Agricultural Sci. J. 50 : 3 (Suppl.) : 159-162 (2019) ว. วิทย. กษ. 50 : 3 (พิเศษ) : 159-162 (2562)

ผลของฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อรา *Penicillium digitatum* ในสภาพแขวนลอย

Effect of Ozone Microbubbles with Various Temperatures on Growth of *Penicillium digitatum* in Suspension

วิริญญ์ สิงห์โทราช[1] จำนงค์ อุทัยบุตร[1,2] และกานดา หวังชัย[1,2*]

Wirin Singtoraj[1], Jamnong Uthaibutra[1,2] and Kanda Whangchai[1,2]

Abstract

Effect of ozone microbubbles (OMBs) with various temperatures on growth of *Penicillium digitatum* in suspension were studied. The *P. digitatum* suspension ($1x10^6$ spore/ml) were exposed in OMBs solution with different temperatures (15, 20 and 25 ºC) and times (10, 20, 30, 40, 50 and 60 minutes), compared to the control (distilled water). pH and Oxidation-Reduction Potential (ORP) in all treatment were measured. Then dropped the solution on compact dry plate and incubated at 27 °C for 48 hours, and then the growth of fungi (showing in colony forming units) was investigated. The results showed the OMBs at 15 ºC for 20 minutes (pH 6.9 and ORP 976 mV) had the most effective treatment to inhibit the growth of *P. digitatum* which was 0.48 logCFU/ml and 2.13 logCFU/ml in the distilled water (control). The low temperature of OMBs could be increased the growth inhibition affected of *P. digitatum*. Moreover, it was related to the decreasing of pH and increasing of ORP. Thus, OMBs at low temperature may be used as effective method for agricultural products sanitization to control postharvest disease.

Keywords: Ozone microbubbles, Low temperature, *Penicillium digitatum*

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของการใช้ฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อรา *Penicillium digitatum* ในสภาพแขวนลอย โดยนำสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *P. digitatum* ที่มีความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร มาผสมกับน้ำฟอง-ไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิ 15, 20 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่น โดยนำทุกชุดการทดลองมาวัดค่า pH และค่าประสิทธิภาพในการออกซิเดชัน-รีดักชัน (Oxidation-Reduction Potential; ORP) จากนั้นดูดสารละลายดังกล่าวมาหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแห้ง (compact dry plate) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนี จากการทดลองพบว่าการใช้น้ำฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (ค่า pH เท่ากับ 6.9 และค่า ORP เท่ากับ 976 mV) ให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* โดยมีจำนวนโคโลนีน้อยที่สุดเท่ากับ 0.48 logCFU/ml ในขณะที่ชุดควบคุมมีจำนวนโคโลนีเท่ากับ 2.13 logCFU/ml ซึ่งการใช้ฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิต่ำสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* นอกจากนี้อุณหภูมิของน้ำที่ลดลงยังมีผลต่อการลดลงของค่า pH และการเพิ่มขึ้นของค่า ORP ดังนั้นการนำน้ำฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิต่ำไปใช้ในการทำความสะอาดผลิตผลทางการเกษตรน่าจะเป็นวิธีที่สามารถควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ: ฟองไมโครร่วมกับโอโซน อุณหภูมิต่ำ *Penicillium digitatum*

คำนำ

โรคเน่าของผลส้มที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* เป็นโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่สำคัญของผลส้ม ถึงแม้ว่าอาการเน่าจากเชื้อราชนิดนี้จะเกิดเฉพาะส่วนเปลือกของผลส้มเท่านั้น แต่คุณภาพของน้ำและเนื้อของผลส้มจะเสียไปด้วย

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่เชียงใหม่ 50200

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

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

[2]Postharvest Technology Research Center, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 / Postharvest Technology Innovation Center, Office of the Higher Education Commission, Bangkok, 10400

(ดนัย, 2543) การป้องกันและควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดบนผลส้มในปัจจุบันนิยมใช้สารกำจัดเชื้อรา การจุ่มน้ำร้อน การเคลือบผิวผล และการใช้สารเคมีป้องกัน แม้ว่าการใช้สารเคมีจะมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเชื้อรา และเป็นที่นิยมอย่างมาก แต่สารเคมีเหล่านี้ก่อให้เกิดการตกค้าง ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม เป็นอันตรายต่อระบบนิเวศน์ และส่งผลกระทบต่อชุมชนด้วย (พาณิชย์, 2542) ซึ่งในปัจจุบันมีเทคโนโลยีใหม่ๆ เช่น การใช้ฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผักและผลไม้ได้ และยังมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ระบบนิเวศน์ และผู้บริโภค

