Agricultural Sci. J. 49 : 4 (Suppl.) : 155-158 (2018) ว. วิทย. กษ. 49 : 4 (พิเศษ) : 155-158 (2561)

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถลดปริมาณสารพิษฟูโมนิซินในสภาพหลอดทดลอง

In vitro Screening of Fumonisin Detoxification Bacteria

พิสุทธิ์ เขียวมณี[1,2] สรรเสริญ รังสุวรรณ[1,2] ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1,2,*] และรัติยา พงศ์พิสุทธา[1,2]

Pisut Keawmanee[1,2], Sansern Rungsuwan[1,2], Chainarong Rattanakreetakul[1,2,*] and Ratiya Pongpisutta[1,2]

Abstract

Mycotoxins contamination in raw material of food and animal feed are important problems. Fumonisin is the most mycotoxin contamination in Southeast Asia country and it is usual found in maize product. Fumonisin has effect to human and many animal health. Reducing of fumonisin contamination can be used the microbial enzyme to detoxify. In this study, fumonisin detoxification bacteria were isolated from maize by acclimatization with fumonisin on media at concentration of 2 ppm shake at room temperature for 3 weeks. After the pure culture isolation, each single bacteria were incubated again in 2 ppm fumonisin solution on Acetonitrile : H_2O at 1:1 (v/v) ratio for 24 hours. Bacterial isolate 329-2 showed the effect on decreasing of fumonisin for 26.48 %. These bacteria was gram negative and the result of 16S ribosomal RNA sequencing was shown similar to *Serratia marcescens*. Bacterial isolate 329-2 was likely to be effective bacteria on fumonisin detoxification.

Keywords: Fumonisin, detoxification, food safety

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในวัตถุดิบในอาหารและอาหารสัตว์ เป็นปัญหาที่สำคัญต่อระบบอุตสาหกรรมอาหารคนและสัตว์ สารพิษฟูโมนิซินจัดเป็นสารพิษที่ผลิตจากเชื้อรา *Fusarium* species ที่พบได้มากที่สุดในผลผลิตข้าวโพดที่พบในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ การได้รับสารพิษฟูโมนิซินจะทำให้เกิดอาการผิดปกติทั้งในมนุษย์และสัตว์หลายชนิด การลดสารพิษฟูโมนิซินในสภาพธรรมชาติ สามารถเกิดขึ้นได้โดยการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เพื่อการสลายสารพิษ งานวิจัยนี้ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ที่นำไปเลี้ยงบนอาหารเหลวที่ผสมสารพิษฟูโมนิซินที่ความเข้มข้น 2 ppm เขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 3 สัปดาห์ ตามวิธีการ acclimatization จากนั้นทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ไปทดสอบความสามารถในการลดปริมาณสารพิษฟูโมนิซินในสารละลาย ACN:H_2O; 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้น 2 ppm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 329-2 มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารพิษฟูโมนิซินที่ 26.48 % จากการย้อมแกรมพบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และเมื่อทำการระบุชนิดด้วยลำดับนิวโคโอไทด์โดยใช้ส่วน 16S ribosomal RNA พบว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* โดยเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารพิษฟูโมนิซิน

คำสำคัญ: ฟูโมนิซิน การลดปริมาณสารพิษ ความปลอดภัยทางด้านอาหาร

คำนำ

การปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในวัตถุดิบ เป็นปัญหาที่สำคัญต่อระบบอุตสาหกรรมการผลิตอาหารคนและสัตว์ จากรายงานของ Biomin (2018) ที่ได้ทำการสำรวจการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในปี 2560 พบว่า 98% ของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์จากทวีปเอเชียพบการปนเปื้อนของสารพิษฟูโมนิซิน และพบว่าอาหารสัตว์จากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีการปนเปื้อนของสารพิษฟูโมนิซินสูงถึง 86% โดยสารพิษฟูโมนิซินเป็นสารทุติยภูมิจากเชื้อรา *Fusarium verticillioides, F. proliferatum* และ *F. subglutinans* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค Fusarium ear rot ของข้าวโพด (Munkvold *et al*., 1997). อย่างไรก็ตามยังคงมีรายงานว่า เชื้อราในสกุล *Fusarium* บางชนิดสามารถสร้างสารพิษฟูโมนิซินได้ (Rheeder *et al*., 2002) สารพิษฟูโมนิซินนั้นได้ถูกจัดให้เป็นสารก่อมะเร็ง group 2B carcinogens (IARC, 2002) หากมนุษย์และสัตว์ได้รับสารพิษฟูโมนิซินจะทำให้เกิด

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10400

[2] Postharvest Technology Innovation Center, Office of the Higher Commission, Bangkok 10400

