Agricultural Sci. J. 47 : 3 (Suppl.) : 67-70 (2016) ว. วิทย. กษ. 47 : 3 (พิเศษ) : 67-70 (2559)

ศักยภาพของสารจากธรรมชาติ กรดอะมิโน และกรดอินทรีย์ต่อการควบคุมเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* ของเมล็ดข้าว

Potential of Natural Products, Amino Acids and Organic Acids to Control *Aspergillus fumigatus* of Rice Seed

ภัสรา แสนงาม[1] รัติยา พงศ์พิสุทธา[1] และ ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1]

Patsara Saen-ngam[1], Ratiya Pongpisutta[1] and Chainarong Rattanakreetakul[1]

Abstract

Postharvest disease is the most important problem affecting of rice product in both quantity and quality. The crucial factor is storage fungi. The objective of this research is to investigate the potential of chitosan and chitooligosaccharide, amino acids as L-glutamic acid and organic acids as acetic and lactic acids to control *Aspergillus fumigatus*, a causing agent of storage fungi on rice seed. Blotter technique was used after dipping rice seed into the solutions at the concentrations of 0.5 and 1.0% for 30 min, followed by spraying with spore suspension at the concentration of 1 x 10^6 spore/ml, then incubate at room temperature for 5 days. There were significant differences in colonization of *A. fumigatus* on rice seeds. Lactic acid at 3% concentration showed the highest efficiency with 20.00% of colonization while control represented 84.00 % (LSD=12.9044).

Keywords: storage fungi of rice seed, fungal control, lactic acid

บทคัดย่อ

โรคหลังการเก็บเกี่ยวของเมล็ดข้าวจัดเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตของข้าวทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ ปัจจัยที่สำคัญคือการเจริญของเชื้อราในโรงเก็บ วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อศึกษาศักยภาพของสารในกลุ่ม chitosan และ chitooligosaccharide สารในกลุ่มกรดอะมิโน ได้แก่ L-glutamic acid และสารในกลุ่มกรดอินทรีย์ ได้แก่ acetic acid และ lactic acid ในการควบคุมเชื้อราในโรงเก็บบนเมล็ดข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* โดยทดสอบด้วยวิธี blotter technique หลังการแช่เมล็ดในสารละลายที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที จากนั้นฉีดพ่นด้วย สารละลายแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น 1 x 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 5 วัน พบว่าการเจริญของเชื้อรา *A. fumigatus* บนเมล็ดข้าวมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุดคือ lactic acid ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยพบการเจริญของเชื้อรา 20.00 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การทดลองควบคุมพบการเจริญของเชื้อรา 84.00 เปอร์เซ็นต์ (LSD=12.9044)

คำสำคัญ: เชื้อราในโรงเก็บของเมล็ดข้าว, การควบคุมเชื้อรา, lactic acid

คำนำ

ข้าวเป็นอาหารหลักที่บริโภคกันเกือบทั่วทุกมุมโลก เป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทยอีกด้วย หากเก็บรักษาเมล็ดข้าวในโรงเก็บที่ไม่ได้มาตรฐานอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราได้ เชื้อราชนิดหนึ่งในโรงเก็บที่มีความสำคัญคือ *Aspergillus fumigatus* เป็นกลุ่มเชื้อราที่ทำให้เกิดโรค Aspergillosis เกิดการติดเชื้อที่ระบบทางเดินหายใจ ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ผลิตและผู้บริโภค มีรายงานว่าประเทศไทยพบผู้ป่วยด้วยโรคนี้มีมากที่สุด สำหรับการควบคุมเชื้อราบนเมล็ดพันธุ์ที่เคยมีรายงาน เช่น การใช้กรดไนไตรท์สามารถควบคุมเชื้อราบนเมล็ดพริกได้ (ทิพวรรณ, 2553) บุษกร และคณะ (2557) พบว่าการใช้สารสกัดกาบมะพร้าวและกรดฟูมาริกมีศักยภาพใช้เป็นสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ อาภากร (2554) นำสารสกัดจากพืชสมุนไพรเช่น ขิง ข่า ตะไคร้ กระชาย และขมิ้นมาใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Aspergillus flavus* ซึ่งมีทั้งสารที่มีความปลอดภัย และเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะกลุ่มของสารเคมีที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย รณภพ (2530) รายงานว่าสาร ammonium propionate หรือมีชื่อทางการค้าว่า Luprosil NC มีความสามารถในการควบคุมสารพิษอฟลาทอกซินบนเมล็ดข้าวโพด แต่การใช้สารเคมีในการควบคุมการเจริญของเชื้อรามีข้อจำกัด หากมีการใช้ติดต่อกัน

