ระดับความเข้มข้นของไคโตซานที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อราปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
Effect of Chitosan on Inhibition Fungi Contaminated in Plant Tissue Culture Medium

เดือนเพ็ญ อาจไธสง[1*] อมรพันธ์ แก้วศรีนวล[1] รัชณี อ้าวลึกน้อย[1] และน้ำค้าง กุลหมาด[1]
[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช (ไสใหญ่)
อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช 80110
E-mail: biotg7@yahoo.com

บทคัดย่อ

การคัดแยกเชื้อราปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบการปนเปื้อนของเชื้อรา 3 ชนิด คือ เชื้อราสีขาว (WRU111) เชื้อราสีน้ำตาล (BRU112) และเชื้อราสีเขียว (GRU113) เมื่อนำสารละลายไคโตซานมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรเอ็มเอสที่เติมสารละลายไคโตซาน ในระดับความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สารละลายไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา WRU111 และเชื้อรา GRU113 ได้ดีที่สุด ในขณะที่เชื้อรา BRU112 ถูกยับยั้งได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราเชื้อรา WRU111 เชื้อรา BRU112 และเชื้อรา GRU113 ในปริมาณที่สูง คือ 17.71 , 33.02 , และ 15.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

คำสำคัญ: ไคโตซาน การยับยั้งเชื้อรา การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Abstract

The result showed that the MS medium was contaminated by 3 kinds of fungus plant tissue culture : white fungus (WRU111), brown fungus (BRU112), and green fungus (GRU113). The Chitosan was tested for the effectiveness of microbial inhibition in MS medium with 0.1, 0.3, 0.5, and 1% chitosan. The results were found that 1% chitosan could inhibit WRU111 and GRU113. However, BRU112 could be inhibited by 0.3% chitosan. It showed that WRU111 BRU112 and GRU113 of were inhibited by 0.5% chitosan at 17.71, 33.02 and 15.42% respectively.

Keywords: chitosan inhibition mold tissue culture

1. บทนำ

เทคโนโลยีการขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันนี้ แต่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เป็นปัญหาหลักที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ก่อให้เกิดความเสียหายหลายประการ เช่น เกิดการแย่งอาหารระหว่างเชื้อจุลินทรีย์และต้นพืช ทำให้ชิ้นส่วนพืชเน่าเสีย ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและเสียเวลาในการเตรียมอาหารใหม่ ในปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้าวิจัยและพบว่าสารไคโตซานเป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่ได้จากเปลือกกุ้ง ปู แกนหมึก เชื้อรา และแมลงหลายชนิด สารไคโตซานสามารถเข้าสู่เซลล์ของเชื้อรา ซึ่งมีผลยับยั้งการสร้างและการสะสม RNA ที่เป็นแหล่งผลิตสารพันธุกรรมของเชื้อรา ทำให้เชื้อราถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้สารไคโตซานยังช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของรากและยอดในพืชหลายชนิด เช่น การฉีดพ่นไคโตซานที่รากกล้วยไม้มีเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต กระตุ้นการออกดอก เพิ่มความสามารถในการต้านทานเชื้อราและไวรัสได้ [1] มีการศึกษาผลของไคโตซานในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยเติมไคโตซานที่อยู่ในรูปของสารละลายชื่อ chitogel ลงในอาหารเพาะเลี้ยงองุ่น (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) ส่งผลให้องุ่นในหลอดทดลองเจริญเติบโตได้ดีกว่าชุดควบคุม และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis cinerea* ได้อีกด้วย [2] ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาหาระดับความเข้มข้นของไคโตซานที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อราในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อราในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื้อ และใช้เป็นแนวทางสำหรับการศึกษาผลของไคโตซานต่อการสร้างภูมิต้านทานโรคที่มีสาเหตุจากจุลินทรีย์ การต้านทานเชื้อราบางชนิดที่ทำให้เกิดโรครากเน่า โคนเน่าในพืช และเป็นตัวกระตุ้นให้พืชสร้างสารป้องกันตัวเอง เป็นต้น

2. วัตถุประสงค์

2.1 ศึกษาเชื้อราที่ปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.2 ศึกษาระดับความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อราปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3. วิธีดำเนินงาน

