สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยรังสิต
RANGSIT UNIVERSITY LIBRARY

ความหลากหลายของเชื้อราในการสร้างสารพิษแอฟฟล่าท็อกซินบนอาหารจำพวกเมล็ดพืชแห้งเพื่อการส่งออก

(Biodiversity of Aflatoxins-producing Fungi on Cereal Grains for Export)

โดย
อ.อินทิรา แถมพยัคฆ์ อ.พัตรา สุนทรฐิติเจริญ และ
อ.นันทนิตย์ หงษ์ศรีจันดา

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต
ประจำปี พ.ศ. 2541-2542
ISBN 974-9701-95-X

คำนำ

โครงการวิจัยเรื่อง "ความหลากหลายของเชื้อราในการสร้างสารพิษแอฟฟล่าท็อกซินบนอาหารจำพวกเมล็ดพืชแห้งเพื่อการส่งออก" นี้ ได้รับเงินทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยรังสิต ผลงานวิจัยที่ได้จากโครงการนี้ทำให้ทราบว่าเมล็ดพืชแห้งที่จัดเก็บเพื่อการส่งออก และเพื่อการบริโภคนั้น มีการปนเปื้อนเชื้อรา และสารพิษแอฟฟล่าท็อกซิน บี 1 สามารถนำข้อมูลนี้ไปใช้ปรับปรุงวิธีการจัดเก็บเพื่อการส่งออกและเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคต่อไป

(อ.อินทิรา แถมพยัคฆ์)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทคัดย่อ

จากศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราในอาหารจำพวกเมล็ดพืชแห้งที่ขายตามท้องตลาดในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑลจำนวน 251 ตัวอย่าง ได้แก่ ข้าวสาร 52 ตัวอย่าง (ข้าวขาว 32 ตัวอย่าง และข้าวกล้อง 20 ตัวอย่าง) ข้าวโพด 49 ตัวอย่าง ถั่วเขียว 50 ตัวอย่าง ถั่วเหลือง 20 ตัวอย่าง และถั่วลิสง 50 ตัวอย่าง พบว่ามีเชื้อราปนเปื้อน 218 ตัวอย่าง โดยมีการปนเปื้อนในถั่วลิสง 100% ถั่วเขียว 92% ข้าวโพด 88% ถั่วเหลือง 84% ข้าวขาว 72% และข้าวกล้อง 70% ซึ่งเชื้อราที่ปนเปื้อนพบชนิด *Aspergillus* 260 ตัวอย่าง (*A. flavus* 112 ตัวอย่าง, *A. niger* 111 ตัวอย่าง, *A. ochraceous* 37 ตัวอย่าง), *Rhizopus* 79 ตัวอย่าง, *Penicillium* 11 ตัวอย่าง, *Fusarium* 14 ตัวอย่าง และเชื้อราที่ไม่ทราบชนิด (unidentified species) 43 ตัวอย่าง สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณแอฟฟล่าท็อกซิน B1 จากตัวอย่างเมล็ดพืชโดยวิธี ELISA นั้นสามารถตรวจพบปริมาณแอฟฟล่าท็อกซิน B1 ในถั่วลิสง 90% ข้าวโพด 35% ข้าวสาร 27% ถั่วเหลือง 22% และถั่วเขียว 16% ซึ่งปริมาณแอฟฟล่าท็อกซิน B1 ที่ตรวจพบนี้ถือว่ามีปริมาณต่ำคือ 3-36 ppb ยกเว้นในถั่วลิสงที่พบแอฟฟล่าท็อกซิน B1 สูงถึง 268 ppb จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าเมล็ดพืชแห้งตามท้องตลาดในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑลส่วนใหญ่มีการปนเปื้อนด้วยเชื้อรา แต่ปริมาณแอฟฟล่าท็อกซิน B1 ในเมล็ดพืชส่วนใหญ่อยู่ในปริมาณต่ำ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ABSTRACT

The study of fungal contamination was made by random sampling of 251 cereal (52 rice samples, 49 corn samples, 50 mung bean samples, 20 soy bean samples and 50 peanut samples) from markets in Bangkok and nearby provinces. It was found that 218 samples (86.9%) were contaminated with fungi. Peanut was the most fungal contaminated sample (100%) and followed by mung bean (92%), corn (88%), soybean (84%), rice (72%) and brown rice (70%) respectively. Many fungal species were found contaminated in crude most samples mainly *Aspergillus* (260 samples); (*A. flavus* 112 samples, *A. niger* 111 samples and *A. ochraceous* 37 samples). Other fungal contamination were *Rhizopus* (79 samples), *Penicillium* (11 samples), and other fungi *Fusarium* (14 samples) and unidentified fungal (43 samples). Detection and quantification of a well-known mycotoxin, aflatoxin B1 was performed by using ELISA and percentage of fungal contamination in peanut (90%), corn (35%), rice (27%), soybean (22%) and mung bean (16%) was reported. However, the amount of aflatoxin B1 in most of the cereal was relatively low (3-36 ppb) with the exception of peanut (268 ppb). We may conclude from our study that most of the dry cereal sold in Bangkok and nearby provinces are contaminated with low amount of fungi.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยโครงการ "ความหลากหลายของเชื้อราในการสร้างสารพิษแอฟฟล่าท็อกซินบนอาหารจำพวกเมล็ดพืชแห้งเพื่อการส่งออก" ขอขอบคุณสำนักวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ได้อนุมัติเงินทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ศ.ดร.ธีระยุทธ กลิ่นสุคนธ์ ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการทำวิจัย และดร.อมรา ชินภูติ ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณแอฟฟล่าท็อกซิน บี 1 ตลอดจนคณาจารย์ & เจ้าหน้าที่ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ได้ให้ความช่วยเหลือการทำวิจัย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
กิตติกรรมประกาศ	iv
สารบัญ	v
สารบัญตาราง	vi
สารบัญรูป	vii
สารบัญกราฟ	viii
สารบัญแผนภาพ	ix
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาของโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 การดำเนินงานวิจัย	
2.1 เครื่องมือ	4
2.2 อุปกรณ์	4
2.3 น้ำยาและสารเคมี	5
2.4 เชื้อแบคทีเรีย	6
2.5 การเก็บตัวอย่างเมล็ดพืชแห้ง	6
2.6 การตรวจสอบและการแยกสายพันธุ์ของเชื้อราที่อยู่บนเมล็ดพืช	6
2.7 การเก็บรักษาเชื้อราสายพันธุ์เดี่ยว	8
2.8 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อในกลุ่ม *A. niger*	9
2.9 การวิเคราะห์หาปริมาณแอฟฟล่าท็อกซินในอาหารแห้ง	10
2.10 การทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อ biological product ของ *A. niger*	11
บทที่ 3 ผลการทดลอง	13
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	23
เอกสารอ้างอิง	25

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 การปนเปื้อนของเชื้อราบนเมล็ดข้าว (ข้าวขาวและข้าวกล้อง) ข้าวโพด ถั่วเขียว ถั่วเหลือง และถั่วลิสง

ตารางที่ 2 การปนเปื้อนของ *Aspergillus* บนเมล็ดข้าวสาร ข้าวกล้อง ข้าวโพด ถั่วเขียว ถั่วเหลือง และถั่วลิสง

ตารางที่ 3 การปนเปื้อนด้วยแอฟฟลาท็อกซิน บี 1 ในข้าวสาร ข้าวกล้อง ข้าวโพด ถั่วเขียว ถั่วเหลือง และถั่วลิสง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญรูป

รูปที่ 1	การปนเปื้อนของเชื้อราในตัวอย่างเมล็ดพืชชนิดต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA
รูปที่ 2	เชื้อรา Aspergillus niger
รูปที่ 3	เชื้อรา *Penicillium*
รูปที่ 4	เชื้อรา *Fusarium*
รูปที่ 5	การทดสอบ sensitivity ของเชื้อแบคทีเรีย S. *aureus* ATCC 29213 และ *E. coli* ATCC 25922

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญกราฟ

กราฟที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งที่ระยะการเจริญต่างๆ ของ *A. niger*

กราฟที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *A. niger* ที่ระยะการเจริญต่างๆ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่ 1 แสดงการปนเปื้อนของเชื้อราทั้งหมด, เชื้อรา *Aspergillus flavus* และแอฟฟล่าท็อกซิน บี1 บนเมล็ดพืชทุกชนิดที่ตรวจ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 1
บทนำ

