethyl acetate	1000/ลิตร	50 มล	50
5	ประมาณค่าไฟ			
	-เครื่องเขย่า 7 วัน	-	-	50
	- evaporator รอบละ 30 นาที (10 รอบ)	-	-	50
	รวม			193.304

วิจารณ์ผลการวิจัย

การปนเปื้อนของเชื้อราบนยางแผ่นจะทำให้แผ่นยางมีคุณภาพลดลงและขายได้ในราคาที่ต่ำลง โดยสถาบันวิจัยยางกำหนดว่ายางแผ่นดิบคุณภาพ 1,2 และ 3 ต้องไม่มีราบนแผ่นยาง การปนเปื้อนของเชื้อราบนยางแผ่นเกิดจากการที่แผ่นยางมีชื้นสูง ซึ่งอาจเกิดจากการเก็บรวบรวมยางแผ่นโดยอาจนำเอาแผ่นยางที่ยังชื้นอยู่มาซ้อนทับกันเพื่อรอจำหน่ายทำให้เกิดการเจริญของเชื้อราบนแผ่นยางได้ แนวทางในการป้องกันการปนเปื้อนเชื้อราบนแผ่นยางมีหลายวิธี เช่น การรมด้วยควันเพื่อป้องกันเชื้อราเพื่อให้เก็บรักษาได้นานๆ หรืออาจใช้ลมร้อนมาช่วยให้ยางแห้งและเติมสารเคมีป้องกันเชื้อราเช่น พาราไนโตรฟีนอล ซึ่งเป็นสารพิษ ก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) ในอดีตเคยใช้ในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราบนยางแผ่น (fullerton, 1929) แต่ปัจจุบันได้ถูกห้ามใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยางแผ่น แต่ได้มีการนำสารเคมีชนิดอื่นๆมาใช้แทนเช่น sodium metabisulphite, potassium sorbate, potassium benzoate ซึ่งสารต่างๆเหล่านี้ก็ยังคงมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของผู้ใช้ (สุพรรณษา, 2551) อย่างไรก็ตามแม้ว่าใช้วิธีการต่างๆ ดังกล่าวในกันป้องเชื้อราแต่เมื่อเก็บแผ่นยางไว้เป็นเวลานานๆ หรือ ในช่วงฤดูฝนซึ่งมีความชื้นค่อนข้างสูงแผ่นยางที่เก็บไว้จะมีการปนเปื้อนของเชื้อราอยู่ดี งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะนำสารชีวภาพซึ่งได้จากแบคทีเรียแอคติโนมัยสิทมาใช้ในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราบนแผ่นยาง

เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา ทดแทนการใช้สารเคมี โดยใช้เชื้อราที่มีในห้องปฏิบัติการที่เคยมีรายงานว่ามีการปนเปื้อนในยางแผ่นร่วมกับเชื้อราที่แยกได้จากแผ่นยางเป็นเชื้อราทดสอบ

จากการแยกเชื้อราที่ปนเปื้อนบนยางแผ่นพบว่าสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 14 ไอโซเลท โดยพบว่าเป็นเชื้อ *Aspergillus* 5 ไอโซเลท และเชื้อ *Penicillium* 9 ไอโซเลท คิดเป็น 35.7 % และ 64.3% ของเชื้อทั้งหมดที่แยกได้ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสายสมรและคณะ (2555) และ อรัญ (2553) ซึ่งพบว่าเชื้อราที่ปนเปื้อนบนยางแผ่นส่วนใหญ่เป็น 2 จีนัสนี้ ซึ่งชนิดของเชื้อราที่พบว่าสามารถปนเปื้อนแผ่นยางได้จะขึ้นอยู่กับความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศด้วย เนื่องจากเชื้อราแต่ละชนิดมีความต้องการความชื้นในการเจริญแตกต่างกัน (Lian *et al*., 2008) เชื้อราส่วนใหญ่ที่ปนเปื้อนบนแผ่นยางเป็นชนิดเดียวกับเชื้อราที่พบในอากาศ (Chang และคณะ, 1995)

ผลของการนำเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการทั้งหมด 180 สายพันธุ์มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Dual culture bioassay โดยใช้เชื้อราทดสอบจำนวน 20 สายพันธุ์ ผลการทดสอบพบว่า เชื้อ *Streptomyces* TMR032 ให้ผลการยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนยับยั้งมากกว่า 30 มิลลิเมตรในเชื้อราทดสอบทั้ง 20 สายพันธุ์ เมื่อนำสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 และสารพาราไนโตฟีนอลมาทำการเปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราโดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (MFC) พบว่าสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ดีกว่าพาราไนโตรฟีนอล โดยพบว่ามีค่า MFC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนพาราไนโตรฟีนอลมีค่า MFC เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเจริญของเชื้อราบนแผ่นยางโดยการจุ่มแผ่นยางในสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 ความเข้มข้น 1 มก./มล และการนำสารสกัดหยาบมาผสมในยางแผ่นให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มก./มล. พบว่าสามารถป้องกันเชื้อราได้นานถึง 20 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมจะเริ่มสังเกตพบการปนเปื้อนของเชื้อราได้ในวันที่ 5 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของณพรัตน์ และคณะ, 2536 ที่ใช้การแช่แผ่นยางในพาราไนโตรปีนอลพบว่าเมื่อเตรียมยางแผ่นโดยใช้อัตราส่วนของน้ำยาง: น้ำ เท่ากับ 3:2 จากนั้นแช่แผ่นยางใน พาราไนโตรฟีนอล อัตรา 0.1%W/v 30 นาที แล้วนำไปผึ่งในโรงเรือนพบว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อราบนแผ่นยางดิบในระยะเวลาที่ทำการทดลอง 7 วัน

การปนเปื้อนของเชื้อราบนแผ่นยางที่แตกต่างกันอาจขึ้นกับสายพันธุ์ของยางพาราที่นำมาทำยางแผ่นซึ่งมีความแตกต่างกันเนื่องจากมีอัตราส่วนของสารต่างๆ เช่น โปรตีน น้ำตาล และสารประกอบอื่นๆ ที่เป็นอาหารของเชื้อราแตกต่างกัน ดังนั้นทำให้มีการปนเปื้อนของเชื้อราในยางแผ่นที่ได้จากยางพาราสายพันธุ์ต่างๆ แตกต่างกัน (นภาวรรณ และคณะ, 2008) การที่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อราบนยางแผ่นหลัง 20 วัน เนื่องมาจากในธรรมชาติมีเชื้อราอยู่หลายชนิด เชื้อราแต่ละชนิดสามารถทนต่อสารฆ่าเชื้อราได้แตกต่างกัน แม้ในเชื้อราชนิดเดียวกันแต่อยู่ในระยะการเจริญที่แตกต่างกันเช่น ระยะการสปอร์จะทำให้สามารถทนต่อสารฆ่าเชื้อได้ดีกว่าระยะที่ไม่มีการสร้างสปอร์ (พิชัย, 2538) นอกจากนี้ปัจจัยอื่นๆยังมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา เช่น ระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายเชื้อ ชนิดของสารฆ่าเชื้อ ความเข้มข้น พีเอช อุณหภูมิ เมื่อเชื้อราได้รับสารฆ่าเชื้อในอัตราความเข้มข้นหนึ่งๆ เชื้อราจะไม่ตายพร้อมกัน แต่จะมีจำนวนลดลง โดยประชากรของเชื้อราจะประกอบไปด้วยเซลล์ที่มีความต้านทานต่างๆ ส่วนใหญ่จะ

มีความต้านทานปานกลาง ส่วนน้อยจะมีความต้านทานสูง และต่ำ เมื่อได้รับสารฆ่าเชื้อเซลล์ส่วนใหญ่จึงตายก่อน เซลล์ที่มีความต้านทานสูงอาจอยู่รอดได้และเมื่อสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปเซลล์กลุ่มนี้ก็จะกลับมาเจริญได้ ซึ่งเมื่อเกิดการเจริญของเชื้อรากลุ่มนี้ขึ้นมาจะทำให้บริเวณที่เชื้อรากลุ่มนี้เจริญมีสภาพเปลี่ยนแปลงไป โดยเฉพาะพีเอช ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของพีเอชอาจอยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อรากลุ่มอื่นๆ

ความเข้มข้นและปริมาณของสารที่ใช้ในการฆ่าเชื้อก็มีอิทธิพลต่ออัตราการตายของเชื้อราเช่นกัน การใช้สารฆ่าเชื้อปริมาณมากจะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ดีกว่าการใช้ปริมาณน้อย แม้ว่าจะมีความเข้มข้นเท่ากันเนื่องจากสารฆ่าเชื้อจะถูกทำลายฤทธิ์โดยสารต่างๆ อีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญในการฆ่าเชื้อก็คือ การเข้าสัมผัสกับเชื้อราของสาร โดยเชื้อราจะดูดซับสารเข้าไปในเซลล์ ดังนั้นสารฆ่าเชื้อจะมีประสิทธิภาพดีต้องไม่มีสิ่งกีดกั้นการเข้าสัมผัสกัน

ความชื้นเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา ทั้งความชื้นในแผ่นยางและความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ ยางแผ่นที่มีความชื้นต่ำกว่า 0.52 % จะไม่พบการปนเปื้อนในแผ่นยาง จากผลการวิจัยที่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อราในแผ่นยางที่มีการผสมหรือจุ่มในสารสกัดหยาบหลัง 20 วัน อาจเนื่องมาจากได้ทำการทดลองใน moist chamber ซึ่งมีทำให้มีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศสูง ซึ่งอาจสูงถึง 65 % ซึ่งเป็นความชื้นที่เชื้อราสามารถเจริญได้ (BCCDC Laboratory Service, 2003) ถ้าในสภาพที่นำไปใช้งานจริงมีความชื้นต่ำกว่าใน moist chamber อาจทำให้อายุการเก็บรักษายางแผ่นยาวนานขึ้น ดังนั้นการศึกษาระดับความชื้นสัมพัทธ์ร่วมกับอายุการเก็บรักษาด้วยจึงเป็นเรื่องที่ต้องมีการศึกษาต่อไป

ต้นทุนการผลิตเมื่อคิดจากการนำไปใช้โดยคำนึงถึงค่า MFC ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ พบว่า สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 มีต้นทุนสูงกว่าพาราไนโตรฟีนอล 119.304 บาท สารสกัดหยาบมีต้นทุนที่สูงเนื่องจากอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อมีราคาค่อนข้างสูงและกระบวนการสกัดทำให้มีต้นทุนของค่าไฟ และตัวทำละลาย ซึ่งเป็นจำนวนเงินถึง 150 บาท ดังนั้นถ้ามีการศึกษาวิจัยต่อไปเพื่อลดต้นทุนการผลิตลง เช่น การปรับสูตรอาหารโดยใช้สารที่มีราคาถูกลง เช่น สารอาหารหรือของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมและอาหาร คาดว่าจะช่วยลดต้นทุนในส่วนนี้ได้ และถ้ามีการศึกษารูปแบบการนำไปใช้งานโดยอาจตัดขั้นตอนของการสกัดสารออกและเปลี่ยนเป็นการนำเอาน้ำเลี้ยงที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาใช้แทนจะทำให้ลดต้นทุนลงได้ถึง 150 บาท ซึ่งคาดว่าน่าจะทำให้มีต้นทุนใกล้เคียงกับพาราไนโตรฟีนอล ยิ่งไปกว่านั้นการปรับเปลี่ยนมาใช้น้ำเลี้ยงเชื้อจะมีความสะดวกในการนำไปใช้ โดยเกษตรสามารถผลิตได้เองและความปลอดภัยในการนำไปใช้มากกว่าพาราไนโตรฟีนอล ช่วยลดผลกระทบที่เกิดกับสุขภาพของผู้ที่เกี่ยวข้องและลดมลภาวะที่เกิดกับสิ่งแวดล้อม

สรุปผลการวิจัย

1. ผลการแยกเชื้อราที่ปนเปื้อนบนยางแผ่นผึ่งแห้งพบว่ามีเชื้อราทั้งหมด 14 ไอโซเลท โดยจัดเป็นเชื้อ *Aspergillus* จำนวน 5 ไอโซเลท และเชื้อ *Penicillium* จำนวน 9 ไอโซเลท คิดเป็น 35.7 % และ 64.3% ของเชื้อทั้งหมดที่แยกได้ตามลำดับ

2. เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยสิทที่มีในห้องปฏิบัติการจำนวน 180 ไอโซเลทมาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราที่แยกได้ (14 สายพันธุ์) ร่วมกับเชื้อราอีก 6 สายพันธ์ที่มีรายงานว่ามีการ

ปนเปื้อนบนแผ่นยาง พบว่าเชื้อ *Streptomyces* TMR032 ให้ผลการยับยั้งเชื้อราทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนการยับยั้งมากกว่า 30 มิลลิเมตร

3. เมื่อนำสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 และสารพาราไนโตฟีนอลมาทำการเปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราโดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (MFC) พบว่าสารสกัดหยาบจาก*Streptomyces* TMR032 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ดีกว่าพาราไนโตรฟีนอลโดยพบว่ามีค่า MFC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนพาราไนโตรฟีนอลมีค่า MFC เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเจริญของเชื้อราบนแผ่นยางโดยมีรูปแบบการนำสารสกัดจาก *Streptomyces* TMR032 ไปใช้มี 2 รูปแบบ คือ การผสมลงไปในแผ่นยางและการจุ่มแผ่นยางในสารสกัดที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มก./มล. (มากกว่าค่า MFC 2 เท่า) พบว่าสามารถป้องกันเชื้อราได้นาน 20 วัน ในขณะที่ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมหรือจุ่มในสารสกัด) จะพบการปนเปื้อนของเชื้อราในวันที่ 5 ของการทดลอง

5. การจุ่มแผ่นยางในสารสกัดหยาบจะไม่ทำให้ยางเปลี่ยนสีและเกิดการจับตัวกันของเนื้อยางเหมือนการผสมสารสกัดหยาบลงไปในแผ่นยาง

6. ต้นทุนการผลิตเมื่อคิดจากการนำไปใช้โดยคำนึงถึงค่า MFC ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ พบว่า สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 มีต้นทุนสูงกว่าพาราไนโตรฟีนอล 119.304 บาท (สารสกัดหยาบและพาราไนโตรฟีนอลมีต้นทุนการผลิตเท่ากับ 193.304 และ 37 บาท/กรัม ตามลำดับ)

ข้อเสนอแนะ

เชื้อ *Streptomyces* TMR 032 มีศักยภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา เมื่อนำไปใช้ในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราในแผ่นยางยังพบว่ามีปัญหาหลายประการ ซึ่งต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมดังนี้

1. ต้องมีการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในสภาวะที่มีความชื้นระดับต่างๆ เนื่องจากความชื้นในแผ่นยางและความชื้นสัมพัทธ์เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อรา จากการวิจัยครั้งนี้ได้ทำในสภาวะที่มีความชื้นค่อนข้างสูง คือ ใน moist chamber สารสกัดยังสามารถป้องกันการปนเปื้อนในแผ่นยางได้นานถึง 20 วัน ถ้ามีการศึกษาในระดับความชื้นที่ต่ำกว่านี้เชื่อว่าจะสามารถป้องกันเชื้อราได้นานยิ่งขึ้น

2. การปรับสูตรอาหารและรูปแบบในการผลิตและการนำไปใช้เพื่อลดต้นทุนการผลิต

2.1 การปรับสูตรอาหารที่ใช้การเลี้ยง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูก และเหมาะสมสามารถผลิตได้ปริมาณมากแต่ใช้ต้นทุนต่ำ เช่นคัดเลือกหาของเสียหรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหรืออุตสาหกรรมมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

2.2 การปรับรูปแบบการผลิตและการนำไปใช้ เช่น การทดลองเอาน้ำเลี้ยงเชื้อไปใช้โดยตรง เพื่อลดขั้นตอนและต้นทุนในการสกัด ซึ่งอาจจะง่ายและสะดวกต่อเกษตรกรที่จะนำไปผลิตใช้ได้เอง

3. รูปแบบการนำไปใช้ในแผ่นยาง ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่า การผสมสารสกัดที่ละลายด้วยเมทานอลลงไปในยางแผ่นทำให้เนื้อยางจับตัวกัน ครั้งนี้ได้หาแนวทางการนำไปใช้ในลักษณะอื่น เช่น การจุ่มลงในสารสกัด ซึ่งนอกจากจะทำให้ยางยังคงคุณสมบัติแล้ว การจุ่มยังช่วยลดต้นทุนการผลิตเนื่องจากใช้สาร

