Agricultural Sci. J. 48 : 3 (Suppl.) : 113-116 (2017) ว. วิทย. กษ. 48 : 3 (พิเศษ) : 113-116 (2560)

ประสิทธิภาพของการใช้สารละลายพลาสมาและไมโครบับเบิลต่อการเจริญของเชื้อ *Penicillium digitatum*

Efficiency of Plasma and Microbubble Solution on the Growth of *Penicillium digitatum*

ธีรภัทร อินทร์ทอง[1] นรพนธ์ วิเชียรสาร[2] ธีรวรรณ บุญญวรรณ[3] และกานดา หวังชัย[1,4]

Theerapat Intong[1], Norrapon Vichiansan[2], Dheerawan Boonyawan[3] and Kanda Whangchai[1,4]

Abstract

The efficiency of plasma water in combined with microbubble to control the growth of *Penicillum digitatum In vitro* was studied. Plasma solution was generated from plasma activation in microbubble water using argon gas (the gas flow rate was 6 liter/minute) and input electrical current was 2 Ampere with 230 Volt. The *P.digitatum* suspension were exposed in plasma with microbubble solution with different times (15, 30, 45 and 60 minutes) then spreaded on PDA (Potato Dextrose Agar) and incubated at 27˚C then the growth of fungi (showing in colony forming units) was observed every 12 hours. It was found that using plasma solution in combined with microbubble for 15 and 30 minutes had more effective treatment to inhibit of *P.digitatum* which was 0.26 log CFU/ml and 0.30 log CFU/ml than plasma and microbubble, respectively growth. Moreover, the inhibitory efficiency of plasma in combined with microbubble increased according to the decreasing of pH and increasing of ORP. Besides, microscopic observation revealed the presence of damaged mycelia and spores of *P. digitatum* after treated with plasma in combined with microbubble.

Keywords: Plasma, *Penicillium digitatum*, Microbubble.

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของพลาสมา (plasma) ร่วมกับไมโครบับเบิล (microbuble) ในการลดการเจริญของเชื้อรา *Penicillium digitatum* ในห้องปฏิบัติการ โดยผลิตสารละลายพลาสมาด้วยกระบวนการพลาสมาชนิดก๊าซกระตุ้นในน้ำไมโครบับเบิล โดยใช้ก๊าซอาร์กอนที่อัตราการไหล 6 ลิตรต่อนาที กระแสไฟฟ้าขนาด 2.0 แอมแปร์ และใช้กำลังไฟที่ 230 โวลต์ จากนั้นนำสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อราที่ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ผสมกับน้ำพลาสมาร่วมกับไมโครบับเบิลที่เวลาต่างๆ (15, 30, 45 และ 60 นาที) แล้วทำการเกลี่ยลงบนผิวหน้าของอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส โดยการสังเกตการเจริญของเชื้อทุกๆ 12 ชั่วโมง โดยนับจากปริมาณโคโลนีทั้งหมดต่อมิลลิลิตร พบว่าการใช้น้ำพลาสมาร่วมกับไมโครบับเบิลเป็นเวลา 15 นาที และ 30 นาที ให้ผลดีกว่าในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. digitatum* เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้พลาสมา หรือไมโครบับเบิลอย่างเดียว ซึ่งประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของน้ำพลาสมาร่วมกับไมโครบับเบิลจะเพิ่มขึ้นโดยสัมพันธ์กับค่า pH ที่ลดลง และ ORP ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ โดยตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราได้รับความเสียหายจากการได้รับน้ำพลาสมาร่วมกับไมโครบับเบิล

คำสำคัญ: พลาสมา เชื้อรา *Penicillium digitatum* ไมโครบับเบิล

คำนำ

โรคเน่าของผลส้มที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* เป็นโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่สำคัญของผลส้ม ซึ่งส่งผลต่อเกษตรกร ทั้งเชิงปริมาณ และคุณภาพ การป้องกันและควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดบนผลส้มนิยมใช้ สารกำจัดเชื้อรา

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่เชียงใหม่ 50200

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

[2] ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

[2] Department of Industrial Engineering, Faculty of Engineering, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

[3]ภาควิชาฟิสิกส์และวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

[3] Department of Physics and Materials, Faculty of Science Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

[4] ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200 / ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา, กรุงเทพ 10400