*corresponding author

อาการผิดปกติ เช่น เป็นสาเหตุของมะเร็งกล่องอาหารในมนุษย์ ในสุกรที่ได้รับสารพิษฟูโมนิซินจะทำให้เกิดกลุ่มอาการ porcine pulmonary edema (PPE) ในสัตว์ปีกทำให้อัตราการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันลดลง (Marasas, 2001). การลดปริมาณสารพิษฟูโมนิซินในวัตถุดิบอาหารสัตว์จึงเป็นสิ่งสำคัญและได้รับความสนใจ การใช้จุลินทรีย์และสารทุติยภูมิจากจุลินทรีย์เป็นหนึ่งในแนวทางที่ใช้ในการจัดการ โดย Heinl *et al*. (2010) ได้รายงานประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Sphingopyxis* sp. MTA144 ในการย่อยสลายสารพิษฟูโมนิซินเช่นเดียวกับ Deepthi *et al*. (2016) ที่ได้รายงานถึงประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* MYS6 ในการลดปริมาณสารพิษฟูโมนิซิน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการแยก และคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดที่มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารพิษฟูโมนิซินในสภาพหลอดทดลอง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การ acclimatize เชื้อแบคทีเรียกับสารพิษฟูโมนิซิน

นำเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่แสดงอาการเมล็ดลายที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Fusarium* sp. น้ำหนัก 1 กรัม เขย่าและบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA (nutrient glucose agar) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ที่ผสมด้วยสารพิษฟูโมนิซิน (FB_1) มาตรฐาน (Romer Lab®) ที่ความเข้มข้น 2 ppm ทำการเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 3 สัปดาห์ ตามวิธีการ acclimatization (Deepthi *et al*., 2016) จากนั้นทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ยังดำรงชีวิตได้ในสภาพที่มีสารพิษฟูโมนิซินบนอาหาร NGA จนกระทั่งได้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการลดสารพิษฟูโมนิซิน

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 1 มาทำการเพิ่มปริมาณในอาหาร NGA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมละลายแบคทีเรียปริมาณ 1,000 ไมโครลิตร ในหลอด 1.5 microtube ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลาย PBS จำนวน 1 มิลลิลิตร นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้เติมด้วย ACN:H_2O; 1:1 (v/v) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และสารพิษฟูโมนิซิน (FB_1) มาตรฐาน จนทำให้มีความเข้มข้น 2 ppm ทำการเขย่าและบ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจความอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียที่ 24 ชั่วโมงหลังการบ่มเชื้อ และตรวจสอบปริมาณสารพิษฟูโมนิซินด้วย AgraQuant® Total Fumonisin Assay, Romer Labs, Singapore ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากบ่มเชื้อ

3. การระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

ทำการระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการลดสารพิษฟูโมนิซิน โดยทำการย้อมแกรม สกัด DNA ด้วยชุด DNA GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific™) และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม บริเวณ 16S ribosomal RNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) จากนั้นตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดย First BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

ผล

1. การคัดเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการกระตุ้น acclimatize ในสภาพที่มีสารพิษฟูโมนิซิน

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญเติบโต และดำรงอยู่ในอาหารที่มีสารพิษฟูโมนิซินเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท (Figure 1) และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทไปทดสอบความสามารถในการดำรงอยู่ และการลดปริมาณสารพิษฟูโมนิซินพบว่า เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญในสภาพที่มีสารพิษ หลังจากบ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยการตรวจผลการ streak plate บนอาหาร NGA และเมื่อนำไปตรวจสอบปริมาณสารพิษที่เปลี่ยนแปลง หลังจากการบ่มกับเชื้อแบคทีเรียที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ด้วย AgraQuant® Total Fumonisin Assay, Romer Labs, Singapore พบว่าเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท S2, 302-2 และ 329-2 มีความสามารถในการลดปริมาณสารฟูโมนิซินจาก 2 ppm เหลือ 1.58, 1.37 และ 1.47 ppm ตามลำดับ และจากการคำนวณร้อยละของการลดลงของสารฟูโมนิซิ พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S2, 302-2 และ 329-2 มีความสามารถในการลดปริมาณสารฟูโมนิซินที่ 21.00, 31.34 และ 26.48 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Table 1)

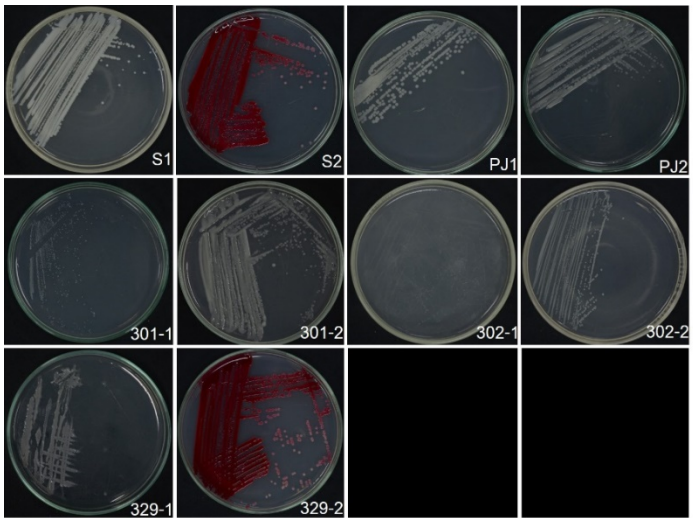

Figure 1 Viability check 10 isolates of bacterial colony after 3 weeks of acclimatization in 2 ppm fumonisin's solution.

