ฟิล์มชีวภาพจากสารสกัดกระเทียมและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อต้านเชื้อรา บนผิวมะม่วงน้ำดอกไม้

Biofilm coating from garlic extracts plus biosurfactant against fungal pathogens on mangoes (Nam Dok Mai)

อุไรวรรณ คำเกลี้ยง อัมพา ขุนจัตุรัส หทัยรัตน์ บัณฑิตพิบูล และ จำรูญศรี พุ่มเทียน*

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ 10540

Uraiwan Khamklieng, Ampa Koonjaturut, Hatairat Bundidpiboon and Jamroonsri Poomtien*

Division of Biological Science, Faculty of Science and Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samutprakarn 10540

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำหมักชีวภาพของกระเทียม ข่า ตะไคร้ และสมุนไพรรวมทั้ง 3 ชนิด สารสกัดของกากสมุนไพร และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจากยีสต์ *Candida mucifera* NJP25 ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในมะม่วงน้ำดอกไม้ เพื่อคัดเลือกมาเป็นส่วนผสมในสารเคลือบผิวของผลมะม่วง ผลจากการแยกเชื้อราจากส่วนผลมะม่วง ใบ และลำต้น จำนวน 10 ไอโซเลต พบราก่อโรคที่เป็นปัญหาสำคัญ คือ *Colletotricum* sp. มากที่สุด การทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อรา พบว่าน้ำหมักชีวภาพของกระเทียมมีฤทธิ์ดีที่สุดในการทำลายเชื้อราทดสอบด้วยวิธี Poisoned food technique นอกจากนี้ น้ำหมักชีวภาพกระเทียมแสดงค่า MFC ต่อรา *Colletotricum* sp., *Aspergillus* sp. และ *Trichoderma* sp. เท่ากับ 25.00, 12.50 และ 25.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สารสกัดกระเทียมมีค่า MFC เท่ากับ 25,000, 3,125 และ 100,000 ppm ตามลำดับ สารเคลือบผิวผลไม้ที่มีส่วนผสมของสารชีวภาพต้านราที่คัดเลือก พบว่าผลมะม่วงที่เคลือบด้วยฟิล์มชีวภาพต้านราสามารถยืดอายุการเสื่อมสภาพได้นานถึง 8 วัน เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เคลือบสารและเคลือบสาร ซึ่งสังเกตเห็นใน 3 วัน และ 5 วัน ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารเคลือบผิวชีวภาพที่ผสมน้ำหมักกระเทียม สารสกัดกระเทียม และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์มีประสิทธิภาพที่ดีต่อการยับยั้งเชื้อราที่จะนำไปประยุกต์ใช้งานเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา พัฒนาคุณภาพของมะม่วงน้ำดอกไม้

คำสำคัญ: เชื้อรา น้ำหมักสมุนไพรชีวภาพ สารเคลือบผิว ค่า MFC

Corresponding author: jamroonsri@gmail.com

Abstract

This efficiency test in antifungal activity of the fermented herbal of garlic, galangal, lemon grass and mixed herbs, the ethanol crude extracts including biosurfactant derived from the yeast *Candida mucifera* NJP25 was studied to inhibit fungal isolates from mangoes (Nam Dok Mai). The agents showing the highest antifungal activity were chosen to formulate the mango wax to prolong the shelf life of mango. The results showed 10 isolates from the surface of the mangoes fruits, leaves and stem, *Colletotricum* sp. were the dominant isolates. The efficacy of anti-fungal. Microorganisms found that garlic is effective in destroying mold, three of the best. When tested with Poisoned food technique also fermented garlic show the MFC to mold *Colletotricum* sp. *Aspergillus* sp., and *Trichoderma* sp. was 25.00%, 12.50% and 25.00%, respectively, garlic extract valuable MFC of 25,000, 3,125 and 100,000 ppm, respectively, for testing a coating containing fermented garlic. Garlic extract and surfactant derived from yeast that fruit is coated with organic garlic in the anti-mold can extend the life of aging for up to 8 days after incubation at room temperature. When compared to a control without coating and coating. The visible rot and deterioration in 3 days and 5 days, respectively, showed that the coating mix bio-fermented garlic. Garlic extract and surfactant derived from yeast fungi have a good performance to be used when lodging the proxies used to extend shelf life. Improve the quality of mangoes (Nam Dok Mai).