[1]ภาควิชาโรคพืชคณะเกษตรกำแพงแสนมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสนจังหวัดนครปฐม 73140

[1]Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaengsaen, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom 73140

เป็นระยะเวลานานทำให้เชื้อสาเหตุโรคต้านทานต่อสารเคมีชนิดนั้นได้ นอกจากนี้ยังพบปัญหาสารพิษตกค้างในสภาพแวดล้อมและเมล็ดข้าวอีกด้วย จึงมีแนวคิดที่จะนำสารที่มีความปลอดภัยมาใช้ในการควบคุมโรคในเมล็ดข้าว คือกลุ่มสารจากธรรมชาติ เช่น chitooligosaccharides เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ มีความสามารถในการต้านเชื้อรา (Rahman *et al*., 2014) รวมทั้งสารในกลุ่มกรดอะมิโน และกรดอินทรีย์ด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus*

นำเชื้อรา *A. fumigatus* มาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นนำน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อผสมกับน้ำยาล้างจานเพื่อทำการละลายสปอร์โดยใช้สัดส่วน 0.1 มิลลิลิตร/ น้ำ 10 มิลลิลิตร ราดลงบนผิวหน้าโคโลนีเชื้อราเพื่อละลายสปอร์ เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์/ มิลลิลิตร

2. การทดสอบศักยภาพของสารจากธรรมชาติ กรดอะมิโน และกรดอินทรีย์ต่อการควบคุมการเจริญของเชื้อราบนเมล็ดข้าว

นำเมล็ดข้าวมาฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ w/v sodium hypochlorite นาน 2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง แช่เมล็ดในสารละลาย chitooligosaccharides, chitosan, acetic acid, lactic acid และ L-glutamic acid ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที ผึ่งให้แห้งจากนั้นฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *A. fumigatus* ความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์/ มิลลิลิตร ลงบนเมล็ดข้าว โดยใช้ปริมาณในการฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยลงบนเมล็ดปริมาณ 1 มิลลิลิตร/ กรรมวิธี นำเมล็ดข้าวที่ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยเรียบร้อยแล้วมาวางลงบนกระดาษเพาะเมล็ด (blotter technique) ทำการทดลองจำนวน 100 เมล็ด/กรรมวิธี จากนั้นนำมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง near-UV 12 ชั่วโมง สลับมืด 12 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD)

บันทึกผลการทดลองโดยตรวจนับจำนวนเมล็ดข้าวที่มีการเจริญของเชื้อรา *A. fumigatus* โดยใช้กล้อง stereo microscope ที่ 3, 5 และ 7 วัน คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อราโดยสูตร

เปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อรา = (จำนวนเมล็ดที่เกิดโรคทั้งหมด × 100)/จำนวนเมล็ดทั้งหมด

ผลและวิจารณ์ผล

จากการทดลองศักยภาพของสารจากธรรมชาติ กรดอะมิโน และกรดอินทรีย์ ที่ใช้ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. fumigatus* บนเมล็ดข้าว ที่ 3 วันพบว่าสาร lactic acid ที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราบนเมล็ดข้าวได้ดีที่สุด โดยมีการเจริญของเชื้อรา 14.00 เปอร์เซ็นต์ และยังมีความสามารถในการควบคุมเชื้อราได้ดีที่สุดในวันที่ 5 และ 7 ด้วยเช่นกัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเชื้อรา 20.00 และ 32.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Blagojev *et al*. (2012) ที่รายงานว่ากรด lactic acid มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และสามารถฆ่าเชื้อราได้ Oliveira *et al*. (2014) รายงานว่าผลของสาร lactic acid ที่ได้จาก lactic acid bacteria (LAB) ที่ความเข้มข้น 10^9 CFU/ g^1 มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* sp. บนเมล็ดธัญพืช จากการศึกษาพบว่า lactic acid ที่ได้นั้นจัดเป็นกรดอินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ทางเคมีหรือสกัดจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในกลุ่ม Lactobacillaceae หรือเรียกอีกอย่างว่า lactic acid bacteria นั้นเอง ดังนั้น lactic acid จึงจัดเป็นสาร antibiotic ชนิดหนึ่ง ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้

