

ผลของแก๊สพลาสมาต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ในสภาพห้องปฏิบัติการ
Effect of Plasma Gas on Inhibition of *Pestalotiopsis* sp. *in vitro*

ศุภลักษณ์ ชิตวรกุล¹ วรณวารงค์ พัฒนะโพธิ์^{1,2} ธนะชัย พันธุ์เกษมสุข^{1,3} อธิวรรณ บุญญวรรณ⁴ อรุมา เรืองวงษ์⁵
และวัลย์พร มุลพุ่มสาย¹

Supaluk Chitworakool¹, Wanwarang Pattanapo^{1,2}, Tanachai Pankasemsuk^{1,3}, Dheerawan Boonyawan⁴, On-Uma Ruangwong⁵ and
Walaiphon Moonpumsai¹

Abstract

Pestalotiopsis sp. is a fungus that cause fruit rot in longan fruit after harvest. This study using plasma gas to inhibit the growth of *Pestalotiopsis* sp. *in vitro*. The plasma gas was sprayed to the surface of PDA culture media before the fungal culture for 0, 3, 5, and 8 minutes and direct sprayed to the fungi for 2, 5, and 8 minutes after culture. For medium plasma spraying, the growth of fungi after 2-8 days were recorded, and calculated for the percent inhibition of the mycelium radial growth. The results showed that spraying plasma gas could delay the growth of the fungus. Spraying plasma gas for 5 minutes was the best treatment for delaying the growth, about 40.10% inhibition. Spraying plasma gas for 3 and 8 minutes had 29.95% and 12.27% inhibition respectively. In the case of plasma direct spraying on fungi for 8 minutes, it could inhibit mycelial growth rate to 41.58% which was greater than plasma spraying for 5 and 2 minutes, the inhibit rates of 37.86% and 28.27%, respectively. These results could be inferred that plasma gas had the potential to develop as a postharvest treatment of longan.

Keywords: plasma, percent inhibition of radial growth, fungi

บทคัดย่อ

Pestalotiopsis sp. เป็นเชื้อราสาเหตุโรคเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของผลลำไย จากการศึกษาดูผลการใช้แก๊สพลาสมาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในสภาพ *in vitro* โดยทำการพ่นแก๊สพลาสมาเป็นเวลา 0, 3, 5 และ 8 นาที ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ก่อนที่จะนำเชื้อรามาลงเพาะ และพ่นลงบนเชื้อราโดยตรงเป็นเวลา 2 นาที, 5 นาที และ 8 นาที แล้วนำเชื้อราไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ใหม่ บันทึกการเจริญของเส้นใยเชื้อราหลังเพาะ 2-8 วัน จากนั้นนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ผลการทดลองพบว่า การพ่นแก๊สพลาสมาสามารถทำให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ช้ากว่าปกติ การพ่นแก๊สพลาสมาเป็นเวลา 5 นาที จะมีผลในการยับยั้งเชื้อราดีที่สุดคือ 40.10% รองลงมาคือ พ่นแก๊สพลาสมาเป็นเวลา 3 และ 8 นาที มีผลยับยั้ง 29.95% และ 12.27% ตามลำดับ ส่วนการพ่นพลาสมาลงบนเชื้อราโดยตรงที่ 8 นาที สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด 41.58% รองลงมาคือ 5 และ 2 นาที ยับยั้งเชื้อราได้ 37.86% และ 28.27% ตามลำดับ ผลการทดลองครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าแก๊สพลาสมามีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นแนวทางในการยืดอายุการเก็บรักษาลำไยหลังการเก็บเกี่ยวได้

คำสำคัญ: พลาสมา, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ, เชื้อรา

คำนำ

ลำไยเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทยที่มีแหล่งปลูกหลักๆ ในจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน มีการส่งออกทั้งในเอเชียและยุโรป (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) และเป็นผลไม้ที่มีอายุการเก็บรักษาล้นมาก เน่าเสียได้ง่าย เนื่องจากลำไยมีปริมาณน้ำตาลสูงมาก มักเกิดโรค โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อรา เช่น โรคผลเน่า โรคขั้วผลเน่า ซึ่งเชื้อราอาจปนเปื้อนอยู่

¹ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

² Postharvest Technology Research Institute, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

³ ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10400

⁴ Postharvest Technology Innovation Center, Commission on Higher Education, Bangkok 10400

⁵ ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

³ Department of Plant and Soil Science, Faculty of Agriculture Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

⁴ ภาควิชาฟิสิกส์-วัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

⁴ Department of Physics, Faculty of Science Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

