Agricultural Sci. J. 49 : 4 (Suppl.) : 159-162 (2018) ว. วิทย. กษ. 49 : 4 (พิเศษ) : 159-162 (2561)

ศักยภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อราเพื่อตรวจสอบเชื้อราปนเปื้อนในเมล็ดข้าวโพด

Efficacy of Fungal Medium to Detect Fungal Contamination from Maize Grains.

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

Sansern Rangsuwan[1,2], Pisut keawmanee[1,2], Chainarong Rattanakreetakul[1,2*] and Ratiya Pongpisutta[1,2]

Abstract

During maize grains storage, the fungi produce various mycotoxins and caused an effect to raw material on food and feed factory which may affect consumer health. The detection of fungal contamination on maize grains before storage into silo is a basic technique for quality check. The purpose of this study were to compare the media for investigation of fungal contamination grains. Four media as potato dextrose agar (PDA), malachite green agar (MG), malt salt agar (MSA) and Aspergillus flavus and parasiticus agar (AFPA) were compared using agar blotter test for detecting fungal contamination associated with 16 maize grains samples. The filamentous fungi were found on maize grains in checking *Aspergillus flavus, A. tamarii, A. niger*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. and *Rhizopus* sp. The result showed that *Aspergillus* spp. were observed after 5 days of incubation (DAI) on AFPA and PDA while only *Fusarium* spp. growing on MG. However, *Aspergillus* spp. were distinguished on MSA after 8 DAI. Additionally, AFPA represented the great result to differentiate *Aspergillus* spp. compared to other media.

Keywords: Storage fungi, food and feed safety, *Aspergillus*

บทคัดย่อ

ในระหว่างการเก็บรักษาเมล็ดข้าวโพดในโรงเก็บเชื้อราที่ปนเปื้อนสามารถสร้างสารพิษหลายชนิดและมีผลกระทบต่อวัตถุดิบซึ่งอาจมีผลต่อผู้บริโภคได้ การตรวจสอบเชื้อราที่ปนเปื้อนจึงเป็นวิธีการเบื้องต้นในการควบคุมคุณภาพของเมล็ดข้าวโพดการศึกษาครั้งนี้ได้เปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อรา 4 ชนิด ได้แก่ potato dextrose agar (PDA) malachite green agar (MG) malt salt agar (MSA) และ Aspergillus flavus and parasiticus agar (AFPA) ในการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราโดยวิธี agar blotter กับเมล็ดข้าวโพดไร่ จำนวน 16 แหล่ง เชื้อราที่พบประกอบด้วย *Aspergillus flavus*, *A. tamarii*, *A. niger*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. และ *Rhizopus* sp. โดยพบว่า เชื้อรา *Aspergillus* spp. สามารถตรวจพบได้ชัดเจน หลังบ่มนาน 5 วัน บนอาหาร AFPA และ PDA ในขณะที่บนอาหาร MG จะพบเชื้อรา *Fusarium* spp. อย่างไรก็ตาม สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *Aspergillus* spp. หลังการบ่มนาน 8 วัน นอกจากนี้ยังพบว่า อาหาร AFAP มีศักยภาพดีที่สุดในการใช้จำแนกเชื้อรา *Aspergillus* spp. เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น

คำสำคัญ: เชื้อราโรงเก็บ อาหารและอาหารสัตว์ปลอดภัย *Aspergillus*

บทนำ

เชื้อรา *Aspergillus* sp. พบเป็นปัญหาสำคัญในข้าวโพดระยะหลังการเก็บเกี่ยว เชื้อราสามารถพบในกองเก็บวัตถุดิบหรือในโรงเก็บวัตถุดิบอาหารสัตว์ เชื้อรานี้สร้างความเสียหายต่อคุณภาพวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเชื้อราสร้างสารพิษปนเปื้อนภายในวัตถุดิบ (อัจฉราพร และคณะ, 2558) การจัดการเพื่อลดสารพิษค่อนข้างเป็นไปได้ยาก เนื่องจากจะต้องใช้อุณหภูมิสูงมากในการทำลายสารพิษ การสะสมของสารพิษขึ้นกับสภาพแวดล้อมเป็นหลัก อุณหภูมิที่ 24 องศาเซลเซียส และระดับความชื้นของเมล็ดข้าวโพด 17.5% เป็นสภาพที่เหมาะต่อการสร้างสารพิษของเชื้อรา (Trenk and Hartman, 1970) ซึ่งในประเทศไทยมีลักษณะอากาศรูปแบบชื้นหลายพื้นที่ การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราตั้งแต่ในระยะเริ่มต้นเป็นวิธีการที่สำคัญ และสามารถใช้เป็นแนวทางป้องกันก่อนเคลื่อนย้ายวัตถุดิบเข้าสู่กระบวนการผลิตอาหารหรืออาหารสัตว์เลี้ยง การตรวจ

