Agricultural Sci. J. 50 : 3 (Suppl.) : 191-194 (2019) ว. วิทย. กษ. 50 : 3 (พิเศษ) : 191-194 (2562)

การประมวลวิธีการตรวจสอบ *Aspergillus flavus* ที่สร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน

Assessment on Detection Methods of the Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* Strains

สรรเสริญ รังสุวรรณ[1,2] **ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล**[1,2] **และ รัติยา พงศ์พิสุทธา**[1,2]
Sansern Rangsuwan[1,2], Chainarong Rattanakreetakul[1,2] and Ratiya Pongpisutta[1,2]

Abstract

Aspergillus spp. are harmful mold which was found in the storage grain process during the postharvest period. The fungi take the optimized environment for growth, such as moisture content and water activity from grains. It can produce aflatoxin during the storage of grain. Some Aspergillus group can produce aflatoxin, and they still have a non-aflatoxin isolate. To distinguish of both strains, the determination technics are focus. The *A. flavus* of the toxin-producing produce more sclerotium and less conidial head on agar media in compare with the non-aflatoxin producing *A. flavus*. The observation of the *A. flavus* by the different color reaction is used. By using the Aspergillus flavus and parasiticus agar (AFPA), they can indicate for the *A. flavus* with orange color in the media. This technic cannot confirm the strain for the toxin-producing. But the use of ammonium hydroxide as vapor can differentiate the mold which produce aflatoxin with the pink color below the colony. The use of PCR for detect to the aflatoxin producing strain with multiplex primers of *afl*, *ver* and *omt* cannot use to differentiate the *Aspergillus* spp. with the character of three DNA bands.

Keywords: Aflatoxin, Storage grain, Food safety

บทคัดย่อ

Aspergillus spp. เป็นเชื้อราที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวของผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งช่วงเวลาที่สำคัญคือในระยะโรงเก็บ ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา เช่น ความชื้น และความชื้นจากผลผลิตที่เก็บเกี่ยว อันจะส่งผลต่อคุณภาพของการเก็บรักษาผลผลิต เมื่อเชื้อราเจริญเติบโตส่งผลต่อการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซินบนผลผลิตที่เก็บรักษา แต่ *A. flavus* ที่พบบนเมล็ดอาจเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษ และไม่สร้างสารพิษได้ ดังนั้นการตรวจสอบเชื้อราที่สร้างสารพิษจึงจำเป็นต่อการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราในการจำแนกเชื้อรา *A. flavus* โดยพบว่า ส่วนใหญ่เชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษ จะมีการสร้างเม็ด sclerotium จำนวนมาก และการสร้าง conidial head ค่อนข้างน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *A. flavus* ที่ไม่มีความสามารถในการสร้างสารพิษ สำหรับการตรวจสอบโดยการใช้ลักษณะสีบนโคโลนี ซึ่งให้ความสะดวกในการติดตาม พบว่าการใช้อาหาร Aspergillus flavus and parasiticus agar (AFPA) สามารถตรวจสอบเชื้อราในกลุ่ม *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยพบการเปลี่ยนเป็นสีส้มแกมเหลือง แต่ไม่สามารถบ่งบอกถึงการสร้างสารพิษ และการตรวจสอบสารพิษอะฟลาท็อกซินโดยการรมด้วย ammonium hydroxide พบว่า เชื้อมีการเปลี่ยนสีชมพูภายใต้โคโลนี ซึ่งบ่งบอกถึงลักษณะการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน แต่อย่างไรก็ตาม การยืนยันด้วย *afl, ver, omt* primers ไม่สามารถใช้เพื่อยืนยันลักษณะเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาท็อกซินได้

คำสำคัญ: อะฟลาท็อกซิน เมล็ดธัญพืช ความปลอดภัยอาหาร

คำนำ

วัตถุดิบสำหรับกระบวนการเลี้ยงสัตว์ ถือเป็นปัจจัยสำคัญต่อกระบวนการผลิตปศุสัตว์ เมื่อสัตว์เลี้ยงได้รับวัตถุดิบที่มีการปนเปื้อนสารพิษปริมาณมาก จะมีปัญหาทางด้านสุขภาพสัตว์ จะส่งผลให้ บริเวณตับเกิดความเสียหาย มีอาการโต ท่อน้ำดีบวม แต่ในกรณีที่สัตว์ได้รับสารพิษในปริมาณต่ำ ทำให้การเจริญเติบโตลดลง ระบบสืบพันธุ์บกพร่อง เป็นต้น (Wogan, 1966) สาเหตุหลักของคุณภาพวัตถุดิบมาจากการปนเปื้อนเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ในช่วงปี 2538 ถึง 2554 มีการสำรวจพบถั่วลิสง มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของปริมาณสารพิษอะฟลาท็อกซินมากเกินกว่า 20 ppb (สนั่น และคณะ, 2554) แม้ว่าเชื้อ

