รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ *Issatchenkia orientalis* VCU24 รูปแบบสูตรน้ำสำหรับการควบคุมทางชีวภาพโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว

Development of microbial products of antagonistic yeast *Issatchenkia orientalis* VCU24 in liquid formulation for controlling anthracnose disease in postharvest mango

นายอนุเทพ ภาสุระ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐ มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802054
สัญญาเลขที่ ๘๖/๒๕๖๐

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ *Issatchenkia orientalis* VCU24 รูปแบบสูตรน้ำสำหรับการควบคุมทางชีวภาพโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว

Development of microbial products of antagonistic yeast *Issatchenkia orientalis* VCU24 in liquid formulation for controlling anthracnose disease in postharvest mango

นายอนุเทพ ภาสุระ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน ๒๕๖๐

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา ๘๖/๒๕๕๙ ผู้วิจัยได้รับความร่วมมือจากบุคคลที่เกี่ยวข้องหลายฝ่ายทั้งจากภายในมหาวิทยาลัยบูรพาและหน่วยงานภายนอก จึงทำให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัย คณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณทุก ๆ ฝ่ายที่มีส่วนร่วมในการดำเนินการวิจัยนี้ทั้งโดยตรงและโดยอ้อม อันได้แก่ ผู้บริหาร เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และเกษตรกรที่ได้ให้คณะผู้วิจัยเข้าไปเก็บตัวอย่างและสอบถามรายละเอียดหลายประการ งานวิจัยนี้จะสำเร็จไม่ได้เลยหากไม่ได้นิสิตผู้ช่วยวิจัย คือ นางสาวพรสุพพัตถ์ บุตรน้ำเพ็ชร ที่ได้ช่วยงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณทุกท่านมา ณ ที่นี้ และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลการวิจัยนี้อาจจะมีประโยชน์ต่อการพัฒนาประเทศไทยในโอกาสต่อไป

ผู้วิจัย

บทนำ

มะม่วง (*Mangifera indica* L.) เป็นผลไม้เศรษฐกิจที่เป็นนิยมบริโภคทั้งในประเทศและส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ เนื่องจากมีรสชาติหวาน หอม และมีสีผิวสวยเป็นที่ต้องการของตลาด ซึ่งตลาดที่สำคัญในการส่งออกมะม่วงได้แก่ ประเทศเวียดนาม ญี่ปุ่น และเกาหลีใต้ เป็นต้น (สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์, 2555) โดยในปี 2556 ช่วงเดือนมกราคมถึงกันยายน มีการส่งออกมะม่วงสด 31,255 ตันคิดเป็นมูลค่ารวมทั้งสิ้น 740 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) มะม่วงเป็นไม้ผลที่ปลูกและเจริญได้ดีทุกภูมิภาคของประเทศไทย ด้วยสภาพภูมิอากาศร้อนชื้นตลอดปี จึงเหมาะต่อการเจริญเติบโตของราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชหลายชนิด รวมทั้ง *Collectotrichum gloeosporioides* (อภิตา บุญศิริ และจริงแท้ ศิริพานิช, 2550) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส ราชนิดนี้จะเข้าทำลายผลมะม่วงตั้งแต่ระยะผลดิบและจะปรากฏลักษณะอาการเมื่อผลเริ่มสุก ทั้งนี้เนื่องจากผลที่ดิบจะมีสารประกอบที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราอยู่สูงโดยเฉพาะที่เปลือกของผลมะม่วง และเมื่อผลมะม่วงเริ่มสุก ปริมาณสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราจะค่อยๆลดลงทำให้เชื้อราสามารถเข้าทำลายและเจริญจนกระทั่งแสดงอาการออกมาให้เห็น (Kamle, et al., 2013) มะม่วงแต่ละสายพันธุ์มีระดับความต้านทานต่อโรคที่แตกต่างกัน และมะม่วงพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคแอนแทรคโนสที่สุด คือ พันธุ์น้ำดอกไม้ โรคแอนแทรคโนสจึงเป็นปัญหาอย่างยิ่งต่อการเก็บรักษาและการส่งออกของมะม่วง (พิสุทธิ์ เอกอำนวย, 2553)

การควบคุมโรคพืชโดยใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรามีข้อจำกัดหลายประการ เช่น การทำลายระบบนิเวศน์และสภาพแวดล้อม ความเป็นพิษของสารเคมีที่ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคที่มีผลต่อผู้บริโภค และการชักนำให้เกิดศัตรูพืชชนิดใหม่ รวมถึงการเกิดเชื้อดื้อยาเพิ่มมากยิ่งขึ้นหากใช้สารเคมีเป็นระยะเวลานาน เช่น กลุ่ม Benzimidazole เป็นต้น (Chung, et al., 2010) อีกทั้งการใช้ยังทำให้เกิดสารตกค้าง ซึ่งไม่เป็นที่ยอมรับในตลาดต่างประเทศ ดังนั้นจึงได้มีการพยายามหาแนวทางในการลดปริมาณการใช้สารเคมีให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัย ตลอดจนหาวิธีการที่เป็นทางเลือกอื่นแทนการใช้สารเคมี (ปริญญา จันทรศรี, 2553) จากข้อจำกัดดังกล่าว ทำให้มีการพยายามค้นคว้าหาวิธีการใหม่ๆมาใช้ควบคุมโรคพืชแทนการใช้สารเคมี ซึ่งการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จัดเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้แทนสารเคมีในการกำจัดเชื้อราได้และมีการศึกษาอย่างแพร่หลาย จินันทนา จอมดวง และวิชชา สอาดสุด (2555) ได้ทำการศึกษาโดยนำยีสต์ *Issatchenkia orientalis* มาควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว พบว่าสามารถลดอาการของโรคบนผลมะม่วงหลังบ่มสุกได้ดี มีการทดสอบเชื้อรา *Trichoderma* sp. กับเชื้อรา *Collectotrichum* spp. พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. สามารถยับยั้งเชื้อรา *Collectotrichum* spp. ได้ดี

(มโนรัตน์ สุดสงวน, ทิพา อัศวรักษ์, วัชระ จินตโกวิท และจิรวรรณ กมลศิลป์, 2550) นอกจากนี้พบว่า สารสกัดหยาบจากผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุของโรคพืช *Alternaria* sp. (สุกัญญา แซ่โจว, 2555)

อย่างไรก็ตามการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืชให้มีประสิทธิภาพสูงนั้น รูปแบบและวิธีการใช้นับว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญที่จะกำหนดความสำเร็จของการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ซึ่งรูปแบบผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ดีควรมีความคงตัว สามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานาน ราคาไม่แพง สะดวกต่อการนำไปใช้และปลอดภัยต่อผู้ผลิตผู้บริโภค (Liu, Sui, Wisniewski, Droby & Liu, 2013) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาชีวภัณฑ์ยีสต์ *Issatchenkia orientalis* ในรูปแบบชนิดเหลวที่เตรียมจากเซลล์ปกติ และทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ดังกล่าวในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ *Issatchenkia orientalis* VCU24 ในรูปแบบชนิดเหลวที่เตรียมจากเซลล์ปกติ
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ *I. orientalis* VCU24 ในรูปแบบชนิดเหลวที่เตรียมจากเซลล์ปกติในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นแนวทางในการศึกษาสำหรับการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในผลมะม่วงให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นโดยใช้สายพันธุ์ยีสต์ปฏิปักษ์ *I. orientalis* VCU24 ในรูปแบบชีวภัณฑ์ชนิดเหลวที่เตรียมจากเซลล์ปกติ และการเติมน้ำตาลมอลโตสซึ่งใช้เป็นสาร Protectant ในการพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ชนิดเหลวในการควบคุมเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพื่อเป็นแนวทางในการลดการใช้สารเคมีกำจัดโรคพืช

สมมติฐานของการศึกษา

1. ชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ยีสต์ปฏิปักษ์รูปแบบชนิดเหลวมีอายุการเก็บรักษาได้นานกว่า 30วัน
2. ชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ยีสต์ปฏิปักษ์รูปแบบชนิดเหลวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรค *C. gloeosporioides* บนผลมะม่วงได้

ขอบเขตของการศึกษา

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาอายุการเก็บรักษาและประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ *I. orientalis* VCU24 ในรูปแบบชนิดเหลวสำหรับการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประกอบด้วย 5 หัวข้อ ดังนี้

1. โรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวและการควบคุมโรคพืช
2. โรคแอนแทรคโนสในมะม่วง
3. ยีสต์ปฏิปักษ์
4. การเสริมประสิทธิภาพชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช
5. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. โรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวและการควบคุมโรคพืช

1.1 โรคพืชและปัจจัยสำคัญในการเกิดโรคพืช (ชลิดา เล็กสมบูรณ์, 2554)

โรคพืช หมายถึง สภาวะที่ต้นพืชผิดปกติ เนื่องจากเชื้อโรคที่เป็นสิ่งมีชีวิต และจากสภาพแวดล้อมซึ่งเป็นสิ่งไม่มีชีวิต โดยสาเหตุโรคไปทำให้การทำงานของระบบต่างๆในพืชผิดปกติ โครงสร้างและรูปร่างของพืชจึงเปลี่ยนแปลงไป

การเกิดโรคพืชมีปัจจัยสำคัญ 3 ประการ คือ *พืช* ที่เป็นพันธุ์อ่อนแอหรืออยู่ในระยะที่อ่อนแอต่อโรค *เชื้อสาเหตุโรค* ที่มีความรุนแรงและปริมาณที่เหมาะสมในการเข้าทำลายพืช และ *สภาพแวดล้อม* ที่เหมาะต่อการเข้าทำลายของเชื้อและส่งเสริมให้พืชอ่อนแอต่อโรค

1.2 โรคของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว (ปริญญา จันทรศรี, 2556)

โรคของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว (Postharvest diseases of fruits) หมายถึง โรคของผลไม้ที่เกิดหลังจากที่พืชได้รับการเก็บเกี่ยวแล้ว และอยู่ระหว่างการเก็บรักษา การขนส่ง หรือแปรรูปผลิตผลพืชและสภาพแวดล้อมต่างๆหลังการเก็บเกี่ยวจะแตกต่างไปจากที่เคยอยู่ในไร่ สวน หรือแปลงปลูก

สาเหตุของโรคหลังการเก็บเกี่ยวผลไม้ คือ

1.2.1 สภาพสรีรวิทยาของผลไม้ ได้แก่ ออกซิเจนไม่เพียงพอ ทำให้เนื้อเยื่อภายในผลไม้ตาย มีสีน้ำตาลดำ

1.2.2 เอสเทอร์ (Ester) ที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) ของผลผลิตตามปกติ เกิดเป็นพิษขึ้นเนื่องจากมีสะสมมากเกินไป

1.2.3 การช้ำเพราะได้รับอากาศเย็นเกินไป

1.2.4 อุณหภูมิที่เก็บผลไม้สูงเกินไป ทำให้อัตราการหายใจของผลผลิตสูง

1.2.5 เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์

สาเหตุสำคัญของโรคผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจากตัวผลผลิตเองและจากสภาพแวดล้อม

1.3 การควบคุมโรคพืช

การควบคุมโรคพืช หมายถึง การหยุดโรคหรือลดความรุนแรงของโรคและไม่ให้โรคแพร่ระบาด (ชลิดา เล็กสมบูรณ์, 2554)

หลักการควบคุมโรคพืช (ชลิดา เล็กสมบูรณ์, 2554)

ก. การหลีกเลี่ยง (Avoidance) ไม่ให้พืชอยู่ในสภาพที่เหมาต่อการเกิดโรค ด้วยการเลือกพื้นที่ปลูกที่ไม่มีเชื้อโรค และเลือกเวลาปลูกที่ไม่เหมาะสมต่อการเกิดโรค

ข. การกีดกัน (Exclusion) ไม่ให้เชื้อโรคเข้ามาในบริเวณที่ไม่เคยมีโรคมาก่อน ด้วยการใช้เมล็ดหรือส่วนขยายพันธุ์ที่ไม่มีเชื้อติดมารวมทั้งการกีดกันเชื้อจากต่างถิ่น หรือจากต่างประเทศ โดยการกักกันพืช

ค. การกำจัด (Eradication) และทำลายประชากรเชื้อโรค ด้วยการกำจัดเศษซากพืชที่เป็นโรคทิ้งฆ่าหรือกำจัดเชื้อโดยใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช และกำจัดพืชอาศัย