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

การจุ่มน้ำร้อน การเคลือบผิวผล การใช้สารเคมีป้องกัน ซึ่งก่อให้เกิดการตกค้าง และเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันมีเทคโนโลยีใหม่ที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผักและผลไม้โดยการใช้พลาสมา

พลาสมาชนิดก๊าซกระตุ้นในน้ำ (Plasma Activation Water) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ และไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม เกิดจากการแยกตัวทางไฟฟ้าของก๊าซ เมื่อก๊าซถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าจึงแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ เช่น ไฮดรอกซิลเรดิคอล ($OH^{\bullet}$) ซุปเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ($O^{\bullet}_2$) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ละลายอยู่ในน้ำ

เทคโนโลยีไมโครบับเบิล (Microbubble) เป็นเทคโนโลยีที่ใช้ในการทำให้เกิดฟองก๊าซขนาดเล็กในสสารตัวกลาง เช่น น้ำ ลักษณะของฟองที่ผลิตได้จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 50-200 ไมโครเมตร ซึ่งสามารถเข้าถึงพื้นที่ผิวซึ่งมีความซับซ้อน

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีพลาสมาร่วมกับไมโครบับเบิล เป็นการสร้างพลาสมาโดยเกิดจากก๊าซที่ถูกบีบให้ไหลผ่านขั้วไฟฟ้าจะทำให้ก๊าซเกิดการแตกตัวเป็นพลาสมาละลายลงในน้ำที่เกิดฟองไมโครบับเบิล โดยไมโครบับเบิลจะทำให้พลาสมากระจายตัวกันอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้น ซึ่งงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของพลาสมาร่วมกับไมโครบับเบิล ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. digitatum*

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1.ศึกษาผลของน้ำไมโครบับเบิลระยะเวลาที่แตกต่างกันต่อการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* ในสภาพหลอดทดลอง

1.1 การเตรียม สารแขวนลอยของสปอร์เชื้อ *P. digitatum* โดยนำน้ำกลั่นมาผสมกับเชื้อแล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง และนับจำนวนสปอร์โดยการตรวจนับด้วย haemacytometer ให้ได้ความเข้มข้น ($1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร)

1.2 การเตรียมน้ำไมโครบับเบิล โดยใช้น้ำกลั่นในการผลิตน้ำไมโครบับเบิล(Figure 1A) เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นวัดประสิทธิภาพของการออกซิเดชัน รีดักชัน(Oxidation Reduction Potential; ORP) และวัด pH โดยใช้ ORP-pH meter จากนั้นนำ สารแขวนลอยของสปอร์เชื้อ*P. digitatum* ผสมกับน้ำไมโครบับเบิล ทิ้งไว้ที่ระยะเวลาต่างกัน (0, 15, 30, 45 และ 60 นาที) แล้วทำการเกลี่ยเชื้อลงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ตามระยะเวลาต่างๆ แล้วนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นนับจำนวนเชื้อรา คำนวนโดยใช้สูตร CFU/g = Number of Colonies/Quantity plate x Dilution factor (CFU/ml)

2. ศึกษาผลของพลาสมาที่ระยะเวลาที่แตกต่างกันต่อการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* ในสภาพหลอดทดลอง

ผลิตพลาสมาโดยใช้ก๊าซอาร์กอน โดยใช้กำลังไฟในการสร้างที่ 230 โวลต์ กระแสไฟฟ้า 2.0 แอมแปร์ โดยใช้ก๊าซอาร์กอนที่ 6 ลูกบาศก์ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที (Figure 1B) แล้วนำสารแขวนลอยของสปอร์ผสมกับน้ำพลาสมา จากนั้นทำตามวิธีการ 1.2

3. ศึกษาผลของพลาสมาร่วมกับไมโครบับเบิลที่ระยะเวลาที่แตกต่างกันต่อการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* ในสภาพหลอดทดลอง

การผลิตพลาสมาร่วมกับไมโครบับเบิล เตรียมน้ำไมโครบับเบิลโดยใช้น้ำกลั่นในการผลิต ผลิตน้ำไมโครบับเบิลเป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วนำไปผลิตพลาสมาโดยใช้ก๊าซอาร์กอน กำลังไฟในการสร้างที่ 230 โวลต์ กระแสไฟฟ้าอยู่ที่ 2.0 แอมแปร์ โดยใช้ก๊าซอาร์กอนที่ 6 ลูกบาศก์ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำสารแขวนลอยของสปอร์ผสมกับน้ำพลาสมาร่วมกับไมโครบับเบิล จากนั้นทำตามวิธีการ 1.2

