

ผลของเกลืออนินทรีย์ร่วมกับการควบคุมปริมาณน้ำอิสระต่ออัตราการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่คัดแยกได้จากพริกไทยดำ (*Piper nigrum* L.)

Effects of Inorganic Salts and Water Activity on Growth Rate of *Aspergillus flavus* Isolated from Black Pepper (*Piper nigrum* L.)

สุพรรณิการ์ สมใจเพ็ง¹ และ ณัฐนันท์ เนียมโส¹
Somjaipeng, S.^{1*} and Niamsot, N.¹

Abstract***

This study examined the combined effects of inorganic salts (chloride salts and sulphate salts) and water activity (a_w) on mycelial growth of *Aspergillus flavus* isolated from black pepper. In vitro treatment trials were performed by supplementing cultured medium (Potato dextrose agar) with studied inorganic salts at different concentrations (0, 0.5, 1.0 and 2.0% w/v). The a_w of media was modified by adding increasing amounts of glycerol to obtain the following a_w treatment levels of 0.90 and 0.95. Statistical analysis indicated that inorganic salts, a_w and their interactions significantly affected mycelial growth rate ($P < 0.05$). Overall, *A. flavus* exhibited sensitive responses to calcium chloride treatments under more freely available water conditions ($> 0.95a_w$) at 0.5-2% w/v. The strong antifungal activity was obtained reducing the mycelial growth by 50%. While supplementing the media with sulphate salts significant efficacy was obtained at $0.95a_w$ with $> 0.5\%$ w/v. According to ED_{50} values, calcium chloride displayed the highest inhibition effect on the mycelial growth rate of *A. flavus* by 50% at doses 0.1023% w/v (ED_{50}) under $> 0.95a_w$ conditions. While showed low antifungal activity reducing the mycelial growth by 50% ($ED_{50} > 2\%$ w/v) under lowered a_w ($0.95-0.90a_w$).

Keywords: *Aspergillus*, pepper, inorganic salts, water activity

บทคัดย่อ***

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของสารประกอบเกลืออนินทรีย์ (กลุ่มคลอไรด์และกลุ่มซัลเฟต) ร่วมกับ water activity (a_w) ต่อการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา *Aspergillus flavus* (ที่แยกได้จากเมล็ดพริกไทย) ทำโดยเลี้ยงเชื้อราในอาหาร Potato Dextrose Agar ที่ผสมเกลืออนินทรีย์ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% ร่วมกับการปรับให้อาหารมีค่า a_w 0.90 และ 0.95 ด้วยกลีเซอรอล ผลการทดลองพบว่า เกลืออนินทรีย์ a_w และอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสอง มีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อรา ($P < 0.05$) และพบว่าเชื้อรา *A. flavus* มีความไวต่อเกลือแคลเซียมคลอไรด์มากที่สุดที่ปริมาณน้ำอิสระมาก ($a_w > 0.95$) โดยที่ระดับความเข้มข้นของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ 0.5-2% w/v สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้มากกว่า 50% เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เกลือกลุ่มซัลเฟตสามารถควบคุมอัตราการเจริญของเชื้อราได้ดีที่ $0.95a_w$ ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 0.5% w/v จากการวิเคราะห์ค่า ED_{50} พบว่าการใช้เกลือแคลเซียมคลอไรด์มีค่า ED_{50} เท่ากับ 0.1023% w/v เมื่อทำการทดลองภายใต้สภาวะที่มีปริมาณน้ำอิสระมาก $> 0.95a_w$ แต่ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ลดลง (ED_{50} มากกว่า 2% w/v) ที่สภาวะ $0.95-0.90a_w$

คำสำคัญ: *Aspergillus* พริกไทย เกลืออนินทรีย์ ปริมาณน้ำอิสระ

คำนำ**

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่มีกบป็นเพื่อนในพืชอาหารทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวในพริกไทยและผลิตภัณฑ์พริกไทย มีรายงานการพบเชื้อราหลายสกุล ได้แก่ *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. และ *Fusarium* sp. (Garcia และคณะ., 2018; Sabokbar และคณะ., 2018) จากความสามารถของเชื้อราที่เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิและ a_w กว้าง สามารถสร้างสปอร์เป็นจำนวนมาก ส่งผลให้เกิดความเสียหายทั้งทางด้านคุณภาพของผลิตภัณฑ์และสุขภาพของผู้บริโภคได้ เนื่องจากเชื้อราบางสปีชีส์สามารถสร้างสารไมโคทอกซินที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค การใช้สารเคมีในการกำจัดตามวิธีแบบดั้งเดิมอาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคเรื่องสารเคมีตกค้างได้ การลดการใช้สารเคมีอันตรายทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้ความร้อน การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ การใช้สารประกอบที่ได้จากธรรมชาติ รวมทั้งการใช้วัตถุเจือปนอาหาร เป็นต้น (Feng และคณะ., 2013; Irshad และคณะ., 2014)