1. ความเป็นมาของโครงการ

1.1 เชื้อราและแอฟฟล่าท็อกซินบนอาหาร

อาหารแห้งโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมล็ดพืชแห้ง (ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ข้าวโพด และข้าว) ทั้งที่ส่งออก และเป็นอาหารของประชาชนไทยนั้น เป็นที่ทราบดีว่าจะมีเชื้อราขึ้นปะปนอยู่เสมอ และเชื้อราเหล่านี้บางชนิดก็สามารถสร้างสารพิษ (mycotoxin) ได้ (1-7) สารพิษจากเชื้อราที่สำคัญและตรวจวิเคราะห์พบได้ในอาหาร ได้แก่ แอฟฟล่าท็อกซิน (aflatoxin) โอคร่าท็อกซิน (ochratoxin) ไตรโคทีซีน (trichothecene) และเซียราลิโนน (zearalenone) (8) สารพิษจากเชื้อราชนิดที่สร้างปัญหาทางด้านสาธารณสุขแก่มนุษย์นั้น ได้แก่ แอฟฟล่าท็อกซิน บี 1 (aflatoxin B1) ซึ่งจะทำให้เกิดตับอักเสบ และอาจจะเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งตับด้วย (9)

จากการศึกษาพบว่ามีเชื้อราหลายสายพันธุ์สร้างแอฟฟล่าท็อกซิน เช่น *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *Penicillium pubcrulum*, *P. frequentans* นอกจากนี้เชื้อราสกุล *Mucor* และ *Rhizopus* ก็สามารถสร้างสารพิษนี้ได้เช่นกัน (7) สำหรับ *A. flavus* group จะมี 3 สายพันธุ์สร้างแอฟฟล่าท็อกซิน คือ *A. flavus* Link ex. Fries, *A. parasiticus* Speare และ *A. nomius* Kurtzman, Horn, and Hesseltine (10)

จากรายงานหาปริมาณของสารแอฟฟล่าท็อกซินในเมล็ดธัญพืชของประเทศฟิลิปปินส์พบว่าใน peanut butter มีแอฟฟล่าท็อกซิน บี 1 โดยเฉลี่ย 213 μg/Kg (8.6 ppm Aflatoxin B1) ส่วนปริมาณสารแอฟฟล่าท็อกซินในถั่วลิสงและข้าวโพดโดยเฉลี่ย 98 และ 110 μg/Kg ตามลำดับ นอกจากนี้ในประเทศอูกันดา พบว่าจากตัวอย่างเมล็ดธัญพืชจำนวน 480 ตัวอย่าง พบว่า 30% จะมีสารแอฟฟล่าท็อกซิน และ 61% มีปริมาณสารแอฟฟล่าท็อกซินน้อยกว่า 100 μg/Kg ส่วนในประเทศไทยที่ได้ทำการศึกษาพบว่าปริมาณสารแอฟฟล่าท็อกซินในข้าวสารมีน้อย ถั่วลิสงมีมากที่สุด (9) ดังนั้น เพื่อหาแนวทางป้องกันการขึ้นปะปนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราเหล่านี้บนอาหารที่ส่งออกใช้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เป็นวัตถุดิบในการผลิตอุตสาหกรรมเกษตร และใช้บริโภคภายในประเทศ จึงจำเป็นต้องตรวจวิเคราะห์อาหารเหล่านี้เพื่อให้ได้คุณภาพที่ปราศจากสารพิษตามมาตรฐานอาหารสากลต่อไป

1.2 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (เกษตร)

โครงการมาตรฐานอาหารโลก [FAO/WHO (Codex)] ได้ให้ความสำคัญในการนำการวิเคราะห์ความเสี่ยงจากสารปนเปื้อน (Risk Analysis of Contaminants) มาใช้ในการกำหนดมาตรฐานเพื่อให้เกิดการประกันคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารแก่ผู้บริโภค และทั้งยังสนับสนุนให้ประเทศสมาชิกนำหลักการดังกล่าวนี้ไปใช้ในการกำหนดมาตรฐานและการควบคุมการตรวจสอบอาหารของแต่ละประเทศด้วย ประเทศไทยในฐานะผู้ส่งออกสินค้าอาหารรายใหญ่ของโลก จึงควรให้ความสำคัญกับความปลอดภัยในกระบวนการผลิตและควบคุมการตรวจสอบอาหารให้สอดคล้องกับมาตรฐานสากลต่อไป

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม และสำนักงานอาหารและยาได้จัดตั้งคณะอนุกรรมการขึ้นหลายคณะ เพื่อดำเนินการในเรื่องดังกล่าวแล้วข้างต้น โดยการนำแนวนโยบายขององค์กรระหว่างประเทศ WHO/FNU/FOS/95.3 (11) และการประชุมเชิงปฏิบัติการของนักวิทยาศาสตร์ไทย (ทางด้านอาหารและพิษวิทยา) ได้สรุปกลุ่มของสารปนเปื้อนและวัตถุอันตรายไว้ จำนวน 5 กลุ่มด้วยกัน คือ

1) วัตถุอันตรายทางการเกษตรและสารสิ่งแวดล้อม
2) ยาสัตว์
3) สารปนเปื้อนและท็อกซิน (แอฟฟล่าท็อกซิน)
4) วัตถุเจือปนอาหาร
5) สารชีวภาพ

กลุ่มสารปนเปื้อนและท็อกซินนั้นได้มีการเสนอแนะสารต่างๆที่เกี่ยวข้องกับอาหารภายในประเทศไทยไว้จำนวน 9 ชนิดด้วยกัน คือ โลหะหนัก แอฟฟล่าท็อกซิน ท็อกซินจากสัตว์ และพืช ท็อกซินจากจุลินทรีย์ เอมีน (biological amine) ไนเตรท (nitrate) ไดออกซิน (dioxin) อโครเลน (acrolane) และไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon) ฉะนั้นจะเห็นได้ว่าการประกันคุณภาพของอาหารพวกเมล็ดพืชแห้ง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

(cereals and grains) จากการขึ้นปะปนของเชื้อราและแอฟฟล่าท็อกซิน จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งและจะต้องดำเนินการอย่างต่อเนื่อง (ถึงแม้จะมีข้อมูลพื้นฐานเก่าอยู่แล้วในระดับหนึ่งก็จำเป็นจะต้องติดตามสถานการณ์ต่อไปอีก) คณะวิทยาศาสตร์มีกลุ่มคณาจารย์ที่มีความสามารถและเคยดำเนินการวิจัยในลักษณะนี้ได้ จึงน่าจะได้มีการจัดกลุ่มวิจัยทางด้านพิษวิทยาของอาหารขึ้น เพื่อนำไปสู่การวิเคราะห์ความเสี่ยงในอาหารและความหลากหลายของเชื้อราในการสร้างสารธรรมชาติ (natural products)

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อจัดกลุ่มนักวิจัยด้านพิษวิทยาทางอาหาร (Food Toxicology) ขึ้นในคณะวิทยาศาสตร์ร่วมกับคณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยี

2. เพื่อตรวจสอบความหลากหลายของเชื้อราที่ขึ้นปะปนบนอาหารแห้ง ได้แก่ ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ข้าวโพด และข้าว ที่ใช้บริโภคภายในประเทศและการส่งออก

3. เพื่อตรวจสอบและวิเคราะห์สารพิษแอฟฟล่าท็อกซินในอาหารแห้งดังกล่าวข้างต้น

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. มหาวิทยาลัยรังสิต จะมีห้องปฏิบัติการทางด้านพิษวิทยาของอาหาร และกลุ่มนักวิจัยทางด้านนี้ขึ้น อันจะเป็นประโยชน์ในการให้บริการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนในกลุ่มสารพิษจากเชื้อราได้ กระบวนการนี้จะทำให้เกิดการประกันคุณภาพอาหารที่มีความปลอดภัยในการบริโภคภายในประเทศ และการส่งออก

2. มหาวิทยาลัยรังสิต จะมีกลุ่มวิจัยในความหลากหลายของเชื้อราในการสร้างสารเคมีอันจะทำให้เกิดฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายลักษณะ เช่น การเกิดพิษ การออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา การต้านการก่อและเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ เป็นต้น การวิจัยในเรื่องนี้จะนำไปสู่การค้นหาสารเคมีที่ผลิตจากเชื้อราซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการดำรงชีวิตของคน และการคงสภาพของระบบนิเวศน์วิทยา

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 2
การดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัยจะมี 3 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1: การเก็บตัวอย่างเมล็ดพืชแห้ง (สำหรับการบริโภคและการส่งออก)

ขั้นตอนที่ 2 : การตรวจสอบและจำแนกชนิดของเชื้อราที่ขึ้นปะปนอยู่ และ

ขั้นตอนที่ 3 : การวิเคราะห์หาปริมาณการวิเคราะห์หาปริมาณแอฟฟล่าท็อกซินในอาหารแห้งเหล่านี้

