Agricultural Sci. J. 46 : 3/1 (Suppl.) : 105-108 (2015) ว. วิทย. กษ. 46 : 3/1 (พิเศษ) : 105-108 (2558)

ประสิทธิภาพของอาหารสูตรดัดแปลงเพื่อตรวจสอบเชื้อราที่สร้างสารพิษปนเปื้อนบนเมล็ดข้าว

Efficiency of the Modified Fungal Media for the Detection of Toxigenic Fungi on Rice Grain.

พิสุทธิ์ เขียวมณี[1], **ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล**[1]**และรณภพ บรรเจิดเชิดชู**[1]

Pisut Keawmanee[1] Chainarong Rattanakreetakul[1] and Ronnapop Bunjoedchoedchu[1]

Abstract

The contamination of rice grain especially mycotoxin was concerned. In this study, the observation of two different brown rice grains of different harvest conditions were screened. Brown rice grain which harvested on rainy season was observed the higher numbers of *Aspergillus* sp. on Malt Extract Salt Agar (MSA), but the luminescent colony can be observed on Coconut Milk Medium (CMM). The effect of sodium chloride and coconut oil was screened to the selected fungi. Four percentage of NaCl could inhibit the growth of *Rhizopus* sp. and promote the growth of *Aspergillus* sp. Coconut oil at 1% promoted the luminescent colony. Therefore, the MSA plus 1% coconut oil and Czapek's Dox Agar (CZA) plus 2% NaCl and 1% coconut oil showed the best result for detection of the contamination fungi. The modified media of MSA and CZA with 4% NaCl and 1% coconut oil was tested. The result revealed that both applied media could be used to screen or detect the contamination fungi on rice grain with good performance.

Keywords: aflatoxin, detection, coconut milk agar

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราบนเมล็ดข้าวเป็นสิ่งสำคัญ จากการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เมล็ดข้าวกล้องสองสภาพจากการเก็บเกี่ยวต่างช่วงเวลาในฤดูฝน และฤดูแล้ง และพบว่าข้าวกล้องที่เก็บเกี่ยวในฤดูฝนจะพบ *Aspergillus* sp. ได้ในปริมาณมากบนอาหาร Malt Extract Salt Agar (MSA) แต่จะพบโคโลนีที่เรืองแสงบนอาหาร Coconut Milk Medium (CMM) ทำการทดสอบผลของ NaCl และน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นต่อเชื้อราที่คัดเลือกได้ พบว่า NaCl ระดับ 4% สามารถยับยั้งโคโลนีของ *Rhizopus* sp. และทำให้ *Aspergillus* sp. เจริญได้ดี และน้ำมันมะพร้าว 1% กระตุ้นให้โคโลนีเชื้อราเรืองแสงได้ อาหาร MSA เมื่อผสมกับ 1% น้ำมันมะพร้าว และ Czapek's Dox Agar (CZA) ผสมกับ 2% NaCl และ 1% น้ำมันมะพร้าวให้ผลดีในการจำแนกเชื้อราที่ปนเปื้อนบนข้าวได้ การดัดแปลงอาหาร MSA และ CZA ผสมกับ 4% NaCl และ 1% น้ำมันมะพร้าว ยังให้ผลดีในการใช้เพื่อคัดเลือกเชื้อราสร้างสารพิษ โดยวิธี agar plate และ spread plate