[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

การสอบคุณภาพการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษในเบื้องต้น มีการตรวจสอบได้หลายวิธี ได้แก่ การตรวจความสะอาด การตรวจเชื้อราที่พบปนเปื้อน รวมไปถึงการตรวจสารพิษด้วยเทคนิค thin layer, high performance liquid chromatography หรือวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Rahmani *et al*., 2009) การตรวจสอบชนิดของเชื้อราปนเปื้อนโดยการเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการจำแนก เป็นแนวทางหนึ่งทำให้สามารถตรวจสอบเชื้อราที่ปนเปื้อนได้ (Zulkifli and Zakaria, 2017) ดังนั้นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เกิดความมั่นใจในการตรวจสอบเชื้อราอย่างมีประสิทธิภาพและสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

รวบรวมเมล็ดข้าวโพดไร่ จำนวน 16 ตัวอย่าง จากแหล่งผลิตในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี และ จังหวัดนครปฐม นำมาตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดข้าวโพดด้วย agar blotting plate โดยทำการฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวโพดบริเวณพื้นผิว ด้วย 2.5% โซเดียมไฮโปคลอไรด์ นาน 2 นาที ซับให้แห้งบนกระดาษฆ่าเชื้อ ก่อนย้ายเมล็ดข้าวโพดจำนวน 10 เมล็ดต่อจานเลี้ยงเชื้อไปวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ potato dextrose agar (PDA; มันฝรั่ง 200 กรัม กลูโคส 20 กรัม ผงวุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มล.), malachite green agar (MG; เปปโตน 15 กรัม โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม malachite green oxalate salt 0.5 กรัม ampicillin 0.5 กรัม rifampicin 2 มล. และน้ำกลั่น 1,000 มล.), malt salt agar (MSA; malt extract 20 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 75 กรัม น้ำมันมะพร้าว 10 มล. ผงวุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มล.) และ Aspergillus flavus and parasiticus agar (AFPA; เปปโตน 10 กรัม yeast extract 20 กรัม แอมโมเนียม ไอออนซิเตรท 0.5 กรัม dichloran 0.004 กรัม และผงวุ้น 15 กรัม) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 5 วัน ทำการจำแนกลักษณะทางสัณฐานโคโลนีของเชื้อราแต่ละชนิดที่ปรากฏบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope บันทึกข้อมูลชนิดของเชื้อราและลักษณะโคโลนีเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่าง

ผล

ผลการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด เพื่อการแยกเชื้อราที่ปนเปื้อนบนเมล็ดข้าวโพดไร่ ลักษณะเชื้อราที่ตรวจพบมีลักษณะใกล้เคียงกัน โดยพบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *A. tamarii*, *Fusarium* sp. และ *Penicillium* sp. ปริมาณการปนเปื้อนบนอาหาร PDA พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus* sp. ได้มากที่สุด รองลงมาได้แก่ MSA และ AFPA เมื่อพิจารณาการตรวจสอบเชื้อ *Fusarium* sp. พบปริมาณเชื้อราปนเปื้อนได้มาก บนอาหาร PDA และ MG ในขณะที่ AFPA และ MSA มีปริมาณน้อย (Figure 1 และ Table 1)

โคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่เจริญบนอาหาร PDA พบมี conidial head หนาแน่นในส่วนกลางโคโลนี พร้อมขอบโคโลนีที่มีเส้นใยขาว ลักษณะคล้ายกับรูปโคโลนีบนอาหาร MG แต่บริเวณส่วนกลางที่ผลิต conidial head เจริญได้น้อยกว่า พร้อมกับขอบโคโลนีมีสีขาวที่กว้าง ลักษณะของ *Aspergillus* spp. บนอาหาร MSA ที่พบเป็นเส้นใยแผ่ออกไป conidial head ขึ้นกระจาย ลักษณะโคโลนีเชื้อมีการเปลี่ยนไปเมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร AFPA โดยโคโลนีเชื้อเจริญเป็นแผ่น พบ conidial head ขึ้นส่วนกลาง พร้อมกับรอยย่น และขอบโคโลนีสีขาว ด้านล่างโคโลนีเป็นสีเหลืองส้ม สำหรับเชื้อรา *Fusarium* spp. พบเป็นกลุ่มเส้นใยเจริญออกมาจากเมล็ด โดยพบว่า บนอาหาร PDA เส้นใยกลุ่มสีขาว ฟูปานกลาง แผ่ออก เมื่อเจริญบนอาหาร MG พบเป็นกลุ่มเส้นใยอัดแน่นสีขาวฟู บนอาหาร MSA เส้นใยแผ่บางสีขาวราบบนผิวหน้าอาหาร และบนอาหาร AFPA พบเส้นใยแน่นสีขาว แผ่ราบ (Figure 2)