3.1. การเตรียมสารละลายไคโตซานจากเปลือกกุ้งเหลือทิ้งในตลาดสด อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช โดยวิธีการทางเคมีซึ่งดัดแปลงจาก [3] แล้วนำมาเตรียมเป็นสารละลายไคโตซาน โดยชั่งผงไคโตซาน 3 กรัม ละลายในกรดแอซิติกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สำหรับเป็นสารละลายเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายไคโตซาน ให้มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.6 นำมาหาความเข้มข้นของไคโตซาน โดยวิธี Phenol-sulfuric method [4]

3.2. การคัดเลือกและแยกเชื้อราที่ปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อรา แล้วเลือกชนิดของเชื้อราที่พบความถี่ของการปนเปื้อนมากที่สุด 3 ชนิด เขี่ยเส้นใยเชื้อราในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาเลี้ยงลงบนอาหารพีดีเอ แล้วทำการแยกเชื้อราจากจานเดิมอีกครั้ง ทำเช่นนี้จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ และเก็บรักษาไว้ในหลอดที่มีอาหารพีดีเอผิวหน้าเอียง เพื่อใช้ในการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อราต่อไป

3.3. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อรา

เลี้ยงเชื้อราในจานเพาะเชื้อให้เจริญบนอาหารพีดีเอ และวัดอัตราการเจริญเติบโตทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน หรือจนเส้นใยเจริญเต็มจานเพาะเชื้อ แล้วนำเชื้อราที่แยกได้ มาดูลักษณะเส้นใย

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยวิธี mount slide ด้วยการย้อมน้ำยา Lactophenol cotton blue ถ่ายภาพและบันทึกผล ตามการอ้างอิงหนังสือของ[5], [6] และ [7]

3.4 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของไคโตซานที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตรเอ็มเอช โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ในแต่ละชุดการทดลอง (ยกเว้นชุดควบคุม) ผสมสารละลายไคโตซานในอาหารสูตรเอ็มเอช ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1, 0.3, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำเชื้อราที่แยกได้ มาเลี้ยงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารพีดีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยโดยใช้ค็อกบอเรอร์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร มาวางลงบนอาหารของชุดการทดลองแต่ละชุด บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญเติบโตและบันทึกผลทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในจานเพาะเชื้อที่มีเข้มข้นของสารละลายไคโตซานเปรียบเทียบกับจานควบคุม เพื่อหาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราของไคโตซานในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากสูตร ดังนี้

$$\text{ประสิทธิภาพการยับยั้ง (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{A1 - A2}{A1} \times 100$$

A1 = ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในชุดควบคุม

A2 = ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา ที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีความเข้มข้นของสารละลายไคโตซาน [8]

การวิเคราะห์ทางสถิติใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างค่าเฉลี่ยของชุดทดลอง (Analysis of variance; ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม R วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ

4. ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การเตรียมสารละลายไคโตซาน

การเตรียมวัตถุดิบจากเปลือกกุ้งเหลือทิ้ง ซึ่งยังไม่ผ่านกระบวนการสกัด แต่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และนำไปบดด้วยเครื่องบด จะได้เปลือกกุ้งที่มีลักษณะเป็นเกร็ด หยาบ สีน้ำตาล มีขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตร ดังแสดงในภาพที่ 1 ก

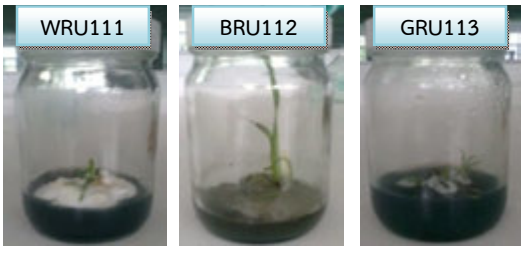
ภาพที่ 1 ลักษณะเปลือกกุ้งที่ผ่านกระบวนการผลิตไคโตซาน

จากนั้นนำเปลือกกุ้งที่บดแล้วมาร่อนด้วยตะแกรงที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร การสกัดไคตินจากเปลือกกุ้งปริมาณ 100 กรัม โดยผ่านการกำจัดแคลเซียมด้วยสารละลายกรดไฮโดรคอริก ความเข้มข้น 1โมลาร์ และกำจัดโปรตีนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ได้ผงไคตินที่มีลักษณะเป็นเกร็ด สีน้ำตาลอ่อน ขนาดน้อยกว่า 2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 1 ข) ปริมาณผงไคตินที่ได้ เท่ากับ 39 กรัม