Keywords: Fungi, fermented herbal plants, Fruit wax, Minimum fungicidal concentration (MFC)

บทนำ

มะม่วงน้ำดอกไม้จัดเป็นผลไม้ที่นิยมบริโภคกันอย่างมาก เนื่องจากมีรสชาติอร่อยและหอมหวาน นิยมปลูกเพื่อบริโภคสุก ทั้งนี้ผลผลิตของมะม่วงไทยพบว่า มีคุณภาพดี และได้การยอมรับจากตลาดภายในและภายนอกประเทศ โดยมีปริมาณการส่งออกมะม่วง ประมาณ 22,700 ตัน [1] อย่างไรก็ดีมะม่วงที่ส่งออกมักประสบปัญหาทางด้านผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว โดยผลมะม่วงจะเกิดความเสียหายได้ง่ายในระหว่างการส่งออก เนื่องจากมะม่วงมีเปลือกและผิวที่บางไม่ค่อยต้านทานต่อโรค ซึ่งสาเหตุที่ก่อให้เกิดความเสียหายหรือการเน่าเสียมักเกิดจากราก่อโรคในพืช [2] ทั้งนี้โรคแอนแทรคโนสในมะม่วงเป็นโรคที่มีความสำคัญอย่างมาก เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporiodies* Penz. โดยก่อให้เกิดอาการเป็นแผลดำบนใบ กิ่ง และผล หากมีการเข้าทำลายที่รุนแรงจะก่อให้เกิดใบแห้งและใบเบี้ยว [3]

พืชสมุนไพรหลายชนิดในประเทศไทยได้ถูกนำมาทำเป็นน้ำหมักชีวภาพ ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและโรคพืชที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ โดยพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ ได้แก่ กระเทียม ข่า และตะไคร้ การนำสมุนไพรมาใช้จึงนับเป็นอีกทางเลือกในการลดการใช้สารเคมี ทั้งนี้พืชสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งศัตรูพืช จึงเป็นที่น่าสนใจในการนำมาใช้ควบคุมโรคที่เกิดขึ้นภายหลังจากการเก็บเกี่ยวผลผลิตทางการเกษตร โดยการนำสมุนไพรมาใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างเหมาะสม ควรเลือกสมุนไพรที่มนุษย์สามารถบริโภคได้และไม่ก่ออันตราย รวมทั้งไม่ควรจะให้มีการตกค้างของสารต่าง ๆ [4] น้ำหมักชีวภาพคือสารละลายเข้มข้นที่ได้จากการหมักเศษพืชและซากสัตว์ที่เกิดจากการย่อยสลายจากจุลินทรีย์ พบการรายงานในการนำสมุนไพรมาสกัดเป็นน้ำหมักชีวภาพ เพื่อประยุกต์ใช้กับผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งสามารถต้านทานต่อโรคได้ดี

รวมทั้งมีผลผลิตที่ดี [5] สำหรับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรีย ราและยีสต์ ซึ่งมีการนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย จะย่อยสลายได้ง่าย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และยังมีความเป็นพิษต่ำ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถลดค่าแรงตึงผิวและเป็นสารที่ก่ออิมัลชันได้ดี จึงนิยมผสมในสารซักล้าง ผสมในอาหาร ยา และเครื่องสำอาง และมีรายงานในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทั้งกลุ่มแบคทีเรีย รา และไวรัส [6] งานวิจัยของ Poomtien และคณะ [7] ศึกษาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการผลิตของยีสต์ *Candida mucifera* NJP25 พบว่ายีสต์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณสมบัติต้านจุลชีพ ซึ่งมีผลต้านแบคทีเรียทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli, Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis*

ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงสนใจศึกษาการใช้สารชีวภาพยับยั้งเชื้อราก่อโรคที่แยกได้จากแผลเน่าบนมะม่วงน้ำดอกไม้ โดยทำการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำหมักชีวภาพที่ทำการสกัดจากสมุนไพร ได้แก่ กระเทียม ข่า และตะไคร้ และสารสกัดของน้ำหมักชีวภาพแต่ละชนิดในตัวทำละลายเอทานอล ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในมะม่วงน้ำดอกไม้ นอกจากนี้ยังนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ *C. mucifera* NJP25 และสารชีวภาพจากสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพดีที่คัดเลือกมาผสมกันในผลิตภัณฑ์ที่ใช้เป็นสารต้านเชื้อรากับผลมะม่วง และทำการทดสอบฤทธิ์การใช้งานผลิตภัณฑ์ต้านเชื้อรา โดยเล็งเห็นประโยชน์ที่นำสารชีวภาพมาใช้ทดแทนการใช้สารเคมี และเป็นการนำสมุนไพรพื้นบ้านมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำหมักชีวภาพแต่ละชนิดของกระเทียม ข่า และตะไคร้ สารสกัดของน้ำหมักชีวภาพแต่ละชนิดในตัวทำละลายเอทานอล ศึกษาประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ *C. mucifera* NJP25 ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในมะม่วงน้ำดอกไม้ และศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารชีวภาพที่คัดเลือกในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในมะม่วงน้ำดอกไม้ และฤทธิ์การใช้งานที่เป็นผลิตภัณฑ์ต้านเชื้อรา

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อราก่อโรคจากผิวของผลมะม่วงน้ำดอกไม้

