Agricultural Sci. J. 50 : 3 (Suppl.) : 187-190 (2019) ว. วิทย. กษ. 50 : 3 (พิเศษ) : 187-190 (2562)

สภาพบรรยากาศจำลองจากกองเก็บเมล็ดธัญพืชต่อการพัฒนาของเชื้อราในโรงเก็บ

The Storage Atmosphere Condition of the Grain Stack Effect to the Development of the Storage Mold

ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1,2] สรรเสริญ รังสุวรรณ[1,2] พิสุทธิ์ เขียวมณี[1,2] และ รัติยา พงศ์พิสุทธา[1,2]

Chainarong Rattanakreekul[1,2], Sansern Rangsuwan[1,2], Pisut Keawmanee[1,2] and Ratiya Pongpisutta[1,2]

Abstract

The atmosphere surrounds the grain stack is change due to the respiration from grain and the microorganisms. The storage atmosphere also affects the activity of the storage fungi. In this study, the atmosphere inside the grain stack was adjusted to the higher carbon dioxide concentration with the Anaerocult® gas trapper and the oxygen absorber was used to lower oxygen concentration. Both conditions were tested to the storage molds as *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. They had no difference for the fungal growth from the tested atmosphere compared with the ambient atmosphere. *A. flavus* colony character under the higher carbon dioxide concentration showed the darker of the colony color with the higher of the conidia producing whereas *F. verticillioides* was no effect. This knowledge will support the future used tecnic of the fungal fumigation under the grain storage condition.

Keywords: storage grain, atmosphere, food safety

บทคัดย่อ

สภาพบรรยากาศในกองเมล็ดธัญพืชมีการเปลี่ยนแปลง อันเนื่องมาจากการหายใจของผลิตผลเกษตร และจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน ซึ่งแก๊สที่เกิดขึ้นภายในกองเมล็ดธัญพืชมีอิทธิพลต่อการเจริญของเชื้อราที่แฝงตัวอยู่ที่เมล็ดธัญพืช จากการปรับสภาพบรรยากาศในโถที่ปิดสนิท เพื่อจำลองสภาพในกองเก็บเมล็ดธัญพืชที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูง และมีออกซิเจนต่ำ โดยใช้ชุด Anaerocult® ร่วมกับชุดดูดซับออกซิเจนที่ทำให้ปริมาณออกซิเจนในบรรยากาศลดลง ตรวจวัดผลการเจริญของเชื้อราในโรงเก็บชนิด Aspergillus flavus และ Fusarium verticillioides เทียบกับสภาพบรรยากาศปกติ พบว่า ไม่มีความแตกต่างของการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้งสองชนิดที่เจริญในสภาพดัดแปลงบรรยากาศเทียบกับชุดควบคุม แต่ในสภาพที่คาร์บอนไดออกไซด์สูงพบ ลักษณะสีโคโลนีของเชื้อรา A. flavus มีสีเขียวเข้มมากขึ้นพร้อมกับการสร้างโคนิเดียเพิ่มมากขึ้น สำหรับสภาพที่มีออกซิเจนต่ำจะลดอัตราการเจริญของเชื้อราได้ ยกเว้นเชื้อ F. verticillioides ที่การปรับสภาพบรรยากาศไม่มีผลต่อขนาดโคโลนีและการสร้างโคนิเดีย ข้อมูลนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการใช้สารรมในเพื่อยับยั้งเชื้อราในสภาพกองเก็บธัญพืช