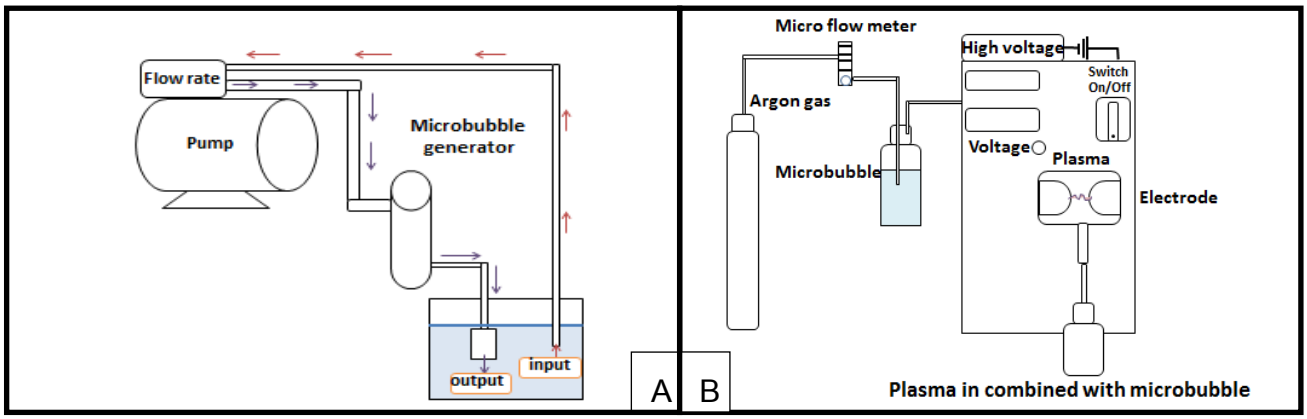

Figure 1 Microbubble production system (A), Plasma production system (B)

ผลและวิจารณ์

จากการทดลองใช้ไมโครบับเบิลอย่างเดียวในการควบคุมเชื้อพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. digitatum* โดยเมื่อนำน้ำไมโครบับเบิลที่มีค่า pH เท่ากับ 5.46 มีค่า ORP เท่ากับ 262 mV มาทดสอบกับสปอร์ของเชื้อรา *P. digitatum* เป็นเวลา 15 นาทีและ 30 นาที สามารถลดเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เท่ากับ 0.33 log CFU/ml และ 0.42 log CFU/ml ส่วนชุดควบคุม มีค่า 0.70 log CFU/ml (Figure 3) โดยมีค่า pH เท่ากับ 7.0 และ ORP เท่ากับ 256.3 mV (Figure 2) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. digitatum* เนื่องจากน้ำไมโครบับเบิลมีพื้นที่ผิวในการจับตัวกับสารจึงสามารถนำมาใช้ในการฆ่าเชื้อก่อโรคในน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพเป็นเวลานาน แต่เมื่อทิ้งระยะเวลานานจึงทำให้ประสิทธิภาพลดลงเนื่องจากการสลายตัวของไฮดรอกซิล เรดิคัล เช่นเดียวกับการศึกษาของ Boqlang *et al*. (2010) พบว่า pH เท่ากับ 2-8 สามารถยับยั้งการงอกของ สปอร์เชื้อ *Penicillium expansum* ได้ในหลอดทดลอง โดยจะมีค่า pH กับ ORP ไม่แตกต่างกันกับชุดควบคุม ในแต่ระยะเวลาในการทดลอง ดังนั้นการใช้ไมโครบับเบิลจึงเป็นวิธีการที่สามารถใช้ร่วมกับวิธีการทดลองอื่น