ง. การป้องกัน (Protection) ไม่ให้พืชถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การใช้สารเคมี

จ. ความต้านทานโรค (Disease resistance) การใช้พันธุ์พืชต้านทานโรค และการเพิ่มหรือส่งเสริมความต้านทานโรคให้แก่พืช

ฉ. การรักษา (Therapy) พืชที่เป็นโรคให้สามารถเจริญเติบโต หรือให้ผลผลิตต่อไปได้

1.3.1 การควบคุมโรคพืชโดยทางกายภาพ (สรวงสรรค์ เนียมแจ้ง, 2549)

การควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวทางกายภาพสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้ความร้อน, Ionizing radiation, การกระตุ้นด้วยรังสี UV การใช้ความเย็นและควบคุมหรือดัดแปลงบรรยากาศ ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้กันมาก

1.3.2 การควบคุมโรคพืชโดยใช้สารเคมี (ชลิดา เล็กสมบูรณ์, 2554)

สารเคมีที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยส่วนมากเป็น สารกำจัดเชื้อรา (Fungicides) และการใช้สารปฏิชีวนะ (Antibiotics) ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรียบางชนิด อย่างไรก็ตามจะต้องระวังพิษของสารเคมีที่เกิดกับพืชเอง (Phytotoxic) และผลของสารเคมีต่อสิ่งมีชีวิตอื่นรวมทั้งผลตกค้างในสิ่งแวดล้อมด้วย

1.3.3 การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Biological control) หมายถึง การลดปริมาณประชากรและลดกิจกรรมของเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดโรคจนอยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจกับพืชโดยอาศัยสิ่งมีชีวิต (Organism) ซึ่งรวมทั้งพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (Antagonistic

microorgsnism) ตลอดจนสารพันธุกรรมหรือผลิตผลจากสารพันธุกรรม (Genes or Gene products) ของสิ่งมีชีวิต เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น เชื้อราเอนโดไฟต์ เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ภายในต้นพืชและไม่ทำให้พืชแสดงอาการของโรค สามารถป้องกันพืช อาศัยจากการเข้าทำลายของศัตรูธรรมชาติอีกทั้งยังช่วยส่งเสริมให้พืชมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น (นิตยา โนคำ, 2552)

กลไกการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (สุดฤดี ประเทืองวงศ์, 2552)

1. การแข่งขันกับเชื้อโรคโดยตรง จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มีความสามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืชเป้าหมายในด้านต่างๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า หรืออาศัยอยู่ในบริเวณนั้นได้เป็นจำนวนมากกว่าเชื้อโรค โดยเชื้อโรคไม่สามารถเจริญแข่งขันได้และขาดอาหาร ตลอดจนขาดพื้นที่อยู่อาศัย ประชากรของเชื้อโรคจึงลงลด หรือมีการเพิ่มปริมาณในระดับต่ำกว่าจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หรือจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

2. การสร้างสารปฏิชีวนะ จุลินทรีย์หลายชนิดมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโรค โดยผลิตสารประกอบทางเคมีที่เป็นพิษไปยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค และสามารถนำมาผลิตเป็นยารักษาโรคกับมนุษย์และสัตว์นอกเหนือไปจากพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพทัดเทียมและ/หรือดีกว่าสารเคมี

3. การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค การชักนำภูมิต้านทานเป็นกระบวนการที่พืชถูกกระตุ้นให้เกิดการต้านทานหรือกีดขวางกระบวนการเข้าทำลายของเชื้อโรค ซึ่งอาจอยู่ในรูปของการกระตุ้นการผลิตโครงสร้างพิเศษทางด้านกายภาพ โดยจุลินทรีย์หลายชนิดจะกระตุ้นกระบวนการรับรู้จดจำของพืชและตอบสนองให้พืชเกิดภูมิคุ้มกัน

4. การเป็นปรสิต โดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเป็นปรสิตจะเข้าไปเจริญอาศัยทำลายเซลล์ของเชื้อโรคอื่น

5. การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยจุลินทรีย์จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในระยะต้นกล้า เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถครอบครองบริเวณรากของพืช และเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นที่อาศัยบริเวณรากได้ดี

6. การผลิตสารส่งเสริมประสิทธิภาพการยึดติดแนบกับผิวพืช เป็นการกีดกันและกำจัดช่องทางเชื้อโรคอื่นไม่ให้สัมผัสผิวพืช และเชื้อโรคไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้

7. การรักษาและแก้ไขความผิดปกติตลอดจนการปรับสภาพความสมดุลให้พืชในทุกด้าน

8. การกระตุ้นและชักนำขีดความสามารถของลักษณะทางสรีรวิทยาพืชให้แสดงออกอย่างมีประสิทธิภาพ

9. การผลิตสารยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชต่างๆที่มีคุณสมบัติคล้ายสารปฏิชีวนะ

10. คุณสมบัติในการส่งเสริมและสนับสนุนการใช้ปุ๋ยหรือธาตุอาหารของพืช บทบาทของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์จะช่วยส่งเสริมการใช้ธาตุอาหารต่างๆของพืช

2. โรคแอนแทรคโนสในมะม่วง

อนุกรมวิธานของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

Kingdom : Mycetae

Division : Eumycota

Sub division : Deuteromycotina

Class : Deuteromycetes

Order : Melanconiaceae

Family : Melanconiaceae

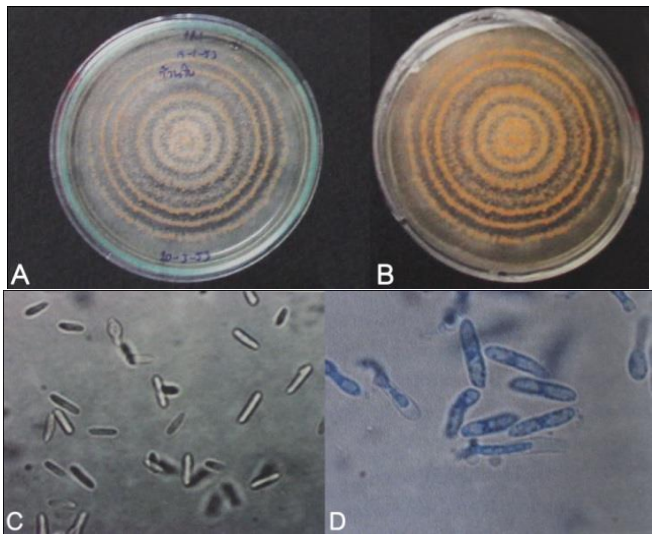
Genus : *Colletotrichum*

Species : *gloeosporioides*

โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งจัดเป็นโรคที่สำคัญที่สุดของมะม่วงที่ปลูกในสภาพอากาศร้อนชื้นอย่างประเทศไทย เป็น Polycyclic disease ที่มีการสร้างส่วนขยายพันธุ์ขึ้นใหม่ และเข้าทำลายพืชได้ทุกระยะการเจริญตลอดฤดูการปลูก จึงทำให้การควบคุมโรคเป็นไปอย่างยากลำบาก มะม่วงแต่ละสายพันธุ์มีความต้านทานโรคแตกต่างกัน พันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคนี้ เช่น พันธุ์มหาชนก พันธุ์น้ำดอกไม้ โรคแอนแทรคโนสที่เกิดในมะม่วงนี้ทำให้เกิดการสูญเสียทั้งผลผลิตและคุณภาพระหว่างการขนส่งไปจำหน่าย จึงเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการส่งไปจำหน่ายยังต่างประเทศ โดยเฉพาะมะม่วงที่ใช้รับประทานแบบผลสุก และมีเปลือกบาง ทำให้เชื้อเข้าทำลายได้ง่าย เช่น พันธุ์น้ำดอกไม้ ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ได้รับความนิยมจากตลาดต่างประเทศ และมีมูลค่าการส่งออกมากที่สุด (ปริญญา จันทรศรี, 2556)

2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

จากการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราก่อโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยการทำให้เนื้อเยื่อบนใบพืชตายด้วยสารพาราควอท และบ่มไว้ในสภาพความชื้นสัมพัทธ์สูง จะปรากฏกลุ่มของสปอร์สีส้มบนใบ ซึ่งเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar เชื้อจะเจริญเป็นกลุ่ม (Colony) ที่ประกอบไปด้วยเส้นใยสีขาวปนเทา หรือเขียวเข้ม และมีกลุ่มสปอร์ของเชื้อราก่อโรคเกิดขึ้นบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบลักษณะของสปอร์หรือโคนิเดีย (Conidia) ที่มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก หัวท้ายมน หรือเรียวแหลมขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ (ภาพที่ 1) (ปริญญา จันทรศรี, 2556) ก้านชูโคนิเดียสีน้ำตาลอ่อน เชื้อรานี้มีการเจริญอยู่ในโครงสร้างสืบพันธุ์ที่มีลักษณะคล้ายจานที่เรียกว่า acervuli (ชานนท์ เพาะเจาะ, 2551)



ภาพที่ 1 ลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*
(A, B) ลักษณะของกลุ่มเส้นใยและกลุ่มสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides*
(C, D) ลักษณะของสปอร์หรือโคนิเดียของเชื้อรา *C. gloeosporioides*
(ที่มา: ปริญญา จันทรศรี, 2556)

2.2 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนส (ปริญญา จันทรศรี, 2556)

อาการของโรคเกิดได้กับส่วนต่างๆของพืช ทั้งต้นกล้า ยอดอ่อน ช่อดอก ผลอ่อน ผลแก่จนถึงผลหลังการเก็บเกี่ยว ทำให้เกิดอาการเป็นจุดแผลตกค้างอยู่บนใบ กิ่ง ผล และหากการเข้าทำลายของโรครุนแรงก็จะเกิดอาการใบแห้ง ใบบิดเบี้ยว และร่วงหล่น ช่อดอกแห้งไม่ติดผล ผลอ่อนเน่าร่วง ตลอดจนผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยว โดยเรียกตามลักษณะอาการต่างๆที่เกิดขึ้น ได้แก่ อาการใบไหม้ (leaf blight) ช่อดอกไหม้ (Blossom or Panicle blight) ผลอ่อนเน่าแห้ง (Mummification) และอาการกิ่งแห้งตาย (Die back) อาการทั้งหมดที่เกิดขึ้นนี้จะเป็นแหล่งสะสมเชื้อที่จะแพร่ระบาดเข้าทำลายผลมะม่วงที่กำลังพัฒนา และเชื้อที่เข้าทำลายจะอยู่ในระยะพักตัวจนกระทั่งเมื่อผลมะม่วงเข้าสู่ระยะแก่ เก็บเกี่ยว และใกล้สุก เชื้อจะเริ่มพัฒนาใหม่และเข้าทำลายผลมะม่วง ก่อให้เกิดอาการผลเน่าเสีย ซึ่งจัดเป็นโรคหลังการเก็บเกี่ยว (Postharvest disease) ที่สำคัญของมะม่วง อาการบนใบเริ่มจากการเป็นจุดชุ่มน้ำและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ บริเวณที่เป็นแผลเนื้อเยื่อใบจะตาย เมื่อใบส่วนอื่นๆที่ไม่มีอาการขยายตัวเพิ่มขึ้นทำให้ใบเกิดการบิดเบี้ยว ใบแก่ขนาดของจุดจะค่อนข้างเป็นเหลี่ยม ถ้ามีการระบาดรุนแรง บางครั้งทำให้รอยแผลที่เกิดบนใบทะลุเป็นรู เมื่อมะม่วงแทงช่อดอก เชื้อจะเข้าทำลายที่ช่อดอก ทำให้ช่อดอกแห้ง ดอกร่วง ช่อที่ติดผลอ่อน รวมทั้งผลแก่จะมีแผลเน่าดำ ในสภาพอากาศที่มีความชื้นสูง เชื้อจะสร้างกลุ่มสปอร์สีส้มขึ้นตาม

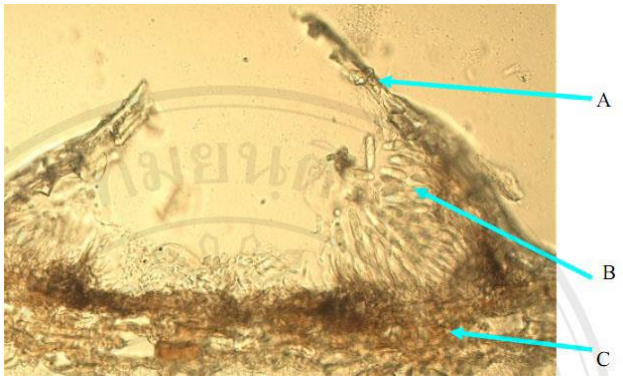
รอยแผลที่เป็นโรค ตามกิ่งหรือลำต้นอ่อน แผลจะมีลักษณะเป็นรอยดำ รูปรีตามความยาวของลำต้น และเมื่อผลแก่จะมีแผลเน่าดำ (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 2 อาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง

2.3 การเข้าทำลายของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

สำหรับการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในเนื้อเยื่อผลมะม่วง สปอร์ของเชื้อจะงอก Germ tube และสร้าง Appressoriem บนผิวผล นอกจากนั้นเชื้อราจะสร้าง Infection hypha ผ่านชั้น Cuticle เข้าไปในผิวผลแล้วแฝงตัวอยู่ในรูปเส้นใยที่เจริญแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ในชั้น epidermis (ภาพที่ 3) และจะพักตัวในผลมะม่วงจนกระทั่งสุกหรือได้รับสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญจึงจะแสดงอาการของโรคออกมา (ชานนท์ เพาะเจาะ, 2551) นอกจากนี้ Kongtragoul (2011) ได้อธิบายเพิ่มเติมไว้ว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* อาศัยการพาของน้ำในช่วงที่ฝนตกและเกิดขึ้นตั้งแต่ระยะเริ่มติดผล จนถึงระยะเก็บรักษา แหล่งพักตัวของเชื้อที่สำคัญคือซากพืชที่เป็นโรคแล้วร่วงหล่นอยู่บริเวณแปลงปลูก โคนิเดียม (Conidium) จะแพร่กระจายไปได้ทั่วแปลงปลูกเมื่อมีการทดน้ำเข้าแปลง หรือมีฝนตกหนัก และสภาพอากาศที่มีความชื้นสูงจะส่งเสริมให้เชื้อเจริญได้ดียิ่งขึ้น เมื่อ โคนิเดียมตกลงบนผิวพืช จะเริ่มการงอกเส้นใยภายใน 12–48 ชั่วโมง โดยอาศัยเมือกเหนียวที่อยู่รอบโคนิเดียม ช่วยในการยึดเกาะกับผิวพืช การงอกเส้นใยจะเกิดขึ้นเป็นสายสั้นๆ หลังจากนั้นจะเริ่มสร้าง Appressorium ซึ่งถ้าอ่อนอยู่จะมีลักษณะใสไม่มีสี แต่เมื่อเวลาผ่านไปความเหนียวแหละสีจะเพิ่มมากขึ้น จากนั้นจะสร้าง Peg เพื่อแทงเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช แต่การสร้าง Peg จะขึ้นอยู่กับช่วงการพัฒนาของผลและปริมาณความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่อยู่บริเวณเปลือกของผล ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีผลต่อความยาวของ Peg ที่เชื้อสร้างขึ้น โดยช่วงก่อนที่เส้นใยจะเข้าไป

ทำลายเนื้อเยื่อพืชนั้น จะมีการพักตัว จึงเป็นช่วงที่สามารถยับยั้ง การเจริญของเชื้อได้ ด้วยการเคลือบ Wax ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ที่เปลือกของผล เมื่อผลสุก การสร้างสารต่อต้านเชื้อรา หรือกลไกป้องกันตัวเองของพืชจะลดลง เชื้อจะเข้าไปทำลายภายในเซลล์พืช และลุกลามไปยังเซลล์ที่อยู่ถัดไปอย่างรวดเร็วทำให้ผลผลิตเน่าเสีย (ภาพที่ 4)



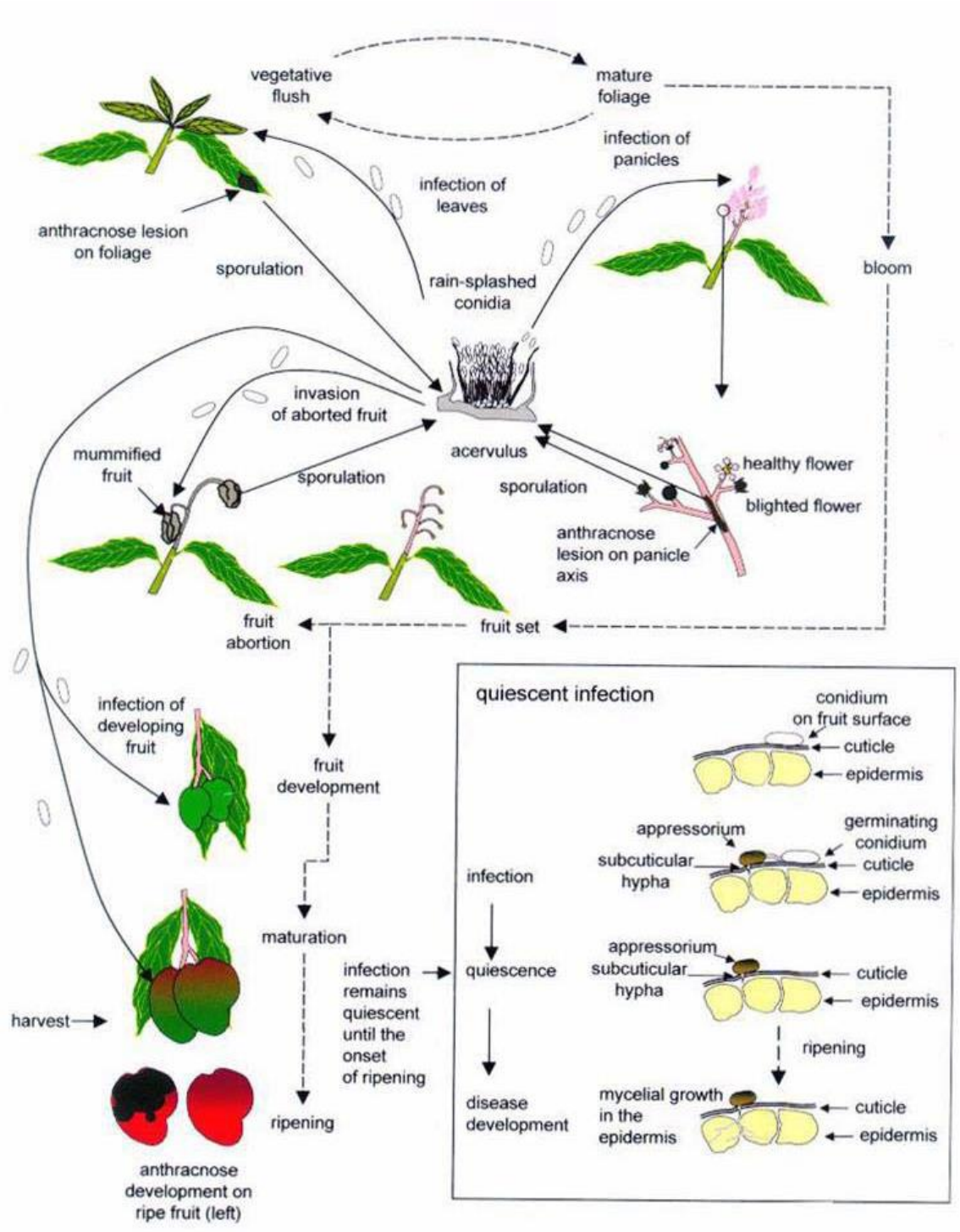
ภาพที่ 3 Acervulus ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

(A) อิพิเดอร์มิสของพืชอาศัย

(B) กลุ่มโคนิเดียของเชื้อ *C. gloeosporioides*

(C) เนื้อเยื่อของพืชอาศัย

(ที่มา: ชานนท์ เพาะเจาะ, 2551)



ภาพที่ 4 วงชีวิตของโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง ; เส้นทึบ คือ วงชีวิตของโรค เส้นประ คือ ลักษณะฟีโนไทป์

(ที่มา: Arauz, 2000 cited in Kongtragoul, 2011)

3. ยีสต์ปฏิปักษ์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มนุษย์นำมาใช้ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มราที่ดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยว มีลักษณะเซลล์แบบยูคาริโอต ส่วนใหญ่จะเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (Budding) มีส่วนน้อยที่จะเพิ่มจำนวนโดยแบ่งเซลล์แบบพิสชัน (Fission) มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ และชนิดที่สร้างเบสิดีโอสปอร์ เป็นต้น ปัจจุบันยีสต์มีประโยชน์มากมาย เช่นผลิตภัณฑ์จากการหมัก 4 ชนิด ได้แก่ เบียร์ ไวน์ ยีสต์ขนมปัง และโปรตีนเซลล์หรือยีสต์อาหารสัตว์ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) นอกจากประโยชน์ทางด้านอาหารและเครื่องดื่มแล้ว ยีสต์ยังมีประโยชน์ทางด้านการควบคุมโรคพืช ที่เรียกว่า ยีสต์ปฏิปักษ์ ซึ่งเป็นที่สนใจมากขึ้น โดยเฉพาะเกษตรกรและผู้บริโภคต่างมีความต้องการอาหารที่มีความปลอดภัยมากขึ้น และมีการดูแลหรืออนุรักษ์สภาพระบบนิเวศระบบเกษตรให้ดีมากขึ้น ยีสต์ปฏิปักษ์จึงเป็นส่วนหนึ่งของจุลินทรย์ควบคุมโรคพืช ที่เข้ามามีบทบาทแทนที่สารเคมีที่อาจก่อให้เกิดสารพิษตกค้างได้ (สุดฤดี ประเทืองวงศ์, 2552)

3.1 แหล่งของยีสต์ปฏิปักษ์

ยีสต์ที่แยกได้จากธรรมชาติและที่แยกจากผิวของผลไม้เป็นยีสต์กลุ่มหลักที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการจัดการกับโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว อย่างไรก็ตามยีสต์ปฏิปักษ์นี้สามารถแยกได้จากหลังอื่นด้วย เช่น ผิวใบไม้ ราก ดิน และน้ำทะเล ยีสต์บนผิวใบไม้ (Phyllosphere yeast) เช่น *Rhodotorulla glutinis* (สายพันธุ์ Y-44) แยกได้จากใบของมะเขือเทศ ซึ่งมีรายงานว่าสามารถยับยั้งราสีเทา (*Botrytis cinerea*) ทั้งบนใบและผลของมะเขือเทศไทย (Kalogiannis *et al*., 2006), *Kloeckera apiculata* (สายพันธุ์ 34-9) แยกได้จากรากของพืชสกุลส้ม (Citrus roots) ซึ่งมีรายงานว่ามีฤทธิ์ในการควบคุม *Penicillium italicum* บนผลส้ม และ *Botrytis cinerea* บนผลองุ่น (Long *et al*., 2005) ยีสต์ที่ทนอุณหภูมิต่ำ (Psychrotrophic yeast) เช่น *Leucosporidium scottii* (สายพันธุ์ At17) แยกได้จากดินบริเวณขั้วโลกใต้ ถูกจัดว่าเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพที่ดีต่อทั้งราสีน้ำเงิน (*P. expansum*) และราสีเทา (*B. cinerea*) บนผลแอปเปิ้ล (Vero *et al*., 2013) ยีสต์ที่อยู่ในทะเล (Marine yeast) เช่น *Rhodosporidium paludigenum* แยกได้จากทะเลทางตะวันออกของจีน มีความสามารถในการยับยั้ง *P. expansum* บนผลลูกแพร และยับยั้ง *Alternaria alternate* บนผลพุทราจีน (Wang *et al*., 2010) และยังมีการเปรียบเทียบระหว่างยีสต์ที่แยกได้จากผิวผลไม้กับยีสต์ที่แยกได้จากทะเล ซึ่งพบว่ายีสต์ที่แยกได้จากทะเลมีความทนต่อแรงดันออสโมติกสูงกว่า อาจจะมีศักยภาพที่เหมาะสำหรับใช้ภายใต้สภาวะที่ยีสต์แสดงออกมาเพื่อตอบสนองต่อความเครียดจากสิ่งไม่มีชีวิต (Abiotic stress) (Hernandez-Montiel *et al*., 2010; Wang *et al*., 2010)

3.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยีสต์ปฏิปักษ์ (Liu, Sui, Wisniewski, Droby and Liu, 2013)

กลไกของยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวนั้น ได้แก่

3.2.1 การเหนี่ยวนำให้โฮสต์ป้องกันตัวเอง เช่น ยีสต์ปฏิปักษ์ *Pichia caribbica* ยับยั้งราก่อโรค *Rhizopus stolonifer* ในผลลูกพีช (Xu *et al*., 2013)