ทำการแยกเชื้อราก่อโรคโดยวิธี tissue transplanting บนอาหารเพาะเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) โดยนำผิวของผลมะม่วงน้ำดอกไม้ที่เป็นแผลรอยโรคมีจุดดำมาตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร แช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำชิ้นตัวอย่างมาวางบนจานอาหารเพาะเชื้อ PDA ที่ผสมยาปฏิชีวนะ chloramphenicol ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญเติบโตของเส้นใยทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเชื้อราที่แยกได้มาศึกษาลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราโดยการทำ slide culture และจัดจำแนกเชื้อราในระดับสกุลโดยใช้การจัดจำแนกลักษณะเชื้อราจากหนังสือ introduction to food and airborne fungi

2. การเตรียมสารชีวภาพในการทดสอบ

2.1 น้ำหมักชีวภาพ นำสมุนไพรมาหั่นให้มีขนาด 3 เซนติเมตร ทำการหมักสมุนไพรในปริมาตร 3 ลิตร โดยใช้อัตราส่วนของสมุนไพรต่อกากน้ำตาลในอัตราส่วน 3:1 หมักลงในขวดโหล จากนั้นเติมน้ำให้ครบตามปริมาตรที่กำหนด แล้วปิดฝา ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลานาน 3 วัน

2.2 สารสกัดสมุนไพร นำสมุนไพรหนัก 30 กรัม ผสมกับแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักลงในขวดโหลที่ปิดฝา เป็นเวลา 7 วัน นำมากรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 สารสกัดที่ได้จะนำไปประเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดสีน้ำตาลที่เหนียวข้น

2.3 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ ทำการเพาะเชื้อยีสต์ *C. mucifera* NJP25 อายุ 18 ชั่วโมง เป็นต้นเชื้อในปริมาณร้อยละ 10 ลงในอาหารเพาะเชื้อเหลวที่มีการปรับปรุงสูตรโดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าพีเอช เริ่มต้นที่ 5.5 ในอาหารเพาะเชื้อเหลว ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาวะการเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่า (shaker) ที่อุณหภูมิ 30 องศา

เซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 7 วัน [8] นำน้ำเลี้ยงเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง มาสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเอทิลอะซิเตทในอัตราส่วน 1:1 ระเหยออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ จะได้ crude extracts เป็นสีน้ำตาล

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในมะม่วงน้ำดอกไม้

3.1 วิธี Agar disc diffusion เตรียม spore suspension ของเชื้อราที่เลือกมาทดสอบ ได้แก่ *Colletotricum* sp., *Aspergillus* sp. และ *Trichoderma* sp. จากนั้นนำไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มใน spore suspension แล้วนำมา swab ให้ทั่วผิวหน้าอาหารเพาะเชื้อ PDA เตรียมสารทดสอบที่ใช้ได้แก่ น้ำหมักชีวภาพที่ไม่เจือจาง สารสกัดกากสมุนไพรที่ความเข้มข้น 5,000, 10,000, 50,000 และ 100,000 ppm และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ความเข้มข้น 5,000, 10,000 และ 50,000 ppm นำแผ่น disc ที่มีสารทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาวางบนจานอาหารที่ป้ายเชื้อแล้ว ในการทดสอบใช้สาร DMSO ปลอดเชื้อ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงลบและใช้สารต้านเชื้อรา ketoconazole ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก ทำการบ่มจานอาหารเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสรอบ ๆ แผ่น disc ที่มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

3.2 วิธี Microbroth dilution method เป็นการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (Minimal inhibitory concentration: MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimal fungicidal concentration: MFC) ต่อเชื้อรา (ดัดแปลงจาก [9]) ทำการทดสอบโดยปิเปตต์อาหารเพาะเชื้อเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) ใส่ลงในหลุมของจาน microtiter plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ใส่สารชีวภาพทดสอบ หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วเจือจางต่อเนื่องไป จนถึงหลุมที่ 10 สำหรับหลุมที่ 11 เป็นยา ketoconazole ที่เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และหลุมที่ 12 เป็นน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ที่เป็นตัวควบคุมเชิงลบ และเติม spore suspension ของเชื้อราทดสอบที่มีความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลุมละ 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พอครบเวลา 24 ชั่วโมง ให้หยดสาร rezasurin ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ในทุกหลุม ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สังเกตสีของ rezasurin ที่เปลี่ยนแปลงในหลุมทดสอบ โดยสังเกตหลุมที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดที่เห็นสีฟ้า ซึ่งจะแสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่ยับยั้งเชื้อราได้ เรียกค่า MIC

จากนั้นปลูกเชื้อจากหลุมที่อ่านค่า MIC และหลุมที่มีความเข้มข้นสูงกว่าและต่ำกว่าหลุมที่มีค่า MIC ไปอย่างละ 2 หลุม ลงบนอาหารเพาะเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อรา โดยค่า MFC จะเป็นปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ทำลายการเจริญของเชื้อราได้

