ผลของน้ำอิเล็กโทรไลต์แบบฟองไมโครต่อการเจริญของเชื้อ *Penicillium digitatum* แบบแขวนลอย

Effect of Electrolyzed Water with Microbubbles on the Growth of *Penicillium digitatum* in Suspension

สุมีซัย กิ่งสวรรค์[1] **และ กานดา หวังชัย** [1,2]

Soumeexay Kingsavanh [1] and Kanda Whangchai [1,2]

Abstract

Effect of electrolyzed water with microbubbles on the growth of *Penicillium digitatum* was investigated. Electrolyzed water was generated from NaCl solution (5% NaCl) by electrolysis cell with negatively-and positively-charged titanium electodes. The electrode was subjected to direct power source at 8 A and 8 volt for 60 minutes and oxidation-reduction potential (ORP) and pH were measured at initial value of 225mV and 3.39, respectively. The generated electrolyzed water was adjusted for total free chlorine concentration at 100 ppm. The spore suspension of *P. digitatum* (10^5 conidia/ml) was added into electrolyzed water with microbubbles system which had bubble size between 40-100μm and incubated for 5, 10 and 15 minutes. Then, 1 ml of the mixture was spread on PDA culture media and incubated at 28+2°C for 72 hours. The survival of the fungus was expressed as the mean number of colony forming unit (CFU/ml). From this experiment, it was found that electrolyzed water with microbubbles and exposure time for 5 minutes exhibited the most effectiveness to inhibit the growth of *P. digitatum* when compared to microbubbles only and the control (distilled water). However, the inhibitory effect of electrolyzed water with microbubbles decreased when the reaction time was increased according to ORP decreasing. Besides, microscopic observation with compound microscope revealed the presence of abnormal mycelia of *P. digitatum* after microbubbles electrolyzed water treatment.

Keywords: Electrolyzed water, *Penicillium digitatum*, Microbubbles

บทคัดย่อ

ผลการศึกษาการใช้น้ำอิเล็กโทรไลต์แบบฟองไมโครต่อการยับยั้งการเจริญของ *Penicillium digitatum* โดยการผลิตน้ำอิเล็กโทรไลต์จากสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยหลักการแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้าที่ใช้ขั้วบวกและขั้วลบทำจากไททาเนียม ผ่านกระแสไฟฟ้า 8 แอมแปร์ และกำลังไฟฟ้า 8 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที และวัดค่า ORP (Oxidation -Reduction Potential) และค่าพีเอชเริ่มต้นได้เท่ากับ 225 มิลลิโวลต์และ 3.39 ตามลำดับ ปรับความเข้มข้นของน้ำอิเล็กโทรไลต์ที่ผลิตได้ให้มีค่าคลอรีนอิสระทั้งหมดเท่ากับ 100 พีพีเอม หลังจากนั้นนำสารแขวนลอยของสปอร์รา *P. digitatum* ปริมาณ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มาผสมกับน้ำอิเล็กโทรไลต์ในระบบไมโครที่มีขนาดฟองเท่ากับ 40-100 ไมโครเมตร แล้วบ่มเป็นเวลา 5,10 และ15 นาที แล้วดูดส่วนผสมมา 1 มิลลิลิตร เกลี่ยให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±2 °C) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นับการเจริญของราเป็นจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) ผลการทดลองพบว่าการให้น้ำอิเล็กโทรไลต์แบบฟองไมโครเป็นเวลา 5 นาที สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ให้ฟองไมโครอย่างเดียวและชุดควบคุม (น้ำกลั่น) อย่างไรก็ตาม การให้น้ำอิเล็กโทรไลต์แบบฟองไมโครเป็นเวลานานขึ้นทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของราลดลง ซึ่งสอดคล้องกับค่า ORP ที่ลดลง และเมื่อนำ *P. digitatum* ที่ผ่านการให้น้ำอิเล็กโทรไลต์แบบฟองไมโครมาตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบพบโครงสร้างของเส้นใยที่ผิดปกติอย่างเห็นได้ชัด

คำสำคัญ: น้ำอิเล็กโทรไลต์, *Penicillium digitatum*, ฟองไมโคร

[1] สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200 / ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา, กรุงเทพ 10400