¹ สาขาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี 22170

Division of Agricultural Technology, Faculty of Science and Arts, Burapha University, Chanthaburi Campus, Chanthaburi 22170

สารประกอบเกลืออนินทรีย์กลุ่มคลอไรด์ (แคลเซียมคลอไรด์ โพแทสเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์) และกลุ่มซัลเฟต (แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมซัลเฟต และโซเดียมไทโอซัลเฟต) จัดเป็นวัตถุเจือปนอาหารในกลุ่ม Generally Recognized as Safe หรือ GRAS สามารถเติมลงในอาหารได้อย่างปลอดภัย และให้ใช้เท่าที่จำเป็นมีการควบคุมปริมาณการใช้ตามข้อกำหนดของ Codex (FAO, 2019) สารประกอบเกลือคลอไรด์และเกลือซัลเฟตสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคหลายชนิด เช่น เกลือแคลเซียมคลอไรด์มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Botrytis cinerea* (Boumaaza และคณะ, 2015), *Fusarium oxysporum* (Turkkan, 2013), และ *Collectotrichum* sp. (Bigges และคณะ, 1999; Awang และคณะ, 2011) เป็นต้น ถึงแม้ว่าจะมีงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เกลืออนินทรีย์ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา แต่ข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาถึงผลของอิทธิพลร่วมระหว่างการใช้สารประกอบกลุ่มเกลือคลอไรด์และเกลือซัลเฟต และ a_w ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราที่คัดแยกได้จากพริกไทยดำมีน้อย ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่งานวิจัยนี้จะทำให้เกิดความเข้าใจถึงผลของอิทธิพลร่วมดังกล่าว เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราในผลิตภัณฑ์พริกไทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ**

เชื้อรา *A. flavus* (แยกได้จากผลิตภัณฑ์พริกไทยที่วางจำหน่ายใน อ.ท่าใหม่ และ อ. เมือง จ.จันทบุรี) ที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน มาใช้ในการทดลองนี้ โดยนำ cork borer (\varnothing 5 มม.) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เจาะที่ปลายเส้นใยของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA จากนั้นนำ mycelial disc ที่ได้วางลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ที่มีการปรับค่า a_w มีค่า a_w เท่ากับ 0.90 และ 0.95 ด้วย glycerol และตรวจสอบค่า a_w ด้วยเครื่อง a_w meter (Aqualab, Decagon device Inc., USA) และมีการเติมเกลืออนินทรีย์ทดสอบกลุ่มเกลือคลอไรด์ (แคลเซียมคลอไรด์ โพแทสเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์) และกลุ่มเกลือซัลเฟต (แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมซัลเฟต และโซเดียมไทโอซัลเฟต) ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2% (w/v) แต่ละกรรมวิธีที่ 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บันทึกผลการทดลอง ได้แก่ 1) อัตราการเจริญของเส้นใย ทำโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดโคโลนีของเชื้อราใน 2 ทิศทางทุกวัน และนำมาคำนวณได้จากสมการถดถอยเชิงเส้น 2) ค่า Effective dose 50 (ED_{50}) ของเกลืออนินทรีย์ ด้วยการวิเคราะห์การถดถอยแบบไม่เป็นเส้นตรง โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 8.0 (GraphPad software Inc., USA)

ผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการใช้เกลืออนินทรีย์ทั้ง 6 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ และการปรับค่า a_w มีผลต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ผลการทดลองโดยรวมพบว่าภายใต้สภาวะที่มีปริมาณน้ำอิสระมาก ($0.99a_w$) ในการใช้เกลือกลุ่มคลอไรด์และเกลือกลุ่มซัลเฟตให้ผลการทดลองที่คล้ายคลึงกัน ที่ระดับความเข้มข้นทดสอบ (0-2% w/v) ไม่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราได้ (ภาพที่ 1) ยกเว้นการใช้เกลือแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.5% w/v มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา อัตราการเจริญของเส้นใยลดลงประมาณ 5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ผลการควบคุมอัตราการเจริญของเชื้อราที่ระดับ a_w ต่ำ ($<0.95a_w$) พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อราขึ้นกับค่า a_w มากกว่าความเข้มข้นเกลือที่ใช้ นอกจากนี้ที่ $0.95 a_w$ การใช้เกลือกลุ่มซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.5-2% w/v มีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* มากขึ้น

สำหรับค่า ED_{50} พบว่าค่า ED_{50} ของเกลืออนินทรีย์ขึ้นกับ a_w ที่สภาวะไม่มีการปรับค่า a_w ($\sim 0.98a_w$) เกลือแคลเซียมคลอไรด์มีผลยับยั้งการเจริญของรา 50% ดีกว่าการใช้เกลือชนิดอื่น มีค่า $ED_{50} \sim 0.10\%$ (w/v) ในขณะที่ประสิทธิภาพของการใช้เกลือกลุ่มซัลเฟตในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเพิ่มมากขึ้น ที่ระดับ a_w ต่ำ ($0.95 a_w$) โดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 0.69% และ 0.0.73% (w/v) เมื่อใช้เกลือโซเดียมซัลเฟตและเกลือโซเดียมไทโอซัลเฟตตามลำดับ (Table 1)

วิจารณ์ผล**

จากการศึกษาการใช้เกลืออนินทรีย์ทั้งสองกลุ่ม พบว่าเกลือแคลเซียมคลอไรด์มีผลต่อการเจริญของเชื้อรามากที่สุด ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา อาจเนื่องจากการสะสมแคลเซียมไอออนภายในเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลรบกวนการทำงานของเซลล์เกิดการยับยั้งการเจริญของเส้นใยในที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากภายในเซลล์ที่สภาวะปกติมีระดับความเข้มข้นของโซเดียมไอออนในระดับความเข้มข้นต่ำกว่าไมโครโมลาร์เพื่อให้เซลล์ทำงานได้ตามปกติ (Rasmussen และคณะ, 1990; Tian และคณะ, 2002) แต่อย่างไรก็ตามการตอบสนองของเชื้อราต่อเกลือแคลเซียมคลอไรด์ให้ผลที่แตกต่างกันถึงแม้จะเป็นเชื้อราในสกุลเดียวกัน ตัวอย่างเช่น การใช้เกลือแคลเซียมคลอไรด์ ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่คัดแยกได้จากพริก ส้ม และ แอปเปิ้ล ที่มีรายงานระดับความเข้มข้น ที่มีผลลดการเจริญของเส้นใยที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0.92 – 80 mg/ml (Ratnayake และ

คณะ, 2009; Le และคณะ, 2018) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในครั้งนี้ที่ใช้เกลือแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 5-20 mg/ml หรือ 0.5 - 2% (w/v) สามารถลดอัตราการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ โดยที่ระดับความเข้มข้นประมาณ 1 mg/ml สามารถลดอัตราการเจริญของเส้นใยได้ 50% ($ED_{50} \sim 0.10\%$ (w/v)) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการ การตอบสนองของเชื้อราต่อเกลือแคลเซียมคลอไรด์ขึ้นกับชนิดของสาย พันธุ์เชื้อรา (strain dependent) ซึ่งอาจอธิบายได้โดยสิ่งแวดล้อม แหล่งที่อยู่ และการปรับตัวของเชื้อราต่อสภาวะความเครียดต่างๆ ที่มีความแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อราของเกลืออนินทรีย์ยังพบว่าต้องมีปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมถึงจะแสดงกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ Le และคณะ, 2018) เมื่อศึกษาถึงผลของอิทธิพลร่วมระหว่างเกลืออนินทรีย์และ a_w พบว่ากิจกรรมในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อรา *A. flavus เพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เกลือกลุ่มซัลเฟต (>0.5% w/v) ที่ 0.95 a_w สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เพิ่มมากขึ้น ภายใต้สภาวะเครียดเนื่องจากน้ำเชื้อราได้รับผลกระทบจากความดันออสโมติกที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการส่งผ่านสารข้ามเยื่อหุ้มเซลล์ (Ramos และคณะ, 1999) เมื่อรวมกับกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเกลืออนินทรีย์ สามารถก่อให้เกิดการเสริมผลกระทบมากกว่าการใช้เกลือเพียงอย่างเดียว*