⁵ ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

⁵ Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

ตามเปลือกผล และอาจเข้าทำลายได้ในระหว่างการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว สำหรับการผลิตและส่งออกผลลำไยพันธุ์ดอในลักษณะของผลไม้สดไปยังต่างประเทศนั้นต้องใช้เวลาในการขนส่งนาน ปัจจุบันการควบคุมหรือป้องกันการเน่าเสียของผลลำไยสดหลังการเก็บเกี่ยว มักจะใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราหรือซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาสารพิษตกค้างเกินระดับมาตรฐาน และเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้

เทคโนโลยีพลาสมา (plasma technology) เป็นเทคโนโลยีที่กำลังได้รับความนิยมในการนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ จุดเด่นของเทคโนโลยีคือเป็นหนึ่งในเทคโนโลยีสะอาด (clean technology) โดยจะทำให้เกิด OH radical ซึ่งสามารถก่อความเสียหายต่อโครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อราได้ (Wang et al., 2012) งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการใช้แก๊สพลาสมาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่อยู่บนผลลำไย เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาลำไยให้มีคุณภาพดีและยืดอายุการเก็บรักษาได้นานยิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองใช้แก๊สพลาสมาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยใช้เครื่องกำเนิดพลาสมาแบบเจ็ท กำลังไฟฟ้า 20 วัตต์ ความต่างศักย์ 40 โวลต์ กระแสไฟฟ้า 0.5 แอมแปร์ ใช้แก๊สอาร์กอน 4 ลิตร/นาที ผสมกับแก๊สออกซิเจน 36 มิลลิลิตร/นาที ระยะห่างของหัวพ่นแก๊สพลาสมา กับสิ่งทดลอง เป็นระยะ 1 เซนติเมตร (Figure 1) ในการทดลองนี้ ประกอบด้วย 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ทำการพ่นแก๊สพลาสมาเป็นเวลา 3, 5 และ 8 นาที ลงบนผิวหน้าอาหาร potato dextrose agar (PDA) ให้ทั่วทั้งจาน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านพลาสมา เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการพ่นพลาสมา การทดลองที่ 2 จะใช้พลาสมาพ่นลงเชื้อราที่เจริญอยู่บนจานอาหารโดยตรง เป็นระยะเวลา 2, 5 และ 8 นาที แล้วนำเชื้อรา ไปเพาะในอาหาร PDA ใหม่ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการพ่นพลาสมา บันทึกการเจริญของเชื้อราทุกวันหลังการเพาะเชื้อตั้งแต่ 2-8 วัน การวัดการเจริญทำโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) กำหนดให้ 1 กรรมวิธี มีจำนวน 10 ซ้ำ วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 16

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (percent inhibition of radial growth, PIRG) (เกษม, 2532) ของพลาสมาที่มีต่อเชื้อดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (PIRG)} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

R1

R1 คือ รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุในชุดควบคุม และ R2 คือ รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุในชุดทดลอง

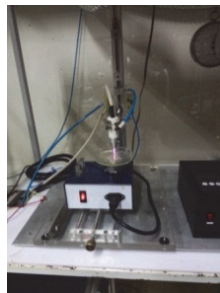


Figure 1 Plasma device

ผล

การทดลองที่ 1 เมื่อวัดการเจริญของเชื้อราทุกวันหลังการเพาะเชื้อลงจานอาหาร 2-8 วัน พบว่า การพ่นแก๊สพลาสมาเป็นเวลา 5 นาที ให้ที่วบนผิวหน้าอาหาร PDA ก่อนนำไปเลี้ยงเชื้อ เชื้อรามี้อัตราการเจริญเติบโตได้ช้าที่สุด รองลงมาคือการทดลองพ่นแก๊สพลาสมา 3 และ 8 นาที ในขณะที่ชุดควบคุมจะมีการเจริญเติบโตของเชื้อดีที่สุด (Figure 2)

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแก๊สพลาสมาต่อเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ในกรรมวิธีที่พ่นแก๊สพลาสมาเป็นเวลา 3, 5 และ 8 นาที ให้ที่วบนผิวหน้าอาหาร PDA ก่อนนำไปเลี้ยงเชื้อรา หลังการเลี้ยงเชื้อรา 8 วัน พบว่าการพ่นแก๊สพลาสมาเป็นเวลา 5 นาที มีผลในการยับยั้งของเชื้อดีที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเป็น 40.10% รองลงมาคือ การพ่นแก๊สพลาสมาเป็นเวลา 3 และ 8 นาที มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเป็น 29.95 และ 12.27% ตามลำดับ กรรมวิธีที่พ่นแก๊สพลาสมาเป็นเวลา 5 และ 8 นาที มีค่า