คำสำคัญ: เชื้อราโรงเก็บ สภาพบรรยากาศ อาหารปลอดภัย

คำนำ

ผลผลิตทางการเกษตรจากแปลงมักจะประสบปัญหาในด้านคุณภาพ สภาพการเก็บรักษาจะแปรผันไปตามลักษณะวัตถุดิบที่มาจากแปลง ในกลุ่มธัญพืชพบว่า ปัจจัยภายในที่มาจากคุณภาพ ได้แก่ อายุ และความชื้น โดยมีปัจจัยร่วมได้แก่ ความสกปรกของฝัก และการปนเปื้อนของเชื้อราบนฝัก ซึ่งมีผลต่อคุณภาพ และอายุการเก็บรักษาเมล็ดข้าวโพด สำหรับปัจจัยจากสภาพบรรยากาศในโรงเก็บ (storage atmosphere) เป็นปัจจัยหนึ่งที่ได้นำใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ วิธีที่ได้รับความนิยมในการเก็บรักษาธัญพืชของประเทศไทยคือ การเก็บแบบ bag stack และ indoor bulk ทั้งนี้ การเก็บทุกรูปแบบทำให้คุณภาพของธัญพืชลดลงตลอดระยะเวลาที่มีการเก็บรักษา (WHO, 2018) ปัจจัยที่มีผลต่อการเสื่อมของคุณภาพธัญพืชลงอย่างรวดเร็วคือ อุณหภูมิ (grain temperature) และความชื้น (moisture content) ปัจจัยทั้ง 2 นี้ มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาตามสภาพการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (ambient temperature) และความชื้นสัมพัทธ์ (relative humidity) ของอากาศ ในการศึกษาครั้งนี้ได้พิจารณาปัจจัยของสภาพของคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีผลต่อความผิดปกติของเชื้อราที่อยู่ในสภาพโรงเก็บประเภท *Aspergillus* sp. และ *Fusarium* sp. เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดการสภาพการควบคุมในระดับโรงเก็บรักษา

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

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

[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10400

[2] Postharvest Technology Innovation Center, Commission on Higher Education Commission, Bangkok 10400

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อรา *Aspergillus* sp. และเชื้อรา *Fusarium* sp. จากเมล็ดข้าวโพด

นำเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในพื้นที่ผลิตจังหวัดนครปฐม และกาญจนบุรี ด้วยวิธี blotter method จากห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาด้านโรคพืช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *A. flavus* จำนวน 2 ไอโซเลท ประกอบไปด้วย ไอโซเลท L-morphotype strain มีความสามารถในการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินน้อย และไอโซเลท S-morphotype strain ที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินมาก (Gilbert *et al.,* 2018) และเชื้อรา *F. verticillioides* ทำการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการตัดปลายเส้นใยของเชื้อราแต่ละไอโซเลทไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อนำไปทดสอบสภาพบรรยากาศที่แตกต่าง

2. การตรวจสอบสภาพการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงบรรยากาศ

จัดเตรียมภาชนะทรงสูง ปริมาตร 1,600 ลูกบาศก์เซนติเมตร เพื่อใช้บรรจุจานเลี้ยงเชื้อพร้อมกับถุงบรรจุสารเพื่อการดัดแปลงสภาพบรรยากาศในภาชนะปิด โดยใช้ชุด Anaerocult® (Merck) จำนวน 2 ซอง, ชุดดูดซับออกซิเจน (oxygen absorber) (Longer keep®) จำนวน 6 ซอง และสภาพปกติเป็นชุดควบคุม ในสภาพบรรยากาศที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แสดง เมื่อระยะเวลาผ่านไป 8 วัน ทำการตรวจสอบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเชื้อรา *A. flavus* และ *F. verticillioides* โดยสำรวจลักษณะสี การเจริญของเส้นใย และตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิด stereo microscope พร้อมการตรวจนับปริมาณโคนิเดียที่พบ