การใช้เทคโนโลยีโอโซนเป็นวิธีการที่น่าสนใจ โดยโอโซนเป็นสารออกซิไดซ์ที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีและมีการสลายตัวอย่างรวดเร็ว อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ได้ดี แต่พบปัญหาคือสามารถละลายน้ำได้น้อย ดังนั้นการใช้ร่วมกับฟองไมโครซึ่งเป็นระบบผลิตฟองอากาศที่มีขนาดตั้งแต่ 50-200 ไมโครเมตร จะทำให้สารมีความคงตัวสูงขึ้น แตกตัวในน้ำยาก และมีความสามารถในการทำความสะอาดผิวของผลิตผลทางการเกษตรได้มากขึ้น นอกจากนี้อุณหภูมิของน้ำยังเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อการละลายน้ำของโอโซน โดยที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยเพิ่มการละลายน้ำของโอโซน ส่งผลให้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้จึงนำเทคโนโลยีโอโซนมาประยุกต์ใช้ร่วมกับฟองไมโคร เพื่อให้โอโซนที่ละลายในน้ำอยู่ได้นานขึ้น เป็นการเพิ่มความสามารถในการออกซิไดซ์และเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อรา *Penicillium digitatum* ในสภาพแขวนลอยได้อย่างดี

อุปกรณ์และวิธีการ

นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *P. digitatum* ที่มีความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.1 มิลลิลิตร มาผสมกับน้ำฟองไมโครร่วมกับโอโซน จำนวน 0.9 มิลลิลิตร โดยมีการผลิตน้ำดังกล่าวจากเครื่อง ozone generator (OZONIZER รุ่น SO5AE) ที่ต่อกับระบบฟองไมโครในอ่างล้าง (รุ่น 15KED02S) ที่อุณหภูมิ 15, 20 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที แล้วเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่น จากนั้นนำทุกชุดการทดลองมาวัดค่า pH และค่าประสิทธิภาพในการออกซิเดชัน-รีดักชัน (Oxidation-Reduction Potential; ORP) แล้วดูดสารละลายดังกล่าวมาหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแห้ง (compact dry plate) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นพิจารณาการเกิดขึ้นของโคโลนีที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาจำนวนของเชื้อรา *P. digitatum* โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design, CRD

ผล

จากการศึกษาแนวโน้มของค่า pH ในชุดทดลองที่ได้รับฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าค่า pH ของชุดทดลองที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มคงที่ตลอดระยะเวลาการทดลอง ส่วนชุดทดลองที่ได้รับฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 10 นาที มีค่า pH ลดลงเพียงเล็กน้อย จากนั้นมีค่าคงที่ตลอดระยะเวลาการทดลอง และชุดทดลองที่ได้รับฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่า pH เพิ่มขึ้นที่เวลา 20 นาที และมีแนวโน้มคงที่ตลอดระยะเวลาการทดลอง (Figure 1A) ส่วนค่า ORP ในทุกชุดทดลองที่ได้รับฟองไมโครร่วมกับโอโซนพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไปนาน 10 นาที และมีแนวโน้มคงที่ตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยชุดทดลองที่ได้รับฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีค่า ORP สูงที่สุด เท่ากับ 964 มิลลิโวลต์ (Figure 1B)

นอกจากนี้เมื่อศึกษาผลของการใช้ฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* ในสภาพแขวนลอย เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ล้างด้วยน้ำกลั่น พบว่าที่เวลา 20 นาที ชุดทดลองที่ได้รับฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่า pH เท่ากับ 6.7 และค่า ORP เท่ากับ 964 มิลลิโวลต์ มีจำนวนของเชื้อรา *P. digitatum* น้อยที่สุดเท่ากับ 0.08 logCFU/ml รองลงมาคือชุดที่ได้รับฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่า pH เท่ากับ 7.1 ส่วนค่า ORP เท่ากับ 723 มิลลิโวลต์ และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่า pH เท่ากับ 7.1 ค่า ORP เท่ากับ 704 มิลลิโวลต์ มีจำนวนเชื้อรา *P. digitatum* เท่ากับ 1.09 logCFU/ml และ 1.85 log CFU /ml ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมมีจำนวนเชื้อรา *P. digitatum* เท่ากับ 2.13 logCFU/ml (Figure 2)