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% แต่ไม่มีความแตกต่างกับการพ่นที่ 3 นาที (Table 1)

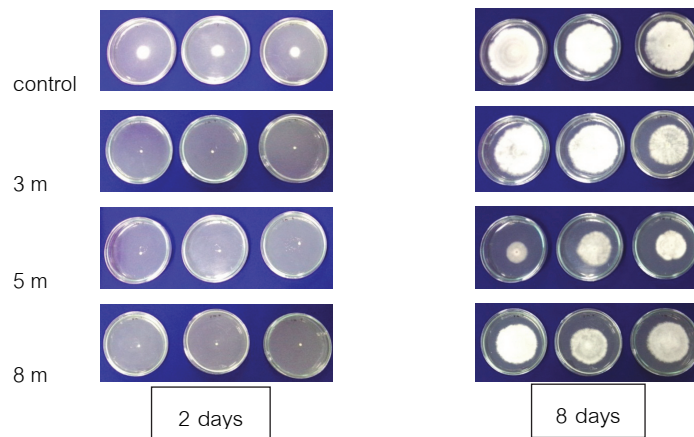


Figure 2 Mycelia growth of *Pestalotiopsis* sp. on plasma treated PDA, at 2 and 8 days

Table 1 Growth inhibition percentage of *Pestalotiopsis* sp. on plasma treated PDA

| Treatment | Percent inhibition of radial growth (%) | | | | | | | |
|-----------|---|-----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | time | Day2 | Day3 | Day4 | Day5 | Day6 | Day7 | Day8 |
| 3 min | | 66.85ab ^{1/} | 47.96ab | 37.58ab | 31.40ab | 31.23ab | 29.30ab | 29.95ab |
| 5 min | | 94.02a | 76.74a | 59.91a | 48.17a | 43.40a | 41.27a | 40.10a |
| 8 min | | 56.52b | 31.97b | 20.88b | 16.11b | 14.96b | 11.83b | 12.27b |

^{1/} Value with different letters within a column were significantly different according to least significant difference (LSD) at P < 0.05

การทดลองที่ 2 การพ่นแก๊สพลาสมาลงบนเชื้อราโดยตรงแล้วนำมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ พบว่าการพ่นแก๊สพลาสมาบนเชื้อราเป็นเวลา 8 นาที ทำให้เชื้อรามี้อัตราการเจริญเติบโตได้ช้าที่สุด รองลงมาคือ การพ่นแก๊สพลาสมาเป็นเวลา 5 และ 2 นาที ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมเชื้อเจริญได้ดีที่สุด (Figure 3)

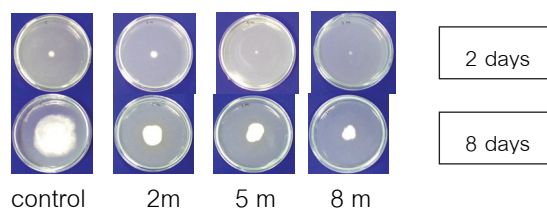


Figure 3 Mycelia growth of *Pestalotiopsis* sp. after direct treated with plasma, on PDA at 2 and 8 days

เมื่อนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต พบว่าการใช้แก๊สพลาสมาพ่นบนเชื้อราเป็นเวลา 8 นาที สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเป็น 41.58% เมื่อพ่นแก๊สพลาสมาบนเชื้อราเป็นเวลา 5 นาที สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 37.86% และเวลา 2 นาที ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 28.27% (Table 2)

Table 2 Growth inhibition percentage of *Pestalotiopsis* sp. after direct treated with plasma

| Treatment | Percent inhibition of radial growth (%) | | | | | | | |
|-----------|---|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | time | Day2 | Day3 | Day4 | Day5 | Day6 | Day7 | Day8 |
| 2 min | | 4.84c ^{1/} | 6.63b | 7.42b | 8.43b | 11.68b | 23.42b | 28.27a |
| 5 min | | 51.02b | 49.97a | 51.48a | 38.42a | 38.77a | 43.06a | 37.86a |
| 8 min | | 88.17a | 68.25a | 69.00a | 56.22a | 56.57a | 49.86a | 41.58a |

^{1/} Value with different letters within a column were significantly different according to least significant difference (LSD) at P < 0.05