ผลและวิจารณ์ผล

การเปลี่ยนแปลงของคาร์บอนไดออกไซด์ และออกซิเจนในสภาพการเก็บรักษาเมล็ดธัญพืชมีความแปรผันไปตามธัญพืชก่อนการเก็บ โดยทั่วไปพบว่า ออกซิเจนจะลดลงจากที่พบในบรรยากาศปกติ 21% ไปเป็น 12%, 9% และต่ำกว่า 1% โดยคาร์บอนไดออกไซด์จะสะสมเพิ่มขึ้นในกองจากสภาพปกติ 0.03 – 0.04% ไปเป็น 3 – 9% เมื่อสภาพความชื้นของธัญพืชเป็น 12%, 13% และ 15% ตามลำดับ (Abalone *et al.,* 2011) สำหรับชุด Anaerocult® (Merck) เมื่อมีการนำไปใช้ในสภาพปิด สามารถลดปริมาณออกซิเจนได้จาก 21% ให้เหลือ 5% และทำให้คาร์บอนไดออกไซด์สามารถเพิ่มขึ้นเป็น 8 % ภายในเวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากชุดนี้มีการใช้ผงเหล็กช่วยในการดูดจับออกซิเจน และมีการผสม calcium carbonate (Merck, 2019) และชุดดูดจับออกซิเจน (oxygen absorber) ที่มีการใช้ในการเก็บรักษาอาหาร จะทำให้ออกซิเจนลดลงในระดับต่ำกว่า 1% และสภาพคาร์บอนไดออกไซด์ในระดับปกติที่ 0.03 – 0.04 % ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง (วีรเวทย์, 2555) ทำให้การใช้ชุดดัดแปลงดังกล่าว สามารถใช้เพื่อศึกษาการตอบสนองของเชื้อราจากการจัดรูปแบบบรรยากาศในการเก็บรักษาธัญพืช

เชื้อราที่ทดสอบ *A. flavus* และเชื้อรา *F. verticillioides* เป็นเชื้อราที่แยกออกมาจากเมล็ดข้าวโพด สำหรับเชื้อรา *A. flavus* ได้มีการตรวจการสร้างสารพิษ โดยคัดเลือกมาสองไอโซเลท ชนิดที่มีการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน และชนิดที่ไม่มีการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน ความแตกต่างของเชื้อทั้งสองกลุ่มนี้มีการศึกษามาโดย Gilbert *et al.* (2018) ก่อนหน้านี้แล้วในลักษณะ L-morphotype คือ เชื้อรา *A. flavus* มีการสร้าง sclerotium ขนาดใหญ่ แต่พบการสร้างสารพิษน้อย S-morphotype strain ซึ่งมีการสร้างเม็ด sclerotium ขนาดเล็ก

จากการศึกษาการดัดแปลงบรรยากาศที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเชื้อรา ทำการศึกษาถึงการตอบสนองของเชื้อราในด้านสี ลักษณะของโคโลนี และจำนวนของโคนิเดีย ของเชื้อรา *A. flavus* ชนิด L-morphotype และ S-morphotype strain ดังแสดงใน Figure 1 และ 2 โดยพบว่า สภาพออกซิเจนต่ำมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ (Figure 1-C, 2-C) แต่สภาพที่คาร์บอนไดออกไซด์สะสมมากขึ้นที่เกิดจากชุด Anaerocult® จะไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา (Figure 1-B, 2-B) สำหรับผลต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อราพบว่า สภาพที่คาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นทำให้เชื้อรา *A. flavus* L-morphotype มีการสร้างสปอร์เพิ่มขึ้นเป็น 2.3×10^{10} conidia/ ml ในขณะที่ชุดปกติมีการสร้างสปอร์ 1.8×10^{9} conidia/ ml ในขณะที่เชื้อรา *F. verticillioides* ไม่พบผลกระทบทางด้านการเจริญ และการสร้างสปอร์จากการเปลี่ยนแปลงสภาพบรรยากาศ