สรุปผล**

การศึกษาในครั้งนี้ทำให้ได้ข้อมูลที่มีประโยชน์เกี่ยวกับการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์พริกไทยต่อการตอบสนองต่อสารกลุ่มปลอดภัยเกลืออนินทรีย์ และ a_w จากสารเคมีทดสอบทั้งหมด 6 ชนิดพบว่าเกลือแคลเซียมคลอไรด์เป็นสารเคมีที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญที่ภายใต้สภาวะ a_w ที่ทำการทดลอง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารกลุ่มปลอดภัยมาใช้ในการลดการปนเปื้อนของเชื้อราที่อาจเกิดขึ้นทั้งก่อนและหลังการเก็บ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาเพื่อเติมเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารกลุ่มปลอดภัยในการควบคุมเชื้อราในผลพริกไทย เพื่อเพิ่มความเข้าใจต่อการตอบสนองของเชื้อราภายใต้สภาวะชีวภาพที่มีความแตกต่างจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

- Awang, Y., Ghani, M. A. A., Sijam, K. and Mohamad, R. B., 2011, Effect of Calcium Chloride on Anthracnose Disease and Postharvest Quality of Red-flesh Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*), African Journal of Microbiology Research, 5(29): 5250-5259.
- Bigges, A. R., 1999, Effects of Calcium Salts on Apples Bitter Rot Caused by Two *Collectotrichum* spp., Plant Disease, 83(11): 1001-1005.
- Boumaaza, B., Benkhelifa, M. and Belkhouja, M., 2015, Effects of Two Salts Compounds on Mycelial Growth, Sporulation, and Spore Germination of Six Isolates of *Botrytis cinerea* in the Western North of Algeria, International Journal of Microbiology, 2015: 1-8.
- FAO, 2019, Salt-affected soils [Online], Available: <http://www.fao.org/soils-portal/soil-management/management-of-soils/salt-affected-soils/more-information-on-salt-affected-soils/en/> [November 10, 2019].
- Feng, W., Zheng, X. and Chen, J., 2013, Combined Inhibitory Effect Against Postharvest Storage Rots and Their Effects on Postharvest Quality Parameters in Cherry Tomatoes by Cassia Oil and Calcium chloride, Journal of Food Protection, 76: 1873-1878.
- Garcia, M. V., Parussolo, G., Moro, C. B., Bernardi, A. O. and Copetti, M. V., 2018, Fungi in Spices and Mycotoxigenic Potential of Some *Aspergilli* Isolated, Food Microbiology, 73: 93-98.
- Irshad, G., Haider, Z., Ikram, Z., Iqbal, A., Hyder, S. and Inamulhaq, M., 2014, Chemical Control of Fungal Diseases of Stored *Solanum lycopersicum* Fruit by Potassium Bicarbonate and Calcium Chloride, Pakistan Journal of Phytopathology, 26: 281-283.
- Le, TT., Vo, T. K., Nguyen, T. M. L., Trieu, P. L., Ngo, V. T. and Nguyen, H. H., 2018. Efficacy of $CaCl_2$ Against Some Important Postharvest Fungi on Orange, Chilli and Cavendish Banana fruits, Journal of Vietnamese Environment, 10(2): 120-128.
- Ramos, A.J., Magan, N. and Sanchis, V., 1999, Osmotic and Matric Potential Effects on Growth, Sclerotia and Portioning of Polyols and Sugars in Colonies and Spores of *Aspergillus ochraceus*, Mycological Research, 103(2): 141-147.
- Rasmussen, H. and Rasmussen, J. E., Calcium as Intracellular Messenger: from Simplicity to Complexity, Current Topics

in cellular Regulation, 31: 1-109.

Ratnayake, R. M. R. N. K., Sumithra, H. J., Fernando, M. D. and Palipane, K. B., 2009, Effect of GRAS Compounds on *Aspergillus* Rot of Wood-apple (*Feronia limonia*), *Phytoparasitica*, 37: 431-436.

Sabokbar, A., Motevalibashi, M. and Talebi, S., 2018, Molecular Identification of Aflatoxin B1 *Aspergillus flavus* in Red, Black and White Pepper Using PCR Method, *International Journal of Molecular Microbiology*, 8(2): 1016-1022.

Tian, S. P., Fan, Q., Xu, Y. and Jiang, A. L., 2002, Effects of Calcium on Biocontrol Activity of Yeast Antagonists Against the Postharvest Fungal Pathogen *Rhizopus stolonifera*, *Plant Pathology*, 51(3): 352-358.

Turkkan, M., 2013, Antifungal Effect of Various Salts against *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*, the Causal Agent of Fusarium Basal Rot of Onion, *Journal of Agricultural Sciences*, 19: 178-187.

Table 1 The ED₅₀ concentrations % (w/v) of inorganic salts required for control of mycelial growth rate of *A. flavus* on PDA at 25°C.

Chemicals	Types	ED ₅₀ (un-modified)	ED ₅₀ (0.95 a _w)	ED ₅₀ (0.90 a _w)
Chloride salts	Calcium chloride	~ 0.1023	~ 2.409	Not converged
	Potassium chloride	>2	>2	Not converged
	Sodium chloride	~ 0.5363	>2	Not converged
Sulphate salts	Ammonium sulphate	>2	Not converged	Not converged
	Sodium sulphate	>2	~ 0.6938	Not converged
	Sodium thiosulphate	~ 1.508	~ 0.7318	Not converged

Not converged refers to the model does not fit the data.

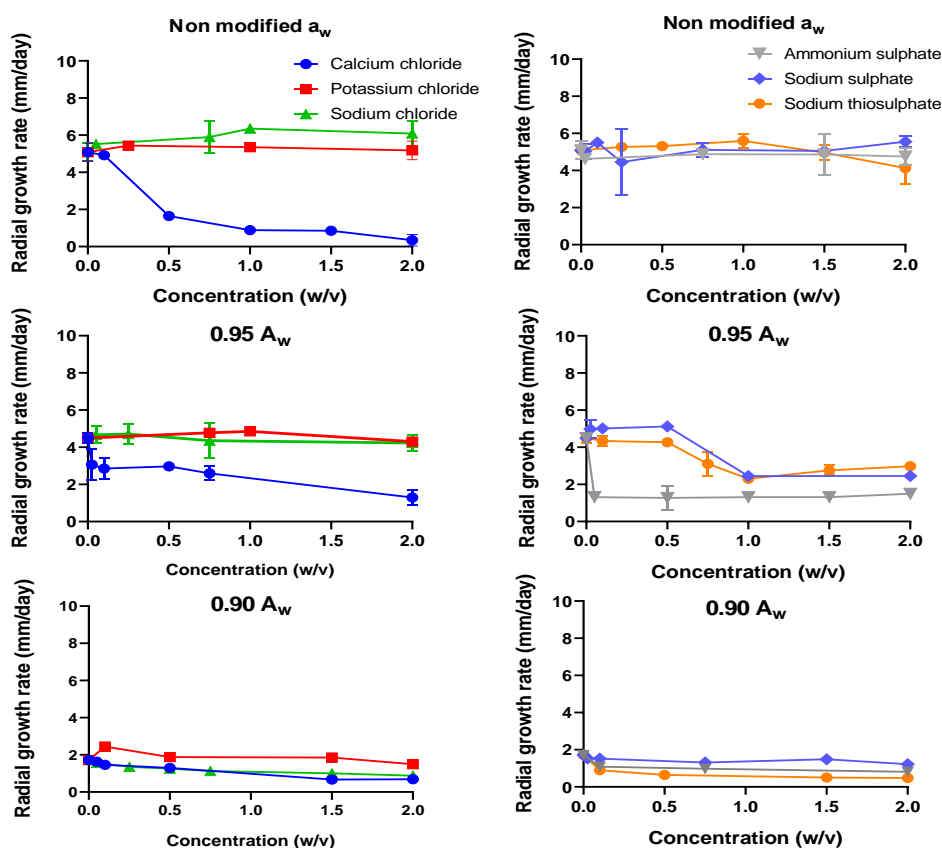


Figure 1 Effect of inorganic salts and a_w on radial growth rate of *A. flavus* on PDA.