3.2.2 การผลิตไลติกเอนไซม์ เช่น ยีสต์ปฏิปักษ์ *Cryptococcus albidus* ยับยั้งราก่อโรค *Monilinia fructicola* และ *Penicillium expansum* ในผลแอปเปิ้ล (Chan & Tian, 2005)

3.2.3 การเพิ่มปริมาณความหนาแน่นของประชากรยีสต์ปฏิปักษ์ เช่น ยีสต์ปฏิปักษ์ *Candida oleophila* ยับยั้งราก่อโรคบนผลองุ่น (McGuire, 2000)

3.2.4 การเปลี่ยนรูปร่างทางสัณฐานวิทยา เช่น ยีสต์ปฏิปักษ์ *Saccharomyces cerevisiae* (M25) ยับยั้งราก่อโรค *Penicillium expansum* บนผลแอปเปิ้ล (Scherm *et al*., 2003)

3.2.5 การสูญเสีย iron เช่น ยีสต์ปฏิปักษ์ *Metschnikowia pulcherrima* ยับยั้งราก่อโรค *Botrytis cinerea, Alternaria alternate* และ *Penicillium expansum* บนผลแอปเปิ้ล (Saravanakumar *et al*., 2008)

3.2.6 การทนต่อ ROS เช่น ยีสต์ปฏิปักษ์ *Metschnikowia fructicola* ยับยั้งราก่อโรค *Penicillium expansum* บนผลแอปเปิ้ล (Liu *et al*., 2011)

3.2.7 ลดการถูกทำลายแบบออกซิเดชันของโฮสต์ (ผลไม้) เช่น ยีสต์ปฏิปักษ์ *Pichia membranaefaciens* ยับยั้งราก่อโรค *Monilinia fructicola* บนผลลูกพีช (Xu, Qin, & Tian, 2008)

3.2.8 เหนี่ยวนำให้โฮสต์ผลิต ROS เช่น ยีสต์ปฏิปักษ์ *Candida oleophila* (I-182) และ *Metschnikowia fructicola* ยับยั้งราก่อโรคบนผลแอปเปิ้ล (Macarisin, Droby, Bauchan, & Wisniewski, 2010)

จินันทนา จอมทอง และวิชชา สะอาดสุด (2555) ได้ทำศึกษาการใช้ยีสต์ *Issatchenkia orientalis* ในการป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสของผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว โดยจากผลการทดสอบการเลี้ยงเชื้อร่วมกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการพบว่า ยีสต์สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporides* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสได้ ส่วนการทดสอบบนผลมะม่วงก็ได้ผลเช่นเดียวกัน คือสปอร์ของเชื้อราไม่สามารถงอกได้ และพบว่าส่วนผิวของสปอร์ที่มียีสต์เกาะติดอยู่มีลักษณะยุบตัวลง การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารระเหยบางชนิดที่ยีสต์สร้างและซึมแผ่ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลในทางลบต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา โดยผลการทดสอบ ประสิทธิภาพการป้องกันการกำจัดโรคโดยแช่ผลมะม่วงในยีสต์แขวนลอยใน

น้ำกลั่นเป็นเวลา 40 นาที พบว่าสามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงหลังบ่มสุกได้ดี ประสิทธิภาพการป้องกันกำจัดโรคเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ยีสต์ร่วมกับการใช้น้ำร้อน คือแช่ผลมะม่วงในน้ำร้อนอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วตามด้วยการแช่ในยีสต์แขวนลอยในน้ำกลั่นนาน 30 นาที

Nally *et al.,* (2013) ได้ทำการศึกษายีสต์ที่แยกจากดินและองุ่นสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งทำการแยกเชื้อได้เป็น *Saccharomyces* 140 สายพันธุ์ และที่ไม่ใช่ *Saccharomyces* อีก 94 สายพันธุ์ มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในองุ่น โดยเชื้อราที่นำมาศึกษานั้นได้แก่ *Aspergillus* 4 สายพันธุ์, *Fusarium oxysporum, Penicillium commune, Rhizopus stolonifer* และ *Ulocladium* sp. และจากการทดสอบพบว่า 43 สายพันธุ์ (*Saccharomyces* 16 สายพันธุ์ และ non-*Saccharomyces* 27 สายพันธุ์) แสดงการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในผลองุ่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Melin, Schnurer, & Hakansson (2011) ได้ทำการศึกษาอายุการเก็บรักษายีสต์ปฏิปักษ์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ J121 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคหลังการเก็บเกี่ยวในผลไม้ โดยการเปรียบเทียบระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 กับ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อผ่านไปเป็นเวลา 1 เดือน จำนวนเซลล์ยีสต์ลดลงเหลือต่ำกว่า 20% เทียบกับที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เมื่อผ่านไปเป็นเวลา 3 เดือน จำนวนเซลล์ยีสต์เหลือ 50%

4. การเสริมประสิทธิภาพชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช

รูปแบบการเก็บรักษาสูตรสำเร็จสามารถสรุปได้ 2 แบบดังต่อไปนี้ (ไก่แก้ว สุธรรมมา, 2552)

ก. สูตรน้ำ (Liquid formulation) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่อยู่ในรูปเซลล์แขวนลอยในตัวทำละลายที่เป็นน้ำหรืออาจอยู่ในตัวทำละลายที่ไม่ละลาย มีข้อดีคือสามารถนำจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์ได้ทันทีไม่ต้องผ่านขั้นตอนการกระตุ้นให้เจริญเติบโต (Reactivation)

ข. สูตรแห้ง (Dry formulation) นิยมใช้จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสปอร์ และในการผลิตจะต้องมีการเติมสารป้องกันเซลล์จากความร้อนในระหว่างกระบวนการทำแห้ง เช่น หางนม เจลาติน เป็นต้น

ชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ในเชิงพาณิชย์นั้นมี 2 สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง คือ อายุการเก็บรักษา และประสิทธิภาพคงเดิม ซึ่งไม่ว่าจะเป็นสูตรน้ำหรือสูตรแห้งก็ต้องมีการเสริมประสิทธิภาพชีวภัณฑ์เพื่อสองสิ่งข้างต้น

Liu, Tian, Li and Qin (2009) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพยีสต์ปฏิปักษ์สูตรน้ำ 2 สายพันธุ์ คือ *Cryptococcus laurentii* และ *Pichia membranaefaciens* ซึ่งมีการเติมสาร protectant

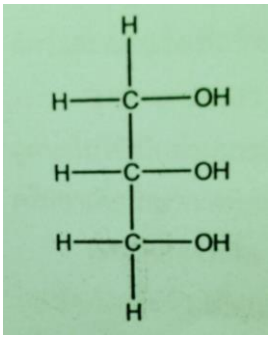
ลงไป คือ น้ำตาลทรีฮาโลส และน้ำตาลกาแลกโตส ทำการทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่า *P. membranaefaciens* ที่เติมน้ำตาลกาแลกโตส 5% เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้อัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดคือมากกว่า 60% หลังเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

4.1 กลีเซอรอล

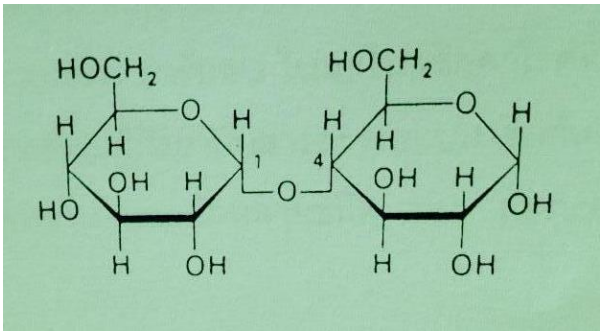
กลีเซอรอล หรือกลีเซอรีน คือ แอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่มีคาร์บอน 3 ตัวต่อกัน และมีหมู่ OH ต่อกับคาร์บอนทั้ง 3 ตัว มีสูตรโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 5 กลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นของเหลวหนืดใส ไม่มีกลิ่น มีรสหวาน มีจุดเดือดที่ 290 องศาเซลเซียส และมีจุดหลอมเหลวที่ 18 องศาเซลเซียส ละลายน้ำและแอลกอฮอล์ได้ดี แต่ไม่ละลายในอีเทอร์ เบนซีน หรือน้ำมัน โดยกลีเซอรอลมีคุณสมบัติดูดความชื้นได้ดีมาก กล่าวคือ เมื่อตั้งกลีเซอรอลไว้ในภาชนะเปิด กลีเซอรอลจะดูดความชื้นจากอากาศได้ถึง 20 % โดยน้ำหนัก กลีเซอรอลที่เข้มข้นสูงจะทำให้ร่างกายเกิดภาวะเสียน้ำได้ แต่กลีเซอรอลที่เจือจางในน้ำสามารถช่วยให้ผิวหนังชุ่มชื้นและนุ่มนวล (ศิริพร จงผาติวุฒิ, 2551)

4.2 น้ำตาลมอลโตส

น้ำตาลมอลโตส เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุลต่อกัน โดยมีอะตอมของออกซิเจนเป็นสะพาน มีสูตรโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 6 ซึ่งมอลโตส เป็นน้ำตาลชนิดรีดิวซิงที่ไม่พบมากในธรรมชาติ พบในเมล็ดข้าวบาร์เลย์หรือเมล็ดข้าวมอลท์ที่กำลังจะงอกหรือได้จากการสลายแป้งด้วยเอนไซม์ (รัชฎา แก่นสาร์, 2551)



ภาพที่ 5 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของกลีเซอรอล
(ที่มา : ศิริพร จงผาติวุฒิ, 2551)



ภาพที่ 6 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของน้ำตาลมอลโตส
(ที่มา : รัชฎา แก่นสาร์, 2551)

5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

Sriram, Roopa and Savitha (2011) ศึกษาการเพิ่มอายุการเก็บรักษาของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* โดยการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 3 6 และ 9 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งพบว่าเมื่อทำการเติมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 3 และ 6 เปอร์เซ็นต์นั้นช่วยเพิ่มอายุการเก็บรักษาเป็น 7 และ 12 เดือนตามลำดับ และเมื่อนำเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่ทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือนมาทดสอบประสิทธิภาพนั้น พบว่าสามารถยับยั้งการก่อโรคในมะเขือเทศจากเชื้อรา *Fusarium* ได้ 44-50 เปอร์เซ็นต์

Lahlali and Jijakli (2009) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพตัวควบคุมทางชีวภาพ *Candida oleophila* (สายพันธุ์ O) โดยการเติมสารปกป้องเซลล์ (protectant) เพื่อปกป้องตัวควบคุมชีวภาพจากปัจจัยแวดล้อม เช่น กิจกรรมของน้ำ (a_w 0.93 และ 0.98) และความชื้นสัมพัทธ์ (75% และ 98%) โดยสาร protectant ที่นำมาทดสอบคือ skimmed milk (SM), เปปโตน, มอลโตส, ซูโครส, แลกโตส และ polyethylene glycol ซึ่งทำการทดสอบทั้งบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อและบนผิวผลแอปเปิ้ล พบว่าการเติมสาร protectant ที่มีความเข้มข้นสูง (1%) ให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์สูงกว่าการเติมสาร protectant ที่ความเข้มข้นต่ำ (0.1% และ 0.5%) และเมื่อนำมาทดสอบบนผิวผลแอปเปิ้ล พบว่าเมื่อมีการเติมสาร SM ร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ O ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Penicillium expansum* ดีที่สุดถึง 74.65%

Torres, Usall, Teixido, Abadias and Vinas (2003) ศึกษาประสิทธิภาพการเติมสาร protectant เพื่อเพิ่มอายุการเก็บรักษาสูตรน้ำของตัวควบคุมทางชีวภาพ *Candida sake* ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 20 องศาเซลเซียส สาร protectant ที่นำมาทดสอบคือ ทรีฮาโลส, มอลโตส, แลกโตส และ ฟรักโตส ที่ความเข้มข้น 1% และ 10% พบว่าเมื่อทำการเก็บรักษา *C. sake* ที่มีการเติบ

สาร protectant เป็นระยะเวลา 4 เดือนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แลกโตสที่ความเข้มข้น 10% ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *C. sake* สูงที่สุด (79%) ส่วนมอลโตสที่ความเข้มข้น 1% พบการรอดชีวิตของ *C. sake* ประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์