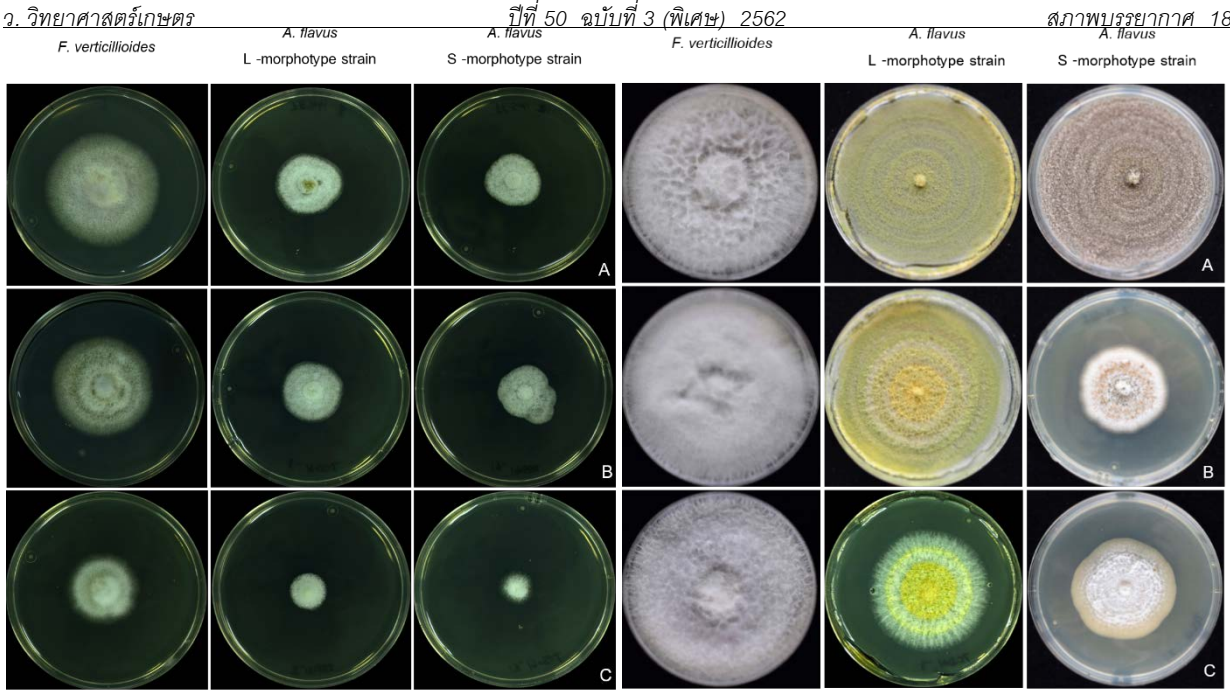

Figure 1 Fungal colony characters of *F. verticillioides*, *A. flavus* L - morphotype strain and *A. flavus* S - morphotype strain after the derived atmosphere condition in closet for 3 d (left) and 8 d (right); A) non treat B) treated with Anaerocult® and C) treated with oxygen absorber.

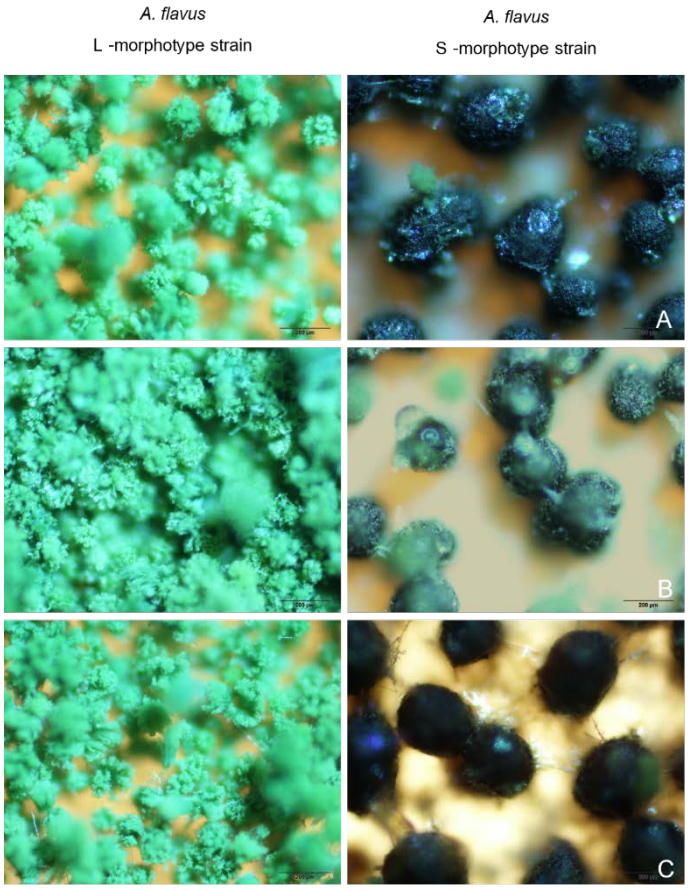

Figure 2 Stereo microscope of the *A. flavus* conidial head after the derived atmosphere condition in closet for 8 d. *A. flavus* L-morphotype strain (left hand site) and *A. flavus* S -morphotype strain (right hand site) (left) ; A) non treat B) treated with Anaerocult® and C) treated with oxygen absorber.