ส่วนการใช้พลาสมา พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. digitatum* โดยมีค่า pH เท่ากับ 5.50 มีค่า ORP เท่ากับ 266 mV มาทดสอบกับสปอร์ของเชื้อรา *P. digitatum* เป็นเวลา 15 นาที และ 30 นาที สามารถลดเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เท่ากับ 0.31 log CFU/ml และ 0.39 log CFU/ml ส่วนชุดควบคุม มีค่า 0.70 log CFU/ml (Figure 3) โดยมีค่า pH เท่ากับ 7.0 และ ORP เท่ากับ 256.3 mV (Figure 2) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.digitatum* เนื่องจากพลาสมามีอนุมูลไฮดรอกซิลอยู่จำนวนมากจึงสามารถนำมาใช้ในการฆ่าเชื้อก่อโรคในน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เมื่อทิ้งระยะเวลานานจึงทำให้ประสิทธิภาพลดลง เนื่องจากอนุมูลของไฮดรอกซิลสลายตัวได้ง่าย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ma *et al*. (2015) พบว่าน้ำพลาสมาสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และเกิด reactive oxygen species (ROS)

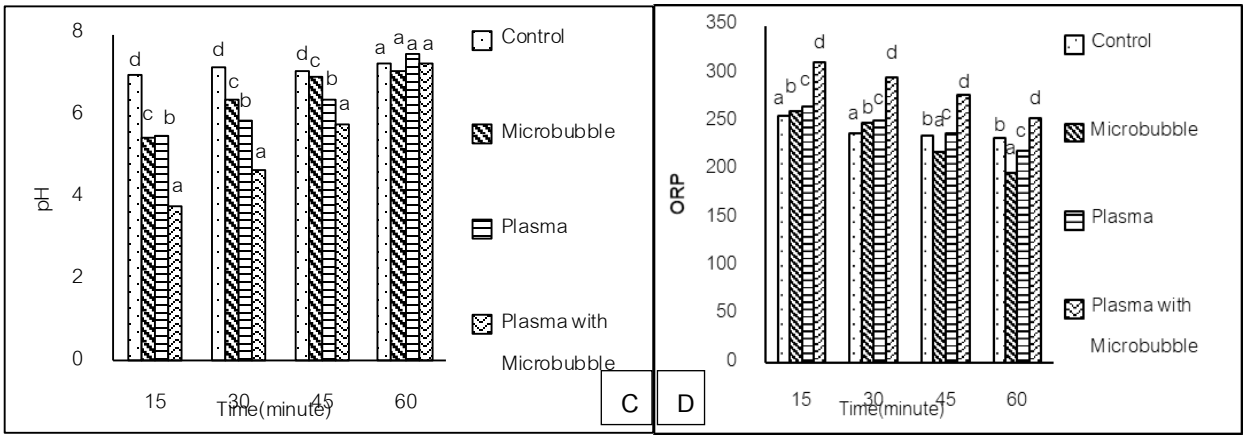

Figure 2 Effect of Microbubble, Plasma and Plasma with Microbubble on pH (C) and oxidation-reduction potential (D)

นอกจากนี้การใช้พลาสมาร่วมกับไมโครบับเบิล พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. digitatum* โดยเมื่อนำน้ำพลาสมาร่วมกับไมโครบับเบิล ที่มีค่า pH เท่ากับ 3.88 มีค่า ORP เท่ากับ 312 mV มาทดสอบกับสปอร์ของเชื้อรา *P. digitatum* เป็นเวลา 15 นาทีและ 30 นาที สามารถลดเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เท่ากับ 0.26 log CFU/ml และ 0.30 log CFU/ml ส่วนชุดควบคุม มีค่า 0.70 log CFU/ml (Figure 3) โดยมีค่า pH เท่ากับ 7.0 และ ORP เท่ากับ 256.3 mV สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.digitatum* (Figure 2) เนื่องจากฟองไมโครบับเบิลจะทำให้พลาสมากระจายตัวกันอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้น และเพิ่มพื้นที่ผิวการยึดเกาะของอนุมูลไฮดรอกซิล เนื่องจากฟองมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กพื้นที่ผิวสัมผัสมีมาก จึงสามารถนำมาใช้ในการฆ่าเชื้อก่อโรคในน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพอยู่ได้เป็นเวลานาน เมื่อทิ้งระยะเวลานานจึงทำให้ประสิทธิภาพลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Deng *et al*. (2010) ได้ศึกษากลไกการฆ่าเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยใช้พลาสมาพบว่าการใช้ก๊าซอาร์กอนร่วมกับออกซิเจนความเข้มข้น 3.59% ทำให้สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ผลดี สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim *et al*. (2013) ได้ศึกษาการใช้พลาสมา