1. เครื่องมือ
   - 1. 1 เครื่องฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (autoclave)
   - 1.2 เครื่องอบไฟฟ้า (hot air oven)
   - 1.3 เครื่องเขย่า (shaker)
   - 1.4 กล้องจุลทรรศน์ชนิดช่วยผ่าตัด (binocular dissecting microscope)
   - 1.5 กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (light microscope)
   - 1.6 เครื่องชั่งละเอียด
   - 1.7 เครื่องปั่นน้ำผลไม้ (blender)

2. อุปกรณ์
   - 2.1 ขวดแก้วฝาเกลียวขนาดเล็ก
   - 2.2 flask 250 ml
   - 2.3 จานแก้ว (petri dish)
   - 2.4 หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 16x125 มม.
   - 2.5 ปากคีบ (forcep)
   - 2.6 beaker
   - 2.7 bent needle
   - 2.8 slide และ cover slip

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.9 pipette

2.10 hand refractometer (ATAGO)

2.11 กระดาษกรอง

2.12 แท่งแก้วโค้งงอรูปตัว V

2.13 แผ่นพาราฟิล์มหรืออะลูมิเนียมฟอล์ย

2.14 autopipette

2.15 cylinder cup ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 cm

2.16 ไม้พันสำลี

3. น้ำยาและสารเคมี

3.1 Sodium hypochlorite (NaOCl) หรือ Chlorox 10%

3.2 อาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อรา ได้แก่ Sabouraud dextrose agar (SDA), Sabouraud dextrose broth (SDB), Czapek's agar (CA)

3.3 อาหาร Muller Hinton agar

3.4 ยาปฏิชีวนะ chloramphenicol ชนิดผง

3.5 ชุดตรวจสอบแอฟฟล่าท็อกซิน B1 (Aflatoxin B1 ELISA Test Kit) ของกลุ่มงานวิจัยโรคพืชผลิตผลเกษตร กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ชุดตรวจสอบประกอบด้วย

1) Micro ELISA plate หรือ Stripe ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่อสารแอฟ ฟล่าท็อกซิน บี 1

2) สารพิษมาตรฐานแอฟฟล่าท็อกซิน บี 1 (Standard Aflatoxin B1) 6 ระดับความเข้มข้น

3) Enzyme conjugate

4) Conjugate buffer

5) Substrate solution

6) Stopping solution

7) Washing buffer (Phosphate Buffered Saline – 20)

3.6 สีย้อม Lactophenol cotton blue

3.7 Sodium lauryl sulfate 0.01%

3.8 น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3.9 Methanol

4. เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมี 2 ชนิด ได้มาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้แก่เชื้อ*Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

5. การเก็บตัวอย่างเมล็ดพืชแห้ง

ตัวอย่างเมล็ดพืชแห้งที่เก็บมี 5 ชนิด ได้แก่ ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ข้าวโพด และข้าว เก็บชนิดละ 50 ตัวอย่าง พื้นที่ในการเก็บตัวอย่างอยู่ในเขตกรุงเทพและปริมณฑล โดยเริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2541 ถึง กรกฎาคม 2542 วิธีการเก็บตัวอย่างจะเก็บในถุงพลาสติกใสปิดปากถุงให้แน่น (seal) พร้อมทั้งจดบันทึกรายละเอียดของตัวอย่างที่เก็บ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

6. การตรวจสอบและการแยกสายพันธุ์ของเชื้อราที่อยู่บนเมล็ดพืช

6.1 การตรวจสอบเชื้อราที่ขึ้นอยู่บนเมล็ดพืชแห้ง

6.1.1 นำตัวอย่างเมล็ดพืชแห้งใส่ในจานแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้ว (1 จานแก้ว ต่อเมล็ดพืชแห้ง 1 ชนิด)

6.1.2 เทน้ำยา chlorox 10% ลงในจานแก้วให้ท่วมเมล็ดพืช เขย่าล้างเป็นเวลา 1 นาที แล้วเท chlorox ทิ้งให้หมด

6.1.3 เทน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อลงในจานแก้วให้ท่วมเมล็ดพืช เขย่าล้างเป็นเวลา 1 นาที แล้วเททิ้ง ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง

6.1.4 ใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบเมล็ดพืชมาวางเรียงบนอาหาร Sabouraud

dextrose agar (SDA) ที่ผสมยาปฏิชีวนะ chloramphenicol 10 mg% จนเต็มจานแก้ว โดยวางให้มีช่องว่างห่างกันพอประมาณ

6.1.5 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 – 30 °C) เป็นเวลา 3-7 วัน เพื่อดูการเจริญของเชื้อราที่อยู่บนเมล็ดพืช

6.2 การแยกเชื้อราและแยกสายพันธุ์

เชื้อราที่ขึ้นอยู่บนเมล็ดพืช (ในกรณีที่เมล็ดพืชมีเชื้อราขึ้นปะปน) จะถูกแยกออกมาจนได้เป็นเชื้อราชนิดเดียวหรือสายพันธุ์เดียว (pure culture) โดยการใช้ bent needle นำเชื้อราเพียงอันเดียว (single conidial head) มาเลี้ยงตรงกลางอาหารวุ้น Czapek's agar (CA) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-7 วัน

6.3 การพิสูจน์เชื้อรา

เมื่อได้เชื้อราที่เป็นชนิดเดียวแล้ว ขั้นต่อไปจะต้องพิสูจน์ชนิดของเชื้อรา โดยอาศัยการดูลักษณะทางกายภาพด้วยตาเปล่าหรือดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดช่วยผ่าตัด (gross examination) และดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination)

6.3.1 การดูลักษณะทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดช่วยผ่าตัด ได้แก่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี สีของโคโลนี (ทั้งด้านบนและด้านล่างอาหาร) การสร้างสีขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะผิวของโคโลนี ลักษณะขอบของโคโลนี และรอยหยักของโคโลนีลงไปในเนื้ออาหาร

6.3.2 การดูลักษณะทางกายภาพของเชื้อราให้ละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยจะดูในส่วนของ mycelium, conidiophore, vesicle, sterigmata และ spore เป็นต้น ซึ่งมีวิธีทำดังนี้

การดูลักษณะเชื้อราโดยการย้อมสี

1) หยดน้ำยา lactophenol cotton blue 1 หยด ลงบนสไลด์

2) ใช้ bent needle ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยโคโลนีของเชื้อราจาก culture plate มาวางบนสไลด์ที่มี lactophenol cotton blue

3) ใช้ bent needle อีกอันหนึ่งเขี่ยซิ้นส่วนเชื้อราให้แยกจากกัน ปิดทับด้วย cover slip

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การดูลักษณะเชื้อราที่เลี้ยงบนวุ้นที่อยู่บนสไลด์ (slide culture)

1) เตรียมจานแก้ว ซึ่งภายในมีแท่งแก้วโค้งรูปตัว V, สไลด์, กระดาษกรอง และ cover slip นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี autoclave

2) ตัดอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ที่อยู่ในจานแก้วให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กๆ แล้วนำไปวางบนสไลด์ที่เตรียมในข้อ 1 โดยวิธีปราศจากเชื้อ

3) Inoculate เชื้อราตรงกลางด้านข้างทั้ง 4 ด้านของชิ้นอาหารที่ตัดไว้ และปิดทับด้วย sterile cover slip

4) ใส่น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปในจานแก้วเล็กน้อยพอให้กระดาษกรองเปียก

5) เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราเจริญเติบโตเต็มที่ มีการสร้างสปอร์ ให้ค่อยๆ ดึง cover slip ออกจากชิ้นอาหาร แล้วนำมาวางบนสไลด์ที่สะอาดอีกแผ่นหนึ่งซึ่งมี lactophenol cotton blue 1 หยด

6) สำหรับตัวแผ่นสไลด์ ให้ค่อยๆเขี่ยอาหารออกจากแผ่นสไลด์ แล้วหยด lactophenol cotton blue 1 หยดลงไปบริเวณที่มีเชื้อราติดอยู่ ปิดทับด้วย cover slip ที่สะอาด

7. การเก็บรักษาเชื้อราสายพันธุ์เดี่ยว

7.1 การเก็บบนอาหารวุ้นเอียง (Czapek's agar slant)

ใช้ bent needle เขี่ยเชื้อราที่พิสูจน์เชื้อชนิดเรียบร้อยแล้ว มาวางลงตรงกลางอาหารเอียงที่อยู่ในหลอดทดลอง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน แล้วเก็บเข้าตู้เย็น 4°C

7.2 การเก็บในดินที่มีข้าวเหนียวปนอยู่ด้วย

7.2.1 วิธีเตรียมดิน (soil tube)