คำสำคัญ: อะฟลาทอกซิน, การตรวจสอบ, coconut milk agar

คำนำ

สารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin) เป็นปัญหาสำคัญในผลผลิตเกษตรที่มีผลในเรื่องของสุขภาพ โดยองค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ รายงานสารพิษกว่า 100 ชนิด จากเชื้อสาเหตุกว่า 200 ชนิด และอาหารเกิดปนเปื้อนสารพิษถึง 100 ล้านตันต่อปี (โครงการสารานุกรมไทย, 2556) ประเทศในแถบร้อนชื้นรวมถึงประเทศไทย จะพบสารอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ได้ในอาหาร และผลผลิตทางการเกษตรเมื่อสภาพการจัดการไม่ดีพอ อะฟลาทอกซินถูกสร้างโดยเชื้อ *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* และหน่วยงาน International Agency for Research on Cancer (IARC) จัดให้อะฟลาทอกซินเป็นสารก่อให้เกิดมะเร็งในตับ (วิษณุ และคณะ, 2556) การศึกษาครั้งนี้จึงต้องการเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ใช้เพื่อตรวจสอบและการดัดแปลงสูตรอาหารเพื่อเพิ่มศักยภาพในการตรวจสอบเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในข้าว

[1]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศักยภาพการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อตรวจสอบเชื้อรา และสารพิษ

นำอาหารเลี้ยงเชื้อ MSA (malt extract salt agar) และ CMM (coconut milk medium) (Lin and Dianese, 1976) มาตรวจสอบปริมาณเชื้อราบนตัวอย่างข้าวกล้องสองแหล่งที่มีช่วงฤดูการเก็บเกี่ยวแตกต่างกัน การบ่มเชื้อจากเมล็ดใช้อุณหภูมิควบคุม 27 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง near UV และ cool white fluorescent บันทึกลักษณะ จำแนกโคโลนีของเชื้อรา ตรวจนับปริมาณเชื้อรา และตรวจสอบการสร้างสารพิษจากโคโลนีด้วยการเรืองแสงจาก UV 365 nm หรือใช้ Dark reader (U.S.A.) เทียบกับอาหาร PDA เมื่อนำเชื้อราที่พบการเรืองแสงไปปลูกเชื้อลงในข้าวสาร บ่มเชื้อ และทำการตรวจสอบปริมาณอะฟลาทอกซิน โดยใช้เทคนิค ELISA (ScreenEZ® Aflatoxin ELISA Test Kit ของบริษัท สยามอินเตอร์ควอลิตี้ จำกัด)

2. ประสิทธิภาพของ NaCl และน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นต่อการเจริญของเชื้อรา และการสร้างสารพิษ

ใช้อาหาร PDA เป็นพื้นฐานในการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง โดยใช้ NaCl 2%, 4% และ 6% และน้ำมันมะพร้าว 0.5%, 1%, 3% และ 5% ทดสอบกับ *Rhizopus* sp., unknown และ *A. flavus* บ่มเชื้อ วัดขนาดโคโลนี และตรวจสอบการเรืองแสงของโคโลนี โดยใช้โปรแกรม ImageJ (National Institute of Mental Health)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อราสูตรดัดแปลง เพื่อตรวจสอบเชื้อราที่สร้างสารพิษ และการประเมินศักยภาพในการนำไปใช้

ดัดแปลงอาหารสูตร MSA, CMM, CZA (Czpek's Dox Agar) และ DRBC (Dichloran Rose Bengal Choramphical) (King *et al*., 1979) โดยการเติม NaCl 2% ร่วมกับ น้ำมันมะพร้าว 1% ทดสอบกับ *Rhizopus* sp., unknown และ *A. flavus* ย้ายเชื้อทดสอบลงในอาหารดัดแปลง บ่มตัวอย่าง วัดขนาดโคโลนี และตรวจสอบการเรืองแสงจากสารพิษคัดเลือก และปรับสูตรอาหารเพื่อใช้ตรวจสอบโดยวิธี spread plate และ agar plate จากตัวอย่างเมล็ดข้าวสาร และข้าวกล้องที่มีจำหน่ายในท้องตลาด เทียบกับข้าวสารที่ปลูกเชื้อ *A. flavus* ตรวจปริมาณเชื้อรา และการเรืองแสงภายหลังการบ่มเชื้อ

ผลการทดลอง

1. ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการตรวจสอบสารพิษและการคัดเลือกเชื้อรา