Table 1 Fumonisin detoxification by 10 isolates of bacteria after 24 hours of incubation.

Bacterial isolate	Quantity and percentage of fumonisin after incubation for 24 hour	
	Concentration (ppm)	Percentage of decrease
S1	2.00 a[1/]	0.00 f
S2	1.58 d	21.00 c
PJ1	1.88 c	6.00 d
PJ2	2.00 a	0.00 f
301-1	1.94 b	3.00 e
301-2	2.00 a	0.00 f
302-1	2.00 a	0.00 f
302-2	1.37 f	31.34 a
329-1	1.88 c	6.00 d
329-2	1.47 e	26.48 b
F-test	**	**

[1/]Column values followed by the same letter are not significantly different with (P = 0.05) by Duncan's Multiple Range Test

** Significant difference at 1% probability level

2. การระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

จากการย้อมแกรมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S2, 302-2 และ 329-2 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารพิษฟูโมนิซิน พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จากการระบุชนิดโดยส่วนของ 16S ribosomal RNA เมื่อทำการ BLAST เทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S2 มีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* strain GR 005 ที่ระดับ 100% เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 302-2 มีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter aerogenes* strain TIL_WAK_137 ที่ระดับ 99% และเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 302-2 มีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* strain B-DRY12 ที่ระดับ 99% (Table 2)

วิจารณ์ผล

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถลดปริมาณสารพิษฟูโมนิซินในสภาพหลอดทดลอง พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลทที่สามารถคงอยู่ในสภาพที่มีสารพิษฟูโมนิซิน และจากการแยกเชื้อแบคทีเรียในแต่ละไอโซเลทเพื่อทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของสารพิษฟูโมนิซิน 2 ppm พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลตที่มีความสามารถลดปริมาณสารพิษฟูโมนิซินได้มากกว่า 20% สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* นั้น Femi-Ola *et al*. (2014) ได้รายงานว่ามีประสิทธิภาพในการผลิต protease ซึ่งอาจจะมีผลต่อการลดลงของปริมาณสารพิษฟูโมนิซิน อย่างไรก็ตามกลไกในการลด

สารพิษฟูโมนิซินนั้น Heinl *et al*. (2010) ได้รายงานไว้ว่าเกิดได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษฟูโมนิซิน B_1 โดยเอนไซม์ carboxylesterases เป็น hydrolyzed fumonisin B_1 และเอนไซม์ aminotransferase จะทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็น 2-keto- hydrolyzed fumonisin B_1

Table 2 Identification of bacteria 3 isolates using 16S ribosomal RNA.

Isolate	Accession	Description	Identities
S2	MH169193.1	*Serratia marcescens* strain GR 005	100%
302-2	KT998836.1	*Enterobacter aerogenes* strain TIL_WAK_137 16S ribosomal RNA gene	99%
329-2	MH000024.1	*Serratia marcescens* strain B-DRY12 16S ribosomal RNA gene	99%

สรุปผล

เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S2, 302-2 และ 329-2 มีความสามารถในการลดปริมาณสารพิษฟูโมนิซินที่ 21.00, 31.34 และ 26.48 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง จากการย้อมแกรมพบเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และเมื่อทำการระบุชนิดด้วยลำดับนิวโคโอไทด์โดยใช้ส่วน 16S ribosomal RNA พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S2 และ 329-2 มีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* และ ไอโซเลท 302-2 มีความใกล้เคียงเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter aerogenes* โดยเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารพิษฟูโมนิซิน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาด้านโรคพืช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย และการได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กทม.

เอกสารอ้างอิง

Biomin. 2018. World Mycotoxin Survey 2017. Annual Report No. 14. 14 p.

Deepthi, B.V., K. Poornachandra Rao, G. Chennapa, M.K. Naik, K.T. Chandrashekara and M.Y. Sreenivasa. 2016. Antifungal attributes of *Lactobacillus plantarum* MYS6 against fumonisin producing *Fusarium proliferatum* associated with poultry feeds. PLoS One. 11 (6): e0155122

Femi-Ola, T.O., O.P. Akinsanmi and O.S. Bamidele. 2014. Production and characterization of protease from *Serratia marcescens*. AU Journal of Technology 18(1): 1-10.

Heinl, S., D. Hartinger, M. Thamhesl, E. Vekiru, R. Krska, G. Schatzmayr, W.-D. Moll and R. Grabherr. 2010. Degradation of fumonisin B1 by the consecutive action of two bacterial enzymes. Journal of Biotechnology 145 (2): 120-129.

IARC (International Agency for Research on Cancer). 2002. "Fumonisin B1," in IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene Vol. 82 (Lyon: IARC Press): 301-366.

Marasas, W.F.O. 2001. Discovery and occurrence of the Fumonisins: a Historical Perspective. Environmental Health Perspectives. 109: 239-243.

Munkvold, G.P., R.L. Hellmich and W.B. Showers. 1997. Fusarium ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. Phytopathology 87: 1071-1107.

Rheeder, J.P., W.F.O. Marasas and H.F. Vismer. 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. Applied and Environmental Microbiology 68: 2101–2105.