Liu *et al* (2011) ศึกษาประสิทธิภาพของ *Rhodotorula mucilaginosa* ในการยับยั้งราสีเทาและราสีน้ำเงินในผลแอปเปิ้ลหลังการเก็บเกี่ยว โดยใส่ *R. mucilaginosa* ในรอยแผลของแอปเปิ้ลที่ทำขึ้น ด้วยทรีทเมนต์ที่แตกต่างกัน พบว่าในผลแอปเปิ้ลมีกิจกรรมของ peroxidase (POD) และ polyphenoloxidase (PPO) และยับยั้ง lipid peroxidation (MDA content) ซึ่งเป็นตัวสำคัญในการยับยั้งราก่อโรค โดยกิจกรรมเหล่านี้เกิดจากการใส่ *R. Mucilaginosa* ลงในรอยแผลของผลแอปเปิ้ล ผลการทดลองในทุกทรีทเมนต์ที่มีการใส่ *R. Mucilaginosa* ในความเข้มข้นที่แตกต่างกันให้ผลในการควบคุมโรคได้ทั้งหมด ซึ่งกลไกในการทำงานของยีสต์ปฏิปักษ์คือการแย่งอาหารและพื้นที่, การเหนี่ยวนำให้แอปเปิ้ลผลิตเอนไซม์ POD PPO และยับยั้ง Lipid peroxidation (MDA content)

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ และจุรีมาศ วงศ์ศรีรัตน์ (2552) ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในผลพริกชี้ฟ้าแดง (*Capsicum annuum* L. var. *acuminatum* Fingerh.) ที่เกิดจากรา *Colletotrichum gloeosporioides* ด้วยยีสต์ปฏิปักษ์ 4 ชนิด ได้แก่ *Pichia quilliermondii* R13 *Candida musae* R6 *Issatchenkia orientalis* ER1 และ *Candida quercitrusa* L2 รวมทั้งสังเกตปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีสต์ปฏิปักษ์และราก่อโรค จากการทดลองพบว่า *P. quilliermondii* มีประสิทธิภาพควบคุมการเจริญของราก่อโรคได้ดีเท่ากับ *I. orientalis* บนจานเพาะเชื้อคือร้อยละ 85.84 โดยใช้เซลล์ยีสต์ปริมาณ 5×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่า *C. musae* และ *C. quercitrusa* ตามลำดับ ผลการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีสต์ 2 ชนิด คือ *P. quilliermondii* และ *I. orientalis* ต่อเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เซลล์ยีสต์ *P. quilliermondii* มีความสามารถในการเกาะติดกับเส้นใยราได้ดี สำหรับสายพันธุ์ *I. orientalis* ไม่พบความสามารถในการเกาะติดกับเส้นใยรา ดังนั้นจึงมีแนวโน้มที่จะนำยีสต์ *P. quilliermondii* และ *I. orientalis* มาใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในผลพริกชี้ฟ้าที่เกิดจาก *C. Gloeosporioides* ด้วยชีววิธี

Melin, Hakansson and Schnurer (2007) ศึกษาความเหมาะสมและเปรียบเทียบรูปแบบชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ระหว่างสูตรน้ำกับสูตรแห้งของยีสต์ปฏิปักษ์ *Pichia anomala* J121 พบว่าการเติมน้ำตาลทรีฮาโลสลงในสูตรทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งของ *P. anomala* ให้อัตราการรอดชีวิตของจำนวนเซลล์ยีสต์สูงสุดถึง 80 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ปี จากการเปรียบเทียบสูตรรูปแบบต่างๆพบว่า สูตรน้ำจะมีจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ในระยะ

เริ่มต้นสูงกว่ารูปแบบอื่น มีชีวิตการเก็บรักษาในอุณหภูมิตู้เย็นได้นานพอสมควร และการใช้งานง่ายกว่าสูตรแห้งแบบใช้ลมร้อนและสูตรแห้งแบบสูญญากาศ

Kefialew and Ayalew (2008) ศึกษาหาตัวควบคุมทางชีวภาพโดยนำจุลินทรีย์ที่แยกได้จากต้นมะม่วงในประเทศเอธิโอเปียมาจำแนกหาสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง สามารถระบุได้ว่าเป็น *Brevundimonas diminuta* (B-62) *Stenotrophomonas maltophilia* (L-16-12), *Enterobacteriaceae* (L-19-13) *Candida membranifaciens* (F-58-22) และยีสต์สายพันธุ์ B-65-23 ซึ่งทั้งหมดนี้เมื่อทำการทดสอบบนจานเพาะเชื้อพบว่ามีความสามารถในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* แต่เมื่อนำไปทดสอบกับผลมะม่วงพบว่ามีเพียง *B. diminuta* และ ยีสต์สายพันธุ์ B-65-25 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* ดีที่สุด (20-29%)

Chan and Tian (2005) ทำการศึกษาปฏิกิริยาและกลไกของยีสต์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยวในผลแอบเปิ้ล ยีสต์ที่นำมาศึกษาคือ *Pichia membranefaciens* และ *Cryptooccus albidus* ราก่อโรคที่นำมาศึกษาคือ *Monilinia fructicol, Penicillium expansum* และ *Rhizopus stolonifer* พบว่า *P. membranefaciens* และ *C. albidus* มีความสามารถในการเกาะติดกับเส้นใยของราก่อโรคทั้งสามชนิดที่แตกต่างกันทั้งการทดลองในจานเพาะเชื้อและในผลไม้ ซึ่งเป็นบทบาทในการควบคุมทางชีวภาพ และการผลิตเอนไซม์ไลติกเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการเกาะติดของยีสต์ปฏิปักษ์กับเส้นใยของเชื้อราก่อโรค

วิธีดำเนินการทดลอง

จุลินทรีย์

1.1 ยีสต์ปฏิปักษ์ *Issatchenkia orientalis* VCU 24 (ได้รับจากผู้ช่วยศาสตรจารย์นิสา ไกรรักษ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา)

1.2 เชื้อรา *Collectotrichum gloeosporioides* แยกจากมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่เป็นโรคแอนแทรคโนส

วิธีการทดลอง

1. การฟื้นเซลล์ยีสต์ *Issatchenkia orientalis* VCU24

1.1 นำหัวเชื้อ *Isaatchenkia orientalis* VCU24 (ที่เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส ใน slant) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NYDB แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ในที่มืด จนอาหารขุ่น

1.2 นำเข็มเขี่ยเชื้อปลายห่วงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาเขี่ยเชื้อ *I. orientalis* VCU24 ที่ผ่านการบ่มจนขุ่นแล้ว มาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NYDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ในที่มืด

1.3 นำโคโลนีเดี่ยวของ *I. orientalis* VCU24 จากข้อ 1.2 มาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NYDA อีกครั้ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียสในที่มืด

2. การทำหัวเชื้อยีสต์ *Issatchenkia orientalis* VCU24

2.1 นำโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ *I. orientalis* VCU24 ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี NYDB อยู่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มและเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน

2.2 นับจำนวนเซลล์ด้วย Haemacytometer คำนวณหาจำนวนเซลล์ และปรับให้เป็น 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NYDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3. การเลี้ยงและเพิ่มปริมาณยีสต์ *I. orientalis* VCU24

3.1 นำหัวเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^8 เซลล์/มิลลิลิตรมา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี NYDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที

3.2 วัดการเจริญของยีสต์โดยนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ทุก 2 ชั่วโมง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

3.3 นำค่าการดูดกลืนแสงมาทำกราฟแสดงการเจริญของยีสต์ปฏิปักษ์ *I. orientalis* VCU24 เพื่อหา Late log phase (บ่มนาน 32 ชั่วโมง)

4. การเตรียมชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ในรูปแบบชนิดเหลว

4.1 นำยีสต์ *I. orientalis* VCU24 ที่มีระยะการเจริญในช่วง late log phase มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 2,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

4.2 เทส่วนของเหลวออก จากนั้นใส่น้ำกลั่น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 2,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำเช่นนี้อีก 2 ครั้ง

4.3 เทส่วนของเหลวออก จากนั้นนำส่วนตะกอนใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มี 0.05M Potassium phosphate buffer pH 6.5 และกลีเซอรอล 20 % w/v แล้วทำการปรับปริมาณเชื้อให้เป็น 2.0 x 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารละลายข้างต้นเป็นตัวปรับ

4.4 แบ่งใส่หลอดทดลองที่มีน้ำตาล maltose ความเข้มข้น 0 1 2.5 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ หลอดละ 5 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 2 หลอด 2 ชุด จากนั้นแบ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส และ 26±2 องศาเซลเซียส ในที่มืดเพื่อป้องกันผลข้างเคียงที่เกิดจากแสง

5. ศึกษาอายุการเก็บรักษาของชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์รูปแบบชนิดเหลว

5.1 นำชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ที่เก็บรักษาในในสภาวะต่างๆ ตามระยะเวลาการเก็บรักษาต่างๆ มาทำการเจือจางแบบ tenfold dilution จากนั้นเกลี่ยลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร NYDA โดยยีสต์ปฏิปักษ์ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส ทำการศึกษาการรอดชีวิตของยีสต์ปฏิปักษ์ วันที่ 0 15 30 45 60 75 และ 90 ของการเก็บรักษา ส่วนที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส จะทำการศึกษาการรอดชีวิตของยีสต์ปฏิปักษ์ วันที่ 0 7 14 21 28 35 และ 42 ของการเก็บรักษา โดย spread plate ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำทุกครั้ง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน ในที่มืด

5.2 ทำการนับโคโลนียีสต์ปฏิปักษ์ที่เจริญบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร NYDA จากนั้นทำกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของยีสต์ปฏิปักษ์ที่มีชีวิตและเวลาของการเก็บรักษา

6. ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ชนิดเหลวในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

6.1 ทำการเตรียมสารละลายชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ชนิดเหลวที่มีความหนาแน่น 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 45 วัน ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส, สารละลายยีสต์สดที่มีความหนาแน่น 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร, สารละลายสปอร์ราที่มีความหนาแน่น 10^3 สปอร์/มิลลิลิตร และสารละลายสารเคมีคาร์เบนดาซิมที่มีความเข้มข้นตามคำแนะนำของผู้ผลิต

6.2 คัดเลือกมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่มีขนาดและความสุกใกล้เคียงกันทั้งหมด 12 ผล (สุกประมาณ ¾ ของผล) เช็ดบริเวณผิวมะม่วงด้วยเอทานอล 70% จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะลึก 5 มิลลิเมตร

6.3 แบ่งการทดลองเป็น 6 ชุด ลูกละ 3 หลุม ดังนี้

ชุดการทดลองที่	ปริมาณที่ใส่ในแต่ละรอยแผลของชุดการทดลอง (ไมโครลิตร)				
	น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	สปอร์รา	ยีสต์สูตรน้ำ	ยีสต์สด	สารเคมี
1	50	0	0	0	0
2	40	10	0	0	0
3	30	0	20	0	0
4	20	10	20	0	0
5	20	10	0	20	0
6	30	10	0	0	10

นำผลมะม่วงจากทั้ง 6 ชุดการทดลองบ่มในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิห้อง (26±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน

6.4 ใช้ใบมีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล 95% เจาะเนื้อเยื่อบริเวณรอยแผลปริมาตร 1 กรัม ใส่ในน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยวิธี tenfold dilution และนำปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร PDA และ NYDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

6.5 นับจำนวนยีสต์ปฏิปักษ์และราก่อโรค รายงานผลในหน่วย CFU/wound

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS แปลงข้อมูลค่าการมีชีวิตรอดของเชื้อ (cfu/g) ให้เป็นค่า log ก่อนทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) คำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน หาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan (P=0.05)

ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาอายุการเก็บรักษาของชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ *Issatchenkia orientalis* VCU24 ชนิดเหลวที่มีน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 0 1 2.5 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 และ 26±2 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาอายุการเก็บรักษาโดยการนับปริมาณเซลล์ยีสต์ในชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ *I. orientalis* VCU24 ชนิดเหลว ที่มีน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 0 1 2.5 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิเก็บรักษา 4±2 และ 26±2 องศาเซลเซียส พบว่า ชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ชนิดเหลวที่มีน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์มากที่สุด ทั้งที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 และ 26±2 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส สามารถเขียนสมการเส้นตรงของความเข้มข้นน้ำตาลมอลโตส 0 1 2.5 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ได้ดังนี้ $y_0 = -0.025x + 8.422$ ($P=0.000$, $R^2= 0.948$), $y_1 = -0.022x + 8.394$ ($P=0.000$, $R^2= 0.972$), $y_{2.5} = -0.020x + 8.403$ ($P=0.000$, $R^2= 0.969$), $y_5 = -0.018x + 8.412$ ($P=0.000$, $R^2= 0.962$), $y_{10} = -0.015x + 8.399$ ($P=0.000$, $R^2= 0.957$) ตามลำดับให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์มากกว่าที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเขียนสมการเส้นตรงของความเข้มข้นน้ำตาลมอลโตส 0 1 2.5 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ได้ดังนี้ $y_0 = -0.059x + 8.215$ ($P=0.000$, $R^2= 0.974$), $y_1 = -0.057x + 8.312$ ($P=0.000$, $R^2= 0.967$), $y_{2.5} = -0.051x + 8.281$ ($P=0.000$, $R^2= 0.983$), $y_5 = -0.048x + 8.265$ ($P=0.000$, $R^2= 0.977$), $y_{10} = -0.043x + 8.302$ ($P=0.000$, $R^2= 0.948$) ตามลำดับ ดังนั้นการทดลองขั้นนี้จึงเลือกสารละลายชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ชนิดเหลวที่มีน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 1 ปริมาณเซลล์ยีสต์ในสารละลายสูตรยีสต์ปฏิปักษ์ *Issatchenkia orientalis* VCU24 ชนิดเหลว ที่มีน้ำตาลมอลโตสความ เข้มข้น 0 1 2.5 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิเก็บรักษา 4 ± 2 องศาเซลเซียส

ระยะการเก็บรักษา (วัน)	ปริมาณเซลล์ยีสต์ (log cfu/ml) ในชีวภัณฑ์ยีสต์ในรูปแบบชนิดเหลว ที่มีน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้นต่างๆ				
	0%	1%	2.5%	5%	10%
0	$8.18 \pm 0.01^{a*D**}$	8.23 ± 0.01^{aC}	8.26 ± 0.01^{aC}	8.26 ± 0.00^{aB}	8.28 ± 0.06^{aA}
15	8.04 ± 0.06^{aB}	8.09 ± 0.01^{aB}	8.08 ± 0.05^{bB}	8.12 ± 0.01^{bAB}	8.19 ± 0.01^{bA}
30	7.89 ± 0.02^{bC}	7.88 ± 0.03^{bC}	7.93 ± 0.03^{cBC}	8.00 ± 0.00^{cAB}	8.04 ± 0.06^{cA}
45	7.57 ± 0.11^{cB}	7.50 ± 0.16^{cB}	7.65 ± 0.04^{dAB}	7.72 ± 0.00^{dAB}	7.83 ± 0.04^{dA}
60	7.00 ± 0.00^{dE}	7.11 ± 0.01^{dD}	7.20 ± 0.00^{eC}	7.39 ± 0.02^{eB}	7.59 ± 0.02^{eA}
75	6.46 ± 0.08^{eE}	6.79 ± 0.03^{eD}	6.90 ± 0.00^{fC}	7.05 ± 0.01^{fB}	7.36 ± 0.02^{fA}
90	6.08 ± 0.03^{fE}	6.30 ± 0.06^{fD}	6.46 ± 0.04^{gC}	6.64 ± 0.02^{gB}	6.94 ± 0.01^{gA}

* ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรพิมพ์เล็กเดียวกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติโดย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)

** ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรพิมพ์ใหญ่เดียวกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติโดย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ linear regression ปริมาณเซลล์ยีสต์ในชีวภัณฑ์ยีสต์ *Issatchenkia orientalis* VCU24 ชนิดเหลวที่มีการเติมน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้นต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส

ระดับน้ำตาลมอลโตส (%)	ค่าความชัน (Slope)	ระดับนัยสำคัญทางสถิติ (P)	R^2
0	- 0.025	0.000	0.948
1	- 0.022	0.000	0.972
2.5	- 0.020	0.000	0.969
5	- 0.018	0.000	0.962
10	- 0.015	0.000	0.957

ตารางที่ 3 ปริมาณเซลล์ยีสต์ในสารละลายชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ *Issatchenkia orientalis* VCU24 ชนิดเหลวที่มีน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 0 1 2.5 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิเก็บรักษา 26±2 องศาเซลเซียส

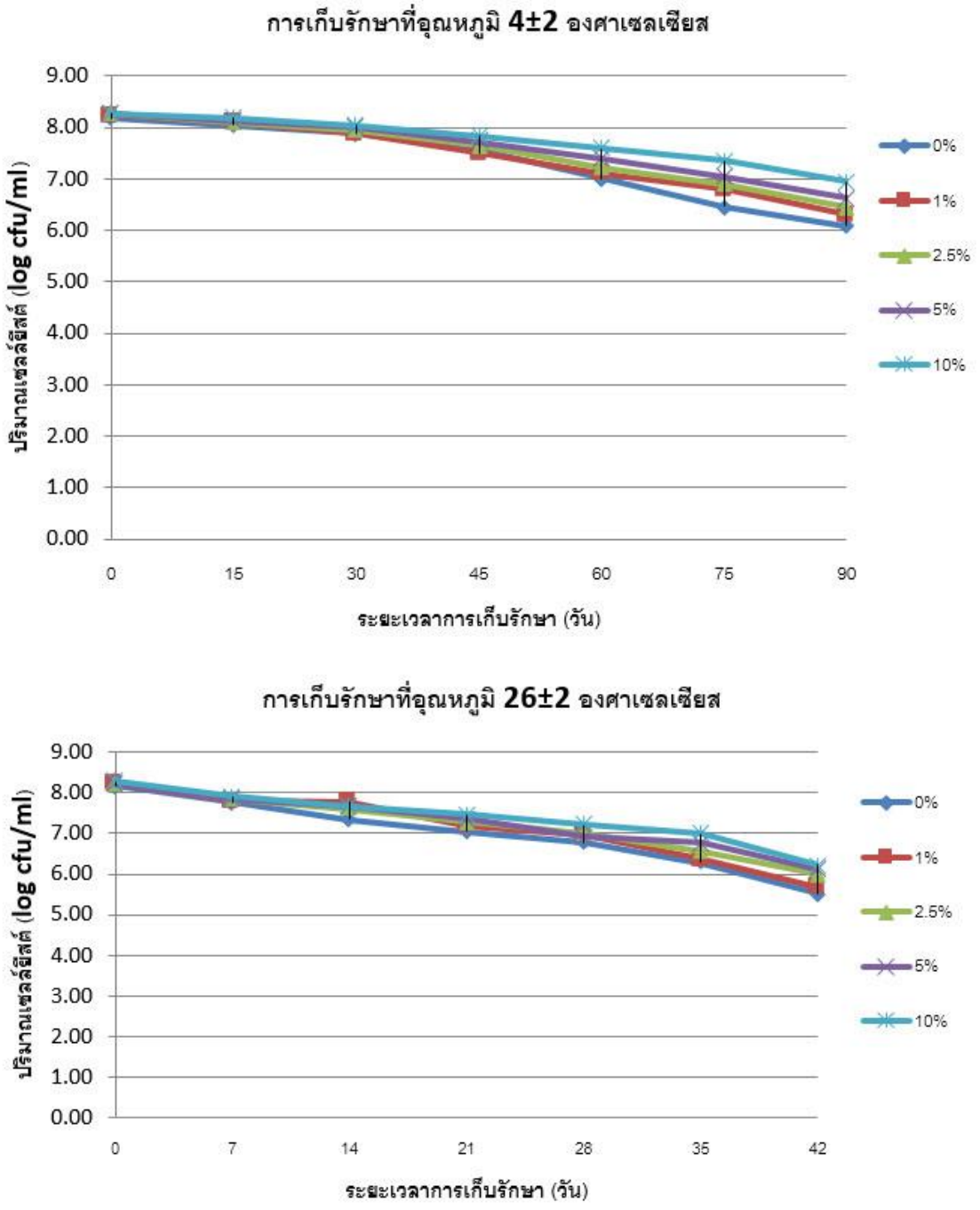
ระยะการเก็บรักษา (วัน)	ปริมาณเซลล์ยีสต์ (log cfu/ml) ในชีวภัณฑ์ยีสต์ในรูปแบบชนิดเหลว ที่มีน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้นต่างๆ				
	0%	1%	2.5%	5%	10%
0	$8.18 \pm 0.01^{a*D**}$	8.23 ± 0.01^{aC}	8.26 ± 0.01^{aC}	8.23 ± 0.00^{aB}	8.29 ± 0.01^{aA}
7	7.76 ± 0.01^{bD}	7.80 ± 0.01^{bC}	7.83 ± 0.03^{bBC}	7.86 ± 0.00^{bB}	7.91 ± 0.01^{bA}
14	7.34 ± 0.06^{cB}	7.60 ± 0.01^{cA}	7.61 ± 0.04^{cA}	7.65 ± 0.01^{cA}	7.68 ± 0.05^{cA}
21	7.04 ± 0.01^{dD}	7.19 ± 0.01^{dC}	7.28 ± 0.01^{dBC}	7.36 ± 0.01^{dB}	7.46 ± 0.08^{dA}
28	6.78 ± 0.05^{eC}	6.95 ± 0.02^{eB}	7.00 ± 0.01^{eB}	6.91 ± 0.04^{eB}	7.21 ± 0.01^{eA}
35	6.28 ± 0.01^{fD}	6.36 ± 0.03^{fD}	6.55 ± 0.08^{fC}	$6.76 \pm 0.0\,1^{fB}$	7.00 ± 0.01^{fA}
42	5.52 ± 0.08^{gE}	5.67 ± 0.04^{gD}	6.00 ± 0.00^{gC}	6.10 ± 0.00^{gB}	6.23 ± 0.01^{gA}

* ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรพิมพ์เล็กเดียวกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติโดย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)

** ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรพิมพ์ใหญ่เดียวกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติโดย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ linear regression ปริมาณเซลล์ยีสต์ในชีวภัณฑ์ยีสต์ *Issatchenkia orientalis* VCU24 ชนิดเหลว ที่มีการเติมน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้นต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส

ระดับน้ำตาลมอลโตส (%)	ค่าความชัน (Slope)	ระดับนัยสำคัญทางสถิติ (P)	R^2
0	- 0.059	0.00	0.974
1	- 0.057	0.00	0.967
2.5	- 0.051	0.00	0.983
5	- 0.048	0.00	0.977
10	- 0.043	0.00	0.948



ภาพที่ 7 ปริมาณเซลล์ยีสต์ในสารละลายชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ *Issatchenkia orientalis* VCU24 ชนิดเหลวที่มีน้ำตาลมอลโตส ความเข้มข้น 0 1 2.5 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบที่อุณหภูมิเก็บรักษา 4±2 องศาเซลเซียส และ 26±2 องศาเซลเซียส

2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ *Issatchenkia orientalis* VCU24 ชนิดเหลวในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

จากการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ *Issatchenkia orientalis* VCU24 ชนิดเหลวในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ พบว่าการใช้ชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์รูปแบบชนิดเหลวที่มีน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสซึ่งมียีสต์ความหนาแน่น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในมะม่วงได้ดีแม้ไม่เทียบเท่ากับการใช้เซลล์ยีสต์สด และพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อดีที่สุดเมื่อใช้สารเคมี