ตรวจสอบคุณภาพข้าวกล้องที่มีการเก็บเกี่ยวต่างฤดูกัน พบว่าบนอาหาร MSA ข้าวกล้องที่เก็บเกี่ยวในฤดูฝน พบ *Aspergillus* sp. ปริมาณ 96 % พบ *Rhizopus* sp. ที่เส้นใยถูกจำกัดในปริมาณน้อยกว่าที่พบในอาหาร PDA สำหรับอาหาร CMM พบ unknown มากถึง 48 % และมี *Rhizopus* sp. เจริญปกคลุม (Table 1) เมื่อนำไปตรวจการเรืองแสง UV ของโคโลนีเชื้อราบนอาหาร CMM จะเห็นว่า *A. flavus* บางโคโลนีเรืองแสง แต่จะใช้สังเกตเชื้อราสีอ่อนได้ยาก เมื่อทำการยืนยันการสร้างสารพิษบนข้าวสารที่เก็บรักษา 2 สัปดาห์ จะตรวจพบสารพิษอะฟลาทอกซินด้วยเทคนิค ELISA ในปริมาณ 25 ppb

Table 1 Percentage of fungi founded on brown rice grain with tested media after agar plate,3 days of incubations.

Medium	Brown rice : Harvest in rainy season			Brown rice : Harvest in dry season		
	PDA	MSA	CMM	PDA	MSA	CMM
Aspergillus sp.	44	96	72	ND	28	ND
Rhizopus sp.	32	8	12	56	ND	16
Unknown	8	ND	48	16	ND	20

ND = non detectable

2. ผลของ NaCl และน้ำมันมะพร้าว ต่อการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษ

ระดับของ NaCl ที่เพิ่มขึ้นจาก 4% ถึง 6% จะยับยั้งการเจริญของ *Rhizopus* sp. ได้ 70-89 % และเชื้อราอื่นๆ ยกเว้น *A. flavus* ที่ NaCl 2% และ 4% ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่การเติม NaCl ไม่มีผลต่อการเรืองแสง การเติมน้ำมันมะพร้าวสามารถกระตุ้นการเจริญของเชื้อราได้ และการเติมน้ำมันมะพร้าวที่ระดับ 1% และ 3% ให้ผลต่อความเข้มแสงได้ใกล้เคียงกันเมื่อตรวจสอบความเข้มของการเรืองแสง UV ด้วยโปรแกรม ImageJ (Table 2)

3. ผลของอาหารสูตรดัดแปลงต่อการตรวจพบเชื้อรา และการสร้างสารพิษ

อาหาร MSA ที่มีน้ำมันมะพร้าว 1% ทำให้ *Rhizopus* sp. และ unknown เจริญได้ช้า และ *A. flavus* สามารถเจริญได้เร็วบนอาหาร MSA สำหรับอาหาร CZA ที่มี NaCl 2% และน้ำมันมะพร้าว 1% พบ *Rhizopus* sp. เจริญได้ปานกลาง แต่พบ

ความหนาแน่นของสร้างเส้นใยน้อย และแบนราบไปกับผิวอาหาร โดยอาหารดัดแปลงทั้ง 2 ชนิดพบการเรืองแสงของสารพิษ สำหรับอาหาร CMM ที่มี NaCl 2% และอาหาร DRBC ที่มีน้ำมันมะพร้าวที่ 1% พบการเจริญของ *Rhizopus* sp. ได้รวดเร็ว รบกวนการเจริญของ *A. flavus* และ อาหาร DRBC จะพบการเรืองแสงบนผิวหน้าอาหารทำให้ยากต่อการตรวจสอบ (Table 3)

Table 2 Effect of NaCl on fungal growth and coconut oil on the intensity of luminescent colony