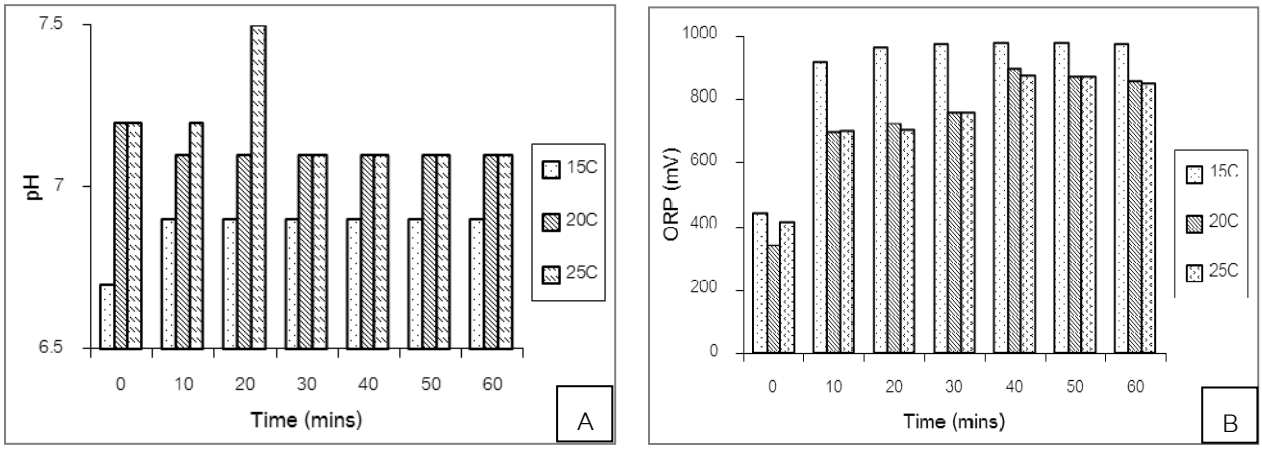

Figure 1 pH (A) and ORP (oxidation-reduction potential) (B) after ozone microbubbles application

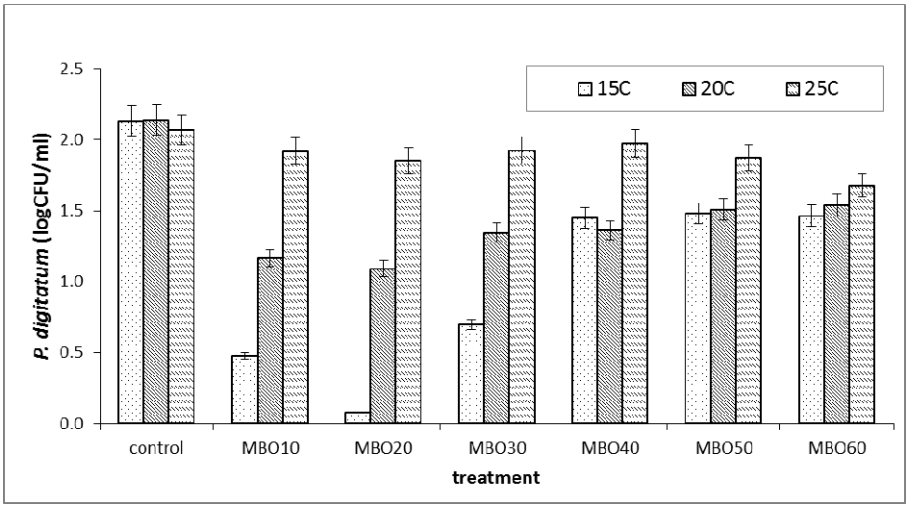

Figure 2 Effect of ozone microbubbles with various temperatures on growth of *Penicillium digitatum* in suspension after incubated for 48 hrs.

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาแนวโน้มของค่า pH ในชุดทดลองที่ได้รับฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าทุกชุดทดลองมีแนวโน้มของค่า pH ค่อนข้างคงที่ โดยชุดทดลองที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีค่า pH ต่ำที่สุด เท่ากับ 6.7 ในขณะที่ชุดทดลองที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส มีค่า pH เท่ากับ 7.1 ซึ่งค่า pH ที่ต่ำแสดงถึงการสลายตัวของโอโซนในน้ำอย่างช้าๆ ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในน้ำเล็กน้อย (Graham, 1997) นอกจากอุณหภูมิของน้ำที่ต่ำจะมีผลต่อการลดลงของค่า pH แล้วยังมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่า ORP อีกด้วย จากการทดลองพบว่าค่า ORP ของชุดทดลองที่ได้รับฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีค่า ORP สูงที่สุด เท่ากับ 964 มิลลิโวลต์ ในขณะที่ชุดทดลองที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส มีค่า ORP เท่ากับ 723 และ 704 มิลลิโวลต์ โดยค่า ORP เป็นค่าที่บ่งบอกถึงความสามารถในการละลายน้ำของโอโซน (Graham, 1997) และความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของการใช้ฟองไมโครร่วมกับโอโซน หากมีค่าสูงขึ้นหมายถึงการเพิ่มขึ้นของไฮดรอกซิลเรดิคัล (hydroxyl radical; •OH) ที่เหมาะแก่การเข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน อีกทั้งค่า ORP ที่เพิ่มขึ้นยังแสดงถึงความสามารถในการเพิ่มการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์อีกด้วย จากการศึกษาของ Suslow (2004) พบว่าความสามารถในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์นั้นขึ้นอยู่กับการเพิ่มขึ้นของค่า ORP ในสารละลาย โดย ORP ที่ 650-700 มิลลิโวลต์ สามารถลดเวลาการฆ่าเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. และ *Listeria* sp. ได้ถึง 10 เท่า เมื่อเทียบกับสารละลายที่มีค่า ORP ต่ำกว่า 485 มิลลิโวลต์