3.3 วิธี Poisoned food technique นำน้ำหมักชีวภาพเติมลงในวุ้นหลอม ที่อัตราส่วน 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปิเปตต์ 10 มิลลิลิตร มาเคลือบทั่วบนผิวหน้าจานอาหารเพาะเชื้อเพื่อเป็นจานทดสอบ เตรียม spore suspension ที่มีความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มาใส่ลงในแผ่น disc ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำแผ่น disc ที่มีเชื้อราวางลงบนจานทดสอบ ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน สังเกตผลการเจริญของเชื้อรา วัดขนาดการเจริญของโคโลนีเชื้อราเปรียบเทียบกับจานควบคุม และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารชีวภาพ

4. การผลิตสารเคลือบผิวที่ผสมสารชีวภาพและการทดสอบฤทธิ์ของสารในการต้านเชื้อราก่อโรคบนผิวของมะม่วงน้ำดอกไม้

การผลิตสารเคลือบผิวที่ผสมสารชีวภาพ ดัดแปลงจาก ปรมาภรณ์ และ พิสุทธ [10] โดยนำตัวอย่างสารชีวภาพที่เลือกได้จากการทดลอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อราก่อโรคซึ่งให้ผลได้ดีที่สุด (สารทดสอบที่เลือกประกอบด้วยน้ำหมักจากกระเทียม สารสกัดจากกระเทียม และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร มาผสมกับไคโตซานความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และกรดอะซิติก ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ผสมให้สารทดสอบและไคโตซานละลายเข้ากัน หลังจากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ของฟิล์มสารชีวภาพเคลือบผิวผลไม้

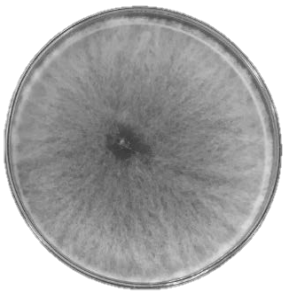
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดชีวภาพในการต้านเชื้อราบนผิวมะม่วงน้ำดอกไม้ นำผลมะม่วงน้ำดอกไม้ที่ผิวสมบูรณ์แช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที และแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 2 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 3 นาที แล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูปลอดเชื้อ นำผลมะม่วงจุ่มสารเคลือบผิวที่ผสมสารชีวภาพ เป็นเวลา 3 นาที แล้วผึ่งแห้ง จากนั้นใช้ลูปเขี่ยเชื้อจุ่ม spore suspension มาแตะลงบนผิวของมะม่วงน้ำดอกไม้ ทั้งหมด 3 จุด บริเวณขั้วผล กลางผล และก้นผลมะม่วงน้ำดอกไม้ บ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคบนผิวของมะม่วงน้ำดอกไม้ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน สำหรับชุดควบคุมเชิงลบจะใช้มะม่วงจุ่มสารเคลือบผิวที่ไม่ผสมสารชีวภาพและไม่มีการปลูกเชื้อ

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การคัดแยกเชื้อราก่อโรคจากผิวของผลมะม่วงน้ำดอกไม้ กิ่ง ลำต้น และใบ

การแยกเชื้อราก่อโรคจากผิวของผลมะม่วงน้ำดอกไม้ กิ่ง ลำต้น และใบของต้นมะม่วงน้ำดอกไม้ จำนวน 12 ตัวอย่าง โดยวิธี tissue transplanting บนอาหารเพาะเชื้อ PDA พบราทั้งหมด 10 ไอโซเลต เป็นเชื้อราในสกุล *Colletotricum* sp. จำนวน 5 ไอโซเลต แยกได้จากตัวอย่างผลมะม่วงน้ำดอกไม้จากตลาดกิ่งแก้ว ตลาดบางโฉลง ตลาดสำโรง ตัวอย่างลำต้นและใบ *Aspergillus* sp. จำนวน 3 ไอโซเลต จากส่วนของลำต้น และ *Trichoderma* sp. จำนวน 2 ไอโซเลต จากตัวอย่างลำต้น และกิ่ง ในรายงานวิจัยที่ผ่านมาให้ข้อมูลว่าเชื้อราที่พบมากสุดในมะม่วงน้ำดอกไม้ คือเชื้อรา *Colletotricum* sp. เป็นสาเหตุของการเกิดโรคแอนแทรคโนสจัดเป็นปัญหาที่สำคัญที่สุดในพืชรวมถึงมะม่วงซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายและการเน่าเสียของมะม่วงน้ำดอกไม้ได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของมะม่วงน้ำดอกไม้ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว [11]

Colletotricum sp. แยกได้จากมะม่วงน้ำดอกไม้โดยวิธี tissue transplanting เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 27-30 องศาเซลเซียส) บนอาหารเพาะเชื้อ PDA เป็นเวลา 2 วัน โคโลนีจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 9.02 เซนติเมตร โคโลนีมีการเจริญเป็นลักษณะวงแหวนหลายชั้น มีสีเทาอมน้ำตาล โคนิเดียมีรูปร่างเป็นทรงกระบอกหัวท้ายมนเกิดบนก้านชูสปอร์ (ภาพที่ 1)



ลักษณะไมซีเลียม

ลักษณะสปอร์ (400 เท่า)

ภาพที่ 1 เชื้อราก่อโรค *Colletotricum* sp.

2. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในมะม่วงน้ำดอกไม้

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้วิธี Agar disc diffusion

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของน้ำหมักสมุนไพร ข่า ตะไคร้ กระเทียม และสมุนไพรรวมของทั้ง 3 ชนิด ต่อเชื้อรา *Colletotricum* sp. HCUM1, *Aspergillus* sp. HCUM6 และ *Trichoderma* sp. HCUM9 โดยใช้วิธี Agar disc diffusion พบว่าน้ำหมักกระเทียมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. ซึ่งมีขนาดโซนใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อรากว้างที่สุด คือ 11.8±0.1 มิลลิเมตร ส่วน *Colletotricum* sp. และเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไม่มีสารทดสอบชนิดใดที่สามารถยับยั้งได้ อาจเนื่องมาจากปริมาณสารชีวภาพที่ทดสอบบนแผ่น disc มีน้อย

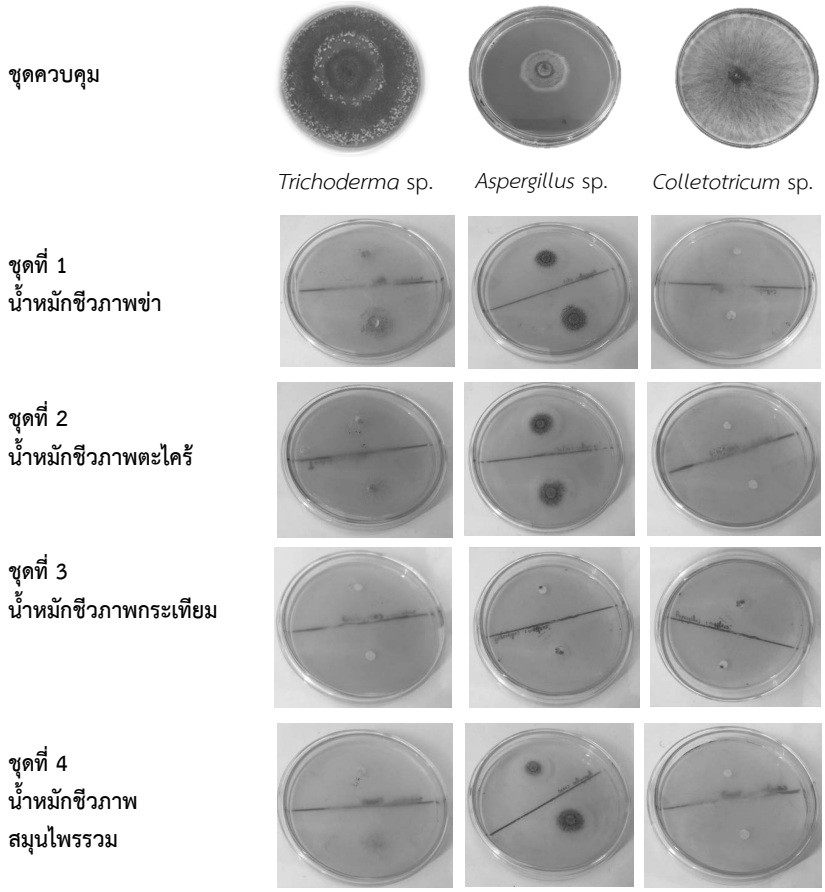
2.2 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้วิธี Poisoned food technique

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้น้ำหมักสมุนไพร ได้แก่ ข่า ตะไคร้ กระเทียม และสมุนไพรรวมทั้ง 3 ชนิด โดยวิธี Poisoned food technique ความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักสมุนไพรข่า กระเทียม ตะไคร้ และสมุนไพรผสมมีค่า 4.37, 5.19, 3.84 และ 4.84 ตามลำดับ โดยทั้งหมดมีความเป็นกรด พบว่าการใช้น้ำหมักกระเทียมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotricum* sp., *Aspergillus* sp. และ *Trichoderma* sp. โดยไม่มีการเจริญของเชื้อราแผ่ออกเป็นวงกว้างเช่นเดียวกับสารต้านเชื้อรา ketoconazole ที่เป็นตัวควบคุมเชิงบวก ดังตารางที่ 1 และภาพที่ 2 การศึกษารายงานวิจัยของ Martins และคณะ [12] รายงานว่ากระเทียมมีสารอัลลิซินเป็นสารทางชีวภาพของกระเทียม มีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของจุลชีพรวมถึงการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและการฆ่าเชื้อรา

ตารางที่ 1 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราจากน้ำหมักชีวภาพของน้ำหมักสมุนไพรวิธี Poisoned food technique