[1] Postharvest Technology Research Institute, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 / Postharvest Technology Innovation Center, Commission on Higher Education, Bangkok, 10400

[2] บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

[2] The Graduate School Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

[3] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

[3] Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

คำนำ

ส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้งเป็นผลไม้ได้รับความนิยมในการบริโภค ปัญหาหลักของการผลิตส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้ง คือมีอายุการวางจำหน่ายสั้นเพียง 4-7 วัน เนื่องจากพบการเกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่สำคัญในระหว่างการเก็บรักษาและการขนส่งออกจำหน่ายได้แก่ โรคเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Penicillium digitatum* อาการของโรคหลังการเก็บเกี่ยวส่วนใหญ่เป็นอาการที่เกิดจากการเน่า โดยเชื้อสาเหตุจะสร้างเอนไซม์มาย่อยสลายเนื้อเยื่อทำลายส่วนที่เป็นเพกทิน ทำให้เซลล์แยกออกจากกันเนื้อเยื่อยุบตัวลงทำให้นิ่มเละ และส่งผลให้คุณภาพของผลส้มลดลงไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคและจำหน่ายไม่ได้ราคา

น้ำอิเล็กโทรไลต์ (electrolyzed oxidizing water ; EO Water) เป็นน้ำที่ผลิตมาจากน้ำและเกลือที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยใช้หลักการแยกสารด้วยประจุไฟฟ้าให้เกิดการแตกตัวของไอออนได้สาร HOCl (hypochlorus) ที่มีประสิทธิภาพดีกว่า OCl^- ที่ได้จากการแตกตัวจาก NaOCl (sodium hypochlorite) และ $Ca(OCl)_2$ (calcium hypochlorite) (Grech and Rijkenberg, 1992; Kim *et al*., 2000)

เทคโนโลยีไมโครบับเบิล (microbubble ; MB) เป็นเทคโนโลยีในการทำให้เกิดฟองอากาศขนาดเล็กในวัสดุหรือสารตัวกลาง สมบัติพิเศษคือมีความคงตัวสูง แตกตัวช้าลงในน้ำ และเพิ่มพื้นที่ผิวในการจับตัวกับสาร จึงทำให้สามารถนำมาใช้ในการฆ่าเชื้อก่อโรคในน้ำได้มีประสิทธิภาพเป็นเวลานาน Takahashi *et al*. (2007) พบว่าการให้โอโซนแบบไมโครบับเบิลสามารถทำให้ได้ hydroxyl radical มากกว่าแบบแมคโครบับเบิล โดย hydroxyl radical เป็นตัวออกซิไดส์ที่แรงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารชนิดอื่นๆ ที่สามารถทำลายสาร polyvinyl alcohol ซึ่งปกติจะสลายตัวได้ยากมากในสภาพธรรมชาติ ดังนั้นงานวิจัยจึงได้ศึกษาผลของน้ำอิเล็กโทรไลต์ร่วมกับฟองไมโครในการควบคุมการเจริญของเชื้อ *P. digitatum*

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาระยะเวลาการผลิตน้ำอิเล็กโทรไลต์แบบฟองไมโครที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *P. digitatum*

ผลิตน้ำอิเล็กโทรไลต์ทำได้โดยการปล่อยกระแสไฟฟ้า 8 แอมแปร์และ 8 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้สารละลายเกลือแกง ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และผ่านกระแสไฟฟ้าประจุบวกและลบ หลังจากนั้นนำน้ำอิเล็กโทรไลต์ไปวัดความเข้มข้นของคลอรีนอิสระ ปรับให้ได้ความเข้มข้น 100 พีพีเอม แล้วนำไปผลิตแบบฟองไมโคร เป็นเวลา 0, 5, 10 และ 15 นาที วัดการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชและค่า ORP (Oxidation -Reduction Potential) โดยเตรียม spore suspention ของเชื้อ *P. digitatum* (10^5 สปอร์/มล.) จำนวน 1 มล. ผสมกับน้ำอิเล็กโทรไลต์แบบฟองไมโคร 9 มล. ที่มีความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 0, 5, 10 และ 15 นาที เปรียบเทียบกับชุดที่ใช้น้ำกลั่น แล้วใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายมา 0.1 มล. ผสมกับ 0.1 N Sodium thiosulfate ปริมาตร 0.9 มล. แล้วใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารสะลายมา 0.1 มล ทำการ spread plate บน PDA แล้วนำไปบ่มที่ 27 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วบันทึกการเจริญของราโดยการนับจำนวนโคโลนีทั้งหมดแล้วเปรียบเทียบชุดที่ใช้ฟองไมโครกับชุดควบคุม