ปริมาณที่น้อยกว่าการผสมลงไป อย่างไรก็ตาม ต้องมีการศึกษาจำนวนครั้งของการจุ่ม ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ณพรัตน์ วิชิตชลชัย, สุวิทย์ สอนสุข, บุญช่วย หม่อมนวล, พเยาว์ ศรีสอ้าน, เสมอ สมนาค, ทวีศักดิ์ อนุศิริ 2536 ศึกษาวิธีการผลิตยางแผ่นดิบเพื่อป้องกันกำจัดเชื้อรา. รายงานผลการวิจัยยางพารา

นภาวรรณ เลขะวิพัฒน์, รัชนี รัตนวงศ์ และอนุสรณ์ แรมลี 2008 การศึกษาชีวเคมีของยางพันธุ์แลกเปลี่ยนระหว่างประเทศในเขตภูมิอากาศที่ 1 (ออนไลน์). สืบค้นจาก: http://www.rubberthai.com/research/year/44/5.htm (13 ตุลาคม 25574)

นารีลักษณ์ นาแก้ว 2552 การควบคุมโรครากขาวในยางพาราโดยชีววิธีด้วยแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสิท. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา(RDG 5250036)

นารีลักษณ์ นาแก้ว 2556 ศักยภาพของแอคติโนมัยสิทต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* สาเหตุโรคเส้นดำยางพาราในระดับห้องปฏิบัติการ. รายงานความก้าวหน้ารอบ 6 เดือน โครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา(RDG 5550073)

ปรีดิ์เปรม ทัศนกุล 2556 เอกสารประกอบการบรรยายเรื่องการแปรกรูปน้ำยางดิบ. ในการประชุมเชิงปฏิบัติการ “การเขียนข้อเสนอโครงการวิจัยยางพาราแบบมุ่งเป้าและพื้นฐานความรู้เกี่ยวกับยางพารา” 11-13 มีนาคม จ. ชลบุรี

พิชัย เจนจำรัสศรี, 2538. ผลของความเข้มข้นของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อระบบบำบัดน้ำเสียโดยวิธีชีววิทยาแบบใช้อากาศ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิรินุช ด้วงสุข 2553 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ยับยั้งเชื้อราที่ปนเปื้อนบนแผ่นยางพารา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สุพรรษา ชาญด้วยกิจ, 2551. การควบคุมการเจริญของเชื้อราบนยางพาราแผ่นโดยใช้สารเคมี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สายสมร ลำยอง , นิคม สุจดา, นครินทร์ สุวรรณราช, วาสนา เป็นเครือ 2555 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตสารป้องกันเชื้อราบนยางพาราแผ่นโดยชีววิธี. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา (RDG 5450047)

อรัญ หันพงศ์กิตติกูล 2553 การหาสาเหตุและการป้องกันการเจริญของเชื้อราบนแผ่นยาง รายงานวิจัยการพัฒนาอุตสาหกรรมยางพารา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (RDG4850069)

Aghighi S, Bonjar GHS, Rawashdeh R, Batayneh S, Saadoun I (2004). First report of antifungal spectra of activity of Iranian Actinomycetes strains against *Alternaria solani, Alternaria alternate, Fusarium solani, Phytophthora megasperma, Verticillium dahlia* and *Saccharomyces cerevisiae*. Asian J. Plant Sci., 3(4): 463-471.

Alimuddin, Widada J, Asmara W, Mustofa (2011). Antifungal Production of a Strain of *Actinomycetes spp* Isolated from the Rhizosphere of Cajuput Plant: Selection and Detection of Exhibiting Activity Against Tested Fungi. I. J. Biotech, 16(1):1-10.

Anitha A, Rebeeth M (2009). *In vitro* antifungal activity of *Streptomyces griseus* against

phytopathogenic fungi of tomato field. Acad. J. Plant Sci., 2(2): 119-123.

Ayari A, Morakch H, Djamila KG (2012). Identification and antifungal activity of *Streptomyces* sp. S72 isolated from Lake Oubeira sediments in North-East of Algeria African Journal of Biotechnology 11(2):305-311

Baniya R, Vaidya GS (2011). Antifungal Activity of Actinomycetes from Vermicompost and Their Morphological and Biochemical Characterization. Nepal Journal of Science and Technology 12:97-102

BCCDC Laboratory Serveices. (2003). A Guide to Selection and Use of Disinfectants. The British Columbia Center for Disease Control. p. 8.

Bennett JV, Brodie JL, Benner EJ, Kirby WMM (1966). Simplified,accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. Appl Microbiol, 14(2): 170-177.

Bonjar GHS, Farrokhi PR, Aghighi S, Bonjar LS, Aghelizadeh A (2005). Antifungal characterization of Actinomycetes isolated from Kerman, Iran and their future prospects in biological control strategies in greenhouse and field conditions. Plant Pathol. J., 4(1): 78-84.

Chang JCS, Foarde KK and Vanosdell DW (1995). Growth evaluation of fungi (*Penicillium* and *Aspergillus* spp.) on ceiling tiles. Atmos. Environ. 29:2331-2337.

Dechsakulthorn F, Hayes A, Bakand LJ, Winder Ch (2007). In vitro cytotoxicity assessment of selected nanoparticles using human skin fibroblasts. AATEX 14, 397-400.

Devi NKA, Jeyarani M, Balakrishnan K 2006. Isolation and identification of marine actinomycetes and their potential in antimicrobial activity. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9: 470-72.

El-Mehalawy AA, Abd-Allah, NA, Mohamed RM, Abu-Shay MR (2005). Actinomycetes antagonizing plant and human pathogenic fungi. II. Factors affecting antifungal production and chemical characterization of the active components. Int. J. Agric. Biol., 7(2): 188-196.

Esuruoso OF (1970) Fungi that cause mouldiness of processed sheet rubber in western Nigiria. Mycopath. Mycol. Appl. 42:187-189.

Fullerton RG (1929). Notes on defects in smokedsheet and crepe rubber. Quaterly Journal, Rubber Research Institute of Malaya 1: 66-74.

Gebreel HM, El-Mehalawy AA, El-Kholy IM, Rifaat HM, Humid AA (2008). Antimicrobial activities of certain bacteria isolated from Egyptian soil against pathogenic fungi. Res. J. Agric. Biol. Sci., 4(4):331-339.

Houssam M, Atta (2009). An Antifungal Agent Produced by *Streptomyces olivaceiscleroticus*, AZ-SH514 World Appl. Sci. J., 6 (11): 1495-1505.

Iwasa T, Higashide E, Yamamoto H, Shibata M (1970). Studies on validamycins, new antibiotics. II. Production and biological properties of validamycin A and B. J Antibiot. (Tokyo). 23: 595-602.

Kavitha A, Vijayalakshmi M, Sudhakar P, Narasimha G (2010). Screening of Actinomycete strains for the production of antifungal metabolites. Afr. J. Microbiol. Res., 4(1): 027-03

Khamna S, Yokota A, Peberdy JF, Lumyong S (2009). Antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants. Int. J. Integr. Biol., 6(3): 143-147.

Lian B, Wang B, Pan M, Liu C, Teng HH (2008). Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigates*. Geochim. Cosmochim. Ac. 72: 87-98.

Lim SW, Kim JD, Kim BS, Hwang B (2000). Isolation and numerical identification of *Streptomyces humidus* strain S5-55 antagonistic to plant pathogenic Fungi. Plant Pathol. J., 16(4): 189-199.

Linos A, Steinbuchel A (2001) Biodegradation of natural and synthetic rubbers. In: Koyama T, and Steinbuchel A, eds., Biopolymers Vol. 2, 1st ed. Wiley-VCH, Weinheim , 321-359

Mohankumar T, Krishnan K (2011) Anti-Aspergillus activity of Streptomyces sp.VITSTK7 isolated from Bay of Bengal coast of Puducherry, J Nat Env Sci. 2:1-8.

Nolan RD, Cross R (1988). Isolation and screening of actinomycetes, pp. 1-32. *In* Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M, eds. Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press, San Diego, CA.

Oskay M (2009). Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains Afr. J. Biotechnol. 8: (13)3007-3017

Sharma H, Parihar L (2010). Antifungal activity of extracts obtained from Actinomycetes. Journal of Yeast and Fungal Research 1(10):197-200.

Takeuchi S, Hirayama K, Ueda K, Sakai H, Yonehara H. (1958). Blasticin S, a new antibiotic. J of Antibiotics (Tokyo). Series A 11: 1-5.

Takizawa M, Colwell RR, Hill RT (1993). Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake bay. Appl Environ Microbiol 59(4): 997-1002.

Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y (1966). New antibiotics, bleomycin A and B. J Antibiot (Tokyo). 15(5): 200-209.

ภาคผนวก

การป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่นอบแห้ง (Air Dried Sheet, ADS) โดยใช้สารต้านเชื้อราประสิทธิภาพสูงจากเชื้อแอคติโนมัยสิท

Prevention of fungal growth on para rubber air dried sheet (ADS) by high potential antifungal from actinomycetes

ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ. พิษณุโลก

Dr. Nareeluk Nakaew

Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical science,

Naresuan University, Phitsanulok

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนของเชื้อราบนยางแผ่นผึ่งแห้ง (air dried rubber sheet (ADS)) นอกจากจะทำให้คุณภาพของยางแผ่นด้อยลงและส่งผลถึงราคาขายแล้ว เชื้อรายังมีผลเสียต่อสุขภาพของที่ผู้เกี่ยวข้องอีกด้วย งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะนำสารยับยั้งเชื้อราซึ่งได้จากแบคทีเรียแอคติโนมัยสิทมาใช้ในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราบนแผ่นยางเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา โดยได้นำเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการทั้งหมด 180 สายพันธุ์มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Dual culture bioassay โดยใช้เชื้อราสายพันธุ์ที่เคยมีรายงานว่ามีการปนเปื้อนในยางแผ่นร่วมกับเชื้อที่แยกได้จากแผ่นยางที่มีการปนเปื้อน รวมทั้งสิ้น 20 สายพันธุ์เป็นเชื้อราทดสอบ ผลการทดสอบพบว่า เชื้อ *Streptomyces* TMR032 สามารถยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนการยับยั้งมากกว่า 30 มิลลิเมตรในทุกสายพันธุ์ และเมื่อนำสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 มาทำการเปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรากับพาราไนโตฟีนอลโดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (MFC) ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทุกสายพันธุ์ได้ดีกว่าพาราไนโตรฟีนอล โดยพบว่ามีค่า MFC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในแผ่นยางโดยเปรียบเทียบรูปแบบการนำไปใช้ระหว่างการผสมลงไปในขั้นตอนการทำยางแผ่นกับการจุ่มแผ่นยางลงไป โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มก./มล. พบว่าทั้ง 2 วิธีสามารถป้องกันเชื้อราได้นานถึง 20 วัน เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อราตั้งแต่วันที่ 5 ของการทดลอง การจุ่มแผ่นยางในสารสกัดหยาบมีข้อดีกว่าการผสมสารสกัดหยาบลงในแผ่นยางตรงที่ไม่ทำให้คุณภาพของแผ่นยางเปลี่ยนแปลงไป จากผลการวิจัยที่ได้ครั้งนี้พบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำเอาสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 มาใช้ป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราบนยางแผ่นทดแทนการใช้สารเคมี แต่จะต้องมีการศึกษาวิจัยในด้านอื่นๆ เช่น การลดต้นทุนการผลิต, รูปแบบการผลิตและนำไปใช้ และ ผลกระทบต่อคุณสมบัติยางต่อไป เพื่อให้มีความสะดวกและปลอดภัยในการนำไปใช้จริง

Abstract

Fungal contamination of air dried rubber sheet (ADS) is often occurred and diminishes quality and value of this product. This contamination also affects the health of workers who involve with ADS production. In this work, we aim to evaluate antifungal agents produced by

actinobacteria for biological control of fungal contamination on ADS and to extend the shelf life of ADS. A total of 180 actinobacterial isolates was screened for antifungal activity against fungal contaminants by dual culture bioassay. A total of 20 fungal strains isolated from contaminated ADS was used as tested fungal contaminants in dual culture bioassay. It was found that *Streptomyces* TMR032 gave the highest antagonistic activity against all fungal contaminants with relatively large inhibition zone (> 30 mm). When we compared the minimal fungicidal concentration (MFC) of the crude extract derived from strain TMR032 (ethyl acetate extraction and evaporation of cell-free culture broth) and *p*-nitrophenol, the crude extract exhibited greater MFC value (0.5 mg mL^{-1}) than *p*-nitrophenol (1 mg mL^{-1}). When we compare the treating approaches between adding and soaking with the crude extract at the final concentration of 1 mg mL^{-1}, the fungal contamination was suppressed the same for 20 days. Both treating approaches for the fungal contamination also revealed greater than the control (without applying the crude extract) that appeared the contamination in 5 days. Interestingly, soaking ADS with the crude extract exhibited greater quality of ADS than the adding approach that appeared darkened color and incomplete consolidation of ADS. This may due to the reaction between latex and the solvent (methanol) that was used for dissolving the crude extract. Based on the results of this study, we propose that antifungal agents produced by strain TMR032 could be further applied effectively in production of ADS with the benefits of reduced chemical uses. Other investigations regarding to the reduced cost and the optimal conditions for production of such antifungal agents shall be studied for economically effective use in ADS production.

คำนำ

ยางแผ่นเป็นการแปรรูปยางขั้นพื้นฐานจากน้ำยางดิบเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมขั้นต่อไป เช่น ยางแท่ง ยางรถยนต์ ท่อยาง ยางรัดของ ยางแผ่น แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ยางแผ่นรมควัน (Ribbed Smoked Sheet; RSS) และยางแผ่นอบแห้ง (Air Dried Sheet) ซึ่งได้มาจากการแปรรูปยางแผ่นดิบ (Unsmoked sheet, USS) ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกยางธรรมชาติอันดับหนึ่งของโลก โดยร้อยละ 95 ของผลผลิตที่ส่งออกส่วนใหญ่เป็นยางแผ่นรมควันถึงร้อยละ 52

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างยาง ADS กับ RSS แล้วพบว่า ยาง ADS มีข้อดีกว่าตรงที่มีสีเหลืองสดใสกว่า ขายได้ราคาสูงกว่า และใช้พลังงานในการผลิตต่ำกว่ายาง RSS เนื่องจากการผลิตยางแผ่น ADS จะใช้อุณหภูมิในการอบต่ำกว่าและใช้ระยะเวลาสั้นกว่ายางแผ่น RSS (ADS ใช้อุณหภูมิ 45-55 °C นาน 3-4 วัน, RSS ใช้อุณหภูมิ 50-65 °C นาน 5-7 วัน) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าส่วนใหญ่นิยมผลิตยาง RSS มากกว่าเนื่องจากในขั้นตอนการผลิตยาง RSS จะมีการอบด้วยควันไม้ ซึ่งจะมีสารกันเชื้อราจึงช่วยรักษาเนื้อยางไม่ให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อราในอากาศทำให้สามารถเก็บรักษาได้นานกว่ายาง ADS

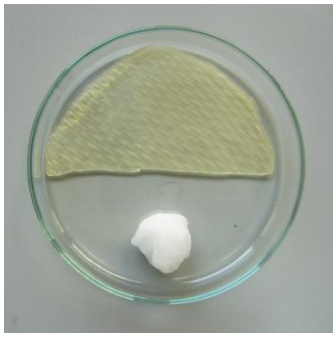
การปนเปื้อนของเชื้อราในยางแผ่นจะทำให้ยางแผ่นราคาตก และเชื้อรายังมีผลเสียต่อสุขภาพของผู้เกี่ยวข้อง การผลิตยางแผ่นอาจจะมีการเติม หรือ จุ่มสารเคมีป้องกันเชื้อราเช่น พาราไนโตฟีนอล ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อผู้ใช้ และถูกห้ามใช้ในอุตสาหกรรมยางบางประเภท