เชื้อราทดสอบ	**ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา (เซนติเมตร) ที่อายุ 48 ชั่วโมง (% การยับยั้งการเจริญของรา)**					
	ข่า	**ตะไคร้**	**กระเทียม**	**สมุนไพรรวม**	**0.3% ketoconazole**	**ชุดควบคุม**
Colletotricum sp. HCUM1	6.48±0.1 (28.00%)	6.47±0.1 (28.11%)	**0* (100.00%)**	6.67±0.1 (25.89%)	0* (100.00%)	9.00±0.1
Aspergillus sp. HCUM6	2.52±0.1 (44.00%)	2.68±0.1 (40.44%)	**0* (100.00%)**	2.63±0.1 (41.56%)	0* (100.00%)	4.50±0.1
Trichoderma sp. HCUM9	7.00±0.1 (22.22%)	6.38±0.1 (29.11%)	**0* (100.00%)**	6.76±0.1 (24.89%)	0* (100.00%)	9.00±0.1

หมายเหตุ 0 คือ ไม่พบการเจริญของเชื้อราแผ่ออกมานอกแผ่น disc ของเชื้อรา



ภาพที่ 2 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราจากน้ำหมักชีวภาพของสมุนไพร โดยวิธี Poisoned food technique

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพสารที่ยับยั้งการเจริญและสารฆ่าเชื้อราโดยใช้วิธี Microdilution

ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและฆ่าเชื้อราของน้ำหมักสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ข่า ตะไคร้ กระเทียม และสมุนไพรรวม ต่อเชื้อราทดสอบ 3 ไอโซเลต เมื่อเทียบกับชุดควบคุมเชิงลบ ดังตารางที่ 2 พบว่าค่า MIC ของน้ำหมักข่าที่ความเข้มข้น 12.5-50.0 เปอร์เซ็นต์ ค่า MFC มีความเข้มข้น 25.0-100.0 เปอร์เซ็นต์ น้ำหมักตะไคร้ มีค่า MIC ในช่วงความเข้มข้น 6.25-12.5 เปอร์เซ็นต์ ค่า MFC มีความเข้มข้น 25.0-100.0 เปอร์เซ็นต์ สำหรับน้ำหมักกระเทียม มีค่า MIC ในช่วงความเข้มข้น 12.5-50.0 เปอร์เซ็นต์ ค่า MFC มีความเข้มข้น 12.5-25.0 เปอร์เซ็นต์ สมุนไพรรวม มีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 12.5เปอร์เซ็นต์ ค่า MFC มีความเข้มข้น 12.5-100.0 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า น้ำหมักสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราทดสอบทั้ง 3 ไอโซเลต ความเข้มข้นของน้ำหมักชีวภาพแต่ละชนิดมีผลต่อการยับยั้งเชื้อและฆ่าเชื้อราที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 2 ค่า MIC และ MFC ของน้ำหมักสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ข่า ตะไคร้ กระเทียม และสมุนไพรรวมต่อเชื้อรา

เชื้อราทดสอบ	**น้ำหมักสมุนไพรที่เจือจาง (เปอร์เซ็นต์)**							
	ข่า		**ตะไคร้**		**กระเทียม**		**สมุนไพรรวม**	
	MIC	**MFC**	**MIC**	**MFC**	**MIC**	**MFC**	**MIC**	**MFC**
Colletotricum sp. HCUM1	12.5	25.0	12.5	25.0	25.0	25.0	12.5	50.0
Aspergillus sp. HCUM6	50.0	100.0	6.25	100.0	50.0	12.5	12.5	100.0
Trichoderma sp. HCUM9	12.5	50.0	12.5	50.0	12.5	25.0	12.5	12.5

ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและฆ่าเชื้อราของสารสกัดกากสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ข่า ตะไคร้ กระเทียม และสมุนไพรรวม ต่อเชื้อราทดสอบ 3 ไอโซเลต เมื่อเทียบกับชุดควบคุมเชิงลบ ดังตารางที่ 3 พบว่าค่า MIC ของสารสกัดข่าที่ความเข้มข้นในช่วง 12,500-50,000 ppm ค่า MFC มีความเข้มข้น 50,000-100,000 ppm สารสกัดตะไคร้ มีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 12,500 ppm ค่า MFC มีความเข้มข้น 6,250-100,000 ppm สารสกัดกระเทียม มีค่า MIC ในช่วงความเข้มข้น 12,500-100,000 ppm ค่า MFC มีความเข้มข้น 3,125-100,000 ppm และสารสกัดสมุนไพรรวมค่า MIC ในช่วงความเข้มข้น 50,000 ppm ค่า MFC มีความเข้มข้น 12,500-50,000 ppm มีผลในการฆ่าเชื้อราทดสอบทั้ง 3 ไอโซเลต ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดมีผลต่อการยับยั้งเชื้อและฆ่าเชื้อราที่แตกต่างกัน