2. ศึกษาการใช้น้ำอิเล็กโทรไลต์แบบฟองไมโครต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเชื้อ *P. digitatum*

ทำการแยกเชื้อราที่มีอายุ 4-5 วัน มาใส่ในแผ่นสไลด์ที่ทำความสะอาดแล้ว จากนั้นหยดน้ำอิเล็กโทรไลต์ที่ผลิตได้จากข้อ 1 ใช้แผ่น cover ปิดทับลงไปปล่อยไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นสไลด์ไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ

ผล

1. ศึกษาระยะเวลาการผลิตน้ำอิเล็กโทรไลต์แบบฟองไมโครที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *P. digitatum*

หลังจากนำ spore suspention มาผสมกับน้ำอิเล็กโทรไลต์ที่ผลิตแบบฟองไมโคร พบว่า น้ำอิเล็กโทรไลต์แบบฟองไมโคร สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ที่เวลา 5 นาที ซึ่งมีค่า pH= 3.39 ORP= 225mV เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ให้ฟองไมโครอย่างเดียว และชุดควบคุม (น้ำกลั่น)(Figure 1) รองมาคือ ชุดที่ใช้ฟองไมโครบับเบิลอย่างเดียวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 20 เปอร์เซ็นต์ที่มีค่า pH= 8.56 ORP=-84.20mV เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีค่า pH= 8.68 ORP=-91.43mV ซึ่งฟองไมโครบับเบิลมีสมบัติพิเศษคือมีความคงตัวสูงแตกตัวช้าลงในน้ำ และพื้นที่ผิวในการจับตัวกับสารจึงทำให้สามารถนำมาใช้ในการฆ่าเชื้อก่อโรคในน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพเป็นเวลานาน และน้ำอิเล็กโทรไลต์แบบฟองไมโครเมื่อระยะเวลานานจึงทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้น (Figure 2) แต่ค่า ORP ลดลง (Figure 3)

2. ศึกษาการใช้น้ำอิเล็กโทรไลต์แบบฟองไมโครต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเชื้อ *P. digitatum*

หลังจากนำราไปตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบพบว่าเส้นใยของรามีลักษณะผิดปกติคือมีการแตกหัก และสปอร์มีลักษณะสีเข้มขึ้นจากเดิม (Figure 4)

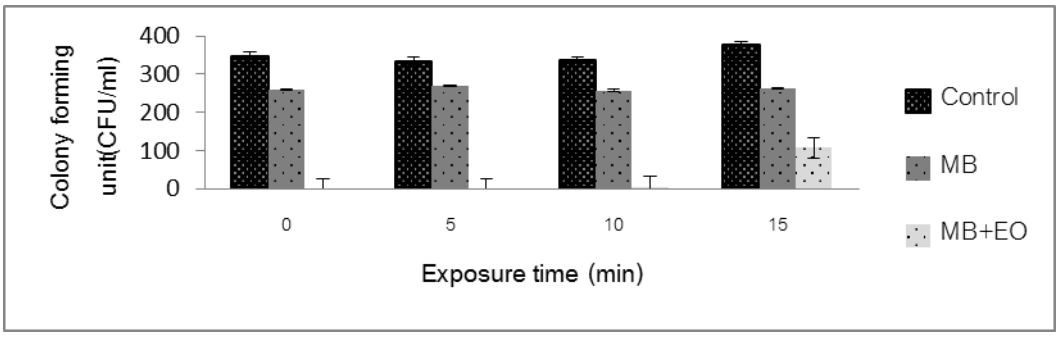

Figure 1 Effect of electrolyzed water and microbubbles on colony forming unit of *Penicillium digitatum* with different times