จากข้อมูลดังกล่าว จึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้ ซึ่งเป็นการวิจัยเพื่อมุ่งไปสู่การผลิตยาง ADS ที่มีคุณภาพดีเก็บรักษาได้นาน และปลอดภัยต่อผู้ใช้ โดยพัฒนาการผลิตยางแผ่น ADS ที่มีคุณสมบัติในการทนต่อเชื้อรา โดยใช้สารต้านเชื้อราประสิทธิภาพสูงที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยสิท ซึ่งเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบว่ามีรายงานการผลิตสารต้านเชื้อราได้ดีที่สุด ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้คาดว่าจะทำให้ยาง ADS สามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น ช่วยให้เกษตรกรจำหน่ายยางแผ่นที่มีคุณภาพดี ได้ราคาสูง และลดต้นทุนการผลิต

วิธีการวิจัย

1. การแยกเชื้อราที่ปนเปื้อนบนแผ่นยาง

ทำการแยกเชื้อราที่ปนเปื้อนในยางแผ่นผึ่งแห้ง โดยนำยางแผ่นผึ่งแห้งมาใส่ไว้ใน Moist chamber ซึ่งทำได้โดยนำก้อนสำลีชุบน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ วางในจานอาหารที่มีแผ่นยางอยู่ดังรูป 1 ทิ้งไว้จนสังเกตเห็นเชื้อราเจริญบนยางแผ่น ทำการแยกเชื้อราที่ขึ้นบนยางแผ่นให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี cross streak บนอาหาร water agar ที่เติม rose Bengal และ chloramphenicol จากนั้นเก็บรักษาเชื้อราบริสุทธิ์ไว้อาหารวุ้นเอียงเพื่อนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของโดยเชื้อแอคติโนมัยสิทต่อไป



รูป 1 ยางแผ่นใน Moist chamber

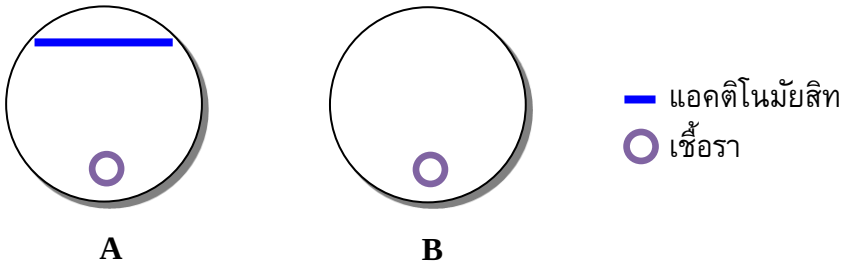
2. จัดจำแนกเชื้อราบนแผ่นยางโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำเชื้อราที่แยกได้จากแผ่นยางมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนสไลด์ (slide culture technique) จนเชื้อรามีการสร้างสปอร์ จากนั้นจึงนำสไลด์ที่มีเชื้อรามาตรวจดูลักษณะของสปอร์ภายกล้องจุลทรรศน์

3. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราในห้องปฏิบัติการ

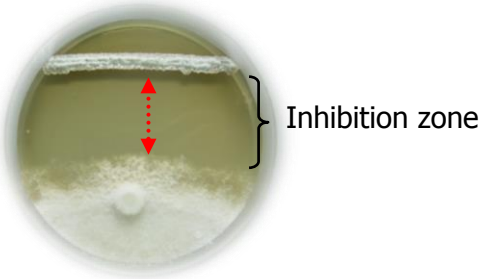
ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสิทที่มีในห้องปฏิบัติการ (เชื้อ *Streptomyces* TMR 032 ที่เคยทดสอบกับเชื้อรา *Rigidoporus* sp. โครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา (RDG5250036) และเชื้อไอโซเลท A31 และ A30 ที่เคยทดสอบกับเชื้อรา *Phytophthora* sp. ในโครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา (RDG 5550073) ร่วมกับเชื้อที่แยกได้ใหม่จากดินด้วยวิธี Dual culture bioassay (Bennett et al., 1996) โดยเพาะเชื้อแอคติโนมัยสิทลงบนด้านใดด้านหนึ่งของจาน

อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเพาะเชื้อราลงไปในด้านตรงข้ามกับเชื้อแอคติโนมัยสิท ชุดควบคุมเป็นจานอาหารที่เพาะแต่เชื้อราอย่างเดียว (รูป 2) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ



รูป 2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Dual culture bioassay A: ชุดทดสอบ B: ชุดควบคุม

บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มเพลท ดังรูป 3 สังเกตและวัดขนาดของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้น เลือกแอคติโนมัยสิทที่มีบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดเพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

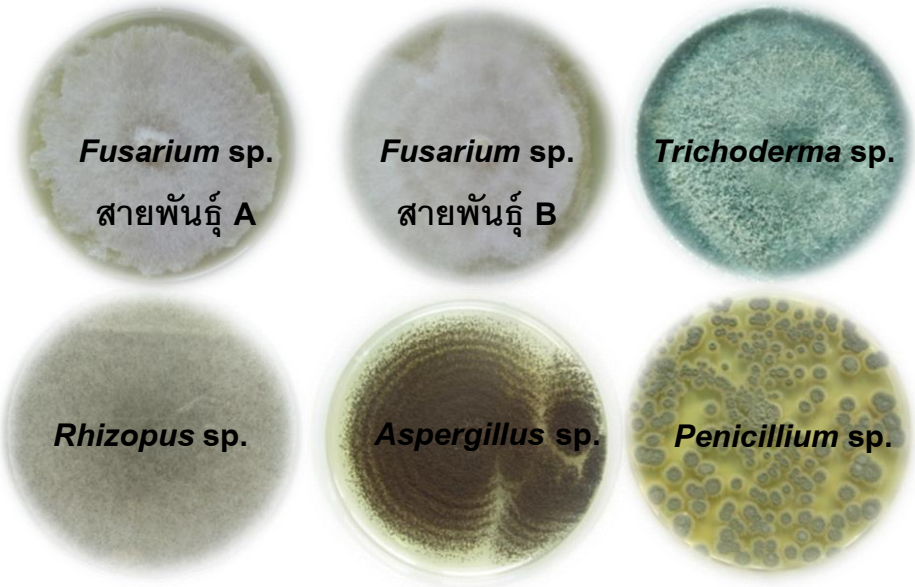


รูป 3 การวัดขนาดของโซนยับยั้ง (Inhibition Zone)

โดยเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบเป็นเชื้อราที่แยกได้จากยางแผ่นผึ่งแห้ง 14 สายพันธุ์ และเชื้อราที่พบว่ามีรายงานว่าปนเปื้อนในยางแผ่นที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการอีก 6 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่

1. *Trichoderma* sp.
2. *Aspergillus* sp.
3. *Penicillium* sp.
4. *Fusarium* sp. สายพันธุ์ A (*F. moniliforme*) โคโลนีสีม่วง
5. *Fusarium* sp. สายพันธุ์ B (*F. oxysporum*) โคโลนีสีส้ม
6. *Rhizopus* sp.

ซึ่งเชื้อราทั้ง 6 สายพันธุ์มีลักษณะโคโลนีดังรูป4



รูป4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์

4. เปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสิทกับสารเคมี

สกัดสารยับยั้งเชื้อราจากเชื้อแอคติโนมัยสิทสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

1) เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสิทในอาหารเหลว ISP2 บนเครื่องเขย่า บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน
2) เติมตัวทำละลาย (ethyl acetate) ลงไปในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เขย่า ทุก 15 นาที
3) แยกส่วนของ ethyl acetate ออกมาแล้วทำการระเหย ethyl acetate ออกด้วยเครื่อง evaporator เก็บส่วนที่เหลือ (crude extract) เพื่อนำไปทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (Minimum Fungicidal Concentration, MFC)

การทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและค่า MFC

1) เจือจางสารสกัดหยาบในเมทานอลและพาราไนโตรฟีนอลในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ กัน จากนั้นนำไปเติมลงในอาหาร PDA เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.05, 0.1, 0.5, 0.7 และ 1 มก./มล. จากนั้นทำอาหาร PDA ที่ได้เทลงในจานอาหาร
2) เพาะเชื้อราลงไปในจานอาหารที่มีสารสกัดหยาบและพาราไนโตรฟีนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ มีชุดควบคุมคือจานอาหารที่ไม่ได้เติมสาร
3) เมื่อเชื้อราในจานอาหารควบคุมเจริญเต็มจาน ให้ทำการวัดขนาดของโคโลนีของเชื้อราที่เจริญในอาหารทดสอบ เพื่อนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (percent inhibition of radial growth:PIRG) ค่า MFC คือ ความเข้มข้นที่ให้ค่า PIRG เท่ากับ 100% การคำนวณค่า PIRG มีสูตรคำนวนดังนี้

$$PIRG = [(R1-R2)/R1x100]$$

R1 = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อในจานอาหารควบคุม

R2 = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อในจานอาหารทดสอบ

สำหรับเชื้อราที่มีการเจริญโดยมีการกระจายของโคโลนี เช่น *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. จะไม่สามารถวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ได้ ยกเว้น 100% นั่นคือไม่พบการเจริญของเชื้อราในจานอาหาร

เปรียบเทียบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ของสารสกัดจากแอคติโนมัยสิทและสารพาราไนโตฟีนอลที่เคยมีรายงานการศึกษาว่าใช้ป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราในแผ่นยางอบแห้ง เพื่อประเมินศักยภาพของสาร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (ค่า MIC ยิ่งน้อยเท่าไหร่แสดงว่าสารมีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราดีมาก นั่นคือ สารปริมาณที่น้อยมากสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี)

5. การทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่น

นำสารสกัดจากแอคติโนมัยสิทมาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อราในแผ่นยางโดยทำการทดลองสองวิธี คือ

5.1 แบบที่มีการผสมสารสกัดหยาบลงในแผ่นยาง

เตรียมยางแผ่นที่ใช้ในการทดสอบการป้องกันการเจริญของเชื้อรา โดยมีชุดทดสอบที่เติมสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสิทที่คัดเลือกได้ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้เติม ดังตาราง 1

ตาราง 1 การเตรียมแผ่นยางเพื่อใช้ในการทดสอบการป้องกันการเจริญของเชื้อรา

ชุดการทดลอง	ปริมาณสารที่เติม			
	น้ำยาง (กรัม)	น้ำกลั่น (มล.)	กรดอะซีติก 2 % (มล.)	สารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสิทที่คัดเลือกได้ (มล.)
ชุดทดสอบ	20	10	8	2
ชุดควบคุม	20	12	8	0

หมายเหตุ: ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดหยาบที่ใช้ในชุดทดสอบเท่ากับ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าค่า MIC ของสาร (0.5มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เตรียมโดยละลายสารสกัดหยาบ 40 มิลลิกรัม ด้วยตัวทำละลาย เมทานอล 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำลงไป 10 มิลลิลิตร

นำยางแผ่นชุดทดสอบและชุดควบคุมมาตัดเป็น 4 ส่วน นำแต่ละส่วนมาใส่ใน moist chamber สังเกตดูการปนเปื้อนของเชื้อราบนแผ่นยาง บันทึกภาพ

5.2 การจุ่มแผ่นยางลงในสารสกัด

นำแผ่นยางมาทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราโดยเปรียบระหว่างการจุ่มแผ่นยางลงในสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทที่ละลายด้วยเมทานอลและน้ำ โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 4 ชุด ดังนี้

- ชุดทดสอบ1 : จุ่มแผ่นยางในสารสกัดจากแอคติโนมัยสิทที่ละลายด้วยเมทานอล (ความเข้มข้น 1 มก./มล.)
- ชุดทดสอบ 2 : จุ่มในสารสกัดจากแอคติโนมัยสิทที่ละลายด้วยน้ำ (ความเข้มข้น 1 มก./มล.)
- ชุดควบคุม 1 : จุ่มเมทานอล
- ชุดควบคุม 2 : จุ่มในน้ำ

นำยางแผ่นที่ได้มาใส่ใน moist chamber สังเกตดูการปนเปื้อนของเชื้อราบนแผ่นยาง บันทึกภาพ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ

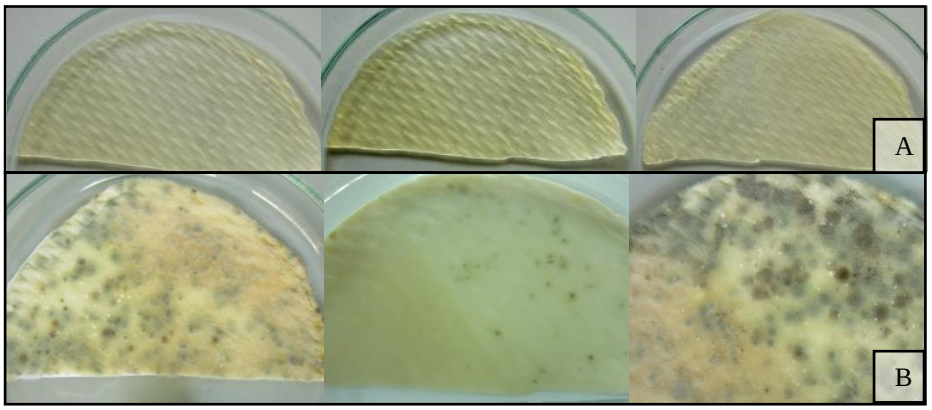
6. เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* TMR032 กับ พาราไนโตรฟีนอล

เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 และ พาราไนโตรฟีนอล โดยการผลิตสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยสิททำโดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP2 ปริมาณ 1000 มล. (สูตร ISP2: yeast extract 4 กรัม, malt extract 10 กรัม, glucose 4 กรัม และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย Ethyl acetate 2000 ml (ethyl acetate สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก จะมีการสูญเสียเนื่องจากมีการระเหยระหว่างการสกัดไม่เกิน 50 มิลลิลิตร) ทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง evaporator นำตัวทำละลายกลับไปทำการสกัดสารใหม่อีก 9 รอบ

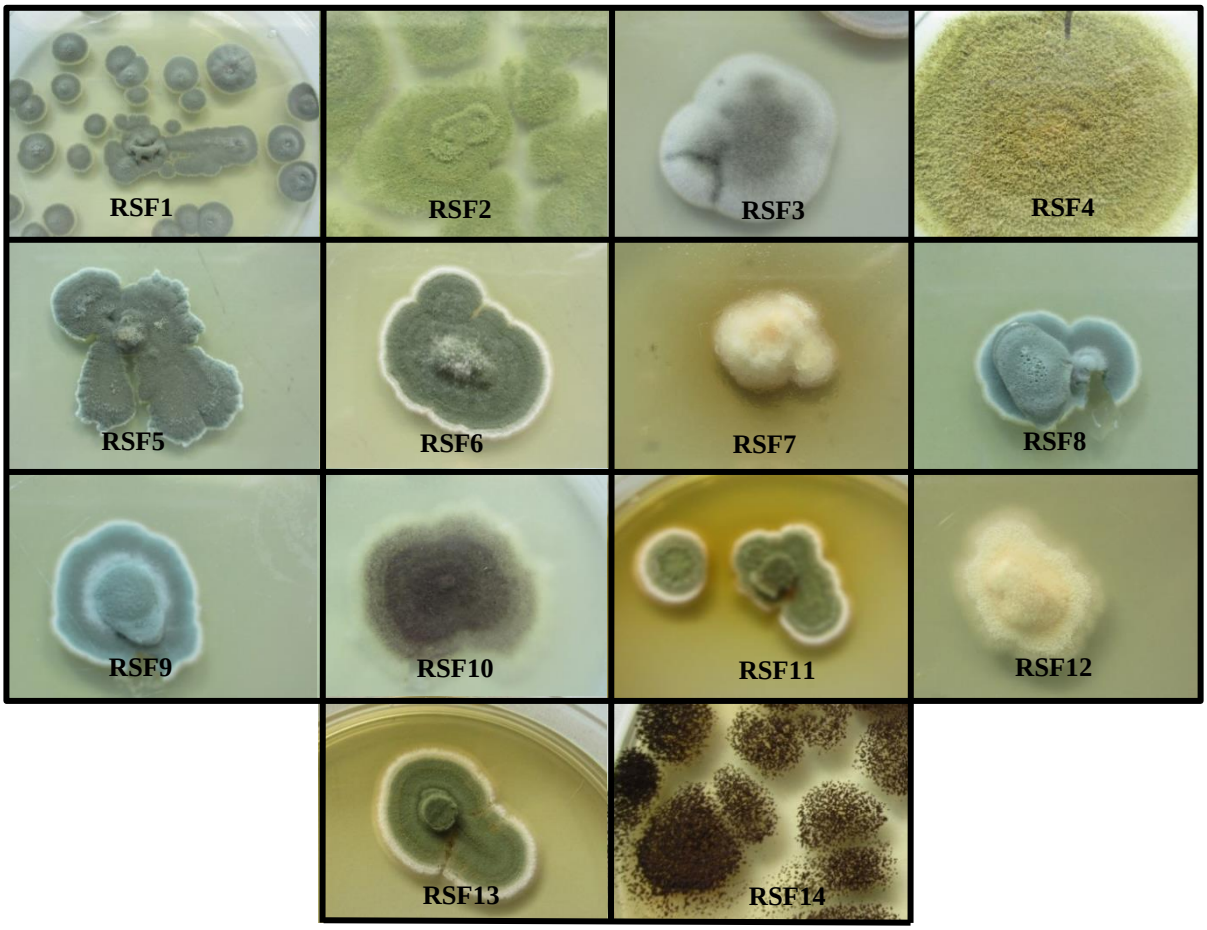
ผลการวิจัย

1. การแยกเชื้อราที่ปนเปื้อนบนแผ่นยาง

ผลจากการนำยางแผ่นผึ่งแห้งมาใส่ไว้ใน Moist chamber เป็นเวลา 5 วัน พบว่ามีเชื้อราเจริญบนยางแผ่น (รูป 5) จากนั้นทำการแยกเชื้อราให้อยู่ในรูปเชื้อบริสุทธิ์ พบว่าได้เชื้อราทั้งหมด 14 ไอโซเลท โดยแต่ละไอโซเลทมีลักษณะโคโลนีดังรูป 6