จาก Table 2 เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 3 กรรมวิธี ในวันที่ 2 เท่านั้นที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ วันที่ 3-7 กรรมวิธีที่พ่นแก๊สพลาสมาเป็นเวลา 5 กับ 8 นาที มีความแตกต่างกับกรรมวิธีที่พ่นเป็นเวลา 2 นาที ในขณะที่วันที่ 8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ในทุกกรรมวิธี

วิจารณ์ผล

การพ่นแก๊สพลาสมาลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จะทำให้เกิด OH radical บนพื้นผิวอาหารที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ (Yonemori and Ono, 2014) ซึ่งจะเป็นตัวสำคัญในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดย OH radical จะเข้าไปทำลายกรดไขมันไม่อิ่มตัวและชั้นโปรตีนบน cell membrane จึงเป็นสาเหตุให้ polysaccharides ที่ผนังเซลล์เสียหายจนกระทั่งทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Wang *et al.*, 2012) ในการพ่นแก๊สพลาสมาลงบนอาหาร PDA ก่อนแล้วจึงเพาะเชื้อรา และการพ่นแก๊สพลาสมาลงบนเชื้อราโดยตรง สามารถชะลอการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้

การใช้แก๊สพลาสมาพ่นลงอาหาร PDA เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหารดังกล่าว มีผลในการยับยั้งของเชื้อได้ดีที่สุด มากกว่า 3 และ 8 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในขณะที่พ่นแก๊สพลาสมา นั้น จะพบความร้อนเกิดขึ้นที่บริเวณผิวหน้าอาหาร PDA จึงเป็นสาเหตุทำให้ OH radical สลายตัวไปได้ อีกทั้งในอาหาร PDA มีมันฝรั่งเป็นส่วนประกอบ ซึ่งมีการทดลองแล้วว่าโนเปือกมันฝรั่งมีคุณสมบัติในการจับอนุมูลอิสระ (Singh and Rajini, 2003) OH radical จึงมีน้อยลง

ส่วนการทดลองที่พ่นแก๊สพลาสมาลงบนเชื้อราโดยตรง แล้วจึงย้ายเชื้อราไปยังอาหาร PDA ใหม่ พบว่าที่เวลา 8 นาที ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด มากกว่า 5 และ 2 นาที ซึ่งเป็นไปตามสมมติฐานที่ว่าเมื่อเชื้อราสัมผัสแก๊สพลาสมา ก็จะถูกทำลายจาก OH radical ส่วนของเชื้อราที่เจริญลึกลงไปในอาหารบางส่วนอาจจะมีโอกาสรอดมากขึ้น (Wang *et al.*, 2012) เมื่อสัมผัสแก๊สพลาสมาเป็นเวลาไม่นาน

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ในทั้ง 2 การทดลองยังถือว่ามีประสิทธิภาพต่ำเพราะมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยกว่า 50% (เกษม, 2532) อย่างไรก็ตามในการทดลองต่อไป ควรจะมีการปรับเปลี่ยนหรือพัฒนาวิธีการทดลองเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเพิ่มมากขึ้น

สรุป

การทดลองใช้แก๊สพลาสมาพ่นลงบนอาหาร PDA ก่อนแล้วจึงเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร เวลาในการพ่นแก๊สพลาสมา 5 นาที ได้ผลดีที่สุด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 40.10% ส่วนการพ่นแก๊สพลาสมาโดยตรงลงบนเชื้อราที่เวลา 8 นาที สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด 41.58%

คำขอขอบคุณ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำหรับทุนสนับสนุนในการทำวิจัยบางส่วน

เอกสารอ้างอิง

- เกษม สร้อยทอง. 2532. การใช้รา *Chaetomium cupreum* ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวโดยชีววิธี. วารสารโรคพืช 9(1): 28-33.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=13577. (2 พฤษภาคม 2559).
- Singh, N. and P.S. Rajini. 2003. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. Food Chemistry 85: 611-616.
- Wang, R.X., W.F. Nian, H.Y. Wu, H.Q. Feng, K. Zhang, J. Zhang, W.D. Zhu, K.H. Becker and J. Fang. 2012. Atmospheric-pressure cold plasma treatment of contaminated fresh fruit and vegetable slices: inactivation and physiochemical properties evaluation. The European Physical Journal D 66: 276 p.
- Yonemori, S. and R. Ono. 2014. Flux of OH and O radicals onto a surface by an atmospheric-pressure helium plasma jet measured by laser-induced fluorescence. Journal of Physics D: Applied Physics 47:10 pp.