นำดินที่ตากแดดจนแห้งมาบดให้ละเอียดเป็นฝุ่น ใส่ในขวดจุกเกลียวขนาดเล็กประมาณครึ่งขวด แล้วใส่เมล็ดข้าวเหนียวดิบลงไปเล็กน้อยประมาณครึ่งเซนติเมตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน นำมาฆ่าเชื้ออีกครั้งและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง แล้วจึงนำดินมาตรวจสอบการปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อนจะนำไปใช้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

7.2.2 วิธีเตรียมสารละลายสปอร์

นำเชื้อราที่พิสูจน์ชนิดแน่นอนแล้วมาเลี้ยงใน SDA slant ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-7 วัน เมื่อมีสปอร์ขึ้นจำนวนมาก จึงใส่สารละลาย sodium lauryl sulfate 0.01% ลงไป 3 มล.เขย่าให้เข้ากันจนทั่ว นำสารละลายสปอร์จำนวน 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปิดฝาไว้หลวมๆ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง แล้วจึงปิดฝาให้แน่นพอควร เก็บไว้ในตู้เย็น 4°C จนกว่าจะนำมาทดลองต่อไป

8. การศึกษาการเจริญเติบโตในอาหารเหลว (เชื้อในกลุ่ม *A. niger*)

การศึกษาขั้นตอนนี้จะเป็นการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตในอาหารเป็นวุ้นและอาหารเหลวของ *A. niger* (ซึ่งจากการศึกษาที่แล้วมาพบว่าเชื้อรากลุ่มนี้สร้างสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีววิทยาได้หลายลักษณะด้วยกัน) อันจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยต่อไปในความสามารถของการสร้างสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีววิทยาจากอาหารชนิดต่างๆ กัน

8.1 นำเชื้อ *A. niger* มาเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 16 x 125 มม. ที่มีอาหาร SDA slant จำนวน 8 หลอด เป็นเวลา 3 วัน

8.2 ใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลาย SDS 0.01% จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อ เอียงหลอดขึ้นลง 10 ครั้ง เพื่อให้สปอร์หลุดออกมาอยู่ในสารละลาย และเมื่อนำสารละลายนี้มานับจำนวนสปอร์จะได้ประมาณ 107 เซลล์/มล.

8.3 ใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายสปอร์ 1 มิลลิลิตร ใส่ใน flask 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร Sabouraud dextrose broth (SDB) บรรจุอยู่ 50 มิลลิลิตร จำนวน 16 ขวด (ทำ 2 ซ้ำ) จากนั้นนำ flask ที่ใส่สปอร์แล้วไปใส่เครื่องเขย่า 150 rpm ที่อุณหภูมิห้อง

8.4 เก็บเชื้อครั้งละ 2 ขวด ที่เวลา 12, 24, 36, 48, 50, 62, 74, และ 86 ชั่วโมง ตามลำดับ

8.5 นำเชื้อราที่เก็บในช่วงเวลาต่างๆมากรองบนกระดาษกรอง แล้วนำไปอบให้แห้ง เพื่อหาน้ำหนักแห้งของเชื้อรา สำหรับส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นส่วนน้ำใสนั้นจะนำไปหาค่า pH ด้วยเครื่องวัด pH หาปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่อง hand refractometer และนำไปทดสอบการต้านการเจริญของเชื้อต่อไป

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

9. **การวิเคราะห์หาปริมาณแอฟฟล่าท็อกซินในอาหารแห้ง**

การวิเคราะห์หาปริมาณแอฟฟล่าท็อกซินในอาหารเมล็ดพืชแห้งจะใช้วิธีการ ELISA โดยใช้เทคนิค Direct Competitive ELISA Procedure ซึ่งเป็นชุดตรวจสอบแอฟฟล่าท็อกซินบี 1 (Aflatoxin B1 ELISA Test Kit) กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผลิตผลเกษตร กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร (14)

9.1 วิธีสกัดตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์

1) บดตัวอย่างเมล็ดพืชแห้งให้ละเอียดด้วย blender

2) ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วคลุกเคล้าให้เข้ากันปริมาณ 20 กรัม ใส่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

3) เติม 70%methanol 100 ml ลงใน flask (อัตราส่วนตัวอย่างต่อ 70%methanol = 1:5)

4) ปิดปาก flask ด้วยแผ่นพาราฟิล์มหรืออะลูมิเนียมฟอล์ย แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 300 rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ 5 - 10 นาที

5) นำส่วนที่ใสมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ถ้ายังไม่สามารถทำการวิเคราะห์หาปริมาณแอฟฟล่าท็อกซินขณะนั้นได้ให้เก็บส่วนใสที่กรองแล้วนี้ในภาชนะปิดสนิทที่ป้องกันแสงสว่างได้ เก็บที่อุณหภูมิ –20°C

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

9.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์

1) นำส่วนใสที่กรองได้มาเจือจางด้วย washing buffer ให้เป็น 1:20 (สารสกัด 1 ml: buffer 3 ml) ถ้าส่วนใสนั้นถูกนำออกมาจาก –20°C จะต้องให้อุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องเสียก่อนจึงจะนำมาวิเคราะห์ได้

2) หยด 50 µl ของสารพิษมาตรฐาน 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0, 0.1, 1, 2, 5, 10 ppb ลงในหลุมทดสอบความเข้มข้นละ 1 หลุม และหยด 50 µl ของสารสกัดตัวอย่างที่เจือจางแล้วในหลุมที่เหลือ

3) หยด 50 µl ของ enzyme conjugate ที่เจือจางแล้วตามลงไปทุกหลุม เขย่าเล็กน้อยเพื่อให้เข้ากัน เก็บบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในที่มืด นาน 30 นาที

4) คว่ำ stripe หรือ micro ELISA plate เอาสารในหลุมทิ้งแล้วล้างด้วย PBS-T 3-4 ครั้ง

5) หยด 100 µl ของ substrate ที่เตรียมไว้ในหลุม แล้วบ่มในที่มืดนาน 10 นาที จะเกิดปฏิกิริยาเป็นสีฟ้าในหลุมที่ไม่มีสารพิษหรือมีน้อย ส่วนหลุมที่มีสารพิษสีจะจางหรือใสตามความเข้มข้นของสารพิษที่ตรวจพบ

6) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสามารถหยุดได้โดยเติม 100 µl ของ stopping solution ซึ่งจะทำให้สีที่เกิดขึ้นเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

7) การอ่านผลโดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของสีในหลุมตัวอย่างที่วิเคราะห์กับหลุมสารพิษมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตามฉลาก ถ้าอ่านด้วยเครื่อง Micro ELISA Plate Reader หรือ Spectrophotometer ให้อ่านในช่วง 630 nm สำหรับสีฟ้า และ 450 nm สำหรับสีเหลือง

9.3 การคำนวณ

1) นำค่า Absorbance ของ standard ที่ได้มาสร้างเป็น standard curve ในกระดาษ semi-log graph โดยให้ค่า Absorbance เป็นแกน Y และให้ค่าความเข้มข้นของ standard เป็นแกน X

2) นำค่า Absorbance ของตัวอย่างที่ได้มา plot บนแกน Y แล้วลากเส้นตรงขนานกับแกน X ไปตัดเส้น standard curve จากจุดตัดนั้น ให้ลากเส้นตรงลงมาตั้งฉากกับแกน X อ่านความเข้มข้น ณ จุดนั้น นำค่าที่ได้มาคูณด้วย 20 จะได้ค่าการปนเปื้อนแอฟฟล่าท็อกซินในตัวอย่างนั้นเป็น ppb

10. การทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อ Biological product ของ *A. niger*

การทดลองนี้เป็นการทดสอบเบื้องต้นต่อคุณสมบัติทางปฏิชีวนะของสารที่สร้างจากเชื้อรา *A. niger* โดยมีขั้นตอนการทำดังนี้

10.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 29213 ในอาหารเหลว Trypticase soy broth (TSB) แล้วนำมาเทียบความขุ่นให้เท่ากับ McFarland no. 0.5 ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2×10^8 ใน 1 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

10.2 นำไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงในเชื้อที่เทียบค่ากับ McFarland no. 0.5 แล้วให้เปียกพอหมาดๆ จากนั้นนำมาป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Muller Hinton agar เชื้อละ 3 plates

10.3 ใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้ว คีบ cylinder cup ที่ฆ่าเชื้อแล้วมาวางบนผิวหน้าอาหารซึ่งถูกป้ายด้วยเชื้อแล้วจำนวน 5 อัน และแผ่น dish ยา Norfoxacin 1 อัน โดยวางให้มีระยะห่างกันพอควร ทำเช่นนี้เหมือนกันทุก plate