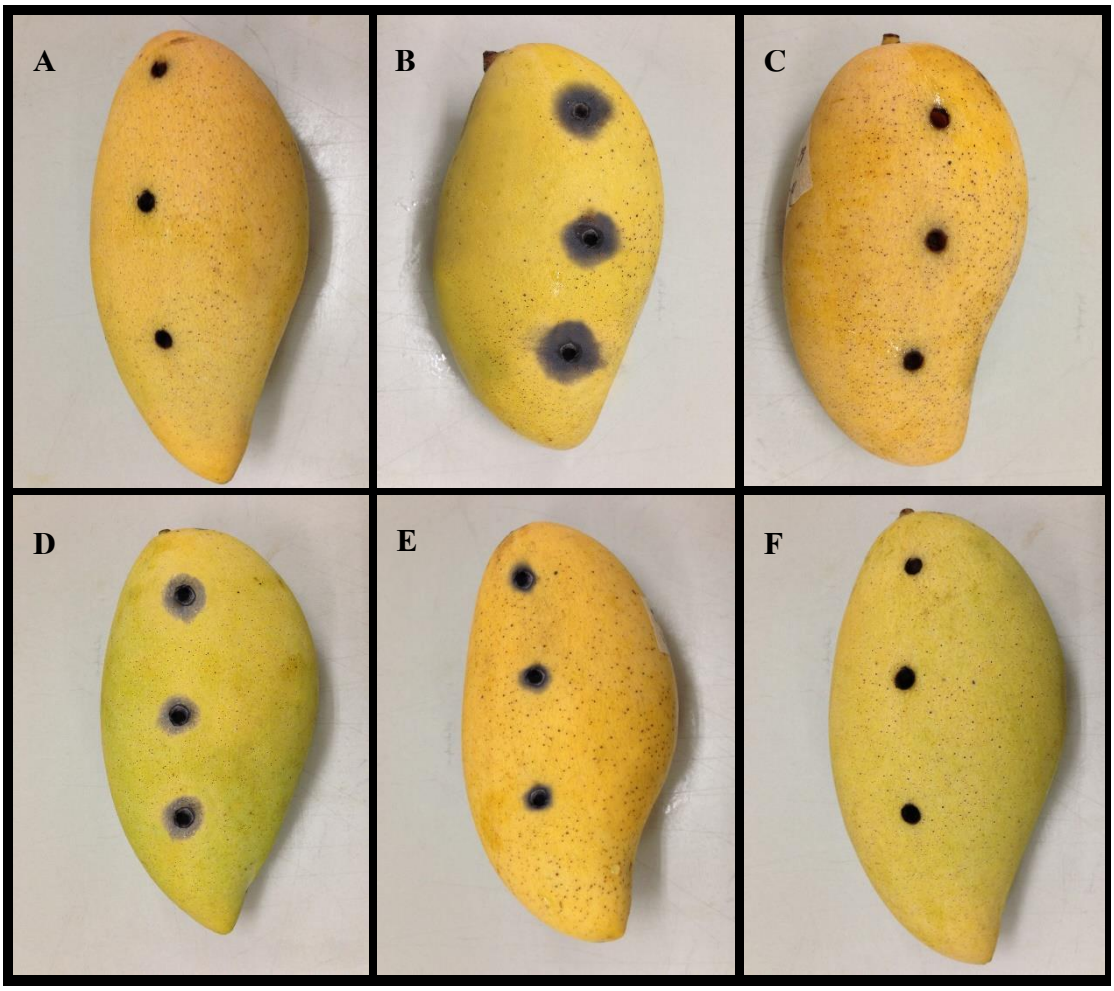
ตารางที่ 5 จำนวนโคโลนีราก่อโรค จำนวนโคโลนียีสต์ปฏิปักษ์ และเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยโรค

ชุดการทดสอบ	จำนวนโคโลนีเชื้อรา (log cfu/รอยแผล)	จำนวนโคโลนียีสต์ (log cfu/รอยแผล)	เส้นผ่านศูนย์กลางของรอยโรค (มิลลิเมตร)
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	0.00 ± 0.00^{d1}	0.00 ± 0.00^{c2}	0.00 ± 0.00^{d3}
รา	3.44 ± 0.02^{a1}	0.00 ± 0.00^{c2}	10.38 ± 0.53^{a3}
ชีวภัณฑ์ชนิดเหลว	0.00 ± 0.00^{d1}	5.74 ± 0.02^{a2}	0.00 ± 0.00^{d3}
รา + ชีวภัณฑ์ชนิดเหลว	2.92 ± 0.02^{b1}	5.52 ± 0.01^{b2}	2.88 ± 0.53^{b3}
รา + ยีสต์แขวนลอย	2.74 ± 0.03^{c1}	5.54 ± 0.01^{b2}	2.38 ± 0.18^{c3}
รา + สารเคมีคาร์เบนดาซิม	0.00 ± 0.00^{d1}	0.00 ± 0.00^{c2}	0.00 ± 0.00^{d3}

[1] ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีเชื้อราที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติโดย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)

[2] ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนียีสต์ที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติโดย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)

[3] ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางรอยโรคที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติโดย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)



ภาพที่ 8 ลักษณะรอยแผลการก่อโรคของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนผลมะม่วงตามกรรมวิธีต่างๆหลังบ่มเป็นเวลา 3 วัน

(A) รอยแผลที่ใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

(B) รอยแผลที่ใส่สปอร์แขวนลอยเชื้อรา *C. gloeosporioides*

(C) รอยแผลที่ใส่สารละลายยีสต์ชนิดเหลว

(D) รอยแผลที่ใส่สปอร์แขวนลอยเชื้อรา *C. gloeosporioides* และยีสต์ชนิดเหลว

(E) รอยแผลที่ใส่สปอร์แขวนลอยเชื้อรา *C. gloeosporioides* และเซลล์แขวนลอยยีสต์ปฏิปักษ์ *I. orientalis* VCU 24

(F) รอยแผลที่ใส่สปอร์แขวนลอยเชื้อรา *C. gloeosporioides* และสายละลายสารเคมีคาร์เบนดาซิม

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาอายุการเก็บรักษาชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ *Issatchenkia orientalis* VCU24 ในรูปแบบสูตรน้ำที่เตรียมจากเซลล์ปกติ พบจำนวนเซลล์ยีสต์รอดชีวิตมากที่สุดในสูตรชนิดเหลวที่มีน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส และเมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ *I. orientalis* VCU24 รูปแบบชนิดเหลวพบว่ามีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ไม่แตกต่างจากการใช้เซลล์ยีสต์สด

อภิปรายผลการทดลอง

มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เป็นมะม่วงชนิดรับประทานเมื่อผลสุกที่ได้รับความนิยมอย่างมากทั้งในประเทศและต่างประเทศ ซึ่งมีมูลค่าการส่งออกสูงและมีแนวโน้มจะสูงขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากมีกลิ่นหอม รวมไปถึงลักษณะเนื้อสัมผัสและรสชาติที่ดี (ปริยวรรณ ทรัพยสาร, 2551) แต่พบว่ามีปัญหาที่สำคัญภายหลังการเก็บเกี่ยวคือการเน่าเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ โดยสาเหตุหลักมาจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส (จุพาพันธุ์ รัตนนิล, 2554) โรคนี้ปรากฏให้เห็นได้ทั้งระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว โดยเชื้อราสามารถติดไปกับผลอ่อนในสภาพพักตัว และเจริญอย่างรวดเร็วเมื่อผลเริ่มสุก ทำให้เกิดจุดดำกระจายบนผล และขยายตัวออกกว้างเมื่อผลมะม่วงสุกและมีกลุ่มสปอร์สีชมพูหรือส้มเกิดบริเวณเนื้อเยื่อที่เน่าดำมาก ผลมะม่วงจะเหี่ยวและเน่าดำทั้งผลในเวลาต่อมา ปัจจุบันการควบคุมโรคนี้มักใช้สารเคมีในการป้องกันโรค โดยเฉพาะสารเคมีประเภทดูดซึม เช่น Carbendarzim, Benomyl และ Thiabendazole แต่เริ่มมีข้อจำกัดในบางประเทศ เนื่องจากมีสารพิษตกค้างเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ซึ่งในประเทศที่พัฒนามีการออกมาตรการควบคุมการใช้สารเคมี เช่นประเทศญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา (นิภาดา ประสมทอง, 2554) นอกจากนั้นเมื่อใช้สารเคมีไปนานๆ เชื้อราจะทนทานต่อสารเคมี และมีการกลายพันธุ์ ทำให้ไม่สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้ (รัมม์พัน โกศลานันท์, 2554) ดังนั้น การใช้วิธีการอื่นทดแทนการใช้สารเคมีเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจและมีความจำเป็น ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้าได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของยีสต์ *Issatchenkia orientalis* ในการป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสของผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว โดยจากผลการทดสอบการเลี้ยงเชื้อร่วมกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการพบว่า ยีสต์ปฏิปักษ์ *I. orientalis* VCU24 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และเมื่อ

ทดสอบบนผลมะม่วงได้ผลเช่นเดียวกัน คือสปอร์ของเชื้อราไม่สามารถงอกได้ และพบว่าส่วนผิวของสปอร์ที่มียีสต์เกาะติดอยู่มีลักษณะยุบตัวลง แสดงให้เห็นว่าสารระเหยบางชนิดที่ยีสต์สร้างและซึมแผ่ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลในทางลบต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อราอันเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส (จินันทนา จอมดวง และวิชชา สอาดสุด, 2555) ในการศึกษานี้ผู้วิจัยมีความสนใจในการพัฒนายีสต์ปฏิปักษ์เป็นชีวภัณฑ์ที่ง่ายต่อการใช้งานและมีอายุการเก็บรักษานานเพียงพอก่อนนำไปใช้งาน จากการศึกษาอายุการเก็บรักษาชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ *I. orientalis* VCU24 ในรูปแบบชนิดเหลวที่เตรียมจากเซลล์ยีสต์ปกติ พบว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส ให้จำนวนเซลล์รอดชีวิตมากกว่าที่ 26±2 องศาเซลเซียส ที่มีการลดลงของจำนวนเซลล์รอดชีวิตอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Melin *et al* (2011) ที่ได้ทำการเปรียบเทียบอายุการเก็บรักษายีสต์ปฏิปักษ์ *Pichia anomala* J121 สูตรน้ำที่ระหว่างอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสกับ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสให้จำนวนเซลล์ยีสต์มีชีวิตสูงกว่า ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบถึงผลของน้ำตาลมอลโตสในการเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บรักษาชีวภัณฑ์ ซึ่งทำการเติมน้ำตาลมอลโตสที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0 1 2.5 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนเซลล์ยีสต์มีชีวิตมากที่สุดภายหลังการเก็บรักษา ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่ทำการศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์ *Candida sake* ในรูปของยีสต์สูตรน้ำเมื่อมีการเติมสารปกป้องเซลล์ (protectant) ที่ต่างชนิด พบว่า น้ำตาลมอลโตสมีประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์เทียบเท่ากับ syrup และสูงกว่าน้ำตาลแลคโตส และศึกษาผลของความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์ โดยพบว่าเมื่อเติมสารปกป้องเซลล์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของจำนวนเซลล์ยีสต์ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ 3.3 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของจำนวนเซลล์ยีสต์เพียงประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (Torres *el al.,* 2003) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ *Issatchenkia orientalis* VCU24 ที่มีอายุการเก็บรักษาได้ดีที่สุดคือชีวภัณฑ์ที่มีการเติมน้ำตาลมอลโตสที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส โดยจากผลการทดลองพบว่าปริมาณเซลล์ยีสต์มีอยู่ 6.94 log cfu/ml ซึ่งคิดเป็นจำนวนเซลล์รอดชีวิต 83.8 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีการเติมกลีเซอรอลลงไปในสูตรน้ำนี้ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการรักษาความชื้น และช่วยลดการลดจำนวนของเซลล์ยีสต์ที่เกิดจากการลดลงของ water activity ระหว่างการเก็บรักษาอีกด้วย (Sriram *et al*., 2011)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ *I. orientalis* VCU24 รูปแบบชนิดเหลวในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ โดยนำชีวภัณฑ์ที่มีน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียสมาใช้ในการทดสอบ พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางรอยโรคของกรรมวิธีทดลองเชื้อราและชีวภัณฑ์ยีสต์รูปแบบสูตรน้ำมีขนาด

ลดลงเมื่อเทียบกับกรรมวิธีทดลองที่มีเพียงเชื้อราอย่างเดียว แสดงว่าชีวภัณฑ์ยีสต์ชนิดเหลวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส นอกจากนี้ยังพบว่ามีเส้นผ่านศูนย์กลางใกล้เคียงกับกรรมวิธีทดลองที่ใช้เชื้อราและยีสต์สด ซึ่งหมายความว่าชีวภัณฑ์ยีสต์รูปแบบชนิดเหลวมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากยีสต์สดอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามยังมีประสิทธิภาพยังคงน้อยกว่าการใช้สารเคมี ซึ่งไม่เกิดรอยโรคบนผลมะม่วงเลย

เอกสารอ้างอิง

เกศินี แก้วมาลา. 2551. *ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ Trichoderma* spp. *ต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองในระยะต้นอ่อน*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

จินันทนา จอมดวง และวิชชา สอาดสุด. (2555) การใช้ยีสต์ *Issatchenkia orientalis* เพื่อป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสของผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว. *วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ*, 35(1), 55-64.

จุพาพันธุ์ รัตนนิล, ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล และรชา เทพษร. (2554). ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ของฟิล์มบริโภคได้จากผงบุกผสมสารสกัดจากสมุนไพรไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 42, 196-199.