Figure 1 Morphological of contaminated fungi growth on maize grains in 4 different media at 5 days a) PDA b) MSA c) MG and d) AFPA

Table 1 Percentage of contaminated storage fungi as *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. on maize grains from 16 samples in 4 different media

Sample sources	Percent contaminated fungi on maize grain after 5 days							
	PDA		MSA		MG		AFPA	
	Asper	Fu	Asper	Fu	Asper	Fu	Asper	Fu
KPS1	90	50	60	25	70	25	40	50
KPS2	30	45	20	35	10	40	10	10
KPS3	30	70	20	25	20	50	20	50
KPS4	20	45	20	15	15	15	20	40
KPS5	25	50	15	85	40	55	5	60
KPS6	0	55	10	30	5	60	10	50
KPS7	35	5	15	40	25	15	15	30
KPS8	50	50	10	60	50	45	25	50
KPS9	100	20	95	75	95	30	85	10
KPS10	90	15	55	55	100	5	65	40
KPS11	30	80	10	85	25	75	35	50
KPS12	25	5	0	80	40	25	25	40
KPS13	45	25	20	50	40	25	35	40
KPS14	45	70	5	75	45	55	10	60
KPS15	5	45	0	5	10	25	15	30
KPS16	50	40	25	70	25	100	40	60

Asper: *Aspergillus* spp. and Fu: *Fusarium* spp.

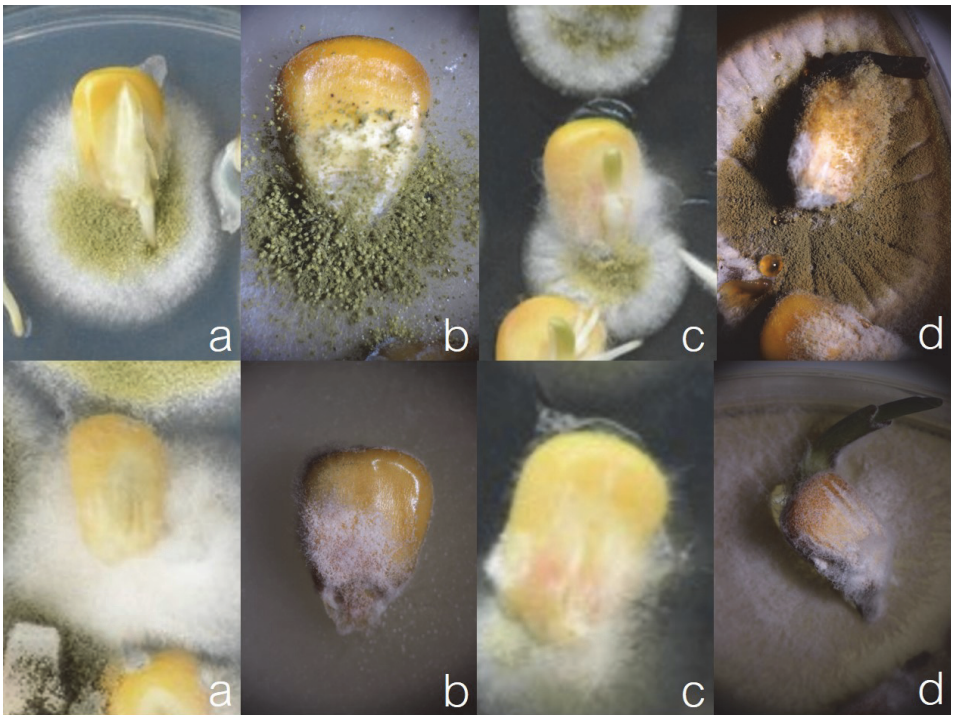

Figure 2 Morphological of contaminated fungi on maize grains in different media at 4 days a) PDA b) MSA c) MG and d) AFPA; upper picture as *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. bottom picture as *Fusarium* spp.