จากภาพที่ 1 ค แสดงลักษณะผงไคโตซานซึ่งผ่านการกำจัดหมู่อะซิทิลด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ จะได้ ผงไคโตซานที่มีลักษณะเป็นเกร็ด สีชมพูอ่อน ขนาดน้อยกว่า 2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3) โดยใช้ผงไคตินจำนวน 39 กรัม ให้ปริมาณผงไคโตซาน เท่ากับ 20 กรัม คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ ของเปลือกกุ้งทั้งหมดที่นำมาสกัด ซึ่งปริมาณของไคตินและไคโตซานที่ได้ขึ้นอยู่กับกระบวนการสกัด และรวมถึงโครงสร้างของสัตว์ที่มีการสะสมไคติน แร่ธาตุ โปรตีน และสารประกอบอื่นๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน

4.2 การแยกและคัดเลือกเชื้อราที่ปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

จากการคัดเลือกเชื้อราปนเปื้อน 3 ชนิด ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านเพชรหึง จากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบการปนเปื้อนของเชื้อราสีขาว รหัส WRU111, เชื้อราสีน้ำตาล รหัส BRU112 และเชื้อราสีเขียว รหัส GRU113 ซึ่งพบว่าเชื้อรารหัส WRU111 เกิดการปนเปื้อนในช่วง 1 เดือนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เมื่อเกิดการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าว ทำให้พืชหยุดการเจริญเติบโต ส่วนเชื้อรา รหัส BRU112 และรหัส GRU113 จะเกิดการปนเปื้อนในช่วง 6 เดือนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เมื่อเกิดปนเปื้อนของเชื้อทั้งสองชนิดนี้ ทำให้พืชหยุดการเจริญเติบโตเช่นกัน (ภาพที่ 2) การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เป็นปัญหาที่พบได้บ่อย อาจมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่มีในอากาศตกลงไปในระหว่างการปฏิบัติงาน จากการศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นชนิดเดียวกับที่พบในบริเวณโต๊ะ ผนังห้องปฏิบัติการ อาคารภายในห้องปฏิบัติการและถุงมือ ถ้าอนุภาคของเชื้อราเหล่านั้นตกลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อก็จะแสดงอาการปนเปื้อน เพราะอนุภาคของเชื้อราเหล่านั้นสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และจะปรากฏกลุ่มโคโลนีอย่างชัดเจน [9]



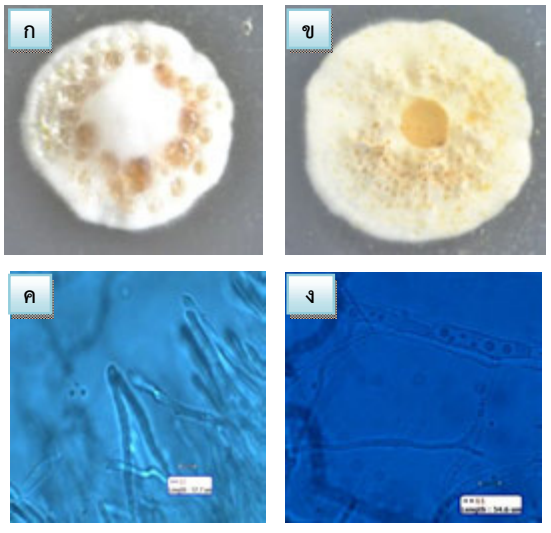
ภาพที่ 2 ลักษณะของเชื้อราที่เจริญในขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

4.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อรา

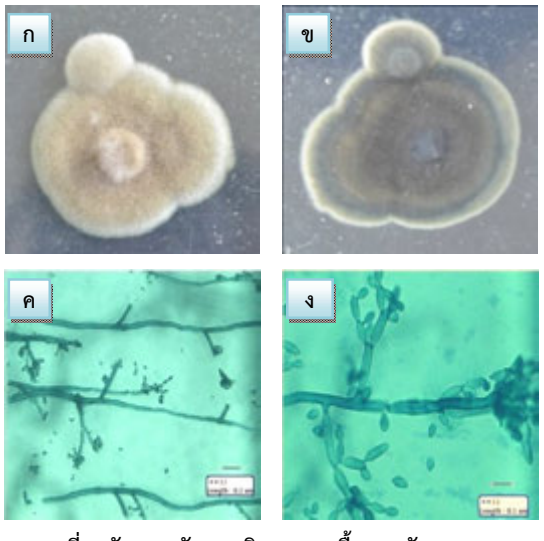
ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อรา รหัส WRU111 ที่เลี้ยงบนอาหารพีดีเอหลังการเพาะเลี้ยง 5 วัน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนีด้านบนมีสีขาว ลักษณะด้านล่างโคโลนีที่ติดกับอาหารเป็นสีขาวเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 3 ข) ลักษณะผิวโคโลนีคล้ายกำมะหยี่ สร้างหยดน้ำบนโคโลนีส่วนบริเวณใต้หยดน้ำ มีเม็ดสีน้ำตาลอ่อน ๆ ขนาดเล็กเกาะอยู่ ดังภาพที่ 3 ก ลักษณะเส้นใยของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเส้นใยมีผนังกั้น เชื้อรามีเส้นใยสีขาวเกาะกันแน่น ไม่สร้างสปอร์เรนเจียม (sporangium)

ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อรา รหัส BRU112 ที่เลี้ยงบนอาหารพีดีเอหลังการเพาะเลี้ยง 5 วัน ลักษณะการเจริญด้านบนอาหารแข็งที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร สีของโคโลนีบนอาหารมีสีเขียวมะกอกจนถึงสีดำ ลักษณะผิวของโคโลนีคล้ายกำมะหยี่ ลักษณะแบบโคโลนีเรียบ (ภาพที่ 4 ก) ลักษณะด้านล่างของโคโลนีเป็นสีดำสลับกับสีน้ำตาล บริเวณขอบโคโลนีสีขาว (ภาพที่ 4 ข) ส่วนลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบว่า เส้นใยมีผนังกั้นตามขวาง รูปร่างคล้ายการแตกออกของต้นไม้ (ภาพที่ 4 ค) มีโคนิดิโอฟอร์สั้นตรงขึ้นมาจากฐาน สปอร์มีสีน้ำตาลเข้ม ผลิตต่อกันเป็นลูกโซ่ที่แตกแขนง (ภาพที่ 4 ง) ลักษณะของเชื้อราดังกล่าว มักพบในพืชผักที่แช่เย็นหรือแช่แข็ง ที่มีอุณหภูมิต่ำ เช่นเดียวกับห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เชื้อราชนิดนี้จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย

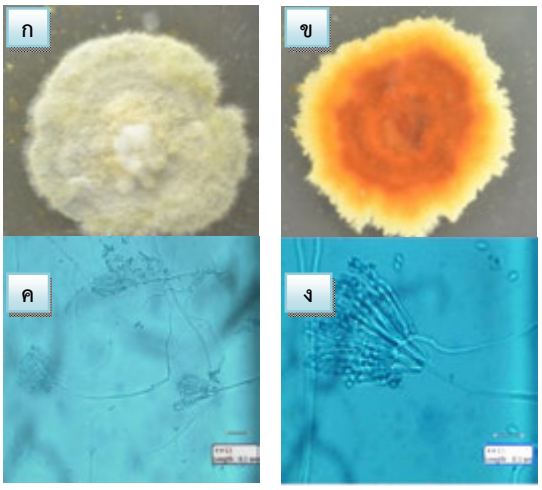
ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อรา รหัส GRU113 ที่เลี้ยงบนอาหารพีดีเอ มีการเจริญด้านบนอาหารมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร หลังการเพาะเลี้ยง 5 วัน โคโลนีของเชื้อรามีสีเขียวขี้ม้าปนเหลืองลักษณะผิวของโคโลนีฟูเล็กน้อย ขอบโคโลนีหยัก (ภาพที่ 5 ก) ส่วนลักษณะด้านล่างของโคโลนีเป็นสีส้มเข้ม



ภาพที่ 3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา รหัส WRU111



ภาพที่ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา รหัส BRU112



ภาพที่ 5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราหัส GRU113

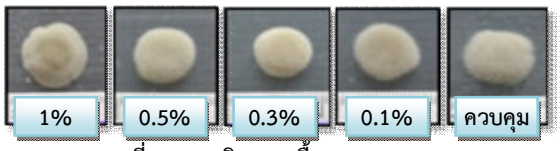
บริเวณขอบโคโลนีมีสีเหลืองอ่อน (ภาพที่ 5 ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า เป็นเชื้อราที่มีผนังกั้นตามขวาง ไม่มีฟุทเซลล์ (foot cells) บริเวณเกือบจะถึงยอดจะมีการแตกแขนงออกมาในลักษณะไม้กวาด (brush-like) เพื่อเป็นฐานรองรับโคนิเดียที่จะถูกสร้างอยู่บนฟิไลด์ (phialides) โคนิเดียมีสีเขียว รูปร่างกลมหรือรูปไข่ (ภาพที่ 5 ง) ซึ่งเชื้อราลักษณะดังกล่าว สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วมากที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส และเจริญเติบโตได้ช้าเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส แสดงว่า เชื้อราชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