จาก Figure 2 ลักษณะความแตกต่างของบริเวณ conidial head เชื้อรา *A. flavus* types L-morphotype strain ที่มีความหนาแน่นมากขึ้นในสภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูง (Fig 2-B) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และชุดที่ไม่มีออกซิเจน (Fig 2-A และ Fig 2-C) ซึ่งสภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูงมีส่วนเสริมให้เชื้อราบางกลุ่มเจริญได้ดี โดยเฉพาะ *A. flavus* types L - morphotype strain ซึ่งคล้ายกับที่ Yang and Lucas (1970) ได้บรรยายเชื้อ *A. niger* แต่สภาพดังกล่าวมีผลกระทบน้อยกับเชื้อ *Fusarium* sp. ซึ่งเป็นเชื้อราในดิน ลักษณะนี้แสดงให้เห็นว่าการปรับสภาพบรรยากาศสามารถใช้เพื่อควบคุมเชื้อราในกลุ่ม mold ที่มีการสร้างโคนิเดียขึ้นที่ผิวเท่านั้น แต่ในสภาพที่เชื้อรามีการฝังตัวลงในวัสดุ หรือเชื้อราที่ไม่สร้างโคนิเดียบนพื้นผิว การใช้สภาพบรรยากาศควบคุมทำได้ยากกว่า

สรุป

สภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูง ระดับ 9% และมีออกซิเจนต่ำกว่า 1 % โดยใช้ Anaerocult® มีผลต่อลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. flavus* L-morphotype strain ที่มีปริมาณมากขึ้น เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่การใช้ชุดดูดจับออกซิเจน ที่ให้คาร์บอนไดออกไซด์ต่ำที่ 0.04%- และออกซิเจนน้อย ที่ระดับ 0.5 % จะมีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ทั้งสองชนิด และการเปลี่ยนแปลงสภาพบรรยากาศไม่มีผลต่อเชื้อรา *F. verticillioides*

เอกสารอ้างอิง

วีรเวทย์ อุทโธ. 2555. เทคโนโลยีการบรรจุเชิงแอคทีฟสำหรับผลิตภัณฑ์อาหาร. เอกสารประกอบการสอน. สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.agri.ubu.ac.th/mis/evaluate/assess_learn/upload/61566.pdf. (3 มกราคมคม 2562).

Abalone, R., A. Gastón, R. Bartosik, L. Cardoso and J. Rodríguez. 2011. Gas concentration in the interstitial atmosphere of a wheat silo-bag. Part I: Model development and validation. Journal of Stored Products Research 47 : 268 – 275.

Gilbert, M.K., B.M. Mack, G.G. Moore, D.L. Downey, M.D. Lebar, V. Joardar, L. Losada, J. Yu, W.C. Nierman and D. Bhatnagar. 2018. Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* L-morphotype strain NRRL 3357 (type) and S-morphotype strain AF70. PLoS ONE 13(7)

Merck. 2019. Anaerocult® A. [Online]. Available source: http://www.merckmillipore.com/TH/en/product/Anaerocult-A,MDA_CHEM-113829#anchor_Product%20Information. (2 January. 2019).

WHO. 2018. Food safety digest, Aflatoxins pose a serious health risk to humans and livestock. [Online]. Available source https://www.who.int/foodsafety/FSDigest_Aflatoxins_EN.pdf. (2 January. 2019).

Yang. H. and G.B. Lucas. 1970. Effects of N_2 - O_2 and CO_2 - O_2 tensions on growth of fungi isolated from damaged flue-cured Tobacco. Applied microbiology 19 (20): 271 – 277.