วิจารณ์ผล

อาหาร PDA สามารถใช้ในการตรวจสอบเชื้อรา *Aspergillus* spp. บนเมล็ดข้าวโพดได้ดี แต่จะพบการเจริญของเชื้อราชนิดอื่นได้ดีเช่นกัน ลักษณะนี้ทำให้รบกวนการจำแนกหรือการตรวจสอบชนิดและปริมาณของเชื้อรา *Aspergillus* spp. โดยที่อาหาร PDA มีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต 4-6% และโปรตีน 0.2-0.4% (FAO, 2007) สัดส่วนของธาตุอาหารดังกล่าวจึงเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อราทุกชนิด นอกจากนี้การใช้อาหาร PDA สามารถพบเชื้อรากลุ่ม Zygomycetes เช่น เชื้อรา *Mucor* sp. และ *Rhizopus* sp. ที่สามารถรบกวนการตรวจสอบได้ ในขณะที่อาหาร AFPA มีส่วนประกอบของสาร dichloran ซึ่งสามารถควบคุมเชื้อราในกลุ่ม Zygomycetes ได้ (Henson, 1981) ส่วน MSA มีการผสมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูง ทำให้สามารถควบคุมเชื้อราอื่นๆได้ ทั้งนี้เชื้อรา *Aspergillus* sp. เป็นเชื้อราในกลุ่ม xerophilic fungi ทำให้อาหาร MSA สามารถควบคุมเชื้อราอื่นได้ดี นอกจากนี้ในอาหาร MSA ได้มีการผสมน้ำมันมะพร้าวที่ทำให้เกิดการเรืองแสงของสารอะฟลาทอกซินได้

มีการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium* sp. (พิสุทธิ์ และคณะ, 2558) โดยการใช้อาหาร MG โดยในกลุ่มเชื้อรา *Fusarium* การใช้ malachite green ที่ความเข้มข้นสูง 15-50 ppm ช่วยยับยั้งเชื้อราชนิดอื่น แต่เชื้อ *Fusarium* sp. เจริญได้ (Singh and Nene, 1965) คุณสมบัติดังกล่าง จึงนำไปใช้ในการผสมอาหาร ดังในรายงานของ Castella *et al*., 1997 มีการพัฒนาสูตรอาหาร malachite green เพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อ *Fusarium* sp.

สรุป

การจำแนกชนิดของเชื้อ *Aspergillus* spp. บนเมล็ดข้าวโพด สามารถใช้อาหาร MSA และ AFPA ซึ่งจะพบลักษณะเฉพาะที่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ได้ในด้านการสร้างสารพิษและการกำหนดชนิด *A. flavus* และ *A. parasiticus* เมื่อต้องการตรวจสอบเชื้อ *Fusarium* sp. จากเมล็ดข้าวโพดสามารถใช้อาหาร PDA หรือ MG ได้ ทั้งนี้การคัดเลือกสูตรอาหารเพื่อใช้ตรวจสอบชนิดเชื้อราปนเปื้อน จำเป็นที่ผู้ตรวจจะต้องทราบวัตถุประสงค์ของการเลือกสูตรอาหาร

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาด้านโรคพืช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่อำนวยความสะดวกในด้านการปฏิบัติงานวิจัย และสถานที่ที่ใช้ในการปฏิบัติงาน และศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ได้สนับสนุนทุนในการวิจัยจนสำเร็จลุล่วง

เอกสารอ้างอิง

พิสุทธิ์ เขียวมณี, ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล และรณภพ บรรเจิดเชิดชู. 2558. ประสิทธิภาพของอาหารสูตรดัดแปลงเพื่อตรวจสอบเชื้อราที่สร้างสารพิษปนเปื้อนบนเมล็ดข้าว. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 46 (3/1 พิเศษ): 105-108.

อัจฉราพร ศรีจุดานุ, สุพี วนศิรากูล และ มัทนา วานิชย์. 2558. เชื้อรา *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ใหม่ที่ไม่สร้างสารพิษและศักยภาพการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราที่สร้างสารพิษและยับยั้งสารแอฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวโพด. วารสารวิชาการเกษตร 33(2): 118-131.

Castella, G., R.M. Bragulat, V.M. Rubiales and F.J. Cabanes. 1997. Malachite green agar, a new selective medium for *Fusarium* spp.. Mycopathologia 137: 173-178.

FAO. 2004. Potatoes, nutrition and diet. [Online]. Available Source: http://www.fao.org/potato-2008/en/potato/factsheets.html (28 June 2018)

Henson, E.O. 1981. Dichloran as an inhibitor of mold spreading in fungal plating media: Effects on colony diameter and enumeration. Applied and environmental microbiology 42(4): 656-660.

Rahmani, A., S. Jinap and F. Soleimany. 2009. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 8: 202-251.

Singh R.S. and Y.L. Nene. 1965. Malachite green in synthetic medium for the isolation of *Fusarium* spp. from plant tissues. Naturwissenschaften 52(2): 94.

Trenk, L.H. and P.A. Hartman. 1970. Effects of moisture content and temperature on Aflatoxin production in corn. Applied and Environmental Microbiology 19(5): 781-784.

Zulkifli, A.N. and L. Zakaria. 2017. Morphological and molecular diversity of Aspergillus from corn grain used as livestock feed. Hayati Journal of Biosciences 24: 26-34.