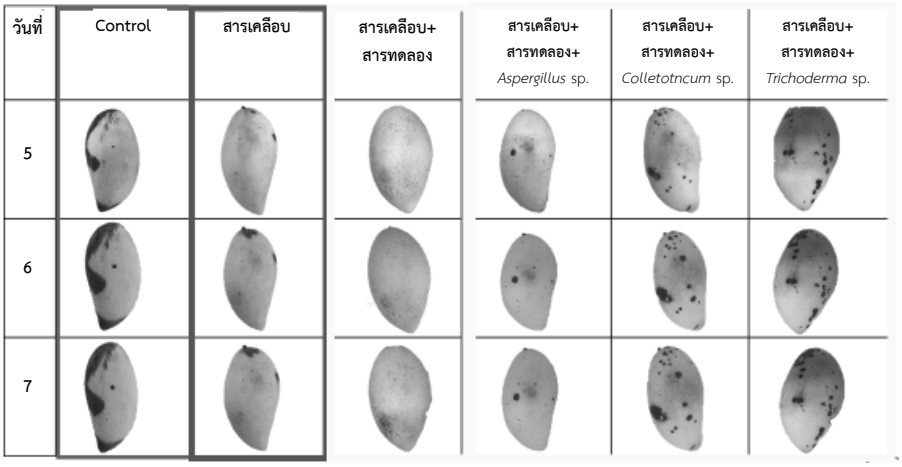
ตารางที่ 3 ค่า MIC และ MFC ของสารสกัดกากสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ข่า ตะไคร้ กระเทียม และสมุนไพรรวมต่อเชื้อรา

เชื้อราทดสอบ	**สารสกัดกากสมุนไพร (ppm)**							
	ข่า		**ตะไคร้**		**กระเทียม**		**สมุนไพรรวม**	
	MIC	**MFC**	**MIC**	**MFC**	**MIC**	**MFC**	**MIC**	**MFC**
Colletotricum sp. HCUM1	12,500	100,000	12,500	100,000	100,000	25,000	50,000	50,000
Aspergillus sp. HCUM6	25,000	50,000	12,500	6,250	12,500	3,125	50,000	12,500
Trichoderma sp. HCUM9	50,000	100,000	12,500	100,000	100,000	100,000	50,000	50,000

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ค่า MIC ที่ 50,000 ppm ค่า MFC มีความเข้มข้น 50,000 ppm มีผลในการฆ่าเชื้อราทดสอบทั้ง 3 ไอโซเลต

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพสารยับยั้งการเจริญเชื้อราโดยใช้สารเคลือบผิวชีวภาพ

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อรา *Colletotricum* sp., *Aspergillus* sp. และ *Trichoderma* sp. ของตัวอย่างสารชีวภาพทั้งหมดในการทดลอง พบว่าสารชีวภาพจากกระเทียมมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราได้ดีที่สุด โดยน้ำหมักชีวภาพกระเทียมมีค่า MFC ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 12.5 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดสมุนไพรกระเทียมมีค่า MFC ที่ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 3,125 ppm จึงเลือกไปใช้เป็นส่วนผสมเพื่อใช้ในการผลิตสารเคลือบต้านเชื้อราบนผิวมะม่วง และศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เทียบกับชุดควบคุม ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 14 วัน ดังภาพที่ 3 พบว่า มะม่วงในชุดควบคุม มีลักษณะการเกิดโรคปรากฏจุดดำในอายุการบ่มที่ 3 วัน ที่ขั้วมะม่วงและแผ่ขยายรอยดำมากขึ้นตั้งแต่อายุการบ่มวันที่ 5 และเน่าเสียทั่วทั้งผลในวันที่ 8 ชุดของสารเคลือบผิวเริ่มมีลักษณะการเกิดโรคโดยการปรากฏจุดดำในอายุการบ่มที่ 5 วัน และแผ่ขยายรอยดำมากขึ้นตั้งแต่อายุการบ่มวันที่ 8 วัน และเน่าเสียทั่วทั้งวันในวันที่ 10 และชุดของสารเคลือบผิวที่ผสมกับสารชีวภาพ พบว่า มีลักษณะการเกิดโรคปรากฏจุดดำในอายุการบ่มที่ 7 วัน ที่ก้นของมะม่วง และแผ่ขยายรอยดำมากขึ้นตั้งแต่อายุการบ่มวันที่ 11 และเน่าเสียทั่วทั้งผลในวันที่ 13 เมื่อชุดที่มีการปลูกเชื้อลงไปในผลมะม่วงพบว่าเริ่มมีรอยโรคปรากฏจุดดำอย่างเห็นได้ชัดในวันที่ 5 และแผ่ขยายรอยดำมากขึ้นตั้งแต่อายุการบ่ม 6 วัน และเน่าเสียทั่วทั้งผลในวันที่ 8 จากการศึกษารายงานวิจัยของ ศิรกานต์ และคณะ [13] ที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพการทดสอบสารเคลือบผิวบางชนิดต่อคุณภาพของมะม่วงน้ำดอกไม้เบอร์ 4 พบว่าได้ทำการเคลือบผิวด้วยสารเคลือบผิวคาร์นูบา พบว่ามีประสิทธิภาพที่ดีในการชะลอการสุกของมะม่วง ชะลอการสูญเสียน้ำรวมถึงการเปลี่ยนแปลงของสีผิวมะม่วงน้ำดอกไม้ และงานวิจัยของ นันทา และคณะ [14] ศึกษาผลของสารเคลือบผิวกัมอะราบิกต่อคุณภาพและความปลอดภัยของมะม่วงน้ำดอกไม้เบอร์ 4 พบว่ามีประสิทธิภาพในการลดการสูญเสียน้ำหนักได้และสามารถชะลอการเสียสภาพของมะม่วงน้ำดอกไม้



ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพสารยับยั้งการเจริญเชื้อราโดยใช้สารเคลือบผิวชีวภาพ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาเชื้อราก่อโรคในมะม่วงน้ำดอกไม้พบว่ามีการพบเชื้อรา *Colletotrichum* sp. มากที่สุด เนื่องจากเป็นปัญหาสำคัญของการเกิดโรคในมะม่วง การทดสอบสารประสิทธิภาพของน้ำหมักชีวภาพจากสมุนไพรพบว่า น้ำหมักชีวภาพจากสมุนไพรกระเทียมและสารสกัดกระเทียมมีประสิทธิภาพในยับยั้งที่ดีที่สุด และสารเคลือบผิวชีวภาพผสมน้ำหมักชีวภาพจากสมุนไพรกระเทียม สารสกัดกระเทียมและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์มีประสิทธิภาพที่ดีต่อการต้านเชื้อราในการยืดอายุการเก็บรักษาคุณภาพของมะม่วงน้ำดอกไม้

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. สถิติการส่งออก (export) มะม่วงสด ปริมาณ และมูลค่าการส่งออกรายเดือน. [อินเทอร์เน็ต]. 2554 [เข้าถึงเมื่อ 3 ก.ค. 54]. เข้าถึงได้จาก: http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php
2. อุราภรณ์ สะอาดสุด, วิชชา สะอาดสุด, โสภณ สิงห์แก้ว. การประเมินความเสียหายในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้หลังการเก็บเกี่ยว. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 2546;34(4-6):37-40.
3. วราภรณ์ สุทธิสา, ภานุวัฒน์ เทพคำราม, วัชรา กาญจนรัช, พนิดา อริมัตสึ. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง. วารสารแก่นเกษตร 2557; 42(1):665-70.
4. รังสิมา เก่งการพานิช. การลดการใช้สารเคมีเพื่อป้องกันการกำจัดศัตรูพืชหลังการเก็บเกี่ยว. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร; 2558.
5. เตือนใจ บุญหลง. น้ำหมักชีวภาพ bacterio mineral water ในการผลิตถั่ว. [อินเทอร์เน็ต]. 2545 [เข้าถึงเมื่อ 25 มิ.ย. 2560]. เข้าถึงได้จาก: http://www.doa.go.th
6. Muthusamy K, Gopalakrishnan S, Ravi TK, Swachidambaram P. Biosurfactants properties, commercial production and application. Current Science 2008;94(6):736-47.
7. Poomtien J, Thanasukhonphat T, Songmark P, Jindamorakot S, Thaniyavarn J. Biosurfactant act as antimicrobial properties produced by *Candida mucifera* NJP25. In: proceedings of the Burapha University International

Conference, July 12, 2015; Chonburi, Thailand; 2015. p. 839-47.

8. ธิดารัตน์ สมเรือง. การหาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Candida mucifera* NJP25 วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์, บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ; 2559.
9. Andrews, JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemother 2002;49(6):1049.
10. ปรมาภรณ์ เกิดทรัพย์, พิสุทธิ หนักแน่น. การพัฒนาสารเคลือบผิวต้านจุลินทรีย์ที่เติมสารสกัดใบหม่อนและการประยุกต์ใช้เป็นสารเคลือบผิวเพื่อยืดอายุการเก็บรักษามะม่วงสำหรับการส่งออก. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ; 2556.
11. สุชาติ วิจิตรานนท์, ขจรศักดิ์ ภวกุล, ดารา ทางสุวรรณ. โรคของมะม่วง. ชาวเกษตร 2531;11(126):65-8.
12. Martins N, Petropoulos S, Ferreira IC. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: a review. Food Chem 2016;211:41-50.
13. ศิรกานต์ ศรีธัญรัตน์, เบญจมาส รัตนชินกร, คมจันทร์ สรงจันทร์. ผลของสารเคลือบผิวบางชนิดต่อคุณภาพของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ เบอร์ 4 ระหว่างเก็บรักษา. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 2555;43(2):101-4.
14. นันทา เป็งเนตร์, บุญส่ง แสงอ่อน, พีระศักดิ์ ฉายประสาท. ผลของสารเคลือบผิวกัมอะราบิกต่อคุณภาพและความปลอดภัยของมะม่วงน้ำดอกไม้เบอร์ 4 ตัดแต่งพร้อมบริโภคในสภาพการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ. แก่นเกษตร 2557;42(3):81-7.