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. 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

รา *Aspergillus* spp. มีความสามารถในการสร้างสารพิษอะฟลาท๊อกซินบนผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว แต่อย่างไรก็ตามยังพบเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่ไม่มีความสามารถในการสร้างสารพิษอะฟลาท๊อกซิน (Ehrlich, 2014) ปัจจุบันการตรวจสอบจึงเป็นสำคัญ ทำให้ทราบถึงโอกาสปนเปื้อนของสารพิษ โดยการตรวจสอบมีหลากหลายกรรมวิธี เช่น การรมสารเคมีเพื่อการเปลี่ยนสีของเชื้อรา การตรวจสอบด้วยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยา และเทคนิคทางชีวโมเลกุล (Saito and Machida, 1999; Bintvihok *et al*., 2016; Kim *et al*., 2011) รวมไปถึงการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Aspergillus* spp. เพื่อการจำแนก การตรวจสอบเชื้อด้วยอาหารจำเฉพาะ และการติดตามการสร้างสารพิษอะฟลาท๊อกซิน งานวิจัยนี้จึงได้ทำการประมวลวิธีการตรวจสอบเชื้อรา *A. flavus* เพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการทราบเทคนิคเบื้องต้นของการจำแนกเชื้อรา อันจะมีผลต่อการประเมินของคุณภาพผลผลิตได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อรา *Aspergillus* spp. จากเมล็ดข้าวโพด และการตรวจสอบเชื้อรา *Aspergillus* spp. ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Aspergillus flavus and parasiticus agar (AFPA)

รวบรวมตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ จำนวน 25 ตัวอย่าง จากพื้นที่ผลิตจากจังหวัดนครปฐม กาญจนบุรี และพิษณุโลก ทำการแยกเชื้อราจากเมล็ดบนอาหาร 5% malt salt agar (5% MSA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 5 วัน ทำ single spore และตัดปลายเส้นใยของเชื้อราแต่ละไอโซเลทย้ายไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox เพื่อจำแนกชนิดเชื้อรา ก่อนนำไปยืนยันบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ AFPA สังเกตการเปลี่ยนสีภายใต้โคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่ระยะเวลา 5 วัน

2. การตรวจสารพิษอะฟลาท๊อกซินจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* ด้วย ammonium hydroxide และเทคนิค ELISA

นำเชื้อรา *A. flavus* ที่คัดเลือก มาเลี้ยงบนอาหาร yeast extract sucrose (YES) บ่มในสภาพอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ทำการหยดสารละลาย ammonium hydroxide ลงบนฝาจานเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ 1 หยด ระยะเวลา 15 นาที ตรวจสอบใต้โคโลนีเชื้อรา ยืนยันลักษณะสีของเชื้อราที่พบการเปลี่ยนเป็นสีชมพู

ใช้ชุดตรวจสอบ ScreenEZ® Aflatoxin ELISA Test Kit (Siaminter quality, Thailand) เพื่อตรวจปริมาณสารพิษอะฟลาท๊อกซิน ใช้ชิ้นวุ้นของเชื้อรา *A. flavus* เลี้ยงในอาหาร yeast extract sucrose agar (YES) นาน 7 วัน จำนวน 4 ชิ้น สกัดด้วยสารละลาย 70% เมทานอล ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เขย่านาน 30 นาที นำสารที่สกัดได้ไปตรวจสอบการทำปฏิกิริยาและอ่านค่าด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3 การตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลของส่วนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษอะฟลาท๊อกซิน