ไกลดิงอาร์คร่วมกับไมโครบับเบิลสามารถกระจายฟองอากาศของก๊าซได้อย่างสม่ำเสมอ และมีปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในน้ำเพิ่มขึ้น โดยนำไปทดสอบกับ *Escherichia coli* ใช้ก๊าซอาร์กอนโดยอัตราการจ่ายก๊าซ 107.6 ลิตรต่อนาที ใช้ระยะเวลาในการปล่อยพลาสมา 25 นาที ใช้แรงดันไฟฟ้า 3 กิโลโวลต์ และใช้อัตราการจ่ายน้ำ 120 มิลลิลิตรต่อนาที สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้

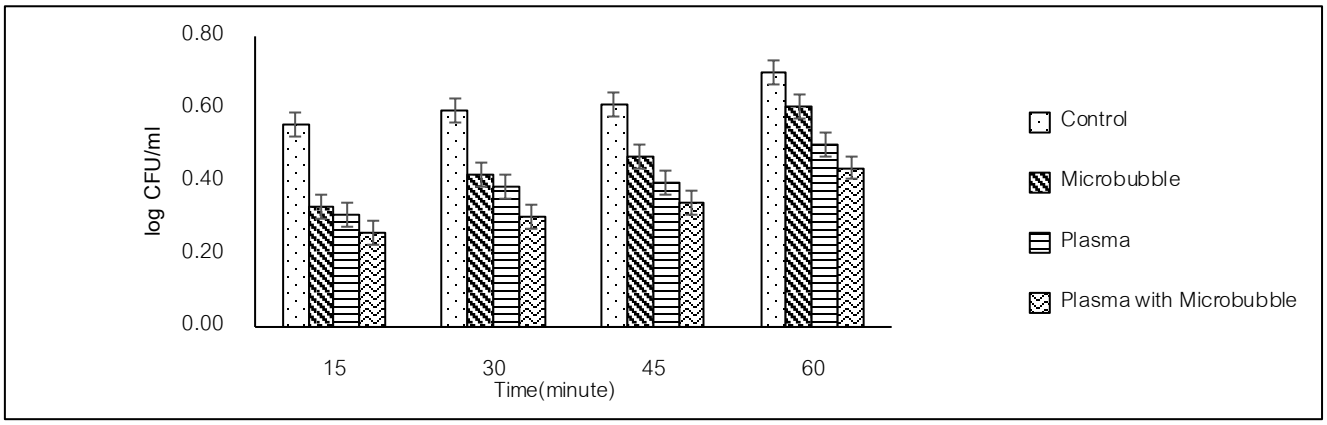

Figure 3 Growth inhibition of *P. digitatum* when treated with Microbubble, Plasma and Plasma with Microbubble

สรุปผล

การใช้น้ำพลาสมาร่วมกับไมโครบับเบิลมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. digitatum* โดยมีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยมีค่า pH เท่ากับ 3.88 และค่า ORP เท่ากับ 312 และใช้เป็นเวลา 15 นาที และ 30 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำไมโครบับเบิล หรือน้ำพลาสมาเพียงอย่างเดียว

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการวิจัยสรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว และห้องปฏิบัติการพลาสมา อุทยานวิทยาศาสตร์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Boqlang, L., T. Lai, G. Qin and S. Tian. 2010. Ambient pH stress inhibits spore germination of *Penicillium expansum* by impairingprotein synthesis and folding. A proteomic-based study. Journal of proteome research 9: 298-307.

Deng, S., C. Cheng, G. Ni, Y. Meng and H. Chen. 2010. *Bacillus subtilis* devitalization mechanism of atmosphere pressure plasma jet. Current Applied Physics 10: 1164–1168.

Kim, S. H., I. Y. Cho, H. I. Hwang, H. D. Lee, J. D. Cho, A. Rabinovich and A. Fridman, 2013. Use of plasma gliding arc discharges on the inactivation of *E. coli* in water. Separation and Purification Technology 120: 423-428.

Ma, R., G. Wang, Y. Tian, K. Wang, J. Zhang and J. Fang. 2015. Non-thermal plasma-activated water inactivation of food-borne pathogen on fresh produce. Journal of Hazardous Materials 300: 643–651.