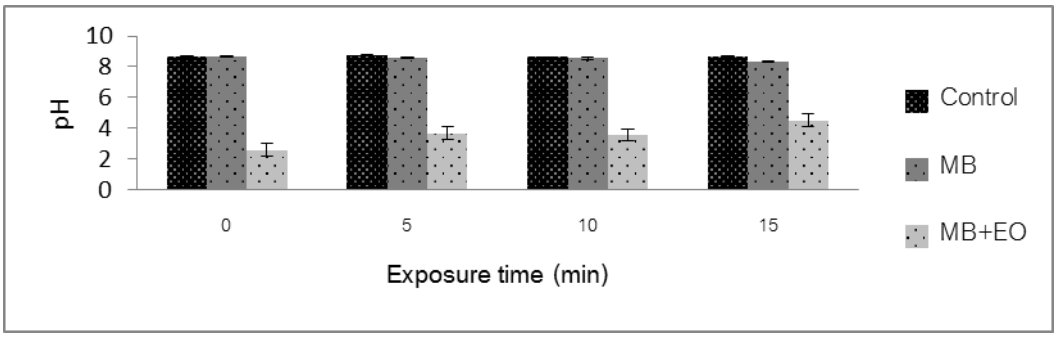

Figure 2 Effect of electrolyzed water and microbubbles on pH with different times

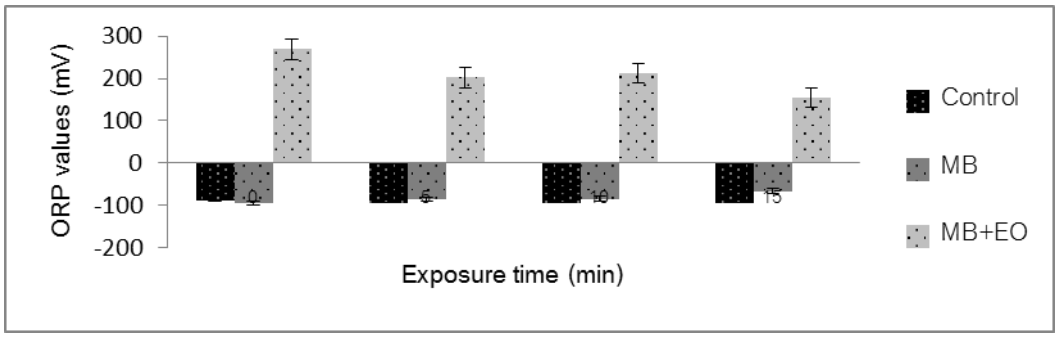

Figure 3 Effect of electrolyzed water and microbubbles on ORP (oxidation-reduction potential) with different times

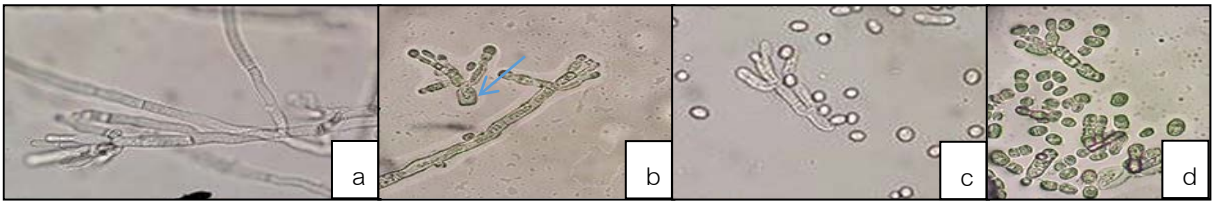

Figure 4 Microscopic photograph showing (a) the normal mycylia (b) broken mycelia (c) the normal spore and (d) abnormal structure of spore after treating with electrolyzed water with microbubble for 5 min and then placed on PDA plate for 24 hours

วิจารณ์ผล

การให้น้ำอิเล็กโทรไลต์แบบฟองไมโครในระยะเวลา 5 นาที แรกมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Penicillium digitatum* ได้ดีกว่าการใช้ฟองไมโครบับเบิลอย่างเดียว เช่นเดียวกับที่ Whangchai *et al*. (2009) รายงานพบว่าการล้างผลส้มเขียวหวานเป็นเวลา 8 นาที โดยใช้น้ำอิเล็กโทรไลต์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคราสีเขียวที่เกิดจากเชื้อ *P. digitatum* น้อยที่สุด เนื่องจากน้ำอิเล็กโทรไลต์มีค่า pH ที่ต่ำทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ยอมให้กรดไฮโปรคลอรัสเข้าไปในเซลล์ได้ง่ายขึ้นโดยกรดนี้มีผลไปออกซิไดส์กรดนิวคลีอิค และโปรตีนทำให้โปรตีนเสียสภาพ และเซลล์ถูกทำลายในที่สุด (Acher *et al*.,1997) อย่างไรก็ตามการให้น้ำอิเล็กโทรไลต์แบบฟองไมโครเป็นระยะเวลานานขึ้นอาจทำให้สารคลอรีนอิสระเกิดการระเหยทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อลดลง