10.4 ใช้ autopipette ดูดอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *A. niger* 96 ชั่วโมง (ส่วนใสที่ได้จากการกรองเชื้อรา) จำนวน 200 µl ใส่ลงใน cylinder cup ที่วางอยู่บนอาหารวุ้น ตัวอย่างละ 1 อัน ในการทดลองนี้ใช้ *A. niger* 5 ตัวอย่าง ทำเช่นเดียวกันนี้กับทุก plate

10.5 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้สารละลายค่อยๆแพร่ออกไป แล้วจึงค่อยนำเข้าตู้เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

10.6 ดูผลการเกิด clear zone หรือบริเวณใสที่ไม่มีเชื้อขึ้น โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสนั้น

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 3
ผลการทดลอง

การปนเปื้อนเชื้อราในเมล็ดพืช พบว่าตัวอย่างเมล็ดพืชที่นำมาทดลองมีเชื้อราปนเปื้อนเกือบทั้งสิ้น (**รูปที่** 1) โดยถั่วลิสงมีเชื้อราปนเปื้อนมากที่สุดคือ 100% รองลงมาได้แก่ ถั่วเขียวมีเชื้อราปนเปื้อน 92% ข้าวโพดมีเชื้อราปนเปื้อน 88% ถั่วเหลืองมีเชื้อราปนเปื้อน 84% ข้าวขาวมีเชื้อราปนเปื้อน 72% และข้าวกล้องมีเชื้อราปนเปื้อน 70% (**ตารางที่** 1)

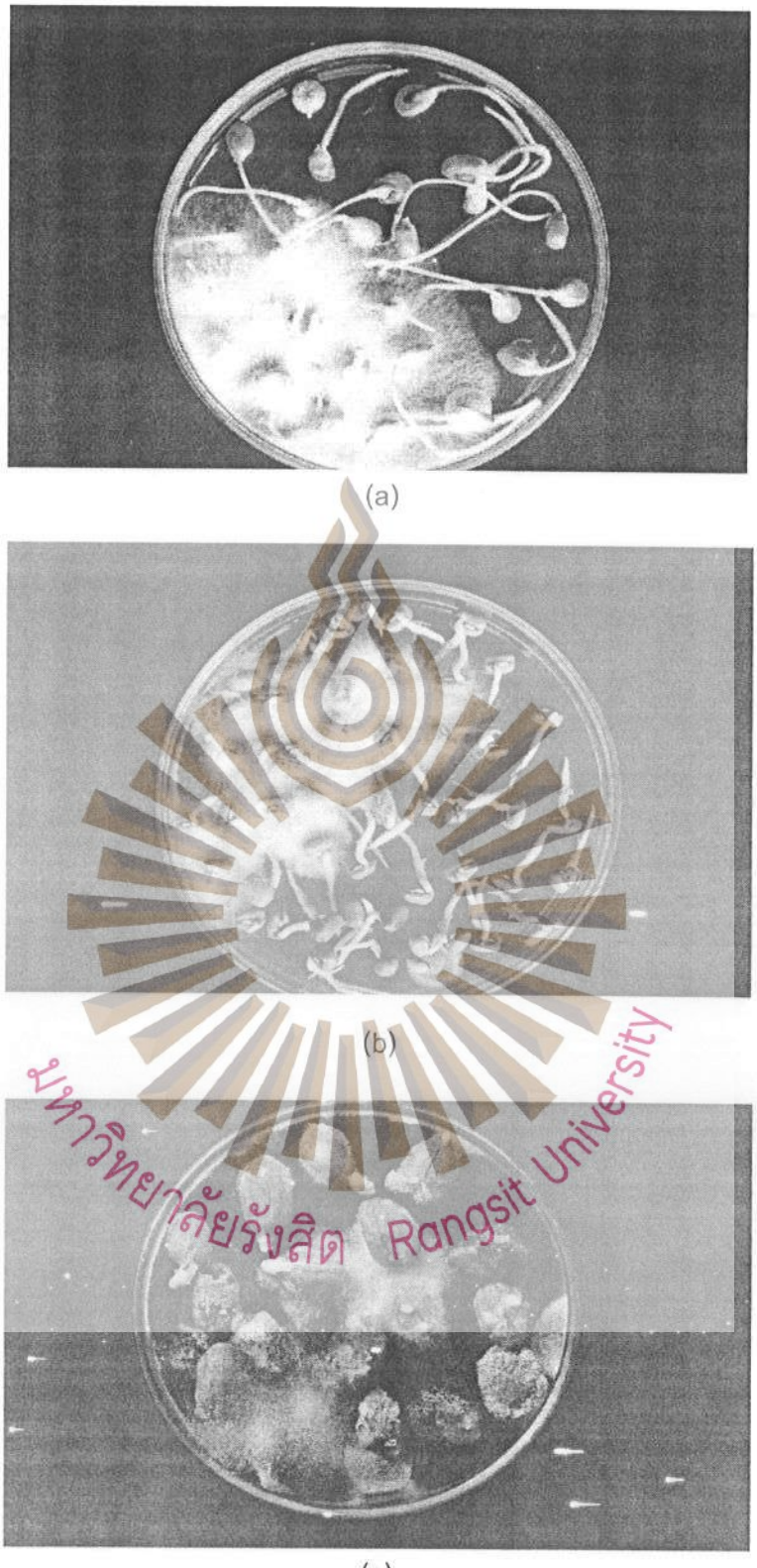
จากการแยกเชื้อราจากเมล็ดพืชมาทำให้บริสุทธิ์และศึกษาชนิดของเชื้อราที่แยกได้ พบว่าส่วนใหญ่เป็น *Aspergillus*, *Penicillium* (**รูปที่** 3), *Fusarium* (**รูปที่** 4) และ *Rhizopus* มีส่วนหนึ่งที่ไม่สามารถทราบชนิดได้ (unidentify) ชนิดที่พบมากที่สุดคือ *A. flavus* (**ตารางที่** 2, **รูปที่** 5) รองลงมาคือ *A. niger* (**รูปที่** 2) และ *A. ochraceous* ตามลำดับ โดยตรวจพบ *A. flavus* มากที่สุดในถั่วลิสง

เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณแอฟฟล่าท็อกซินบี 1 ในเมล็ดพืช พบว่าในถั่วลิสงมีค่าเฉลี่ยสูงถึง 36 ppb รองลงมาคือข้าวโพด 29 ppb ถั่วเหลือง 4 ppb ข้าวและถั่วเขียว 3 ppb (**ตารางที่** 3)

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของ *A. niger* ในอาหารเหลว SDB พบว่า เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะของอาหารที่จัดกัดจำนวนเชื้อหรือน้ำหนักแห้งจะเพิ่มมากขึ้น (**กราฟที่** 1) ส่วนค่า pH และน้ำตาลจะลดลง (**กราฟที่** 2) น้ำตาลลดลง 36.8 % ในวันที่ 4 และมีความเป็นกรดเพิ่มสูงขึ้น

เมื่อนำอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อ *A. niger* (ที่แยกได้จาก 5 ตัวอย่างคือ ถั่วลิสง ข้าวโพด ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และข้าว) ในชั่วโมงที่ 96 หรือวันที่ 4 มาทำการทดสอบ sensitivity ต่อเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 เกิดวงใสหรือที่เรียกว่า clear zone รอบ cylinder cup ส่วนเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 นั้นไม่เกิดวงใสรอบ cylinder cup (**รูปที่** 5)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



(a)

(b)

(c)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

รูปที่ 1 แสดงการปนเปื้อนของเชื้อราในตัวอย่างเมล็ดพืชชนิดต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA; (a) ข้าวโพด (b) ถั่วเขียว (c) ถั่วลิสง

ตารางที่ 1 การปนเปื้อนของเชื้อราบนเมล็ดข้าว (ข้าวขาว และข้าวกล้อง), ข้าวโพด, ถั่วเขียว, ถั่วเหลือง และถั่วลิสง