4.4 ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของไคโตซานที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้

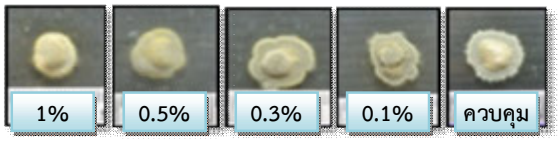
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้ง 3 ชนิดลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรเอ็มเอช ที่มีสารละลายไคโตซานในระดับความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราทุกวัน และคำนวณหาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา พบว่า ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา รหัส WRU111 (ภาพที่ 6) ที่ระดับความเข้มข้นของ ไคโตซาน 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งสูงที่สุด คือ 21.04 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ประสิทธิภาพการยับยั้ง 2.76, 14.95 และ 17.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา รหัส BRU112 (ภาพที่ 7) พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของไคโตซาน 0.3 เปอร์เซ็นต์ ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงที่สุด คือ 18.62 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) ขณะที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ประสิทธิภาพการยับยั้ง 13.78 และ 15.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ที่ระดับความเข้มข้นของไคโตซาน 1 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเพราะค่าที่ได้ คือ -1.11 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้จากการศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานขึ้นอยู่กับชนิด และระยะการเจริญเติบโตของเชื้อรา การงอกของสปอร์ และการเจริญเติบโตของเส้นใยด้วย ส่วนประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา รหัส GRU113 (ภาพที่ 8) พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของไคโตซาน 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงที่สุด คือ 40.45

เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 0.3 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีประสิทธิภาพการยับยั้งเท่ากับ 33.02, 22.82 และ 21.61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ภาพที่ 6 การเจริญของเชื้อรา WRU 111

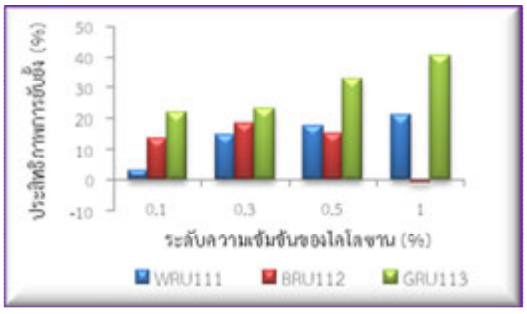


ภาพที่ 7 การเจริญของเชื้อรา BRU 112



ภาพที่ 8 การเจริญของเชื้อรา GRU 113

จากประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ชนิด เห็นได้ว่าสารละลายไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา รหัส GRU113 ได้ดีที่สุดในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ คือ ไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อรา รหัส WRU111 ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อรา อยู่ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันโดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ [10] พบว่า การเคลือบผิวสตรอเบอรี่ด้วยไคโตซาน 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดการเกิดโรคจากเชื้อ *Botrytis cinerea* และ *Rhizopus stolonifer* ได้ และไคโตซาน1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีผลในการยับยั้งการงอกสปอร์และการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ในขณะที่เชื้อรา รหัส BRU112 ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้ง คือไคโตซานระดับความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา รหัส BRU112 ได้เลย ดังภาพที่ 9 ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้ในปริมาณสูง อยู่ในช่วง 15.42-33.02 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณ ไคโตซาน 765 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการยับยังเชื้อราสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและสอดคล้องกับงานวิจัยของ [11] ซึ่งศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporoides* ที่ปลูกเชื้อบนผลมะม่วง พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 800 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 สามารถยับยั้งการงอกสปอร์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 9 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา 3 ชนิด