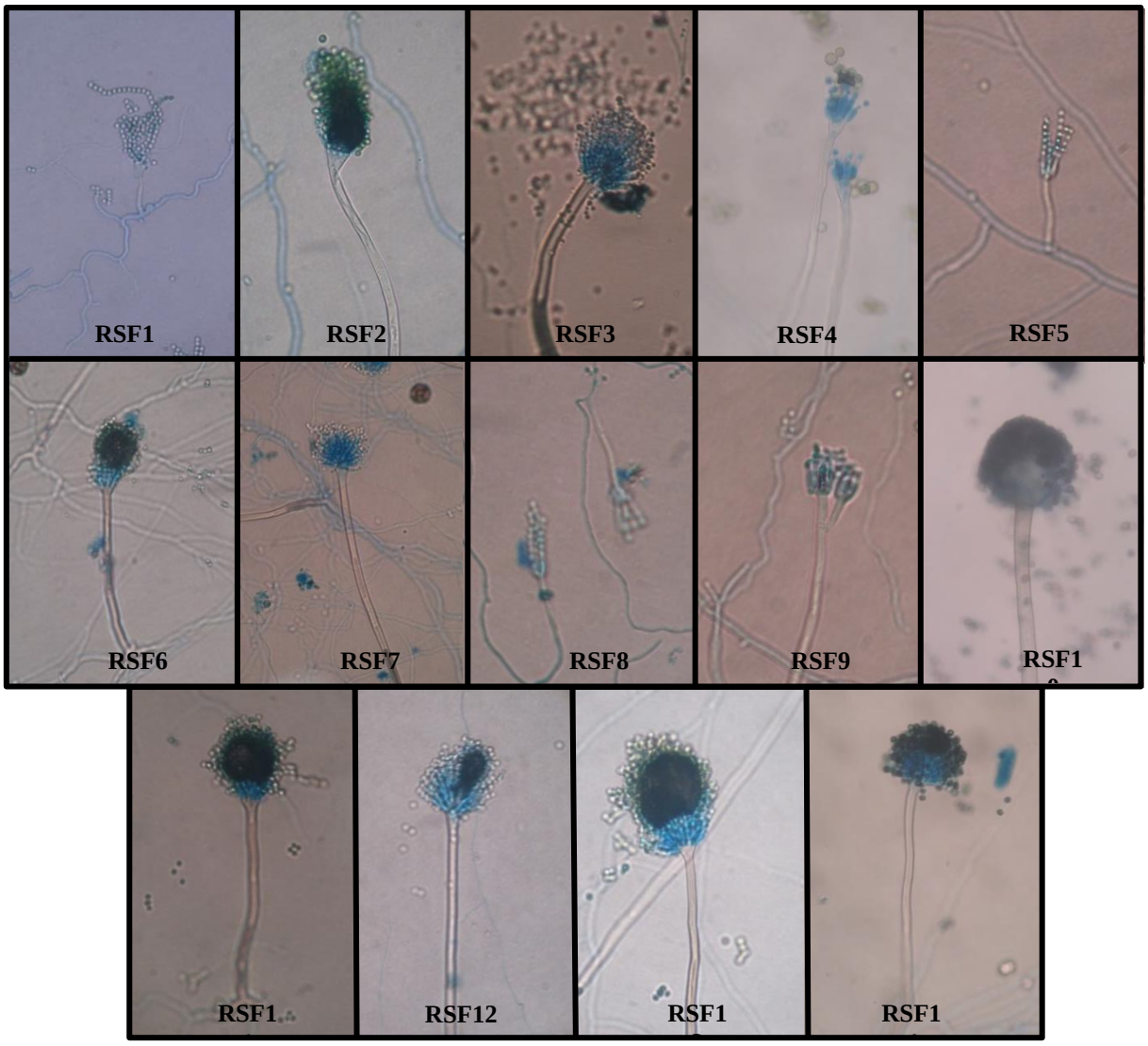
รูป 5 A: ยางแผ่นผึ่งแห้งใน moist chamber วันแรกของการทดลอง
B: ยางแผ่นผึ่งแห้งใน moist chamber หลังจากทิ้งไว้ 5 วัน



รูป 6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้จากแผ่นยาง

2. การจัดจำแนกเชื้อราที่แยกได้จากยางแผ่น

การจัดจำแนกเชื้อราโดยอาศัยลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เชื้อราที่แยกได้ไอโซเลท RSF2, RSF3, RSF7, RSF10 และ RSF14 มีเส้นใยที่มีผนังกั้นตามขวาง สร้างสปอร์รูปร่างกลมต่อกันเป็นสาย ปลายก้านชูสปอร์จะโป่งออกเป็นเวสสิเคิล (vesicle) และมีส่วนที่ยื่นออกมาเรียกสเตอริกมา ซึ่งสปอร์จะอยู่กับส่วนปลายของสเตอริกมา ดังนั้นเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลทนี้จึงจัดอยู่ในจีนัส *Aspergillus* ส่วนเชื้อราที่แยกได้อีก 9 ไอโซเลทสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายเช่นกัน แต่ก้านชูสปอร์ซึ่งเรียกว่า phialide จะมีการแตกแขนงเหมือนไม้กวาด จึงจัดอยู่ในจีนัส *Penicillium* ดังรูป 7



รูป 7 ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา 14 สายพันธุ์ที่แยกได้จากยางแผ่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์

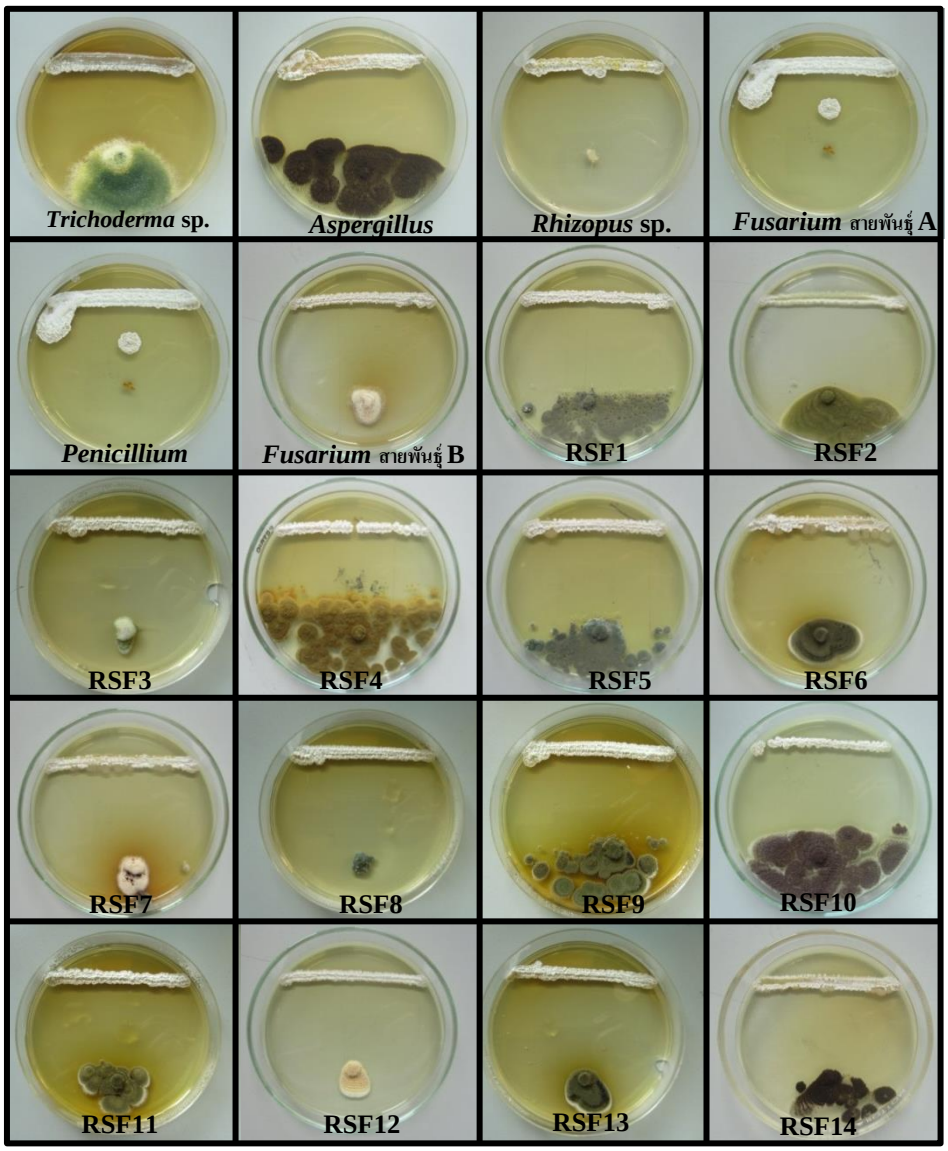
3. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราในห้องปฏิบัติการ

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Dual culture bioassay โดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสิทที่มีในห้องปฏิบัติการทั้งหมด 180 สายพันธุ์ ใช้เชื้อราที่เก็บรักษาในห้องปฏิบัติการ ที่เคยมีรายงานการปนเปื้อนบนแผ่นยาง และเชื้อราที่แยกได้จากแผ่นยางทั้งหมด 20 สายพันธุ์ เป็นเชื้อราทดสอบ ผลการวิจัยพบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสิททั้งหมด 72 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้ ดังตาราง 2

จากตาราง 2 พบว่าเชื้อ *Streptomyces* TMR032 ให้ผลการยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนการยับยั้งในเชื้อราทดสอบทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ มากกว่า 30 มิลลิเมตรในทุกสายพันธุ์ ดังรูป 8

ตาราง 2 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทั้ง8 สายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการ

ขนาดของโซนยับยั้ง (มม.)	จำนวน	ไอโซเลท
≥30	1	TMR032
20-29	3	A31, 8-2-1, F2
10-19	29	F1, A75, F4, B5, D1, D2, D3,D9,E1 E4, E5, E8, E9, G1, G6, G10, G11, G19, H1, H2, , H4, H5, H6, H7, I4, I5, I9, I10, J1
0-9	39	F5, F7, B2, B3, B4, B6, D4, D5, D6, D7, D8, E2, E3,E6, E7, G2, G3, G4, G5, G7, G8, G9, G12, G13, G14, G15, G16, G17, G18, H3, H8, H9, H10, I1, I2, I3, I6, I7, I8



รูป 8 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 20 สายพันธุ์ของเชื้อ *Streptomyces* TMR032 (ด้านบน: *Streptomyces* TMR032, ด้านล่าง : เชื้อราทดสอบ)

4. เปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 กับสารเคมี

เมื่อทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราระหว่างสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 และสารพาราไนโตฟีนอลพบว่าสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ 100 % ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนพาราไนโตรฟีนอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ 100 % ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตาราง 3

ตาราง 3 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR 032 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เชื้อราทดสอบ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ									
	0.05 มก./มล.		0.1 มก./มล.		0.5 มก./มล.		0.7 มก./มล.		1 มก./มล.	
	TMR 032	PNP	TMR 032	PNP	TMR 032	PNP	TMR 032	PNP	TMR 032	PNP
Rhizopus sp.	100	10.23	100	58.14	100	100	100	100	100	100
Penicillium sp.	0	0	0	0	100	0	100	100	100	100
Trichoderma sp.	57.12	12.30	75.29	46.12	100	100	100	100	100	100
Aspergillus sp.	0	0	0	0	100	0	100	100	100	100
Fusarium sp. A	100	21.06	100	57.98	100	100	100	100	100	100
Fusarium sp. B	100	15.17	100	68.75	100	100	100	100	100	100
RSF1	0	0	100	0	100	100	100	100	100	100
RSF2	0	0	100	0	100	0	100	100	100	100
RSF3	0	0	0	0	100	0	100	100	100	100
RSF4	0	0	100	0	100	0	100	0	100	100
RSF5	0	0	100	0	100	0	100	0	100	100
RSF6	0	0	100	0	100	0	100	0	100	100
RSF7	0	0	100	0	100	0	100	100	100	100
RSF8	0	0	0	0	100	100	100	100	100	100
RSF9	0	0	0	0	100	100	100	100	100	100
RSF10	0	0	100	0	100	100	100	100	100	100
RSF11	0	0	0	0	100	0	100	100	100	100
RSF12	0	0	0	0	100	0	100	100	100	100
RSF13	0	0	100	0	100	0	100	0	100	100
RSF14	0	0	0	0	100	0	100	100	100	100

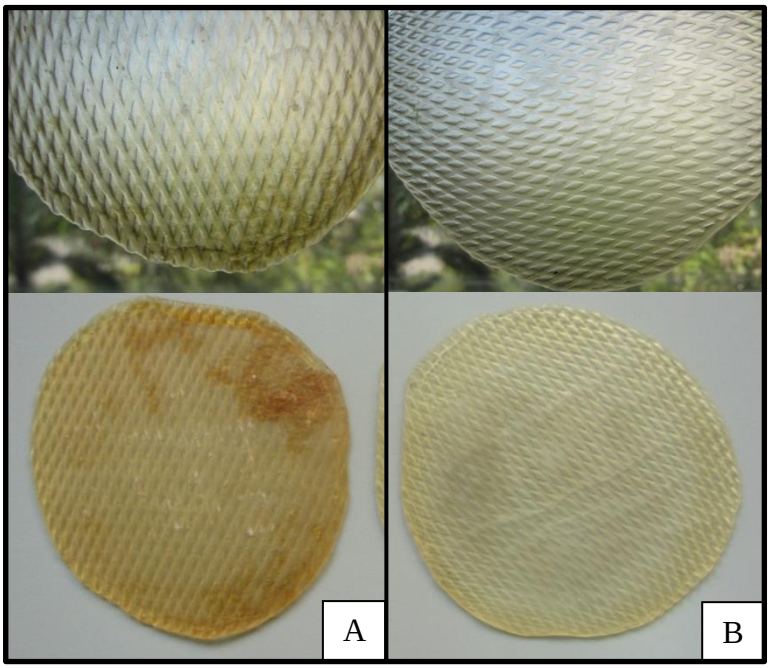
หมายเหตุ: TMR 032 คือ สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR 032; PNP คือ paranotrophenol;

5. การทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่น

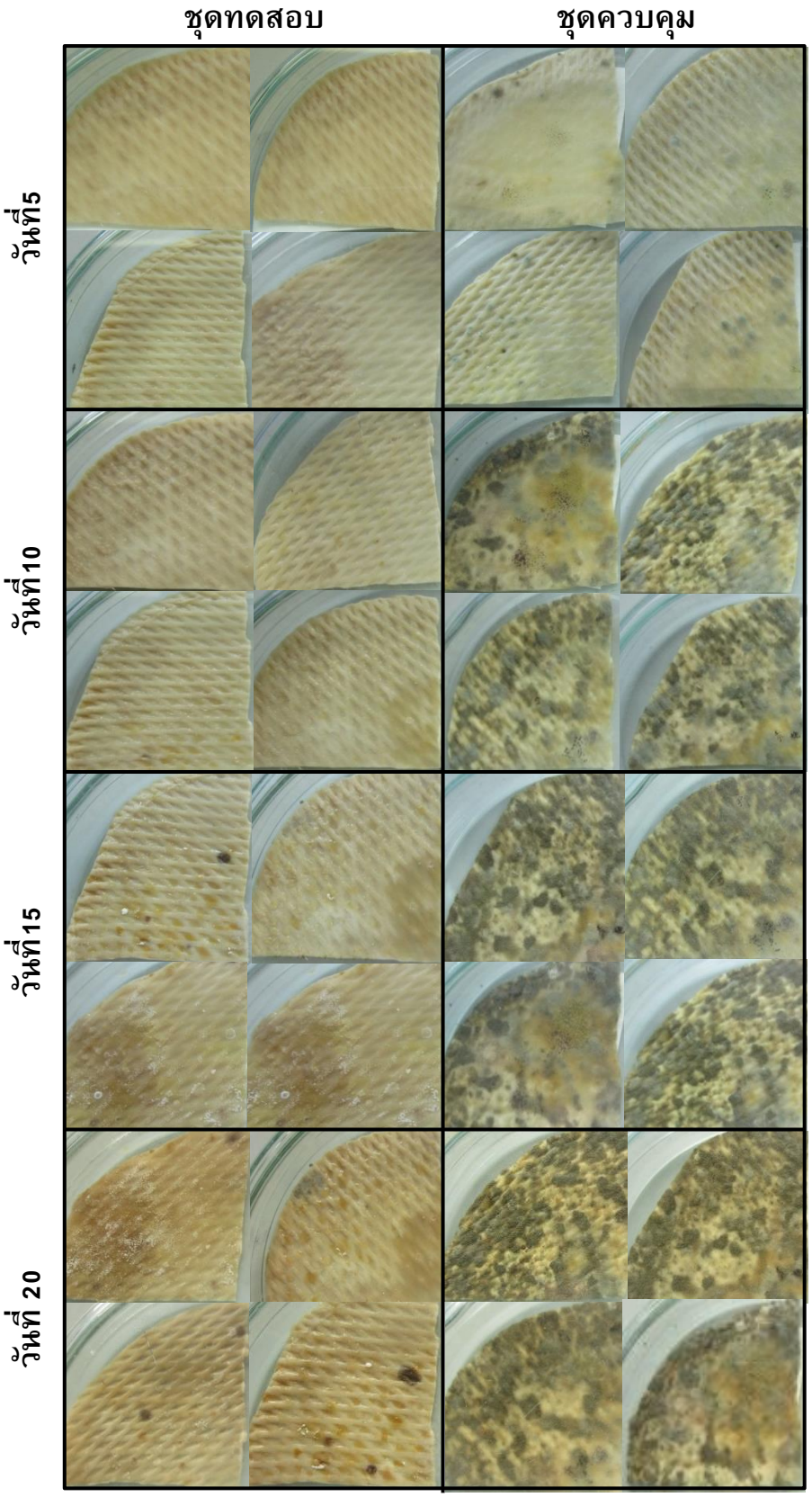
5.1 **แบบที่มีการผสมสารสกัดลงในแผ่นยาง**

การทดสอบการป้องกันการเจริญของเชื้อราในยางแผ่นโดยใช้สารสกัดหยาบเติมลงในแผ่นยางเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ แผ่นยางที่ไม่ได้เติมสารสกัด ในด้านคุณภาพของแผ่นยางพบว่าการเติม

สารสกัดลงไปจะทำให้ยางแผ่นมีสีเข้มขึ้น และในขั้นตอนการเตรียมพบว่ามีการจับกันของเนื้อยางซึ่งอาจจะเนื่องมาจากการใช้เมทานอลเป็นตัวละลายสารสกัดหยาบ (รูป 11) ในด้านของประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อราพบว่ายางแผ่นที่มีการเติมสารสกัดลงไปจะสามารถป้องกันเชื้อราได้นานถึง 20 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมจะเริ่มสังเกตพบการปนเปื้อนของเชื้อราได้เมื่อวันที่ 5 ของการทดลอง (รูป 12)



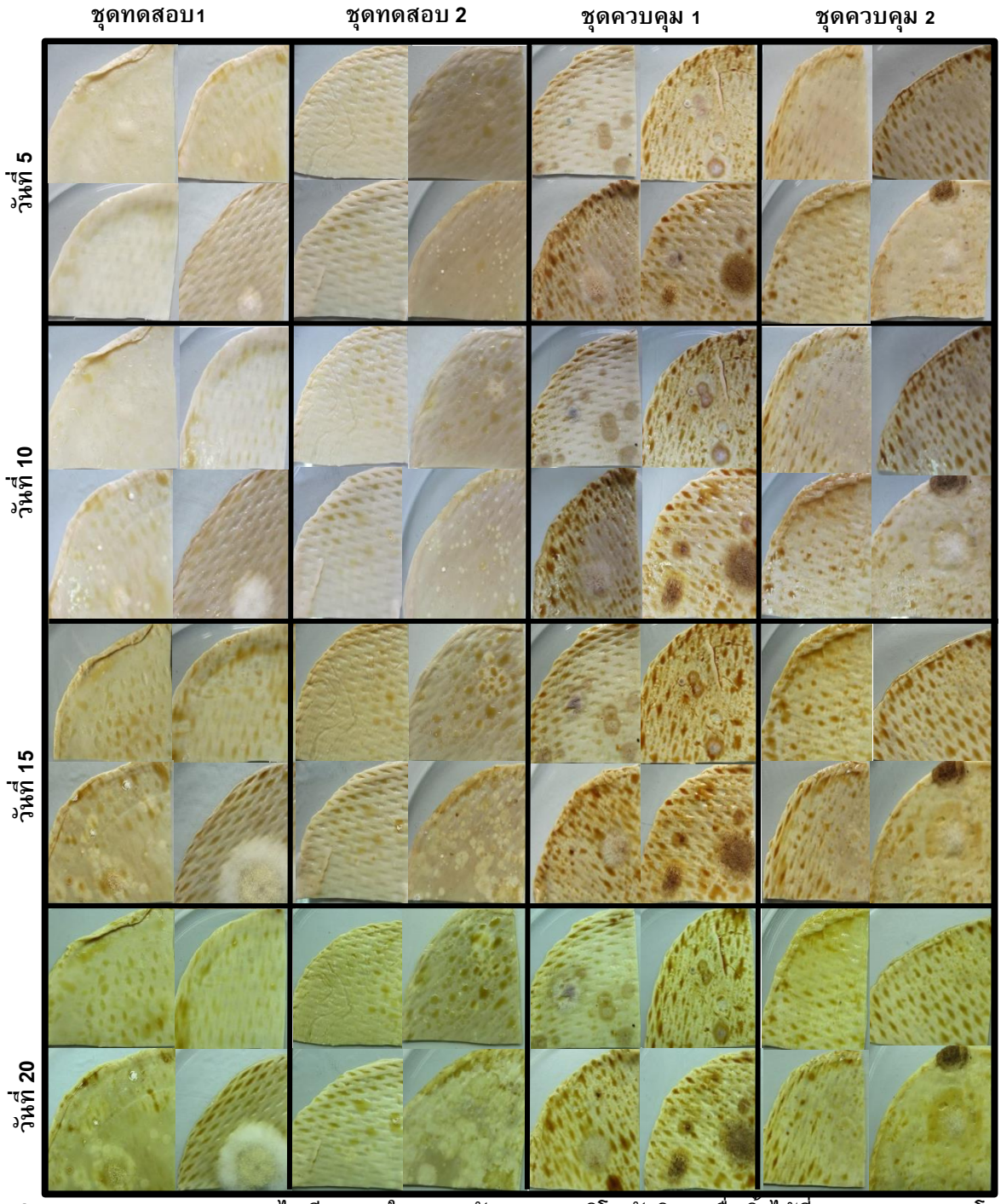
รูป 11 การเปรียบเทียบสีและความใสของยางแผ่นที่มีการเติมสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* TMR 032 และยางแผ่นชุดควบคุม (ไม่ได้เติมสารสกัด)
A: ยางแผ่นที่เติมสารสกัดจาก *Streptomyces* TMR 032 , B: ยางแผ่นที่ไม่ได้เติมสารสกัด



รูป 11 เปรียบเทียบการปนเปื้อนของเชื้อราบนแผ่นยางชุดทดสอบ (เติมสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR 032) และยางแผ่นชุดควบคุม (ไม่ได้เติมสาร) ที่เวลาต่างๆ โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ

5.2 การจุ่มแผ่นยางลงในสารสกัด

การทดสอบการป้องกันการเจริญของเชื้อราในยางแผ่นโดยการจุ่มแผ่นยางลงในสารสกัดหยาบที่ละลายด้วยเมทานอล และ น้ำ (ชุดทดสอบ 1 และ 2 ตามลำดับ) โดยมีความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1 mg/ml โดยมีชุดควบคุม 1 และ 2 คือ การจุ่มในน้ำ และ เมทานอล ตามลำดับ ในด้านคุณภาพของแผ่นยาง พบว่าคุณภาพแผ่นยางก่อนจุ่มและหลังจุ่มไม่มีความแตกต่างกันเลย ในด้านของประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อราพบว่ายางแผ่นที่มีการจุ่มในสารสกัดจะสามารถป้องกันเชื้อราได้นานถึง 20 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมจะเริ่มสังเกตพบการปนเปื้อนของเชื้อราได้เมื่อวันที่ 5 ของการทดลอง (รูป 12)



รูป 12 แผ่นยางชุดควบคุม (ไม่มีการจุ่มในสารสกัดจากแอคติโนมัยสิท) เมื่อทิ้งไว้ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ

6. เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 กับ พาราไนโตรฟีนอล

จากตาราง 4 พบว่า สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 ปริมาณ 1 กรัม มีต้นทุนการผลิตเท่ากับ 193.304 บาท เมื่อเปรียบเทียบกับพาราไนโตรฟีนอลซึ่งมีราคา 37 บาท/กรัม เมื่อนำไปใช้กับแผ่นยางเมื่อดูจากค่า MFC ที่ได้จากผลการทดลองข้อ 4 พบว่าต้องใช้พาราไนโตรฟีนอลในปริมาณที่มากกว่า สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 ถึง 2 เท่า ซึ่งอย่างไรก็ตามการใช้พาราไนโตรฟีนอลจะมีต้นทุนถูกกว่าสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 119.304 บาท

ตาราง 4 ต้นทุนการผลิตสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 ปริมาณ 1 กรัม

ลำดับ	รายการ	ราคา(บาท)/หน่วย	ปริมาณที่ใช้	คิดเป็นเงิน (บาท)
1	Yeast extract	990/500กรัม	4กรัม	7.92
2	Malt extract	1750/500กรัม	10 กรัม	35
3	glucose	96/1000กรัม	4 กรัม	0.384
4	Ethyl acetate	1000/ลิตร	50 มล	50
5	ประมาณค่าไฟ			
	-เครื่องเขย่า 7 วัน	-	-	50
	- evaporator รอบละ 30 นาที (10 รอบ)	-	-	50
	รวม			193.304

วิจารณ์ผลการวิจัย

การปนเปื้อนของเชื้อราบนยางแผ่นจะทำให้แผ่นยางมีคุณภาพลดลงและขายได้ในราคาที่ต่ำลง โดยสถาบันวิจัยยางกำหนดว่ายางแผ่นดิบคุณภาพ 1,2 และ 3 ต้องไม่มีราบนแผ่นยาง การปนเปื้อนของเชื้อราบนยางแผ่นเกิดจากการที่แผ่นยางมีชื้นสูง ซึ่งอาจเกิดจากการเก็บรวบรวมยางแผ่นโดยอาจนำเอาแผ่นยางที่ยังชื้นอยู่มาซ้อนทับกันเพื่อรอจำหน่ายทำให้เกิดการเจริญของเชื้อราบนแผ่นยางได้ แนวทางในการป้องกันการปนเปื้อนเชื้อราบนแผ่นยางมีหลายวิธี เช่น การรมด้วยควันเพื่อป้องกันเชื้อราเพื่อให้เก็บรักษาได้นานๆ หรืออาจใช้ลมร้อนมาช่วยให้ยางแห้งและเติมสารเคมีป้องกันเชื้อราเช่น พาราไนโตรฟีนอล ซึ่งเป็นสารพิษ ก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) ในอดีตเคยใช้ในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราบนยางแผ่น (fullerton, 1929) แต่ปัจจุบันได้ถูกห้ามใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยางแผ่น แต่ได้มีการนำสารเคมีชนิดอื่นๆมาใช้แทนเช่น sodium metabisulphite, potassium sorbate, potassium benzoate ซึ่งสารต่างๆเหล่านี้ก็ยังคงมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของผู้ใช้ (สุพรรณษา, 2551) อย่างไรก็ตามแม้ว่าใช้วิธีการต่างๆ ดังกล่าวในกันป้องเชื้อราแต่เมื่อเก็บแผ่นยางไว้เป็นเวลานานๆ หรือ ในช่วงฤดูฝนซึ่งมีความชื้นค่อนข้างสูงแผ่นยางที่เก็บไว้จะมีการปนเปื้อนของเชื้อราอยู่ดี งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะนำสารชีวภาพซึ่งได้จากแบคทีเรียแอคติโนมัยสิทมาใช้ในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราบนแผ่นยาง

เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา ทดแทนการใช้สารเคมี โดยใช้เชื้อราที่มีในห้องปฏิบัติการที่เคยมีรายงานว่ามีการปนเปื้อนในยางแผ่นร่วมกับเชื้อราที่แยกได้จากแผ่นยางเป็นเชื้อราทดสอบ

จากการแยกเชื้อราที่ปนเปื้อนบนยางแผ่นพบว่าสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 14 ไอโซเลท โดยพบว่าเป็นเชื้อ *Aspergillus* 5 ไอโซเลท และเชื้อ *Penicillium* 9 ไอโซเลท คิดเป็น 35.7 % และ 64.3% ของเชื้อทั้งหมดที่แยกได้ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสายสมรและคณะ (2555) และ อรัญ (2553) ซึ่งพบว่าเชื้อราที่ปนเปื้อนบนยางแผ่นส่วนใหญ่เป็น 2 จีนัสนี้ ซึ่งชนิดของเชื้อราที่พบว่าสามารถปนเปื้อนแผ่นยางได้จะขึ้นอยู่กับความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศด้วย เนื่องจากเชื้อราแต่ละชนิดมีความต้องการความชื้นในการเจริญแตกต่างกัน (Lian *et al*., 2008) เชื้อราส่วนใหญ่ที่ปนเปื้อนบนแผ่นยางเป็นชนิดเดียวกับเชื้อราที่พบในอากาศ (Chang และคณะ, 1995)

ผลของการนำเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการทั้งหมด 180 สายพันธุ์มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Dual culture bioassay โดยใช้เชื้อราทดสอบจำนวน 20 สายพันธุ์ ผลการทดสอบพบว่า เชื้อ *Streptomyces* TMR032 ให้ผลการยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนยับยั้งมากกว่า 30 มิลลิเมตรในเชื้อราทดสอบทั้ง 20 สายพันธุ์ เมื่อนำสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 และสารพาราไนโตฟีนอลมาทำการเปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราโดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (MFC) พบว่าสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ดีกว่าพาราไนโตรฟีนอล โดยพบว่ามีค่า MFC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนพาราไนโตรฟีนอลมีค่า MFC เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเจริญของเชื้อราบนแผ่นยางโดยการจุ่มแผ่นยางในสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 ความเข้มข้น 1 มก./มล และการนำสารสกัดหยาบมาผสมในยางแผ่นให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มก./มล. พบว่าสามารถป้องกันเชื้อราได้นานถึง 20 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมจะเริ่มสังเกตพบการปนเปื้อนของเชื้อราได้ในวันที่ 5 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของณพรัตน์ และคณะ, 2536 ที่ใช้การแช่แผ่นยางในพาราไนโตรปีนอลพบว่าเมื่อเตรียมยางแผ่นโดยใช้อัตราส่วนของน้ำยาง: น้ำ เท่ากับ 3:2 จากนั้นแช่แผ่นยางใน พาราไนโตรฟีนอล อัตรา 0.1%W/v 30 นาที แล้วนำไปผึ่งในโรงเรือนพบว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อราบนแผ่นยางดิบในระยะเวลาที่ทำการทดลอง 7 วัน

การปนเปื้อนของเชื้อราบนแผ่นยางที่แตกต่างกันอาจขึ้นกับสายพันธุ์ของยางพาราที่นำมาทำยางแผ่นซึ่งมีความแตกต่างกันเนื่องจากมีอัตราส่วนของสารต่างๆ เช่น โปรตีน น้ำตาล และสารประกอบอื่นๆ ที่เป็นอาหารของเชื้อราแตกต่างกัน ดังนั้นทำให้มีการปนเปื้อนของเชื้อราในยางแผ่นที่ได้จากยางพาราสายพันธุ์ต่างๆ แตกต่างกัน (นภาวรรณ และคณะ, 2008) การที่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อราบนยางแผ่นหลัง 20 วัน เนื่องมาจากในธรรมชาติมีเชื้อราอยู่หลายชนิด เชื้อราแต่ละชนิดสามารถทนต่อสารฆ่าเชื้อราได้แตกต่างกัน แม้ในเชื้อราชนิดเดียวกันแต่อยู่ในระยะการเจริญที่แตกต่างกันเช่น ระยะการสปอร์จะทำให้สามารถทนต่อสารฆ่าเชื้อได้ดีกว่าระยะที่ไม่มีการสร้างสปอร์ (พิชัย, 2538) นอกจากนี้ปัจจัยอื่นๆยังมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา เช่น ระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายเชื้อ ชนิดของสารฆ่าเชื้อ ความเข้มข้น พีเอช อุณหภูมิ เมื่อเชื้อราได้รับสารฆ่าเชื้อในอัตราความเข้มข้นหนึ่งๆ เชื้อราจะไม่ตายพร้อมกันแต่จะมีจำนวนลดลง โดยประชากรของเชื้อราจะประกอบไปด้วยเซลล์ที่มีความต้านทานต่างๆ ส่วนใหญ่จะ

มีความต้านทานปานกลาง ส่วนน้อยจะมีความต้านทานสูง และต่ำ เมื่อได้รับสารฆ่าเชื้อเซลล์ส่วนใหญ่จึงตายก่อน เซลล์ที่มีความต้านทานสูงอาจอยู่รอดได้และเมื่อสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปเซลล์กลุ่มนี้ก็จะกลับมาเจริญได้ ซึ่งเมื่อเกิดการเจริญของเชื้อรากลุ่มนี้ขึ้นมาจะทำให้บริเวณที่เชื้อรากลุ่มนี้เจริญมีสภาพเปลี่ยนแปลงไป โดยเฉพาะพีเอช ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของพีเอชอาจอยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อรากลุ่มอื่นๆ

ความเข้มข้นและปริมาณของสารที่ใช้ในการฆ่าเชื้อก็มีอิทธิพลต่ออัตราการตายของเชื้อราเช่นกัน การใช้สารฆ่าเชื้อปริมาณมากจะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ดีกว่าการใช้ปริมาณน้อย แม้ว่าจะมีความเข้มข้นเท่ากันเนื่องจากสารฆ่าเชื้อจะถูกทำลายฤทธิ์โดยสารต่างๆ อีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญในการฆ่าเชื้อก็คือ การเข้าสัมผัสกับเชื้อราของสาร โดยเชื้อราจะดูดซับสารเข้าไปในเซลล์ ดังนั้นสารฆ่าเชื้อจะมีประสิทธิภาพดีต้องไม่มีสิ่งกีดกั้นการเข้าสัมผัสกัน

ความชื้นเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา ทั้งความชื้นในแผ่นยางและความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ ยางแผ่นที่มีความชื้นต่ำกว่า 0.52 % จะไม่พบการปนเปื้อนในแผ่นยาง จากผลการวิจัยที่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อราในแผ่นยางที่มีการผสมหรือจุ่มในสารสกัดหยาบหลัง 20 วัน อาจเนื่องมาจากได้ทำการทดลองใน moist chamber ซึ่งมีทำให้มีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศสูง ซึ่งอาจสูงถึง 65 % ซึ่งเป็นความชื้นที่เชื้อราสามารถเจริญได้ (BCCDC Laboratory Service, 2003) ถ้าในสภาพที่นำไปใช้งานจริงมีความชื้นต่ำกว่าใน moist chamber อาจทำให้อายุการเก็บรักษายางแผ่นยาวนานขึ้น ดังนั้นการศึกษาระดับความชื้นสัมพัทธ์ร่วมกับอายุการเก็บรักษาด้วยจึงเป็นเรื่องที่ต้องมีการศึกษาต่อไป

ต้นทุนการผลิตเมื่อคิดจากการนำไปใช้โดยคำนึงถึงค่า MFC ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ พบว่า สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 มีต้นทุนสูงกว่าพาราไนโตรฟีนอล 119.304 บาท สารสกัดหยาบมีต้นทุนที่สูงเนื่องจากอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อมีราคาค่อนข้างสูงและกระบวนการสกัดทำให้มีต้นทุนของค่าไฟ และตัวทำละลาย ซึ่งเป็นจำนวนเงินถึง 150 บาท ดังนั้นถ้ามีการศึกษาวิจัยต่อไปเพื่อลดต้นทุนการผลิตลง เช่น การปรับสูตรอาหารโดยใช้สารที่มีราคาถูกลง เช่น สารอาหารหรือของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมและอาหาร คาดว่าจะช่วยลดต้นทุนในส่วนนี้ได้ และถ้ามีการศึกษารูปแบบการนำไปใช้งานโดยอาจตัดขั้นตอนของการสกัดสารออกและเปลี่ยนเป็นการนำเอาน้ำเลี้ยงที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาใช้แทนจะทำให้ลดต้นทุนลงได้ถึง 150 บาท ซึ่งคาดว่าน่าจะทำให้มีต้นทุนใกล้เคียงกับพาราไนโตรฟีนอล ยิ่งไปกว่านั้นการปรับเปลี่ยนมาใช้น้ำเลี้ยงเชื้อจะมีความสะดวกในการนำไปใช้ โดยเกษตรสามารถผลิตได้เองและความปลอดภัยในการนำไปใช้มากกว่าพาราไนโตรฟีนอล ช่วยลดผลกระทบที่เกิดกับสุขภาพของผู้ที่เกี่ยวข้องและลดมลภาวะที่เกิดกับสิ่งแวดล้อม

สรุปผลการวิจัย

1. ผลการแยกเชื้อราที่ปนเปื้อนบนยางแผ่นผึ่งแห้งพบว่ามีเชื้อราทั้งหมด 14 ไอโซเลท โดยจัดเป็นเชื้อ *Aspergillus* จำนวน 5 ไอโซเลท และเชื้อ *Penicillium* จำนวน 9 ไอโซเลท คิดเป็น 35.7 % และ 64.3% ของเชื้อทั้งหมดที่แยกได้ตามลำดับ

2. เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยสิทที่มีในห้องปฏิบัติการจำนวน 180 ไอโซเลทมาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราที่แยกได้ (14 สายพันธุ์) ร่วมกับเชื้อราอีก 6 สายพันธ์ที่มีรายงานว่ามีการ

ปนเปื้อนบนแผ่นยาง พบว่าเชื้อ *Streptomyces* TMR032 ให้ผลการยับยั้งเชื้อราทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนการยับยั้งมากกว่า 30 มิลลิเมตร

3. เมื่อนำสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 และสารพาราไนโตฟีนอลมาทำการเปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราโดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (MFC) พบว่าสารสกัดหยาบจาก*Streptomyces* TMR032 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ดีกว่าพาราไนโตรฟีนอลโดยพบว่ามีค่า MFC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนพาราไนโตรฟีนอลมีค่า MFC เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเจริญของเชื้อราบนแผ่นยางโดยมีรูปแบบการนำสารสกัดจาก *Streptomyces* TMR032 ไปใช้มี 2 รูปแบบ คือ การผสมลงไปในแผ่นยางและการจุ่มแผ่นยางในสารสกัดที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มก./มล. (มากกว่าค่า MFC 2 เท่า) พบว่าสามารถป้องกันเชื้อราได้นาน 20 วัน ในขณะที่ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมหรือจุ่มในสารสกัด) จะพบการปนเปื้อนของเชื้อราในวันที่ 5 ของการทดลอง

5. การจุ่มแผ่นยางในสารสกัดหยาบจะไม่ทำให้ยางเปลี่ยนสีและเกิดการจับตัวกันของเนื้อยางเหมือนการผสมสารสกัดหยาบลงไปในแผ่นยาง

6. ต้นทุนการผลิตเมื่อคิดจากการนำไปใช้โดยคำนึงถึงค่า MFC ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ พบว่า สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 มีต้นทุนสูงกว่าพาราไนโตรฟีนอล 119.304 บาท (สารสกัดหยาบและพาราไนโตรฟีนอลมีต้นทุนการผลิตเท่ากับ 193.304 และ 37 บาท/กรัม ตามลำดับ)

คำขอบคุณ

โครงการนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ประจำปีงบประมาณ 2556

เอกสารอ้างอิง

Aghighi S, Bonjar GHS, Rawashdeh R, Batayneh S, Saadoun I (2004). First report of antifungal spectra of activity of Iranian Actinomycetes strains against *Alternaria solani, Alternaria alternate, Fusarium solani, Phytophthora megasperma, Verticillium dahlia* and *Saccharomyces cerevisiae*. Asian J. Plant Sci., 3(4): 463-471.

Alimuddin, Widada J, Asmara W, Mustofa (2011). Antifungal Production of a Strain of *Actinomycetes spp* Isolated from the Rhizosphere of Cajuput Plant: Selection and Detection of Exhibiting Activity Against Tested Fungi. I. J. Biotech, 16(1):1-10.

Anitha A, Rebeeth M (2009). *In vitro* antifungal activity of *Streptomyces griseus* against phytopathogenic fungi of tomato field. Acad. J. Plant Sci., 2(2): 119-123.

Ayari A, Morakch H, Djamila KG (2012). Identification and antifungal activity of *Streptomyces* sp. S72 isolated from Lake Oubeira sediments in North-East of Algeria African Journal of Biotechnology 11(2):305-311

Baniya R, Vaidya GS (2011). Antifungal Activity of Actinomycetes from Vermicompost and Their Morphological and Biochemical Characterization. Nepal Journal of Science and Technology 12:97-102

BCCDC Laboratory Serveices. (2003). A Guide to Selection and Use of Disinfectants. The British Columbia Center for Disease Control. p. 8.

Bennett JV, Brodie JL, Benner EJ, Kirby WMM (1966). Simplified,accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. Appl Microbiol, 14(2): 170-177.

Bonjar GHS, Farrokhi PR, Aghighi S, Bonjar LS, Aghelizadeh A (2005). Antifungal characterization of Actinomycetes isolated from Kerman, Iran and their future prospects in biological control strategies in greenhouse and field conditions. Plant Pathol. J., 4(1): 78-84.

Chang JCS, Foarde KK and Vanosdell DW (1995). Growth evaluation of fungi (*Penicillium* and *Aspergillus* spp.) on ceiling tiles. Atmos. Environ. 29:2331-2337.

Dechsakulthorn F, Hayes A, Bakand LJ, Winder Ch (2007). In vitro cytotoxicity assessment of selected nanoparticles using human skin fibroblasts. AATEX 14, 397-400.

Devi NKA, Jeyarani M, Balakrishnan K 2006. Isolation and identification of marine actinomycetes and their potential in antimicrobial activity. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9: 470-72.

El-Mehalawy AA, Abd-Allah, NA, Mohamed RM, Abu-Shay MR (2005). Actinomycetes antagonizing plant and human pathogenic fungi. II. Factors affecting antifungal production and chemical characterization of the active components. Int. J. Agric. Biol., 7(2): 188-196.

Esuruoso OF (1970) Fungi that cause mouldiness of processed sheet rubber in western Nigiria. Mycopath. Mycol. Appl. 42:187-189.

Fullerton RG (1929). Notes on defects in smokedsheet and crepe rubber. Quaterly Journal, Rubber Research Institute of Malaya 1: 66-74.

Gebreel HM, El-Mehalawy AA, El-Kholy IM, Rifaat HM, Humid AA (2008). Antimicrobial activities of certain bacteria isolated from Egyptian soil against pathogenic fungi. Res. J. Agric. Biol. Sci., 4(4):331-339.

Houssam M, Atta (2009). An Antifungal Agent Produced by *Streptomyces olivaceiscleroticus*, AZ-SH514 World Appl. Sci. J., 6 (11): 1495-1505.

Iwasa T, Higashide E, Yamamoto H, Shibata M (1970). Studies on validamycins, new antibiotics. II. Production and biological properties of validamycin A and B. J Antibiot. (Tokyo). 23: 595-602.

Kavitha A, Vijayalakshmi M, Sudhakar P, Narasimha G (2010). Screening of Actinomycete strains for the production of antifungal metabolites. Afr. J. Microbiol. Res., 4(1): 027-03

Khamna S, Yokota A, Peberdy JF, Lumyong S (2009). Antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants. Int. J. Integr. Biol., 6(3): 143-147.

Lian B, Wang B, Pan M, Liu C, Teng HH (2008). Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigates*. Geochim. Cosmochim. Ac. 72: 87-98.

Lim SW, Kim JD, Kim BS, Hwang B (2000). Isolation and numerical identification of *Streptomyces humidus* strain S5-55 antagonistic to plant pathogenic Fungi. Plant Pathol. J., 16(4): 189-199.

Linos A, Steinbuchel A (2001) Biodegradation of natural and synthetic rubbers. In: Koyama T, and Steinbuchel A, eds., Biopolymers Vol. 2, 1st ed. Wiley-VCH, Weinheim , 321-359

Mohankumar T, Krishnan K (2011) Anti-Aspergillus activity of Streptomyces sp.VITSTK7 isolated from Bay of Bengal coast of Puducherry, J Nat Env Sci. 2:1-8.

Nolan RD, Cross R (1988). Isolation and screening of actinomycetes, pp. 1-32. *In* Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M, eds. Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press, San Diego, CA.

Oskay M (2009). Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains Afr. J. Biotechnol. 8: (13)3007-3017

Sharma H, Parihar L (2010). Antifungal activity of extracts obtained from Actinomycetes. Journal of Yeast and Fungal Research 1(10):197-200.

Takeuchi S, Hirayama K, Ueda K, Sakai H, Yonehara H. (1958). Blasticin S, a new antibiotic. J of Antibiotics (Tokyo). Series A 11: 1-5.

Takizawa M, Colwell RR, Hill RT (1993). Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake bay. Appl Environ Microbiol 59(4): 997-1002.

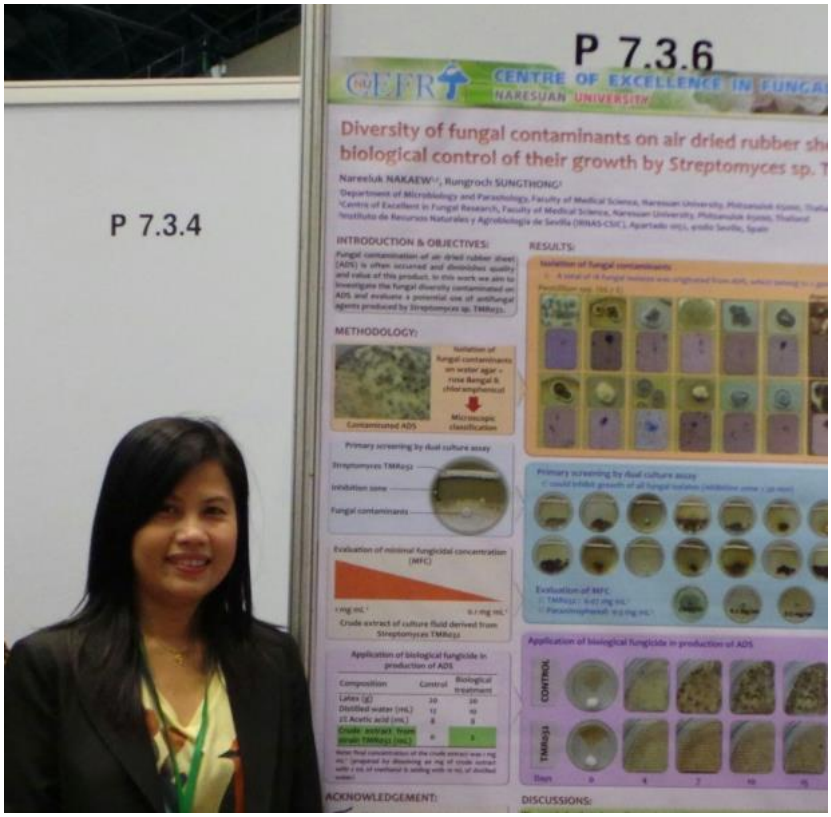
Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y (1966). New antibiotics, bleomycin A and B. J Antibiot (Tokyo). 15(5): 200-209.