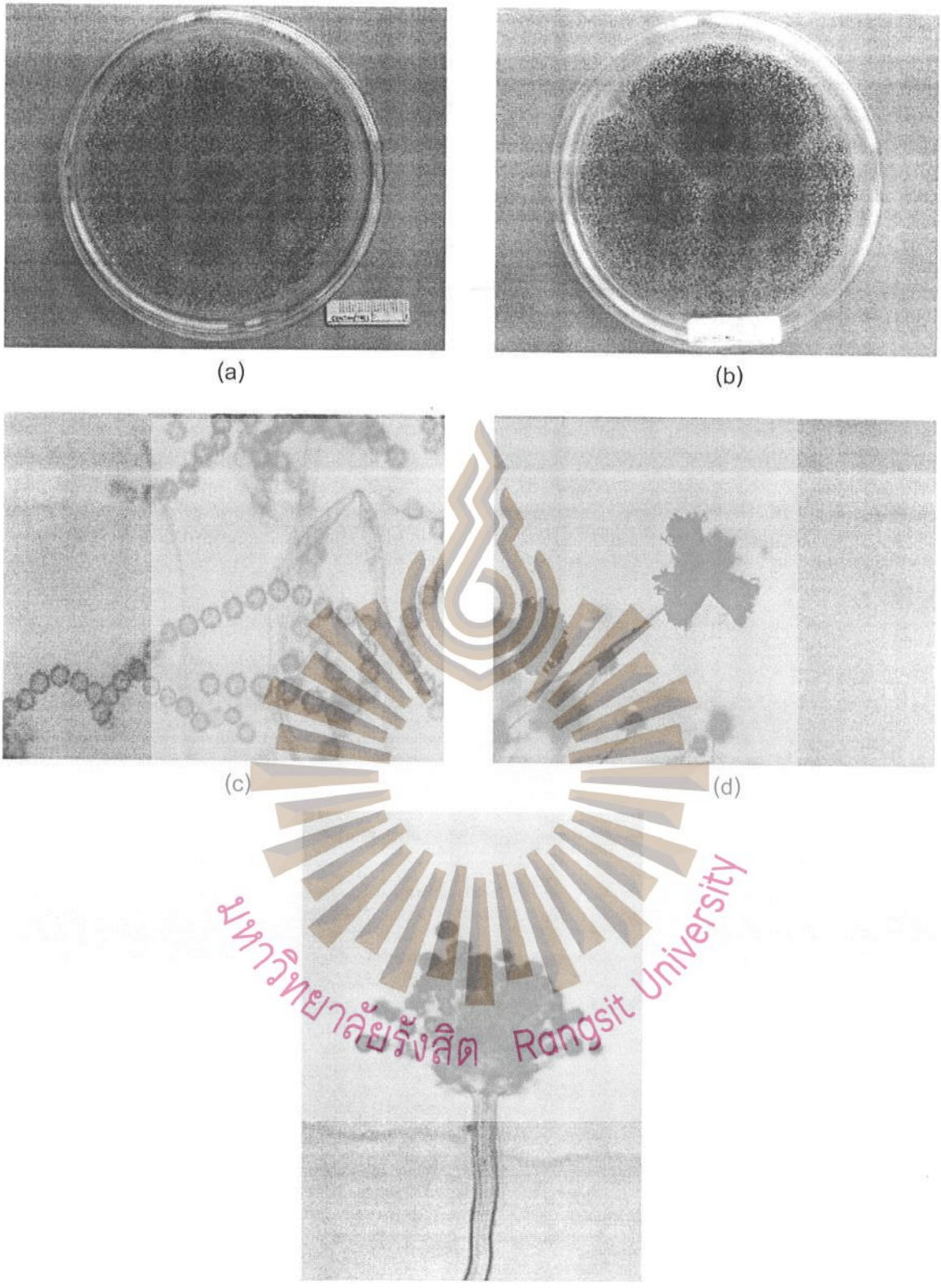
เมล็ดธัญพืช	เชื้อราที่ปนเปื้อนบนเมล็ดธัญพืช (%)					
	เมล็ดพืชที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา* (Cont./tested)	*Aspergillus***	*Rhizopus*	*Penicillium*	*Fusarium*	Unidentified
ข้าวขาว	23/32 (72%)	60	26	4	9	26
ข้าวกล้อง	14/20 (70%)	100	0	7	43	79
ข้าวโพด	43/49 (88%)	83	44	0	2	5
ถั่วเขียว	46/50 (92%)	84	37	7	9	13
ถั่วเหลือง	42/50 (84%)	102	31	2	2	14
ถั่วลิสง	50/50 (100%)	178	56	10	0	24

เชื้อราที่ปนเปื้อนบนเมล็ดธัญพืช (%) = 83

* เมล็ดพืชที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา

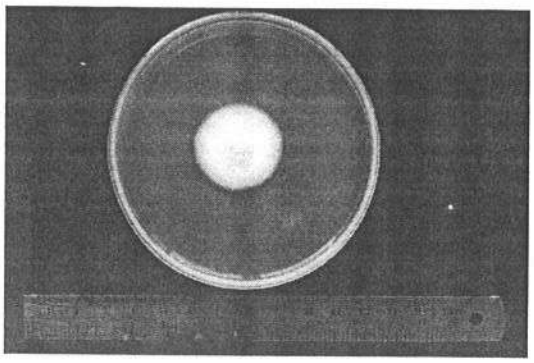
** *Aspergillus* = 3 species : *A. flavus*, *A. niger* and *A. ochraceous*

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

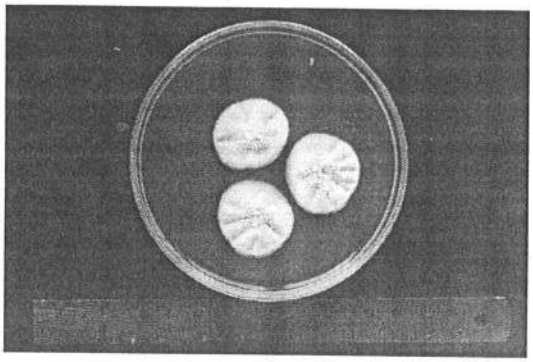


มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

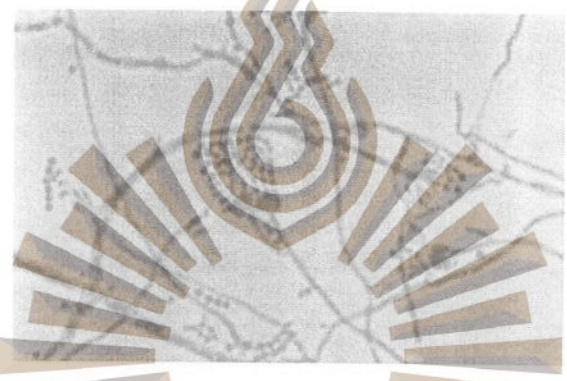
รูปที่ 2 *Aspergillus niger* ; (a),(b) โคโลนีบน Czapek agar อายุ 7 วัน ; (c) conidia : (d) และ (e) conidial head



(a)



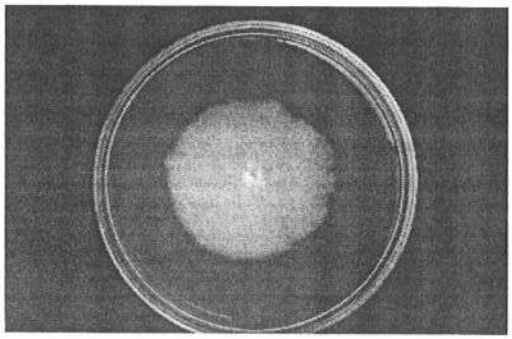
(b)



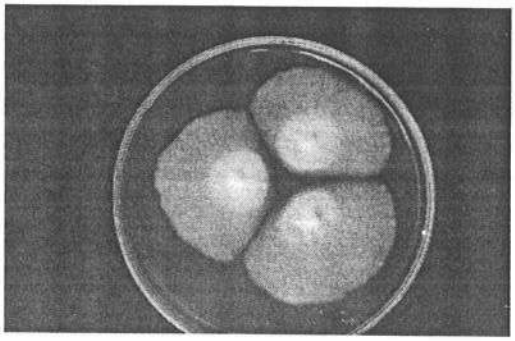
(c)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

รูปที่ 3 *Penicillium* ; (a),(b) โคโลนีบน Czapek agar อายุ 7 วัน ; (c) conidiophore และ conidia



(a)



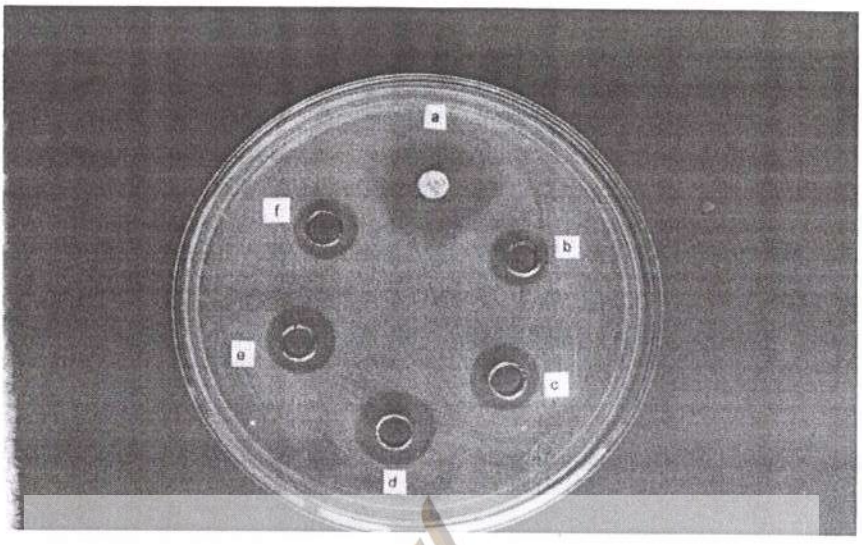
(b)