5. สรุป และข้อเสนอแนะ

จากการนำเปลือกกุ้งบดมาสกัดไคโตซาน พบว่าเปลือกกุ้งบดปริมาณ 100 กรัม ให้ผลิตภัณฑ์ไคโตซานเท่ากับ 20 กรัม เมื่อทำเป็นสารละลายที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และวัดระดับน้ำตาลในสารละลายไคโตซาน ปรากฏว่า ในสารละลายไคโตซานมีระดับน้ำตาลเท่ากับ 1.53 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อคัดแยกเชื้อราในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้เชื้อที่พบการปนเปื้อนสูงสุด 3 ชนิด คือ เชื้อรารหัส WRU111 มีลักษณะโคโลนีสีขาวถึงสีเทาอ่อนๆ สร้างหยดน้ำบนโคโลนี เชื้อรารหัส BRU112 มีลักษณะโคโลนีสีเขียวมะกอกจนถึงสีดำ เส้นใยมีผนังกั้นตามขวาง รูปร่างคล้ายการแตกออกของต้นไม้ และเชื้อรารหัส GRU113 มีลักษณะโคโลนีสีเขียวปนเหลือง การสร้างสปอร์มีการแตกแขนงออกมาในลักษณะไม้กวาด การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของไคโตซานที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราของไคโตซาน ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรารหัส WRU111 และ GRU113 ได้ดีที่สุด ประสิทธิภาพการยับยั้งอยู่ที่ 21.05 และ 40.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเชื้อรารหัส BRU112 ระดับความเข้มข้นของโคโตซาน 0.3 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด มีประสิทธิภาพการยับยั้งอยู่ที่ 18.62 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ระดับความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้ดี ที่ระดับประสิทธิภาพการยับยั้งอยู่ในช่วง 14.95-22.82 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้ประสิทธิภาพสารละลายไคโตซานมีผลมากขึ้น ควรบดให้ละเอียดมาก ๆ หรือเตรียมในรูปโอลิโกเมอร์ซึ่งมีโมเลกุลเล็กสามารถเกิดปฏิกิริยาและดูดซับได้เร็วกว่าโมเลกุลใหญ่ จากผลการศึกษานี้ควรมีการศึกษาที่ระดับความเข้มข้นมากขึ้นอีก เพื่อให้ทราบแน่ชัดว่าความเข้มข้นที่ดีที่สุดซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อราได้มากสุดอยู่ในระดับความเข้มข้นเท่าไร

6. กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช (ไสใหญ่) คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี โดยงบประมาณของโครงการวิจัยด้วยงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2556

7. การอ้างอิง

[1] Chandrkrachang, S. 2002. The applications of chitin and chitosan in agriculture in Thailand. 458-462. *In*: Suchiva, K., S. Chandrkrachang. P. Methacanon and M.G. Peter (ed). advances in chitin science. vol. 5. Bangkok.

[2] Barka, E.A., Eullaffroy, P., Clement, C. and Vernet, g. 2004. Chitosan improves development and protect *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. Plant cell *Rep*.22:608-614.

[3] วรรณรัตน์ อุ่นสนธิ์ และ อรสา วงศ์คำจันทร์. 2547. การศึกษาผลของไคโตซานที่มีต่อการคงสภาพของมะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

[4] Dobois, M., K.A. Gilles, J.K., Hamilton, P.A. Robers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for delermination of sugers and related substances. Analytical Chemistry. 28 (3): 350-356.

[5] Cooney, D.G. and R. Emerson 1964. Thermophilic fungi. W.H. Freeman and Company, London. 188.

[6] Samson, R.A., E.S. Hoekstra and C.A.N. Oorschot van. 1984. Introduction of food born fungi. Institute of the Royal Netherlands. Netherlands.

[7] Domsch, H.H., W. Gams and T. Anderson. 1993. Compendium of soil fungi. IWH –Verlag, Germany.

[8] จุฑารัตน์ ทิมแสง และ พรทิพย์ รอดพลอย. 2546. งานวิจัยการศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรที่ มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *Fusarium oxysporum* และ *Collectotrichum gloeosporioides*. สถาบันราชภัฏนครปฐม.

[9] Odutago O.I., N.A. Amusa., O.O. Kutade and Y.R. Ogunsonwo. 2007. Determination of the Sources of Microbial Contamination of Culture Plant Tissue. Plant Pathology Journal. 6(1) : 77-81.

[10] El-Ghaouth, A., J. Arul, R. Ponnampalam and M. Boulet. 1991. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. Journal of Food Science. 56 : 1618-1620.

[11] ธวัช หะหมาน และสมศิริ แสงโชติ. 2546. ผลของไคโตแซนต่อการเกิดโรคแอนแทรคโนสของผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 34(4-6): 49-52 น.