รองลงมาได้แก่สาร chitooligosaccharides ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ นั้นมีความสามารถในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. fumigatus* ได้เช่นกัน โดยพบว่ามีเชื้อราเจริญได้ 36.00 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 3 วัน ส่วนวันที่ 5 และ 7 วัน มีการเจริญของเชื้อรา 58.00 และ 62.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีความสอดคล้องกับรายงานของ Rahman *et al*. (2014) ว่าสาร chitooligosaccharides มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา และสอดคล้องกับรายงานของ Wang *et al*. (2007) ที่รายงานว่า chitooligosaccharides ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถควบคุมเชื้อได้คือ 0.15 ± 0.01 เปอร์เซ็นต์ สามารถควบคุมเชื้อรา *Aspergillus niger, Rhizopus apiculatus* และ *Mucor circinelloides* ได้ และจากที่ได้ทำการศึกษา chitooligosaccharides, chitosanและ chitosanase พบว่า chitooligosaccharides จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ chitosan และ chitosanase ซึ่ง chitosanase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยผนังของจุลินทรีย์และยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้โดยพบว่า chitosanase เป็นพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งที่มีอนุภาคเป็นประจุบวกที่จะไปยึดเกาะบนผนังของจุลินทรีย์ที่เป็นประจุลบเกิดปฏิกริยา hydrolysis จึงทำให้สารในกลุ่ม chitosanase สามารถย่อยจุลินทรีย์และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Wang *et al*., 2007) ซึ่ง Hirano

and Nagao (2000) รายงานว่า chitooligosaccharides สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น *Fusarium oxysporum, Phomopsis fuleushii* และ *Alternaria alternata* ได้มีประสิทธิภาพที่สูงกว่าการใช้ chitosan นอกจากนี้ Wang *et al.* (2007) รายงานว่า chitooligosaccharides มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งที่เป็นแบคทีเรียและเชื้อราได้ โดยมีประสิทธิภาพคล้ายกับ chitosanase

Table 1 Growth percentage of *Aspergillus fumigatus* on rice seeds immersed in natural product, amino acid and organic acid after 3, 5 and 7 day incubation period at room temperature under near UV 12 hr and dark 2 hr

Treatment	Concentration (%)	Fungal growth (%)[1/]		
		3 days	5 days	7 days
Control	-	81.00 abcd	84.00 abc	87.00 abcd
Chitooligosacharides	0.5	46.00 hi	72.00 cdef	76.00 defg
	1	45.00 hi	66.00 efg	71.00 fghi
	2	38.00 i	64.00 efg	64.00 hi
	3	36.00 i	58.00 g	62.00 i
Chitosan	0.5	71.00 bcdef	84.00 abc	85.00 bcde
	1	68.00 defg	74.00 bcde	75.00 efgh
	2	54.00 gh	60.00 fg	63.00 i
	3	55.00 gh	66.00 efg	69.00 fghi
Lactic acid	0.5	76.00 abcde	81.00 abc	84.00 bcde
	1	57.00 fgh	64.00 efg	71.00 fghi
	2	54.00 gh	63.00 efg	68.00 ghi
	3	14.00 j	20.00 h	32.00 j
Acetic acid	0.5	65.00 efg	68.00 defg	80.00 cdef
	1	75.00 abcde	82.00 abc	85.00 bcde
	2	77.00 abcde	80.00 abcd	83.00 cde
	3	88.00 a	89.00 a	97.00 a
L-glutamic acid	0.5	83.00 abc	85.00 ab	89.00 abc
	1	70.00 cdef	81.00 abc	84.00 bcde
	2	85.00 ab	90.00 a	95.00 ab
	3	65.00 efg	75.00 bcde	95.00 ab
CV		16.29297	12.7365	10.63621
LSD		14.28499	12.9044	11.47959

[1/] Column values followed by the same letter are not significantly different (P=0.05)