NaCl (%)	Oil (%)	%Inhibition			Reflection of UV light intensity from aflatoxin		
		Rhizopus sp.1 d	Unknown 3 d	*A. flavus* 3 d	*Rhizopus* sp. 1 d	Unknown 3 d	*A. flavus* 2 d
2	-	44.44^{c}	44.14^{c}	-4.00^{b}	ND	ND	ND
4	-	70.67^{b}	58.56^{b}	-8.00^{b}	ND	ND	ND
6	-	89.33^{a}	78.38^{a}	12.00^{a}	ND	ND	ND
-	0.5	-15.11^{e}	-27.03^{f}	-72.00^{d}	ND	ND	57.50
-	1	-17.33^{e}	-29.73^{f}	-92.00^{e}	ND	ND	74.00
-	3	-2.22^{d}	-18.02^{e}	-72.00^{d}	ND	ND	74.50
-	5	-5.78^{d}	-1.80^{d}	-44.00^{c}	ND	ND	67.00
CV (%)		20.02	24.15	22.58			

Means in the same column followed by the same letter are not significant different ($p > 0.05$)
ND = non detectable, d = day after incubations

4. การประเมินประสิทธิภาพของอาหารเพื่อตรวจสอบเชื้อราที่สร้างสารพิษปนเปื้อน

อาหาร MSA และอาหาร CZA ที่มีการเติม NaCl 4% ร่วมกับน้ำมันมะพร้าว 1% ด้วยวิธี agar plate method ที่ระยะเวลา 3 วัน พบการเรืองแสง 100% ในข้าวสารที่มีการคลุกด้วย *A. flavus* ในตัวอย่างข้าวกล้องสามารถตรวจพบการเจริญเติบโตของ *Rhizopus* sp. ที่มีลักษณะโคโลนีถูกจำกัด และพบการเรืองแสงของอะฟลาทอกซินได้ ด้วยวิธี spread plate method ที่ระยะเวลา 4 วัน พบการเรืองแสงของ *A. flavus* ในข้าวสารที่มีการคลุกด้วย *A. flavus* และในตัวอย่างข้าวกล้องสามารถพบการเรืองแสงได้เช่นกัน แต่ในอาหาร CZA ขนาดของโคโลนีจะมีขนาดเล็กกว่าอาหาร MSA (Table 4) ทั้งนี้ตรวจไม่พบเชื้อรา และการเรืองแสงของอะฟลาทอกซินในตัวอย่างข้าวสาร

Table 3 Colony diameter of *Rhizopus* sp. at day 1, unknown and *Aspergillus* sp. at day 3 and the reflection of UV light intensity from aflatoxin under various concentration of NaCl and coconut oil.

Medium	NaCl (%)	Oil (%)	Diameter (cm.)			Reflection of UV light intensity from aflatoxin		
			Rhizopus sp.	Unknown	*A. flavus*	*Rhizopus* sp.	Unknown	*A. flavus*
MSA	7.5	-	0.44^{f}	0.74^{e}	1.60^{f}	ND	ND	ND
MSA	7.5	1	0.44^{f}	0.75^{e}	3.40^{bc}	ND	ND	67.00
CMM	-	-	4.02^{c}	3.15^{a}	3.18^{c}	ND	62.00	115.30
CMM	2	-	5.41^{a}	2.48^{b}	3.45^{b}	ND	56.20	93.86
CZA	-	-	4.93^{b}	2.55^{b}	2.15^{e}	ND	ND	ND
CZA	2	1	4.17^{c}	1.82^{d}	2.48^{d}	ND	162.50	75.00
DRBC	-	-	1.50^{e}	1.92^{cd}	1.03^{g}	ND	ND	ND
DRBC	-	1	3.51^{d}	2.03^{c}	3.95^{a}	ND	82.00	127.50
CV (%)			8.55	4.46	4.30			

Means in the same column followed by the same letter are not significant different ($p > 0.05$)
ND = non detectable

Table 4 Percentage of fungal infected rice (25 seeds) by agar plate method and the number of fungi (cfu/25 seeds) by spread plate method.