ชลิดา เล็กสมบูรณ์. (2554). *โรคพืชและการวินิจฉัย*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชานนท์ เพาะเจาะ. (2551). *การใช้สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดเปอร์ออกซีแอซีติกร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เพื่อการส่งออก*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมีบำบัด, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นิตยา โนคำ. (2552). *การควบคุมโรคแอนแทรคโนสของกล้วยโดยเชื้อราเอนโดไฟต์*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาโรคพืช, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

นิภาดา ประสมทอง, มาระตรี เปลี่ยนศิริชัย, ประภัสสร บุษหมั่น, วรภัทร ลัคนทินวงศ์, พิทักษ์ สิงห์ทองลา และมงคล วงศ์สวัสดิ์. (2554). ผลของไคซานต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 42, 228-231.

ปริญญา จันทรศรี, วิชชา สะอาดสุด, อุราภรณ์ สอาดสุด และรัฐพล พรประสิทธิ์. (2553). การลดการเจริญแบบแฝงและโรคแอนแทรคโนสเพื่อเพิ่มศักยภาพในการส่งออกของมะม่วงน้ำดอกไม้สีของอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 41(1), 307-310.

ปริญญา จันทรศรี. (2556). *มะม่วง การผลิตและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว*. เชียงใหม่: วนิดาการพิมพ์.

ปริยวรรณ ทรัพยสาร, หทัยทิพย์ นิมิตรเกียรติไกล, ชัยรัตน์ เตชวุฒิพร และเฉลิมชัย วงษ์อารี. (2551). การเปรียบเทียบการจุ่มน้ำร้อนและการอบไอน้ำร้อนต่อคุณภาพการสุกของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 39, 91-94.

พิสุทธิ์ เอกอำนวย. (2553). *โรคและแมลงศัตรูพืชที่สำคัญ* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: สวนสัตว์แมลงสยาม.

มโนรัตน์ สุดสงวน, ทิพา อัศวรักษ์, วัชระ จินตโกวิท และจิรวรรณ กมลศิลป์. (2550). *การศึกษาความสามารถของเชื้อราไตรโคเดอร์มาในการต้านทานเชื้อก่อโรคในผลพริก.* วันที่ค้นข้อมูล 26 พฤศจิกายน 2556, เข้าถึงได้จาก Conf.agi.nu.ac.th/nhc7/…/ab_NHC7_%20มะโนรัตน์_01.doc

รัชฎา แก่นสาร์. (2551). ชีวเคมี. กรุงเทพฯ : บริษัท ธราเพรส จำกัด.

รัมม์พัน โกศลานันท์ และวีรภรณ์ เดชนำบัญชาชัย. (2554). การรมเฮกซาแนลเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสของผลมะม่วง. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. 42, 129-132.

ศิริพร จงผาติวุฒิ. (2551). กลีเซอรอล ผลิตภัณฑ์พลอยได้จากไปโอดีเซล. *วารสารส่งเสริมเทคโนโลยี*. 35(198) : 70 – 76.

ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์. (2556). *ตลาดส่งออกสำคัญของไทย*. วันที่ค้นข้อมูล 26 พฤศจิกายน 2556, เข้าถึงได้จาก http://www.ops3.moc.go.th/infor/market_export.asp

สุกัญญา แซ่โจว. (2555). *การศึกษาสารสกัดหยาบจากผนังเซลล์ยีสต์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาโรคพืช, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์. (2552). การใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช. *เกษตรกรรมธรรมชาติ*, 12(9), 29-40

สรวงสรรค์ เนียมแจ้ง. (2549). *การคัดเลือกและเพิ่มประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคราสีเขียว (Penicillium digitatum) บนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาโรคพืช, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อภิตา บุญศิริ และจริงแท้ ศิริพานิช. (2550). *ส่งออกมะม่วงไปต่างประเทศทำอย่างไร*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Chan, Z., & Tian, S., (2005). Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. *Postharvest Biology and Technology*. 36, 215-223.

Chung, W. H., Chung, W. C., Peng, M. T., Yang, H. R., & Huang, J. W. (2010). Specific Detection of Benzimidazole Resistance in *Collectotrichum gloeosporioides* from Fruit Crops by PCR-RFLP. *New Biotechnology*, 27, 17-24.

Hernandez-Montiel, L. G., Ochoa, J. L., Troyo-Dieguez, E., & Larralde-Corona, C.P., (2010). Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. *Postharvest Biology and Technology* 56, 181-187.

Kalogiannis, S., Tjamos, S. E., Stergiou, A., Antoniou, P. P., Ziogas, B. N., & Tjamos, E.C., (2006). Selection and evaluation of phyllosphere yeasts as biocontrol agents against grey mold of tomato. *European Journal and Plant Pathology*. 116, 69-76.

Kamle, M., Kumar, P., Gupta,K. V., Tiwari, K. A., Misra, K. A., & Pandey, K. B. (2013). Identification and phylogenetic correlation among *Collectotrichum gloeosporioides* pathogen of anthracnose for mango. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 285-287.

Kongtragoul, P. (2011). *Detection and Control of Carbendazim-Resistant Colletotrichum* spp. *Causing Mango Anthracnose. Thesis Doctor of Philosophy*, Field of Plant Pathology, Faculty of Science, Chiang Mai University.

Lahlali, R. & Jijakli, M. H., (2009). Enhancement of the biocontrol agent *Candida oleophila* (strain O) survival and control efficiency under extreme conditions of water activity and relative humidity. *Biological Control.* 51, 403-408.

Liu, J., Tian, S. P., Li, B. Q., & Qin, G. Z., (2009). Enhancing viability of two biocontrol yeasts in liquid formulation by applying sugar protectant combined with antioxidant. *Biological Control*. 54, 817-824.

Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Tian, S., Hershkovitz, V., & Tworkoski, T., (2011). Effect of heat shock treatment on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Metschnikowia fructicola. FEMS Microbiology Ecology*. 76, 145-155.

Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y., (2013). Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*. 167, 153-160.

Long, C. A., Zheng, W., & Deng, B.X., (2005). Biological control of *Penicillium italicum* of citrus and *Botrytis cinerea* of grape by strain 34-9 of *Kloeckera apiculata*. *European Food Research and Technology*. 211, 197-201.

Macarisin, D., Droby, S., Bauchan, G., & Wisniewski, M., (2010). Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist-fruit interaction: a new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol?. *Postharvest Biology and Technology*. 58, 194-202.

McGuire, R. G., (2000). Population dynamics of postharvest decay antagonists growing Epiphytically and within wounds on grapefruit. *Biological Control.* 90, 1217-1223.

Melin, P., Hakansson, S., & Schnurer, J., (2007). Optimisation and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73, 1008-1016.

Melin, P., Schnurer, J., & Hakansson, S., (2011). Formulation of the biocontrol yeast *Pichia anomala*. *Antonie van Leewenhoek*. 99, 107-112.

Nally, M. C., Pesce, V. M., Maturano, Y. P., Toro, M. E., Combina, M., Castellanos, L. I., & Vazquez, F., (2013). Biocontrol of fungi isolated from sour rot infected table grapes by *Saccharomyces* and other yeast species. *Postharvest Biology and Technology*. 86, 456-462.

Saravanakumar, D., Ciavorella, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. I., (2008). *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea, Alternaria alternate* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biology and Technology*. 49, 121-128.

Scherm, B., Ortu, G., Muzzu, A., Budroni, M., Arras, G., & Migheli, Q., (2003). Biocontrol activity of antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple. *Journal of Plant Pathology*. 85, 1-9.

Sriram, S., Roopa, P. K., & Savitha, J. M., (2011). Extended shelf-life of liquid fermentation derived talc formulations of *Trichoderma harzianum* with the addition of glycerol in the production medium. *Crop Protection*. 30, 1334-1339.

Torres, R., Usall, J., Teixido, N., Abadias, M., & Vinas, I., (2003). Liquid formulation of the

Biocontrol agent *Candida sake* by modifying water activity or adding protectants. *Journal of Applied Microbiology*. 94, 330-339.

Vero, S., Garmendia, G., Gonzalez, M. B., Bentancur, O., & Wisniewski, M., (2013). Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malus* x *domestica*). *FEMS Yeast Research*. 13, 189-199.

Wang, Y., Wang, P., Xia, J., Yu, T., Luo, B,. Wang, J., & Zheng, X., (2010). Effect of water activity on stress tolerance and biocontrol activity in antagonistic yeast *Rhodosporidium paludigenum*. *International Journal of Food Microbiology*. 143, 103-108

Xu, B., Zhang, H., Chen, K., Xu, Q., Yao, Y., & Gao, H., (2013). Biocontrol of postharvest *Rhizopus* decay of peaches with *Pichia caribbica*. *Current Microbiology*. 67, 255-261.

Xu, X., Qin, G., & Tian, S., (2008). Effect of microbial biocontrol agents on alleviating oxidative Damage of peach fruit subjected to fungal pathogen. *International Journal of Food Microbiology*. 126, 153-158.

ผลผลิต (Output) ที่เกิดขึ้นในช่วงที่รับทุน

1) บทความวิจัย

อนุเทพ ภาสุระ และ พรสุพพัตถ์ บุตรน้ำเพ็ชร. 2561. อายุการเก็บรักษาและประสิทธิภาพการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงด้วยยีสต์ *Issatchenkia orientalis* VCU24 ในรูปของชนิดเหลวที่เตรียมจากเซลล์ยีสต์ปกติ. รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 10” มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม.

2) อนุสิทธิบัตร/สิทธิบัตร – เรื่อง

3) หนังสือ จำนวน – เล่ม

4) สื่อการเรียนการสอน จำนวน 2 เรื่อง เป็นบทปฏิบัติการในรายวิชา 305473 จุลชีววิทยาของโรคพืช (Microbiology of Plant Pathology) ได้แก่

เรื่องที่ 1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคพืช

เรื่องที่ 2 การผลิตและทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ควบคุมเชื้อก่อโรคพืช

5) การเผยแพร่ผลงานในสิ่งพิมพ์ต่าง ๆ เช่น หนังสือพิมพ์ นิตยสาร เป็นต้น

กำลังเตรียมบทความวิทยุรายการวิทยาศาสตร์เพื่อประชาชนจำนวน 1 เรื่องในบทความชื่อ “ยีสต์ปฏิปักษ์ควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงส่งออก” เพื่อออกอากาศในสถานีวิทยุทั่วประเทศกว่า 53 สถานี

6) ผลงานวิชาการที่ถ่ายทอดสู่สังคม ภาคการผลิตหรือภาคบริการ ซึ่งส่งผลให้เกิดประโยชน์เชิงประจักษ์ จำนวน 1 เรื่องในรูปแบบของบทความที่กำลังเตรียมบทความวิทยุรายการวิทยาศาสตร์เพื่อประชาชนจำนวน 1 เรื่องในบทความชื่อ “ยีสต์ปฏิปักษ์ควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงส่งออก” เพื่อออกอากาศในสถานีวิทยุทั่วประเทศกว่า 53 สถานี

รายงานสรุปการเงิน ประจำปีงบประมาณ ๒๕๖๐
เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRPM 13 หลัก) 2560A10802054 สัญญาเลขที่ ๘๖/๒๕๕๙
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐
มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์ *Issatchenkia orientalis* VCU24 รูปแบบสูตรน้ำสำหรับการควบคุมทางชีวภาพโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร. อนุเทพ ภาสุระ
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2559 **ถึงวันที่** 30 กันยายน 2560
ระยะเวลาดำเนินการ จำนวน ....1....ปี ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2559 **ถึงวันที่** 30 กันยายน 2560

<u>รายรับ</u>

จำนวนงบประมาณที่ได้รับ

- งวดที่ 1 (50%) จำนวน ……70,400……บาท เมื่อวันที่
- งวดที่ 2 (40%) จำนวน ……56,320……บาท เมื่อวันที่
- งวดที่ 3 (10%) จำนวน ……..…14,080…...บาท เมื่อวันที่

รวม ……140,800……บาท

<u>รายจ่าย</u>

หมวด	งบประมาณรวมทั้งโครงการ(บาท)	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน(บาท)	คงเหลือ(หรือเกิน)(บาท)
1. ค่าตอบแทน	15,600	15,600	0
2. ค่าจ้าง	9,600	9,600	0
3. ค่าวัสดุ	98,000	98,300	-300
4. ค่าใช้สอย	4,520	4,520	0
5. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ (ค่าสาธารณูปโภค)	14,080	14,080	0
รวม	140,800	141,100	-300

(นายอนุเทพ ภาสุระ)
หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน