Agricultural Sci. J. 50 : 3 (Suppl.) : 183-183 (2019) ว. วิทย. กษ. 50 : 3 (พิเศษ) : 183-186 (2562)

ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการลดสารพิษซีราลีโนนในสภาพหลอดทดลอง

Efficacy of Zearalenone Detoxification Bacteria *in vitro*

พิสุทธิ์ เขียวมณี[1,2] สรรเสริญ รังสุวรรณ[1,2] ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1,2] และ รัติยา พงศ์พิสุทธา[1,2]

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

Abstract

Maize and cereal products are contaminated more than 70% with zearalenone in the world. Zearalenone is the major mycotoxin produced by *Fusarium graminearum*. Zearalenone affects to human and animal health. Diminishment of zearalenone contamination by microbial enzymes is concerned. In this study, the microorganism isolated from 21 natural resources were used to test their efficiency to detoxify 25 ppm zearalenone using acclimatization method. Four sources of natural microorganism could decrease of zearalenone after 30 days of incubation. Seven bacteria were isolated and purified from 4 sources. Each single bacteria was incubated again in 25 ppm zearalenone solution. Bacteria isolate Z1, Z3 and Z4 showed the effect on decreasing of zearalenone for 100 % within 30 days after incubation. Gram staining showed that bacteria were a gram-positive. Bacteria isolate Z1 and Z3 were shown the result of 16S ribosomal RNA sequencing similar to *Bacillus amyloliquefaciens* and bacteria isolate Z4 was similar to *B. velezensis*. Therefore, bacteria isolate Z1, Z3 and Z4 is likely to be effective bacteria on zearalenone detoxification.

Keywords: Zearalenone, detoxification, food safety

บทคัดย่อ

ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และธัญพืช พบการปนเปื้อนของสารพิษซีราลีโนนมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ทั่วโลก โดยสารพิษซีราลีโนนสร้างจากเชื้อรา *Fusarium graminearum* เป็นหลัก เมื่อเกิดการปนเปื้อนในระบบการผลิตจะส่งผลต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์เป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถลดการปนเปื้อนของสารพิษซีราลีโนนในระบบการผลิตได้ จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติ จำนวน 21 แหล่ง และนำมาทดลองด้วยวิธีการ acclimatization ในสารละลายสารพิษซีราลิโนนความเข้มข้น 25 ppm หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 30 วัน พบเชื้อจุลินทรีย์จาก 4 แหล่งที่สามารถลดปริมาณสารพิษซีราลีโนนได้ และแยกเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 7 ชนิด จากนั้นทดสอบความสามารถในการลดสารพิษซีราลีโนนในสภาพสารละลาย ที่ความเข้มข้น 25 ppm พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Z1, Z3 และ Z4 มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารพิษซีราลีโนนได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 30 วัน การย้อมแกรมพบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และเมื่อทำการระบุชนิดด้วยลำดับนิวโคโอไทด์โดยใช้ส่วน 16S ribosomal RNA พบว่าไอโซเลท Z1 และ Z3 มีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* และ ไอโซเลท Z4 มีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* โดยเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารพิษซีราลิโนน

คำสำคัญ: ซีราลีโนน การลดสารพิษ อาหารปลอดภัย

คำนำ

ในระหว่างกระบวนการเพาะปลูก เก็บเกี่ยว การขนส่ง และการเก็บรักษา วัตถุดิบทางการเกษตรมีโอกาสที่จะปนเปื้อนเชื้อรา และเกิดสารทุติยภูมิที่สร้างจากเชื้อราที่เรียกว่า สารพิษจากเชื้อรา เมื่อมีการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อรานั้นเป็นสาเหตุที่จะก่อโรคแก่มนุษย์ และสัตว์ ส่งผลต่อความเสียหายทางเศรษฐกิจ จากรายงานของ Biomin (2019) ได้รายงานว่าในปี 2561 พบการปนเปื้อนของสารพิษซีราลีโนนมากกว่า 70% ในข้าวโพด และธัญพืชสำหรับอุตสาหกรรมปศุสัตว์ทั่วโลก โดยสารพิษซีราลีโนนสร้างได้จากเชื้อรา *Fusarium graminearum* และ *F. culmorum* (Desjardins and Proctor, 2007) สารพิษซี

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัด นครปฐม 73140

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

[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10400

[2] Postharvest Technology Innovation Center, Commission on Higher Education Commission, Bangkok 10400

ราลีโนนสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมการผลิตสุกร ส่งผลทำให้ระบบสืบพันธุ์ของแม่พันธุ์สุกรมีปัญหาอันเนื่องมาจากระดับฮอร์โมนเอสโทรเจนที่ผิดปกติ (Hussein and Brasel, 2001). การลดการปนเปื้อนของสารพิษซีราลีโนนจึงได้รับความสนใจ มีการใช้วิธีการลดทางกายภาพ เช่น การจัดการแปลง การจัดฤดูผลิต และการใช้วิธีทางเคมี เช่น การผสม clays, activated carbon, bentonite, cholestyramine และ 1,3-beta-d glucan ลงในผลิตภัณฑ์เพื่อดูดซับสารพิษจากเชื้อรา การใช้จุลินทรีย์และสารทุติยภูมิจากจุลินทรีย์เป็นอีกแนวทางที่ได้ทำการศึกษาดังรายงานของ Xu *et al*. (2016) ที่ได้ทำการศึกษาการลดปริมาณสารพิษซีราลีโนนด้วย *B. amyloliquefaciens* ZDS - 1 สำหรับงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากธรรมชาติที่ มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารพิษซีราลีโนนในสภาพหลอดทดลอง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถดำรงชีวิตกับสารพิษซีราลีโนน

นำเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์, ดิน และน้ำหมักจากแหล่งธรรมชาติ ปริมาณ 1 กรัม เขย่าและบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ NGB (nutrient glucose agar) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ที่ผสมด้วยสารพิษซีราลีโนน ที่ความเข้มข้น 25 ppm ทำการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน ย้ายเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ NGB ที่ผสมด้วยสารพิษซีราลีโนน ที่ความเข้มข้น 25 ppm ใหม่ ตามวิธีการ acclimatization (Deepthi *et al*., 2016) จากนั้นบ่มต่ออีก 15 วัน แยกเชื้อแบคทีเรียที่ยังดำรงชีวิตได้ในสภาพที่มีสารพิษซีราลีโนนด้วยอาหาร NGB จนกระทั่งได้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการลดสารพิษซีราลีโนน

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 1 มาทำการเพิ่มปริมาณในอาหาร NGB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียจำนวน 500 ไมโครลิตร ผสมในสารพิษซีราลีโนนความเข้มข้น 50 ppm ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ทำให้มีความเข้มข้น 25 ppm ทำการเขย่าและบ่มที่อุณหภูมิห้อง และตรวจสอบปริมาณสารพิษซีราลีโนนด้วย TLC (thin layer chromatography) หลังจากบ่มเชื้อ 30 วัน โดยใช้ stationary phase TLC Silica gel 60 F_{254} (Merck) และ mobile phase คือ diethyl ether : cyclohexane อัตราส่วน 3:1 ตรวจสอบด้วยแสงที่ความยาวคลื่น 312 nm

3. การระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

ทำการระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการลดสารพิษซีราลีโนน โดยทำการย้อมแกรม สกัด DNA ด้วยชุด DNA GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific™) และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม บริเวณ 16S ribosomal RNA ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้ไพร์เมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT3') (Weisburg *et al*., 1990) จากนั้นตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดย First BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ด้วยการจัดเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบกัน (multiple alignment) และจัดกลุ่มแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA X (Kumar *et al*., 2018).

ผล

1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการลดสารพิษซีราลีโนน

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถดำรงชีวิตอยู่กับสารพิษซีราลีโนน พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียจาก 4 แหล่งที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้กับสารพิษซีราลีโนน หลังจากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร NGB สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลท เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NGB ที่มีสารพิษซีราลีโนนความเข้มข้น 25 ppm เป็นระยะเวลา 30 วัน เมื่อตรวจสอบการลดลงของสารพิษซีราลีโนนด้วยเทคนิค TLC พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Z1, Z3 และ Z4 สามารถลดปริมาณสารพิษซีราลีโนนได้ 100%

2. การระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

จากการย้อมแกรมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Z1, Z3 และ Z4 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารพิษซีราลีโนน พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนยาวตรง (Figure 1) และการระบุชนิดโดยส่วนของ 16S ribosomal RNA เมื่อทำการ BLAST เทียบกับฐานข้อมูล NCBI และจัดกลุ่มแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยวิธีการ Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987) ที่ค่า bootstrap 1,000 โดยมี out group เป็น *Pseudomonas*

aeruginosa พบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Z1 และ Z3 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* และเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Z4 จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (Figure 2)

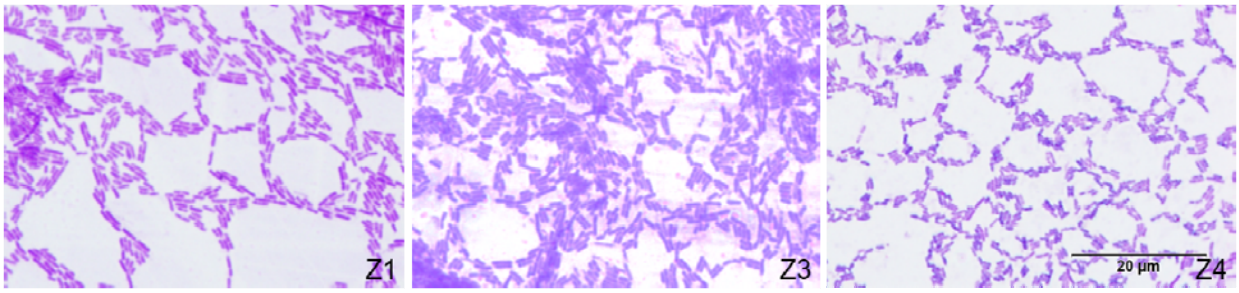

Figure 1 Gram staining of the bacterial isolate Z1, Z3 and Z4 under compound microscope

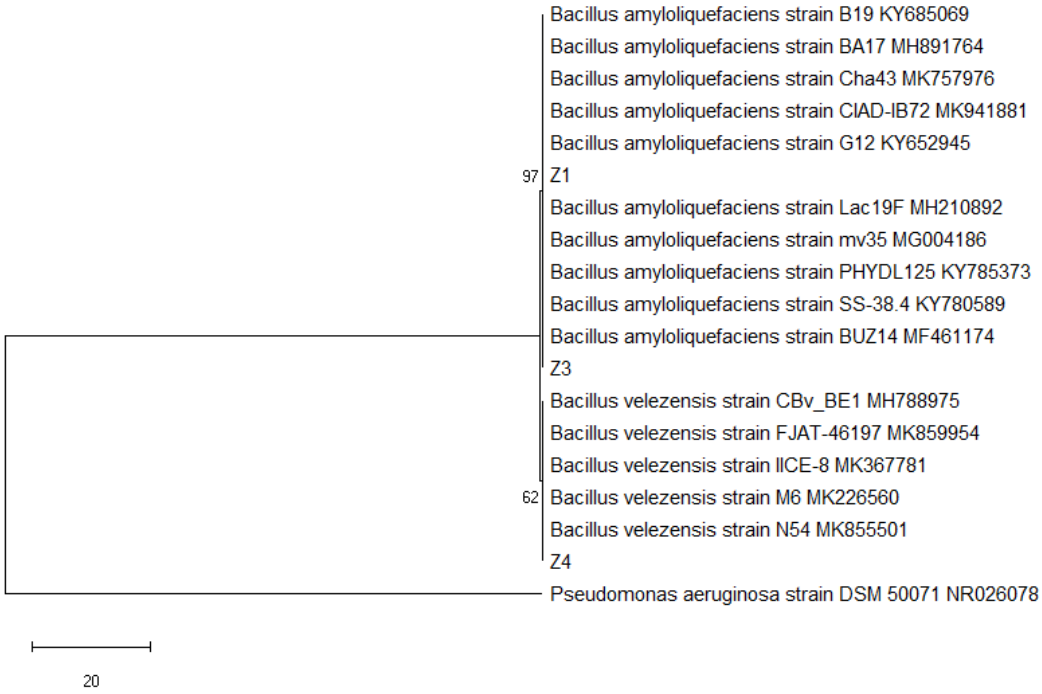

Figure 2 Neighbor-joining phylogenetic tree-based study of the 16S rRNA gene of Z1, Z2 and Z3 . At major nodes, bootstrap percentages for 1,000 re-samplings are shown. *Pseudomonas aeruginosa* was used as an outgroup to root the tree.