Fungi	*A. flavus* infected rice			White rice			Brown rice		
	PDA	mMSA	mCZA	PDA	mMSA	mCZA	PDA	mMSA	mCZA
Agar plate method (3 days)									
Aspergillus sp.	100	100	100	ND	4	ND	52	60	88
Rhizopus sp.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	32	40	ND
Other	ND	ND	ND	ND	ND	ND	28	4	28
luminescent colony	ND	25	25	ND	ND	ND	ND	4	5
Spread plate method (4 days)									
Aspergillus sp.	7098	6568	6250	ND	ND	ND	249	258	129
Rhizopus sp.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9	26	0
Other	ND	ND	ND	ND	ND	ND	86	0	86
luminescent colony	ND	6568	6250	ND	ND	ND	ND	250	112

mMSA = MSA + 4% w/v NaCl and 1% v/v coconut oil
mCZ A = CZA + 4% w/v NaCl and 1% v/v coconut oil
ND = non detectable

วิจารณ์ผล

การเรืองแสง ultraviolet เป็นลักษณะสำคัญที่นำมาใช้เพื่อตรวจการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน (Abbas *et al*., 2004) โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อรา coconut milk medium (Lin and Dianese, 1976) สามารถตรวจสอบเชื้อราที่สร้างอะฟลาทอกซินได้ แต่พบการรบกวนจาก *Rhizopus* sp. ที่ปกคลุมผิวหน้า สำหรับน้ำมันมะพร้าว ทำให้เห็นการเรืองแสง ultraviolet ของอะฟลาทอกซินได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Priyadarshini and Tulpule (1979) ที่ใช้น้ำมันมะพร้าวเพื่อเพิ่มการสร้างสารพิษของ *A. parasiticus* สำหรับการเติม sodium chloride ทำให้ค่า water activity เหมาะสมต่อการเจริญของ *Aspergillus* sp. (Klich, 2007) จึงทำให้เชื้อราชนิดอื่นเจริญไม่ได้ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเติม sodium chloride 4% - 6% (w/v) จะยับยั้งการเจริญของ *Rhizopus* sp. และ unknown ได้ร้อยละ 58-90

สรุป

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม NaCl 4% ร่วมกับน้ำมันมะพร้าว 1% สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจเชื้อราที่สร้างสารพิษปนเปื้อนบนเมล็ดข้าวได้ โดยวิธี agar plate ใช้ระยะ 3 วัน และวิธี spread plate ใช้ระยะ 4 วัน ทั้งนี้ ลักษณะการเรืองแสงในการตรวจสอบอาจไม่ชัดเจนขึ้นกับปริมาณสารพิษที่พบในตัวอย่าง ดังนั้นผู้ตรวจสอบจะต้องปรับเกณฑ์การตรวจสอบให้สอดคล้องกับลักษณะการเรืองแสงในแต่ละตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

โครงการสารานุกรมไทย. 2556. สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนโดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เล่มที่ 14. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://kanchanpisek.or.th/kp6/New/Sub/book/book.php?page=main&book=. (14 ตุลาคม 2556).

วิษณุ ศรีลา, กุณฑลี ร่างน้อย และมณฑารพ ยมาภัย. 2556. Mycotoxin. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://personal.sut.ac.th/montarop/2013%20WBSITE/School_of_Biotech/Blog/Entries/2013/9/14. (10 มกราคม 2558).

Abbas, H.K., W.T. Shier, B.W. Horn and M.A. Weaver. 2004. Cultural Methods for Aflatoxin Detection. Journal of Toxicology. 23: 295-315.

King D.A. Jr., A.D. Hocking and J.I. Pitt. 1979. Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of moulds from foods. J. Applle. Environment. Microbiol. 37: 959-964.

Klich, A.M. 2007. Environment and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Mycoscience. 48:71-80.

Lin, M.T. and J.C. Dianese. 1976. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. Phytopathology. 66:1466-1499.

Priyadarshini, E. and P.G. Tulpule. 1979. Effect of free fatty acid on aflatoxin production in a synthetic medium. Fd Cosmet. Toxicol. 18:367-369.