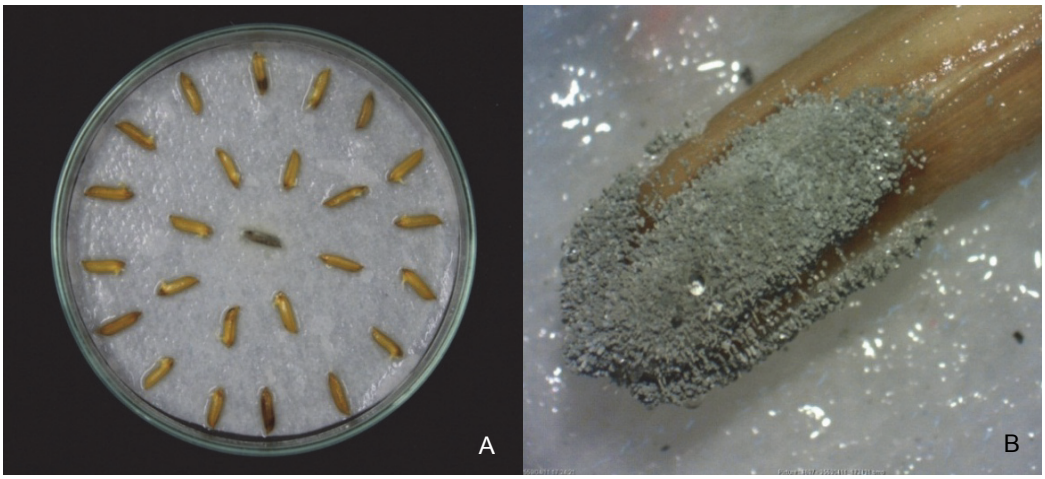

Figure 1 (A) Blotter technique and (B) *Aspergillus fumigatus* on a rice seed

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* บนเมล็ดข้าวที่ระยะเวลา 3, 5 และ 7 วัน พบว่า lactic acid ที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. fumigatus* โดยมีเปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อรา 14.00, 20.00 และ 32.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ chitiooligosaccharides พบว่าสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราได้ดีที่ระยะเวลา 3 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อรา 36.00 เปอร์เซ็นต์

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้การสนับสนุนในเรื่องของสถานที่และอุปกรณ์ที่ใช้ทำการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ทิพวรรณ สิทธิสมบัติ. 2553. ผลของกรดไนไตรท์ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริก. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

บุษกร ทองใบ, พิชาภรณ์ แผ้วพลสง และสาวิตรี ทวีพร. 2557. ประสิทธิภาพของสารสกัดกาบมะพร้าว และกรดฟูมาริกต่อโคลิฟอร์มที่ปนเปื้อนในใบโหรพา. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 42 (3 พิเศษ): 236-239.

รณภพ บรรเจิดเชิดชู. 2530. เชื้อราในโรงเก็บ สารพิษอฟลาทอกซินและการควบคุมด้วยสารเคมีบนเมล็ดข้าวโพด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อาภากร ศิลป์ประเสริฐ. 2554. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการควบคุมเชื้อรา *Aspergillus flavus*. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

Blagojev, N., M. Skrinjar, S. V. Moracanin and V. Soso. 2012. Control of mould growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria metabolites. Romania Biotechnological Letters 17(3): 7219-7226.

Hirano, S. and N. Nagao. 1989. Effects of chitosa, pectic acid, lysozyme,a nd chitinase on the growth of several phytopathogens. Agric Biot Chem 53: 3065-3066.

Oliveira, M. P., E. Zannini and E. K. Arendt. 2014. Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: from crop farming to cereal products. Food Microbiology 37: 78-95.

Rahman, H., L. R. Shovan, L. G. Hjeljord, B. B. Aam, V. G. H. Eijsink, M. Sorlie and A. Tronsmo. 2014. Inhibition of fungal plant pathogens by synergistic action of chito-oligosaccharides and commercially available fungicides. PLoS ONE 9(4): e93192.

Wang, Y., P. Zhou, J. Yu, X. Pan, P. Wang, W. Lan and S. Tao. 2007. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by chitosanase from *Pseudomonas* CUY8. Asia Pac J Clin Nutr 16(1): 174-177.