(c)

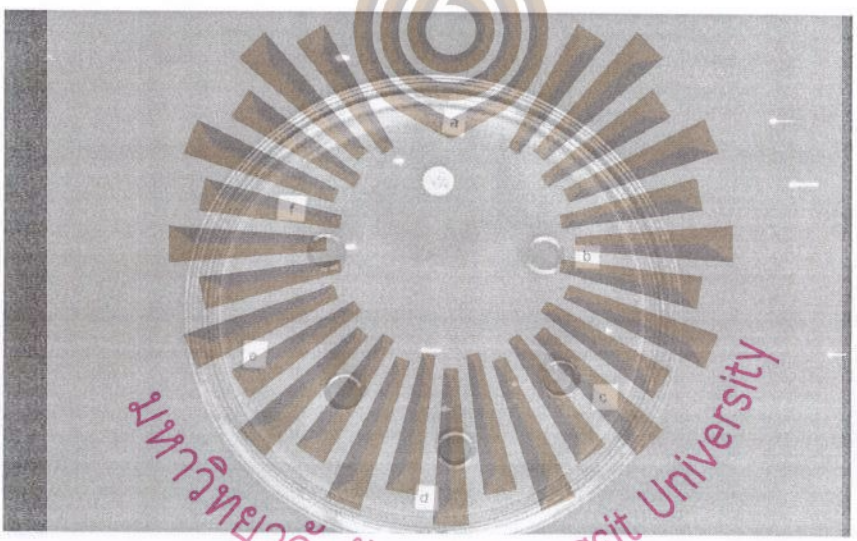
รูปที่ 4 *Fusarium* ; (a),(b) โคโลนีอายุ 7 วัน บน Czapek agar ; (c) macroconi

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

RANGSIT UNIVERSITY LIBRARY



S. aureus ATCC 29213



E. coli ATCC 25922

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

รูปที่ 5 แสดงผลการทดสอบ sensitivity ของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 29213 และ *E. coli* ATCC 25922 โดยใช้ยาปฏิชีวนะ Norfoxacin ; a = Norfoxacin (NOR 10) ; b,c,d,e,f = อาหารเหลวที่ใช้เลี้ยง *A. niger* 4 วัน

ตารางที่ 2 การปนเปื้อนของ *Aspergillus* บนเมล็ดข้าวสาร ข้าวกล้อง ข้าวโพด ถั่วเขียว ถั่วเหลือง และถั่วลิสง

เมล็ดธัญพืช	เมล็ดธัญพืชที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา (Contaminated/Tested)	การปนเปื้อนของ *Aspergillus* (Isolates/ Contaminated Sample)		
		A. flavus	*A. niger*	*A. ochraceous*
ข้าวสาร	23/32	7/23	4/23	3/23
ข้าวกล้อง	14/20	7/14	2/14	5/14
ข้าวโพด	43/49	17/43	19/43	2/43
ถั่วเขียว	46/50	16/46	37/46	9/46
ถั่วเหลือง	42/50	23/42	11/42	9/42
ถั่วลิสง	50/50	42/50	38/50	9/50
รวม	218/51	112/218	111/218	37/218

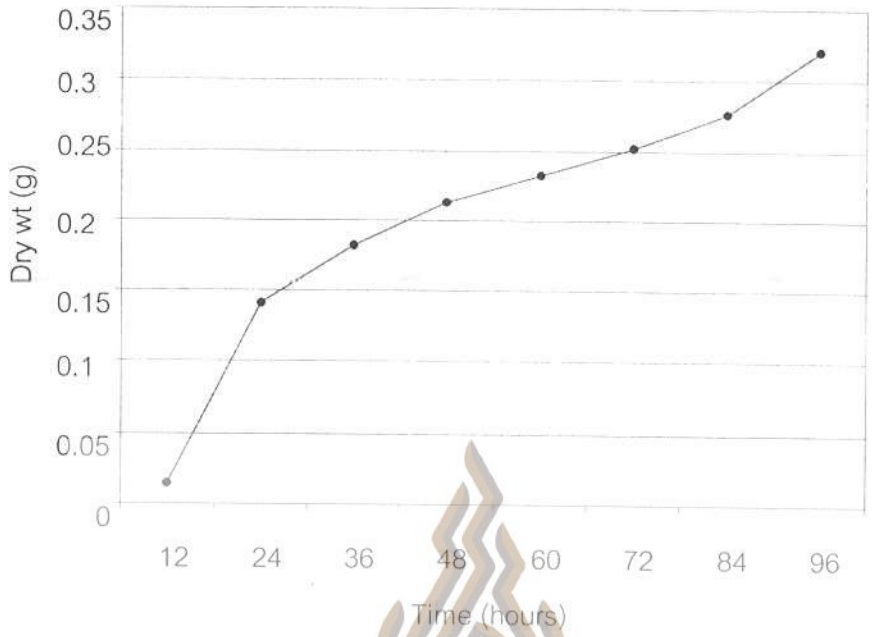
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 3 การปนเปื้อนด้วยแอฟฟล่าท็อกซิน บี 1 (AFB1) ในข้าวสาร ข้าวกล้อง ข้าวโพด ถั่วเขียว ถั่วเหลือง และถั่วลิสง

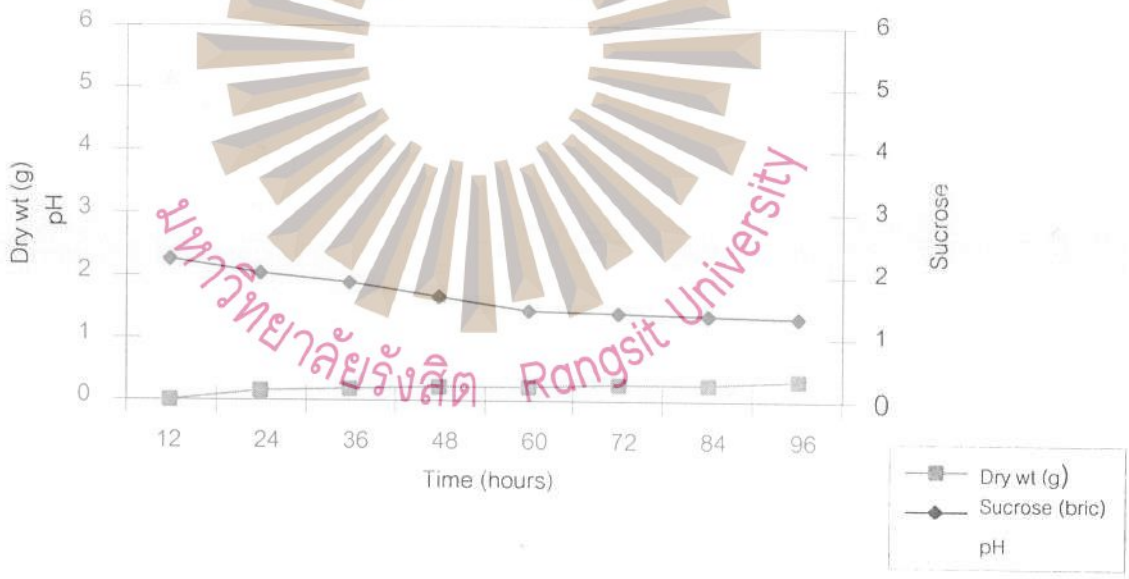
เมล็ดธัญพืช	การปนเปื้อนด้วยแอฟฟล่าท็อกซิน บี 1 (AFB1)		
	Sample		
	Contaminated/Tested	Percent (%)	B1 conc. (ppb)*
ข้าวสารและข้าวกล้อง	14/52	27	3 (2-10)
ข้าวโพด	17/49	35	29 (2-80)
ถั่วเขียว	8/50	16	3 (2-4)
ถั่วเหลือง	11/50	22	4 (2-22)
ถั่วลิสง	45/50	90	36 (2-268)

* B1 conc. = mean (range) ppb = μg/kg sample

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



กราฟที่ 1 แสดงการเจริญของเชื้อ *A. niger* ในอาหารเหลว SDB



มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

กราฟที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้ง, pH และปริมาณน้ำตาลในอาหาร SDB ที่เลี้ยงเชื้อ *A. niger*