ส่วนผลของการศึกษาการใช้ฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* ในสภาพแขวนลอย เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ล้างด้วยน้ำกลั่น พบว่า ชุดทดลองที่ได้รับฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที มีจำนวนเชื้อรา *P. digitatum* น้อยที่สุดเท่ากับ 0.08 logCFU/ml ในขณะที่ชุดควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่นมีจำนวนเชื้อรา *P. digitatum* เท่ากับ 2.13 logCFU/ml จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของการใช้ฟองไมโครร่วมกับโอโซนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* ขึ้นอยู่กับระยะเวลาและอุณหภูมิของน้ำ โดยอุณหภูมิมีความสัมพันธ์กับการละลายของโอโซนในน้ำ ซึ่งอุณหภูมิต่ำสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการละลายน้ำของโอโซนได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kobayashi *et al*. (2011) ที่พบว่าการใช้ฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที สามารถเพิ่มการละลายน้ำของโอโซนได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้มากขึ้น (Graham, 1997) โดยที่อุณหภูมิดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* และ *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* แบบแขวนลอยได้ดีที่สุด นอกจากนี้ Fukumoto *et al*. (2010) ได้รายงานว่าการใช้ฟองไมโครร่วมกับโอโซนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในมะเขือเทศ ผักกาดกวางตุ้ง และสตรอเบอรี่ โดยไม่ทำให้เกิดการสูญเสียคุณภาพของผลิตผล และจากการศึกษาของ Lee *et al*. (2016) พบว่าการล้างเกาลัดด้วยฟองไมโครร่วมกับโอโซนเป็นเวลา 10 นาที สามารถลดโรคเน่าและยืดอายุหลังการเก็บเกี่ยวของเกาลัดได้ อีกทั้ง Tamaki *et al*. (2018) ได้รายงานว่าการใช้ฟองไมโครร่วมกับโอโซนเป็นเวลา 30 วินาที สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis* ได้ และทำลายสปอร์ได้ทั้งหมดที่เวลา 180 วินาที

สรุปผลการทดลอง

การใช้ฟองไมโครร่วมกับโอโซนที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส โดยมีค่า pH เท่ากับ 6.7 และค่า ORP เท่ากับ 964 มิลลิโวลต์ เป็นเวลา 20 นาที มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. digitatum* ในสภาพแขวนลอยได้ดีที่สุด

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย และศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ดนัย บุณยเกียรติ. 2543. โรคหลังการเก็บเกี่ยวของพืชสวน. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. 156 หน้า.

พานิชย์ ยศปัญญา. 2542. ศาสตร์แห่งส้ม. พิมพ์ครั้งที่ 4. บริษัท พิฆเณศพริ้นติ้งเซ็นเตอร์ จำกัด. กรุงเทพมหานคร. 188 หน้า.

Fukumoto, Y., K. Hashizume and Y. Nishimura. 2010. Developmemt of supply system of microbubble ozoned water in agriculture. Horticulture Environment and Biotechnology 51(1): 21-27.

Graham, D.M. 1997. Use of ozone for food processing. Food Technology 51: 72-75.

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.

Lee, U., S. Joo, N.B. Klopfenstein and M.S. Kim. 2016. Efficacy of washing treatments in the reduction of postharvest decay of chestnuts (*Castanea crenata* 'Tsukuba') during storage. Plant Science 96: 1–5.

Suslow, T.V. 2004. Oxidation-Reduction Potential (ORP) for water disinfection monitoring, control and documentation. University of California, Davis: p.1-5.

Tamaki, M., F. Kobayashi, H. Ikeura and M. Sato. 2018. Disinfection by ozone microbubbles can cause morphological change of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Spores. Journal of Plant Pathology 34(4): 335–340.