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
1. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อราที่เจริญบนแผ่นยาง ADS ได้ดีที่สุด 2. เพื่อทราบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนที่ได้จากแอคติโนมัยสิทสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีชนิดอื่นๆที่เคยมีรายงานการศึกษา	1. การทดสอบความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยวิธี dual culture bioassay	▪ แยกเชื้อราที่ปนเปื้อนในยางแผ่นเพื่อนำมาใช้เป็นเชื้อทดสอบ ร่วมกับเชื้อที่มีในห้องปฏิบัติการที่เคยมีรายงานการปนเปื้อนบนแผ่นยางอีก 6 สายพันธุ์ ▪ ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการทั้งหมด 180 สายพันธุ์แล้ว	▪ แยกเชื้อราทดสอบได้ทั้งหมด 14 ไอโซเลท ▪ พบว่า *Streptomyces* TMR 032 ให้ผลการยับยั้งเชื้อราทดสอบทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนยับยั้งมากกว่า 30 มิลลิเมตรจึงเลือกนำมาทำการศึกษาต่อ
	2. เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสิทที่คัดเลือกได้ ทำการสกัดสารยับยั้งเชื้อรา	▪ สกัดจาก เชื้อแอคติโนมัยสิท TMR032	▪ ได้สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR 032 เพื่อนำไปทดสอบหาค่า MFC
	3. ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อ TMR032 โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (MFC)ได้เทียบกับพาราไนโตรฟีนอล	▪ ดำเนินการหาค่า MFC ของสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR 032 เทียบกับพาราไนโตรฟีนอล ▪ ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำไปใช้จริงโดยเตรียมยางแผ่น 2 รูปแบบ คือ 1.เติมสารสกัดหยาบลงไป 2. จุ่มแผ่นยางในสารสกัด เทียบกับชุดควบคุมที่เป็นแผ่นยางที่ไม่ได้เติมสารสกัดหยาบ ▪ เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างสารสกัดหยาบและพาราไนโตรฟีนอล	▪ สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ดีกว่าพาราไนโตรฟีนอลโดยพบว่ามีค่า MFC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนพาราไนโตรฟีนอลมีค่า MFC เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ▪ การผสมสารสกัดหยาบลงไปในแผ่นยางและการจุ่มแผ่นยางในสารสกัดที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มก./มล. (มากกว่าค่า MFC 2 เท่า) พบว่าสามารถป้องกันเชื้อราได้นาน 20 วัน ในขณะที่ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมหรือจุ่มในสารสกัด) จะพบการปนเปื้อนของเชื้อราในวันที่ 5 ของการทดลอง ▪ ต้นทุนการผลิตเมื่อคิดจากการนำไปใช้โดยคำนึงถึงค่า MFC ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ พบว่า สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* TMR032 มีต้นทุนสูงกว่าพาราไนโตรฟีนอล 119.304 บาท (สารสกัดหยาบและพาราไนโตรฟีนอลมีต้นทุนการผลิตเท่ากับ 193.304 และ 37 บาท/กรัม ตามลำดับ)

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องการนำโครงการนี้ไปใช้ประโยชน์

นำข้อมูลที่ได้ไปนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ “The 10th International Mycological congress 2014” เมื่อวันที่ 3-8 สิงหาคม 2557 ณ. ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิตต์ กรุงเทพฯ



การป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่นอบแห้ง (Air Dried Sheet, ADS) โดยใช้สารต้านเชื้อราประสิทธิภาพสูงจากเชื้อแอคติโนมัยสิท

Prevention of fungal growth on para rubber air dried sheet (ADS) by high potential antifungal from actinomycetes

ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว

(ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.))

เรื่องย่อ

○ ผลการแยกเชื้อราที่ปนเปื้อนบนแผ่นยางได้ 14 ไอโซเลท พบว่าเป็นเชื้อ *Penicillium* sp. (64.3%) และ *Aspergillus* sp. (35.7%)

○ ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อราที่ปนเปื้อนบนแผ่นยางโดยเชื้อแอคติโนมัยสิทพบว่า เชื้อ *Streptomyces* TMR032 สามารถยับยั้งเชื้อราทดสอบทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนยับยั้งมากกว่า 30 มิลลิเมตร

○ การทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการปนเปื้อนเชื้อราบนแผ่นยางโดยสารสกัดจากเชื้อ *Streptomyces* TMR032 โดยการเตรียมแผ่นยาง 2 วิธี คือ

- แบบผสมลงในแผ่นยาง
- แบบจุ่มแผ่นยางในสารสกัด

พบว่าทั้ง 2 วิธี สามารถป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราได้นานถึง 20 วัน เมื่อเทียบกับการไม่ผสมสารสกัดลงไปแผ่นยางจะเริ่มพบเชื้อราบนแผ่นยางในวันที่ 5 ของการทดลอง

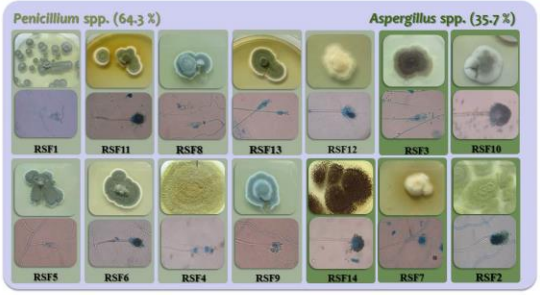
คำนำ

การปนเปื้อนของเชื้อราในยางแผ่น ADS จะทำให้ยางแผ่นราคาตก และเชื้อรายังมีผลเสียต่อสุขภาพของผู้เกี่ยวข้อง การผลิตยางแผ่นอาจจะมีการเติมหรือ จุ่มสารเคมีป้องกันเชื้อราเช่น พาราไนโตฟีนอล ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อผู้ใช้ และถูกห้ามใช้ในอุตสาหกรรมยางบางประเภท

จากข้อมูลดังกล่าว จึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้ ซึ่งเป็นการวิจัยเพื่อมุ่งไปสู่การผลิตยาง ADS ที่มีคุณภาพดีเก็บรักษาได้นาน และปลอดภัยต่อผู้ใช้ โดยพัฒนาการผลิตยางแผ่น ADS ที่มีคุณสมบัติในการทนต่อเชื้อรา โดยใช้สารต้านเชื้อราประสิทธิภาพสูงที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยสิท ซึ่งเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบว่ามีรายงานการผลิตสารต้านเชื้อราได้ดีที่สุด ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้คาดว่าจะทำให้ยาง ADS สามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น ช่วยให้เกษตรกรจำหน่ายยางแผ่นที่มีคุณภาพดี ได้ราคาสูง และลดต้นทุนการผลิต

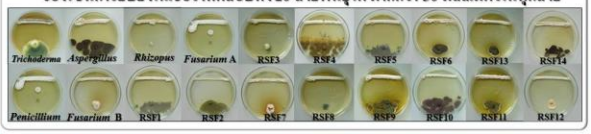
ผลการทดลอง

แยกและจัดจำแนกเชื้อราที่ปนเปื้อนบนแผ่นยาง



ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราในห้องปฏิบัติการ

○ เชื้อ *Streptomyces* TMR032 ให้ผลการยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนการยับยั้งในเชื้อราทดสอบทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ มากกว่า 30 มิลลิเมตรในทุกสาย



เปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสิทกับสารเคมี

MIC VALUE (mg/ml.) ○ Paranitrophenol : 1 ○ *Streptomyces* TMR 032 : 0.5

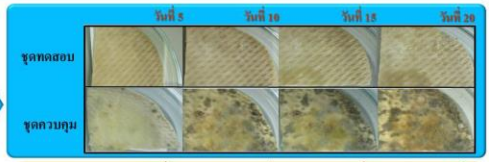
การทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่น

1. แบบที่มีการผสมสารสกัดลงในแผ่นยาง

เตรียมยางแผ่นที่ใช้ในการทดสอบดังตาราง

ชุดการทดลอง	ปริมาณสารที่เติม			
	น้ำยาง (กรัม)	น้ำสั่น (มล.)	กรดอะซีติก 2 % (มล.)	สารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* TMR032 (มล.)
ชุดทดสอบ	20	10	8	2
ชุดควบคุม	20	12	8	0

หมายเหตุ: ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดหยาบที่ใช้ในชุดทดสอบเท่ากับ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



2. การจุ่มแผ่นยางลงในสารสกัด

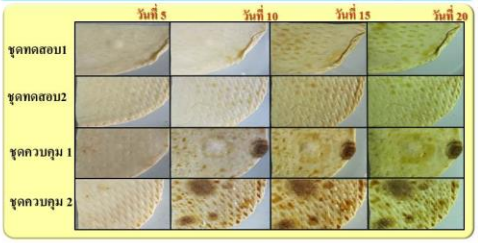
แบ่งชุดการทดลองเป็น 4 ชุด ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ดังนี้

○ ชุดทดสอบ1 : จุ่มแผ่นยางในสารสกัดจากแอคติโนมัยสิทที่ละลายด้วยเมทานอล (ความเข้มข้น 1มก./มล.)

○ ชุดทดสอบ2 : จุ่มในสารสกัดจากแอคติโนมัยสิทที่ละลายด้วยน้ำ (ความเข้มข้น 1มก./มล.)

○ ชุดควบคุม 1 : จุ่มเมทานอล

○ ชุดควบคุม 2 : ไม่ได้จุ่มสารใดๆ



วิจารณ์ผลการทดลอง

○ การใช้สารสกัดจากเชื้อ *Streptomyces* TMR 032 สามารถป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราบนแผ่นยางได้ดี

○ การใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายสารสกัดจากเชื้อ *Streptomyces* TMR 032 ในการเตรียมยางแผ่นพบว่าเมทานอลทำให้ยางจับตัวกันทำให้ยางแผ่นที่ได้ไม่สม่ำเสมอ ซึ่งเมื่อทำการปรับวิธีการเตรียมโดยใช้การจุ่มแผ่นยางในสารสกัดแทน และใช้ตัวทำละลายเป็นน้ำเพื่อเปรียบเทียบกับเมทานอลก็พบว่าการจุ่มในสารทั้ง 2 ชนิดไม่ทำให้ลักษณะของยางแผ่นมีการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยางแผ่นที่ได้ก็สามารถป้องกันเชื้อราได้ดีเหมือนเดิม

○ เนื่องจากการทดลองทำใน moist chamber จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อราได้ง่าย คาดว่าถ้านำไปใช้ในสภาพจริง ซึ่งมีความชื้นต่ำกว่านี้อาจทำให้ยางแผ่นมีอายุการเก็บรักษาได้นานกว่า 20 วัน ซึ่งจะต้องมีการศึกษาวิจัยต่อไปในเรื่องของความชื้นกับการเก็บรักษาแผ่นยาง

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยาคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000 โทร: 055964622 E-mail: nnakaew@hotmail.com

ความคิดเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิในการรายงานความก้าวหน้ารอบ 6 เดือน ครั้งที่ 1
โครงการวิจัย การป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่นอบแห้ง (Air Dried Sheet ADS) โดยใช้สารต้านเชื้อราประสิทธิภาพสูงเชื้อแอคติโนมัยสิท
หัวหน้าโครงการวิจัย ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว

ตารางสรุปความเห็นของ ผู้ทรงคุณวุฒิ นักวิจัย และผู้ประสานงาน (เฉพาะประเด็นสำคัญ)

1. **ข้อคิดเห็นด้านวิชาการ**

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 1 1. ผู้วิจัยไม่ได้ระบุความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการเตรียมแผ่นยาง ขอให้ระบุด้วยว่าใช้ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดหรือไม่	1. ได้ทำการระบุไว้แล้วที่ด้านล่างของตารางที่ 1 หน้า 16	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ
2. การเตรียมตัวอย่างยางแผ่นครั้งต่อไปขอให้เตรียมแผ่นล่ะ 0.80-1.00 กก. เพื่อให้อยู่ในสภาพจริงที่เกษตรกรผลิตและบันทึกปริมาณความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิทุกครั้ง เพื่ออ้างอิงในการเกิดเชื้อรา	2. เห็นชอบตามผู้ทรงคุณวุฒิ แต่ผู้วิจัยขอนำไปดำเนินการในการทำวิจัยครั้งต่อไปเนื่องจากระยะเวลาในการวิจัยมีจำกัด	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และ ส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ
ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 1 1. สามารถดำเนินงานวิจัยได้ผลตามเป้าที่วางไว้และเร็วกว่าเป้า แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยแจ้งว่าสารสกัดจะมีการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ซึ่งยังไม่เห็นมีการดำเนินการดังกล่าว ดังนั้นผลที่ได้อาจจะไม่ต้องเป้าที่วางไว้ในส่วนนี้	1. การทำสารให้บริสุทธิ์บางส่วนต้องใช้สารเคมีและอุปกรณ์ที่ค่อนข้างมีราคาแพง แต่เนื่องด้วยในงานวิจัยครั้งนี้มีงบประมาณจำกัด ดังนั้นผู้วิจัยขอนำไปดำเนินการในงานวิจัยครั้งหน้า	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ
2. การเขียนวิธีการวิจัยจะไม่ได้ให้รายละเอียดที่ชัดเจนในบางข้อ เช่นความเข้มข้นที่ใช้เปรียบเทียบ	2. ได้เพิ่มเติมรายละเอียดวิธีการวิจัยเรียบร้อยแล้ว	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ
3. การนำเสนอมีการใช้ภาพเป็นจำนวนมาก ซึ่งแสดงผลได้ชัดเจนดี แต่ควรเพิ่มคำบรรยายให้ชัดเจนว่าแต่ละภาพเป็นการทดลองอะไร เช่น รูป 7 ใช้เชื้อราชนิดใดในแต่ละภาพย่อย	3.ได้เพิ่มรายละเอียดในคำบรรยายใต้ภาพเรียบร้อยแล้ว	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
		☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ
4. ยังไม่มีการสังเคราะห์ผลและวิจารณ์ผล	4. ได้สังเคราะห์ผล ในผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย เรียบร้อยแล้ว	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และ ส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ
5. ควรเพิ่มเติมเรื่องความคุ้มค่าของการใช้สารสกัดจากแอคติโนมัยสิท เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีในแง่ต้นทุน ผลกระทบต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมและความเป็นไปได้ที่จะมีผู้นำไปต่อยอดหรือผลิตสารสกัดมาใช้งานจริง	5. ได้เพิ่มเติมรายละเอียดไว้ในวิจารณ์ผลการวิจัย หน้า 27 เรียบร้อยแล้ว	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้วซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ
6. อาจจะทดลองใช้เชื้อราผสมหลายชนิดแล้วศึกษาว่าสารสกัดและพาราไนโตรฟีนอลจะยับยั้งเชื้อราได้หรือไม่ เพราะในธรรมชาติจะมีเชื้อราหลายชนิดอยู่ร่วมกันและเจริญได้หลายตัวบนยางพร้อมกัน	6. ในการทดสอบในแผ่นยางเชื้อราที่เกิดขึ้นเป็นเชื้อราในธรรมชาติ ซึ่งมีเชื้ออยู่หลายชนิดอยู่แล้ว ผู้วิจัยไม่ได้เติมเชื้อลงไป ดังนั้นการยับยั้งเชื้อราบนแผ่นยางบนแผ่นยางในชุดทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อราในธรรมชาติได้หลายสายพันธ์	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และ ส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ
<u>ข้อเสนอแนะ</u> 1. การรายงานผลการวิจัยในครั้งต่อไป ผู้รายงานควรเขียนและทบทวนให้ดีก่อนส่ง เนื่องจากพบว่ายังไม่ครบถ้วนในหลายส่วนทั้งในรายละเอียดของการเปรียบเทียบผลที่ค่าต่างๆ ซึ่งไม่มีการระบุในวิธีการทดลอง แต่ไปแสดงผลหรือ ตารางที่ 1 เป็นการเตรียมยางที่ใช้ในการทดลองการป้องกันเชื้อราแต่เขียนเฉพาะของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทแต่ไม่มีของสารพาราไนโตรฟีนอล	1. รายงานครั้งนี้ได้ทบทวนดีแล้วตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และ ส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ

ความคิดเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิในการรายงานความก้าวหน้ารอบ 6 เดือน ครั้งที่ 2
โครงการวิจัย การป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่นอบแห้ง (Air Dried Sheet ADS) โดยใช้สารต้านเชื้อราประสิทธิภาพสูงเชื้อแอคติโนมัยสิท
หัวหน้าโครงการวิจัย ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว

ตารางสรุปความเห็นของ ผู้ทรงคุณวุฒิ นักวิจัย และผู้ประสานงาน **(เฉพาะประเด็นสำคัญ)**

1. ความก้าวหน้าของงานเมื่อเทียบกับแผนที่วางไว้

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 1 1. ผลที่ได้ยังไม่สิ้นสุด ต้องรอผลสุดท้ายในอีก 6 เดือน	1. เห็นชอบตามผู้ทรงคุณวุฒิ	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ

2. ข้อคิดเห็นอื่นๆ

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 1 1. การทดลองเพื่อเปรียบเทียบ MIC ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารสกัดหยาบ ควรเทียบกับสารที่ใช้จริงในอุตสาหกรรมยางแผ่นอบแห้ง	1. ได้ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบ MIC ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารสกัดหยาบ กับสารที่ใช้ในอุตสาหกรรม (พาราไนโตรฟีนอล) ได้ผลการวิจัยในหน้า 21	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ
2. การเติม crude extract ของเชื้อ actinomycetes ต้องไม่ทำให้ยางแผ่นเปลี่ยนคุณภาพและคุณสมบัติ	2. จะได้มีการศึกษาคุณภาพและคุณสมบัติของยางในการวิจัยครั้งต่อไป ซึ่งได้ใส่ไว้ในแผนการดำเนินงานในปีที่ 3 เรียบร้อยแล้ว	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ

ความคิดเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิในการประเมินจากการประชุมรายงานความก้าวหน้า 8 เดือน
โครงการวิจัย การป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่นอบแห้ง (Air Dried Sheet,ADS) โดยใช้สารต้านเชื้อราประสิทธิภาพสูงจากเชื้อแอคติโนมัยสิท
หัวหน้าโครงการวิจัย ดร.นารีลักษณ์ นาแก้ว

ตารางสรุปความเห็นของ ผู้ทรงคุณวุฒิ นักวิจัย และผู้ประสานงาน **(เฉพาะประเด็นสำคัญ)**

1. ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะต่อโครงการวิจัย

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 1 งานวิจัยมีความก้าวหน้าตามแผน การรายงานความก้าวหน้าโครงการชัดเจนเข้าใจง่าย แสดงผลได้ตามแผนงาน แต่มีข้อเสนอแนะเพิ่มเติมดังนี้ 1. การเตรียมสารสกัดใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย เมื่อผสมกับน้ำยางทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อนและยางมีสีเข้ม จึงควรจะมีการทำให้สารสกัดละลายใหม่ในสารอื่นที่จะไม่ให้เกิดปัญหานี้ ในแผ่นยาง	1. ได้ทำการวิจัยเพิ่มเติมตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิโดยทำการวิจัยเปรียบเทียบรูปแบบการใช้สารสกัด ระหว่างการเติมลงไปในแผ่นยาง และการจุ่มยางแผ่นในสารสกัด เพื่อแก้ปัญหาการจับตัวกันของยาง โดยการจุ่มได้เตรียมสารสกัด 2 แบบ คือ ละลายในเมทานอล และละลายในน้ำ ได้ผลดังผลการวิจัยหน้า 23-24	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และ ส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ
2. ควรทดลองประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโดยการจุ่มแผ่นยางในสารละลายของสารสกัดจากเชื้อ Actinomyces ที่ความเข้มข้นต่างๆเพื่อดูว่าหากมีการใช้สารสกัดในวิธีการแตกต่างไปวิธีใดจะให้ผลที่มีประสิทธิผลสูงสุด	2. การทดสอบการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราบนแผ่นยางในการวิจัยครั้งนี้เป็นเพียงการวิจัยขั้นต้น เพื่อดูความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดไปใช้จริง เท่านั้น ดังนั้นการวิจัยในส่วนของรายละเอียดเพิ่มเติมเช่น ความเข้มข้นที่ใช้ ตัวทำละลาย หรือรูปแบบการนำไปใช้ผู้วิจัยขอนำไปดำเนินการในการวิจัยครั้งต่อไป	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ

2. ข้อคิดเห็นอื่นๆ

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 1 1. ควรมีการคิดต้นทุนผลผลิตเปรียบเทียบการใช้สารเคมียับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ใช้กับในปัจจุบันกับการใช้สารสกัดจาก Actinomyces ในโครงการนี้รวมถึงความปลอดภัยต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม	1. ได้มีการคิดต้นทุนผลผลิตเปรียบเทียบการใช้พาราไนโตรฟีนอลและสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทเรียบร้อยแล้วในหน้า 25	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ

ความคิดเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิในการประเมินจากร่างรายงานฉบับสมบูรณ์ ปี 2556
โครงการวิจัย การป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่นอบแห้ง (Air Dried Sheet, ADS) โดยใช้สารต้านเชื้อราประสิทธิภาพสูงจากเชื้อแอคติโนมัยสิท
หัวหน้าโครงการวิจัย ดร.นารีลักษณ์ นาแก้ว

1. โดยรวมแล้วผลงานที่ได้นี้เป็นงานที่น่าท้าท้ายเพียงไร มีความยาก-ง่ายระดับใด และผลที่ได้แสดงให้เห็นว่านักวิจัยได้ใช้ความอุตสาหพยายามเพียงไร

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
1. ผลงานนี้มีความน่าสนใจและท้าทายแต่เนื่องจากผู้วิจัยมีเชื้อ Actinomyces ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราอยู่แล้ว ทำให้สามารถทำวิจัยเพียงแค่ทวนสอบดูว่าจะฆ่าเชื้อราที่มีในแผ่นยางเท่านั้น ทำให้ระดับความยากของงานวิจัยลดลง	1. เห็นชอบตามผู้ทรงคุณวุฒิ	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐ นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ
2. ผู้วิจัยใช้สารสกัดในลักษณะของสารสกัดหยาบจึงไม่มีขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งเป็นวัตถุประสงค์ของผู้วิจัยเพื่อให้ผู้นำไปใช้ต่อสามารถดำเนินการเองได้โดยไม่ต้องใช้เทคโนโลยีสูง วิธีการประเมินผลก็ทำแบบง่ายๆ แต่ก็สามารถแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสารสกัด แต่ข้อมูลอาจจะยังไม่ครอบคลุมเพียงพอ เนื่องจากเป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการไม่มีการทดลองในพื้นที่จริงซึ่งอาจมีปัจจัยอื่นๆ ที่รบกวนผลการทดลองได้	2. เห็นชอบตามผู้ทรงคุณวุฒิ เนื่องการทำสารให้บริสุทธิ์ต้องใช้งบประมาณที่สูงและมีขั้นตอนที่ค่อนข้างยุ่งยาก ซึ่งเมื่อนำไปใช้อาจจะทำให้ผลผลิตที่ได้มีต้นทุนสูงขึ้น และอาจทำให้ผู้ที่จะนำไปใช้ไม่สามารถนำไปใช้ได้จริง การทดลองในพื้นที่จริงเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครอบคลุมนั้นไม่สามารถทำได้ เนื่องจากงบประมาณและระยะเวลาในการวิจัยมีจำกัด	
3. ต้นทุนยังคงสูงกว่าสารเคมี	3. เห็นชอบตามผู้ทรงคุณวุฒิ	
4. ยังขาดระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อ streptomyces แล้วทดลองกับยางแผ่นขนาด นน. 1 กก. เพื่อยืนยันผลการทดลองและผู้วิจัยไม่ได้ระบุว่าเตรียมยางแผ่นอย่างไร	4. การหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบที่จะเติมลงในยางแผ่น ยังไม่ได้ทำการทดลอง เนื่องจากระยะเวลาในการวิจัยมีจำกัด และผู้วิจัยไม่ได้ระบุเรื่องการทดสอบนี้ไว้ในข้อเสนอโครงการตั้งแต่ต้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการวิจัยในส่วนนี้เพิ่มเติมในงานวิจัยครั้งต่อไป ในส่วนของวิธีการเตรียมยางแผ่นที่เติมสารสกัดหยาบ ผู้วิจัยได้ระบุไว้แล้วในวิธีการวิจัย ข้อ 5.1 ตาราง 1 หน้า 38	
5. วัตถุประสงค์ครบถ้วนแล้วแต่ขาดทดสอบประสิทธิภาพเทียบกับการใช้งานจริง	5. เห็นชอบตามผู้ทรงคุณวุฒิ เนื่องจากระยะเวลาในการวิจัยมีจำกัด และผู้วิจัยไม่ได้ระบุเรื่องการทดสอบนี้ไว้ในข้อเสนอโครงการตั้งแต่ต้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการวิจัยในส่วนนี้เพิ่มเติมในงานวิจัยครั้งต่อไป	

2. **เมื่อเทียบกับวัตถุประสงค์และ output (โปรดดูเอกสารแนบ 1 ท้ายสัญญา) ท่านพบว่าโครงการวิจัยได้**

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
-		

3. **ท่านมีความเห็นต่อคุณภาพของร่างรายงานฉบับสมบูรณ์ในประเด็นต่าง ๆ ดังนี้**

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
1. **ความมีเหตุผล** มีในระดับปานกลาง พิจารณาจากการวิจารณ์ผลการทดลองมาสังเคราะห์ข้อมูลในบางประเด็นยังไม่ชัดเจน 2. **ความแม่นยำถูกต้องของข้อมูล** ในการทดลองไม่ได้ระบุว่ามีการทำซ้ำการทดลองหรือไม่ ทำให้ไม่มั่นใจในผลการทดลองว่าถูกต้องเพียงใดพอที่จะเป็นองค์ความรู้ที่จะนำไปใช้งานได้อย่างครบถ้วน	1 . เห็นชอบตามผู้ทรงคุณวุฒิ 2. ได้ระบุการทำซ้ำไว้แล้วใน วิธีการทดลอง ข้อ 3และ4 หน้า 36 และ 38 และผลการทดลอง ในคำบรรยายรูปที่ 10 และ 11 หน้า 44 และ45	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ

4. **ความสมบูรณ์ของรายงาน**

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
1. ในปัญหางานวิจัย ยาง RSS ใช้อุณหภูมิสูงกว่ายาง ADS ระยะเวลา3-4 วันเท่ากันไม่ได้แตกต่าง RSS รมนาน 5-7 วันไม่ได้จะทำให้ยางไหม้ได้และขณะเดียวกัน PNP ห้ามนำเข้าในประเทศไม่มียางจำหน่ายแล้ว ข้อมูลไม่ถูกต้องค่ะ แต่อาจรายงานว่าถึงแม้ว่า PNP ห้ามใช้ในการผลิตยางแผ่นเพื่อป้องกันเชื้อราแต่ใช้เพื่อเปรียบเทียบและเป็นการป้องกันอันตรายที่เกิดขึ้นได้	1. เห็นชอบตามผู้ทรงคุณวุฒิ และได้ระบุเรื่องการนำพาราไนโตรฟีนอลมาใช้เพื่อเปรียบเทียบในการทดลองเรียบร้อยแล้วใน วิธีการวิจัย ข้อ 4 หน้า 15	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ
2. ตรวจสอบในรายละเอียดของวิธีการทดลองให้ชัดเจนว่าทำอย่างไร มีการควบคุมอุณหภูมิ ความชื้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำซ้ำไม่ใช่ระบุว่าทำการทดลองซ้ำหรือไม่เพื่อยืนยันผล	2. ระบุเรื่องการควบคุมอุณหภูมิเพิ่มเติมในส่วนที่ยังไม่ได้ระบุ เรียบร้อยแล้วในวิธีการวิจัย ส่วนความชื้นไม่สามารถระบุได้ เพิ่มผลการทดลองในเรื่องประสิทธิภาพในการป้องกันการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่นโดยเพิ่มรูปภาพผลการทดลองที่ทำทั้งหมด 4 ซ้ำ	
3. ตรวจสอบรูปที่ 8 และ 9 รหัสของเชื้อไม่ถูกต้องตั้งแต่ RSF 10 ลงมาถึง	3. แก้ไขรหัสเชื้อในรูปที่ 8 และ 9 เรียบร้อยแล้ว	

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
RSF 14 4. หน้า 18 ของ 60 ข้อ 2 บรรทัดที่ 2 ควรเรียกชื่อเชื้อตามรหัสที่ได้กำหนดไว้ ไม่ควรใช้ไอโซเลท 2, 3, ...ซึ่งจะไม่ตรงกับในรูปที่ 9	4. หน้า 18 ข้อ 2 บรรทัดที่ 2 ได้แก้ไขชื่อเชื้อโดยใช้รหัสเชื้อที่กำหนดไว้เรียบร้อยแล้ว	

5. **ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม (เช่น ประเด็นที่ควรทำเพิ่ม, การขยายผลด้านผู้ใช้ ฯลฯ)**

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
1. การเตรียมเชื้อใน ethanol หากเป็นได้ขอให้สรุปว่าเชื้อใน ethanol กี่เปอร์เซ็นต์	1. งานวิจัยครั้งนี้ไม่ได้เตรียมเชื้อในเอทานอล แต่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายสารสกัดที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยสิท ซึ่งได้ระบุในรายงานแล้วว่าใช้สารสกัดความเข้มข้น 20 มก./มล. ปริมาณ 2 มล. ในน้ำยาง 20 กรัม เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารในเนื้อยางเท่ากับ 1 มก./มล. ซึ่งสูงกว่าค่า MIC 2 เท่า	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ
2. สรุปว่าถ้ายางแผ่น 1 กก. มีต้นทุนการใช้สารต้านเชื้อราอยู่ที่กี่บาท	2. ถ้าคิดตามผลการวิจัยข้อ 5.1 โดยทำการผสมสารสกัดลงไปในแผ่นยาง จะพบว่า ยาง 20 กรัม ใช้สารสกัดความเข้มข้น 20 มก/มล ปริมาณ 2 มล. ดังนั้นยาง 1 กก. จะใช้สารสกัด 100 มล. นั่นคือ ใช้ปริมาณสาร 2 กรัม ซึ่งคิดเป็นเงินเท่ากับ 386.608 บาท (2 x 193.304)	
3. ควรมีการนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดลองจริงในพื้นที่จริง ว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้หรือไม่ และทำในหลายพื้นที่ หลายฤดูกาล เนื่องจากอุณหภูมิ ความชื้น ฝุ่นละอองจะมีผลต่อชนิดและอัตราการเจริญของเชื้อรา	3. เห็นชอบตามผู้ทรงคุณวุฒิ แต่เนื่องจากระยะเวลาในการวิจัย และงบประมาณมีจำกัด จึงยังไม่สามารถดำเนินงานวิจัยได้	
4. ควรให้วิจัยต่อยอดเรื่องลดต้นทุนการผลิตสารสกัดโดยการให้ผลิตใน scale ที่ใหญ่ขึ้นเพื่อคำนวณต้นทุนให้ใกล้กับการใช้งานจริง และควรให้ศึกษา shelf life ของสารสกัดนี้ด้วย	4. เห็นชอบตามผู้ทรงคุณวุฒิ	

6. **การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์**

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน

1. ไม่สามารถนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้เนื่องจาก ต้นทุนการผลิตยังสูงมากแต่อาจได้ประโยชน์ในบางงานที่ต้องนำยางไปผลิตในเชิงทางการแพทย์ถึงแม้ว่าต้นทุนยังสูงอยู่ก็ตาม 2. ผลงานวิจัยมีแนวโน้มว่าจะนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยการถ่ายทอดสู่กลุ่มผู้ผลิตยาง ภาครัฐและภาคอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง	1. เห็นชอบตามผู้ทรงคุณวุฒิ 2. เห็นชอบตามผู้ทรงคุณวุฒิ	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้วซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