ส่วนการใช้ฟองไมโครบับเบิลอย่างเดียวให้ผลรองลงมาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Penicillium digitatum* โดยค่า pH กับ ORP ไม่แตกต่างกับชุดควบคุม เช่นเดียวกับ Kobayashi *et al.* (2011) ที่รายงานว่าการใช้โมครบับเบิลโอโซนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Fusarium oxysporum* และ*Pectobacterium carotovorum* ในสารละลายที่ใช้ปลูกพืชแบบไฮโดรโปรนิก พบว่าไมโครบับเบิลโอโซนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งสองชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อนำเชื้อ *P. digitatum* ที่ผ่านการให้น้ำอิเล็กโทรไลต์แบบฟองไมโครมาตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ พบว่า โครงสร้างของเส้นใยผิดปกติอย่างเห็นได้ชัดโดยเส้นใยมีลักษณะแตกหัก และ สปอร์มีสีเข้มขึ้นสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Boqlang *et al*. (2010) ที่รายงานว่า pH ที่ 2-8 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อ *Penicillium expansum* โดยมีเส้นใยของเชื้อที่ยาวผิดปกติอย่างเห็นได้ชัด

สรุป

การใช้น้ำอิเล็กโทรไลต์แบบฟองไมโครที่มีค่าคลอรีนอิสระเท่ากับ 100 ppm เป็นเวลา 5 นาที สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Penicillium digitatum* ได้อย่างสมบูรณ์โดยให้ผลดีกว่าการใช้ฟองไมโครอย่างเดียว และชุดควบคุมทำให้โครงสร้างเส้นใยของเชื้อราผิดปกติโดยมีการแตกหัก และสปอร์มีลักษณะสีเข้มขึ้นจากเดิม อย่างไรก็ตามการใช้น้ำอิเล็กโทรไลต์แบบฟองไมโครเป็นเวลานานขึ้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราลดลง

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณรัฐบาลไทยภายใต้ความดูแลของสำนักงานความร่วมมือเพื่อการพัฒนาระหว่างประเทศ (สพร.) สำหรับทุนสนับสนุนการศึกษาและศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับทุนในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Acher, A., E. Fisher, R. Turnheim and Y. 1997. Ecologically friendly wastewater disinfection techniques. Water research 31(6): 1398-1404.

Grech, N.M. and F.H.J. Rijkenburg. 1992. Injection of electronically generated chlorine into citrus micro–irrigation systems for the control of certain waterborne root pathogens. Plant Disease 76: 457-461.

Boqlang, L., L. Tongfei, Q. Guozheng and T. Shiping. 2009. Ambient pH stress inhibits spore germination of *Penicillium expansum* by impairing protein synthesis and folding. A proteomic-based study Journal of proteome research 9: 298-307.

Kim, C., Y-C. Hung and R.E. Brackett. 2000. Roles of oxidation-reduction potential (ORP) in electrolyzed oxidizing (EO) and chemical modified water for the inactivation of food-related pathogens. Journal of Food Protection 63: 19-24.

Kobayashi, F., H. Ikeura, S. Ohsato, T. Goto and M. Tamaki, 2011. Disinfection using ozone microbubbles to inactivate *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis and *Pectobacterium carotovorum* subsp. carotovorum. Crop Protection 30: 1514-1518.

Takahashi, M., K. Chiba and P. Li. 2007. Formation of hydroxyl radicals by collapsing ozone microbubbles under strong acid conditions. Journal of Physical Chemistry B. 111: 11443-11446.

Whangchai, K., K. Saengnil, J. Uthaibutra and C. Singkamanee. 2009. Use of electrolyzed oxidizing water to control postharvest disease during storage of tangerine cv. “Sai Nam Pung”. Acta Horticulturae 837: 211-215.