บทที่ 4
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาการปนเปื้อนเชื้อราในเมล็ดธัญพืช 5 ชนิด ได้แก่ ถั่วลิสง ถั่วลิสง ถั่วเขียว ข้าวโพด และข้าว พบว่ามีการปนเปื้อนด้วยเชื้อราทั้งสิ้น แต่มีปริมาณการปนเปื้อนแตกต่างกันไป พบว่าในถั่วลิสงมีการปนเปื้อนเชื้อรามากที่สุด (6) รองลงมาคือ ถั่วเขียว ข้าวโพด ถั่วเหลือง และข้าว ตามลำดับ (แผนภาพที่ 1) การปนเปื้อนเชื้อรานี้น่าจะเป็นผลจากการมีความชื้นในเมล็ดธัญพืชสูง สืบเนื่องจากวิธีการจัดเก็บไม่เหมาะสมเพราะความชื้นเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการเจริญของเชื้อรา ดังนั้นประเทศกสิกรรมที่อยู่ในเขตร้อนชื้น อากาศจะอบอ้าวและมีความชื้นสูง เช่น ประเทศไทย เมล็ดธัญพืชจึงมีโอกาสปนเปื้อนเชื้อราสูงมาก โดยเฉพาะถ้ามีการเก็บเกี่ยวไม่ดี หรือการเก็บรักษาไม่ดี เช่น เก็บในที่อับชื้นเป็นปี เป็นต้น

ชนิดของเชื้อราที่พบปนเปื้อนในเมล็ดธัญพืชส่วนใหญ่เป็นชนิด *Aspergillus* และชนิดที่พบรองลงมา ได้แก่ *Penicillium, Fusarium* และ *Rhizopus* (14) สำหรับชนิดของ *Aspergillus* ที่พบมากที่สุด คือ *A. flavus* และพบมากที่สุดในถั่วลิสง ซึ่งสัมพันธ์กันกับผลการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารแอฟฟล่าท็อกซิน บี 1 จากการวิเคราะห์พบว่าในถั่วลิสงมีปริมาณแอฟฟล่าท็อกซิน บี 1 สูงมากถึง 36 ppb ส่วนในข้าวโพดตรวจพบว่ามีสูงถึง 29 ppb ซึ่งสูงกว่าระดับที่อนุญาตให้มีได้ในเมล็ดธัญพืชของอเมริกาคือ 20 ppb ดังนั้นผู้บริโภคที่บริโภคถั่วลิสงหรือผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสงที่มีการจัดเก็บไม่ดีมีการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* หรือมีระดับแอฟฟล่าท็อกซิน บี 1 สูงกว่าระดับที่ยอมให้มีได้ในเมล็ดธัญพืชหรืออาหาร จะมีโอกาสเสี่ยงในการเป็นโรคมะเร็งตับสูง โดยเฉพาะถั่วลิสงและข้าวโพดได้เคยมีผู้ทำการตรวจวิเคราะห์พบปริมาณแอฟฟล่าท็อกซินบี1 ในถั่วลิสงสูงถึง 6,415 ppb และในข้าวโพดสูงถึง 4,851 ppb (12) เชื้อ ราชนิดอื่นๆ บางชนิดสร้างแอฟฟล่าท็อกซินได้เช่นกันแต่ไม่มากเท่ากับ *A. flavus*

จากการทดลองหาความไวของแบคทีเรียต่อสารที่เชื้อ *A. niger* สร้างออกมาระหว่างการเจริญในอาหารเหลว เป็นเวลา 96 ชั่วโมง การที่เลือกใช้เวลานี้ก็เพราะว่าอยู่ในช่วงของ stationary phase ซึ่งทราบจากการทำ growth curve จากผลการทดลองพบว่าเกิดการต้านการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 และ *E. coli ATCC* 25922 (13) แสดงว่า *A. niger* สร้างสารพิษบางอย่างออกมาปนอยู่ในอาหารและมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสารพิษที่ *A. niger* สร้างในกรณีที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ได้แก่ malformins, naphthoquinones และ migragillin (14) รวมทั้งสารพิษแอฟฟล่า

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ท็อกซิน (3) ด้วย การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียนี้อาจเกิดจากฤทธิ์ของสารตัวใดตัวหนึ่งหรือหลายตัวร่วมกันก็ได้ พบว่าสารพิษนี้สามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียได้เป็นบริเวณกว้าง 1.2-1.5 เซนติเมตร ซึ่งน้อยกว่า clear zone ที่เกิดจาก Norfoxacin disc ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสาร หรือปริมาณของสารน้อย เพราะไม่ได้ทำการสกัดสารให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปทดสอบการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งขนาดของ cylinder cup ก็เป็นตัวจำกัดปริมาณสารที่ใส่ด้วย ส่วน *E. coli* ATCC 25922 นั้น สารพิษของ *A. niger* ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้ได้ อาจเป็นเพราะปริมาณสารพิษที่ใช้มีปริมาณไม่มากพอที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อตัวนี้ได้ หรือสารพิษชนิดที่พบใน *A. niger* เหล่านี้ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 นี้ จากผลการทดลองนี้น่าจะมีการศึกษาต่อ โดยการสกัดสารให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาทำการทดลอง เพื่อที่จะทราบถึงชนิดและปริมาณของสารที่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าว

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เอกสารอ้างอิง

(1) Shank RC, Wogan GN, Gibson JB, Nondasuta A. Dietary aflatoxins and human liver cancer. II. Aflatoxins in market foods and foodsuffs of Thailand and Hong Kong. Food Cosmet Toxicol 1972; 10: 61.

(2) Shank RC, Wogan GN, Gibson JB. Dietary aflatoxins and human liver cancer. I. Toxigenic molds in foods and foodstuffs in tropical South-east Asia. Food Cosmet Toxicol 1972; 10:51.

(3) Romruen K, Glinsukon T, Toskulkao C. Studies on the poulation of toxigenic fungi in market foods and foodsuffs. III. Toxicological evaluation of the crude toxins produced by the representative strains of *Aspergillus niger*. J Natl Res Council (Thailand) 1981; 13:14.

(4) Glinsukon T, Thamavit W, Toskulkao C, Ruchirawat M. Studies on the poulation of toxigenic fungi in market foods and foodsuffs. II. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A. J Nutrit Assoc Thailand 1980; 14:27.

(5) Glinsukon T, Yuan SS, Wiriyachitra P, Kituara V, Buchi G, Shank RC et al. Isolation and purification of cytochalasin E and two treneorgens from Aspergillus clavatus. Plant Foods for Men 1975; 1:113.

(6) Glinsukon T, Thamavit W, Ruchirawat M. Studies on the poulation of toxigenic fungi in market foods and foodsuffs. I. Mycoflora contamination. J Sci Soc Thailand 1976; 2:176.

(7) Glinsukon T, Tulaporn C, Wongraweekul P, Toskulkao C, Romruen K, Suvannapura A. Studies on the poulation of toxigenic fungi in market foods and foodsuffs. V. Screening tests on the certain strains of *Aspergillus* and *Penicillium*. J Natl Res Council (Thailand) 1982; 41:1.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

(8) Ciegler A, Burmeister HR, Vesonder RF, Hesseltine CW. Mycotoxins : Occurrence in the EnvironmentCentraalbureau voor schimmel cultures. In: Shank RC, editor. Mycotoxins and N-Nitroso Compounds : Environmental Risks. Florida: Press, Inc., Boca raton, 1981: 1-50.

(9) Shank RC. Environmental toxicoses in humans. In: Shank RC, editor. Mycotoxins and N-Nitroso Compounds : Environmental Risks. Florida: Press, Inc., Boca raton, 1981: 107-140.

(10) Eaton DL, Groopman JD. The toxicology of aflatoxin . 1994.

(11) WHO/FUN/FOS/95.3. Application of risk analysis to food standards issues inReport of the joint FAO/WHO Expert Consultation. 1995. Geneva,Switzerland. Ref Type: Report

(12) Glinsukon T. Aflatoxin B1-producing strain of *Aspergillus flavus* var. columnaris. J Natl Res Council (Thailand) 1979; 11:17.

(13) Glinsukon T, Wongraweekul P, Romruen K, Tulaporn C, Toskulkao C, Suwannapura A. V. Screening tests on the antibacterial activity of the crude toxins produced. J Natl Res Council (Thailand) 1982; 41:1.

(14) Frisvad J.C. Fungal species and their specific production of mycotoxins. In: Samson RA, Reenen-Hoekstra ES, editors. Introduction to food-borne fungi. Baarn: Centraalbureau voor schimmel cultures, 1988: 239-249.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University