วิจารณ์ผล

เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Z1, Z3 และ Z4 เป็นเชื้อแบคมีเรียที่มีประสิทธิภาพในการลดสารพิษซีราลีโนน จากการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR ด้วยบริเวณ 16S rRNA gene พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Z1 และ Z3 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สอดคล้องกับ Lee *et al*. (2017) ที่รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* LN ที่แยกได้จากตัวอย่างข้าวโพดในประเทศไต้หวันสามารถลดปริมาณสารพิษซีราลีโนนได้ สำหรับกลไกในการลดของสารพิษซีราลีโนนนั้น Chen *et al*. (2019) กล่าวว่า ประกอบด้วย 2 กลไก ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษ และการดูดซับสารพิษ สำหรับกลไกในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างยังไม่มีรายงานของกลไกที่แน่นอน (Vanhoutte *et al*., 2016) แต่อาจมีความสัมพันธ์กันกับ esterase activity สำหรับกลไกในการดูดซับสารพิษนั้น เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. นั้นเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเช่นเดียวกับ *Lactobacillus* sp. ที่มีความสามารถในการดูดซับสารพิษซีราลีโนนโดยส่วนของ

ผนังเซลล์ (Tinyiro *et al*., 2011) นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานแรกที่พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* มีความสามารถในการลดสารพิษซีราลีโนน

สรุป

เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Z1, Z3 และ Z4 มีความสามารถในการลดปริมาณสารพิษซีราลีโนนได้ 100% ที่ความเข้มข้น 25 ppm เมื่อระยะเวลาผ่านไป 30 วัน จากการย้อมแกรมพบเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และจากการระบุชนิดด้วยลำดับนิวโคโอไทด์โดยใช้ส่วน 16S ribosomal RNA พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Z1 และ Z3 จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* และ ไอโซเลท Z4 กลุ่มเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารพิษซีราลีโนน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาด้านโรคพืช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย และการได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กทม.

เอกสารอ้างอิง

Biomin. 2019. World Mycotoxin Survey 2018: Annual Report No. 15. [Online]. Available Source: https://www.biomin.net/en/articles/biomin-world-mycotoxin-survey-report-2018/. (10 January 2019).

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.

Chen, S.W., H.T. Wang, W.Y. Shih, Y.A. Ciou, Y.Y. Chang, L. Ananda, S.Y. Wang and J.T. Hsu. 2019. Application of zearalenone (ZEN)-detoxifying *Bacillus* in animal feed decontamination through fermentation. Toxins (Basel) 11(6): 330.

Desjardins, A.E. and R.H. Proctor. 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. International Journal of Food Microbiology 119: 47-50.

Hussein, H.S. and J.M. Brasel. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology 167: 101-134.

Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549.

Lee, A., K.C. Cheng and J.R. Liu. 2017. Isolation and characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain with zearalenone removal ability and its probiotic potential. PLos ONE 12(8): e0182220.

Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406-425.

Tinyiro, S.E., C. Wokadala, D. Xu and W. Yao. 2011. Adsorption and degradation of zearalenone by bacillus strains. Folia Microbiol (Praha) 56(4): 321-327.

Vanhoutte, I., K. Audenaert and L. De Gelder. 2016. Biodegradation of mycotoxins: tales from known and unexplored worlds. Frontiers in Microbiology 7: 561.

Weisburg W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier and D.J. Lane. 1990. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology 173: 697–703.

Xu, J., H. Wang, Z. Zhu, F. Ji, X. Yin, Q. Hong and J. Shi. 2016. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* ZDS-1: exploring the degradation of zearalenone by *Bacillus* spp. Food Control 68: 244-250.