คัดเลือกเชื้อรา *A. flavus* นำไปเลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อนำไปสกัดสารพันธุกรรมโดยชุดสกัด DNAsecure Plant Kit (Tiangen, China) ตรวจสอบตำแหน่งที่มีความสามารถในสร้างสารพิษอะฟลาท๊อกซิน โดยใช้ multiplex PCR ประกอบด้วย primer afl (TATCTCCCCCCGGGCATCTCCCGG// CCGTCAGACAGCCACTGGACACGG); primer ver (ATGTCGGATAATCACCGTTTAGATGGC// CGAAAAGCGCCACCATCCACCCCAATG) และ primer omt (GTGGACGGACCTAGTCCGACATCAC// GTCGGCGCCACGCACTGGGTTGGGG) (Kim et al, 2011) เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้สภาพอุณหภูมิ 94 °C นาน 4 นาที และ 94 °C นาน 1 นาที, 68 °C นาน 1 นาที, 72 °C นาน 1 นาที จำนวนรอบ 30 รอบ และ 72 °C นาน 10 นาที จากนั้นตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis

ผล

1. การแยกเชื้อรา *Aspergillus* spp. จากเมล็ดข้าวโพด และการตรวจสอบเชื้อรา *Aspergillus* spp. ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Aspergillus flavus and parasiticus agar

เชื้อราที่พบบนเมล็ดข้าวโพดเป็นเชื้อรา *A. flavus* โดยเชื้อราดังกล่าวมีการนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox เพื่อจำแนกชนิดเชื้อรา ที่มีลักษณะเป็นสีเขียวแกมเหลืองหรือจะพบในบางกลุ่มมีการสร้างเม็ด sclerotium จำนวนมาก และเมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ AFPA มีลักษณะใต้โคโลนีของเชื้อราเป็นสีส้มแกมเหลืองดังใน Figure 1

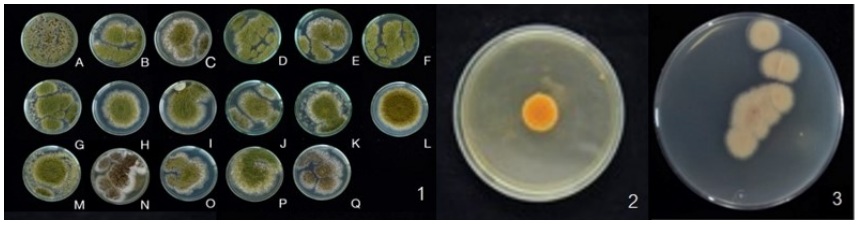

Figure 1 1) The Morphological character of the seventeen isolates of *A. flavus* on Czapek's (A to Q are isolated 1-17); 2) Typically yellow-orange colony color of *A. flavus* on AFPA and 3) The aflatoxin produce *A. flavus* have shown the pink colony after apply the ammonium hydroxide as vapor technic.

2. การตรวจสารพิษอะฟลาท๊อกซินจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* ด้วย ammonium hydroxide และเทคนิค ELISA

เชื้อรา *A. flavus* ที่มีการสร้างเม็ด sclerotium จะพบการเปลี่ยนเป็นสีชมพูบริเวณใต้โคโลนีเชื้อรา เมื่อได้รับการรมสาร ammonium hydroxide เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *A. flavus* ที่ไม่มีการสร้างเม็ด sclerotium ซึ่งภายใต้โคโลนีของเชื้อราดังกล่าวไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังใน Figure 1 และเมื่อยืนยันการสร้างสารพิษอะฟลาท๊อกซินด้วยชุด ELISA พบว่าเชื้อ isolate 5, 14, 15, 16 และ 17 พบสารพิษ 116.55, 116.16, 116.55, 113.89 และ 116.16 ppb ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Detection of ELISA kit on Aflatoxin contents producing by *A. flavus*

isolates	Aflatoxin contents (ppb)	isolates	Aflatoxin contents (ppb)	isolates	Aflatoxin contents (ppb)
Isolate 1	0.26	Isolate 7	17.30	Isolate 13	0.19
Isolate 2	0.15	Isolate 8	0.04	Isolate 14	116.16
Isolate 3	15.11	Isolate 9	0.10	Isolate 15	116.55
Isolate 4	1.67	Isolate 10	0.05	Isolate 16	113.89
Isolate 5	116.55	Isolate 11	0.31	Isolate 17	116.16
Isolate 6	0.16	Isolate 12	0.02		

3. การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษอะฟลาท๊อกซินด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

จากการใช้ primer จำเพาะ ver afl และ omt (Kim *et al.*, 2011) ไปทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่บริเวณที่มีเกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษพบว่า เชื้อราตัวแทนจากทั้งสองกลุ่มที่นำมาทดสอบ มีการเพิ่มปริมาณด้วย primer ทั้ง 3 ชนิดได้ดังใน Figure 2

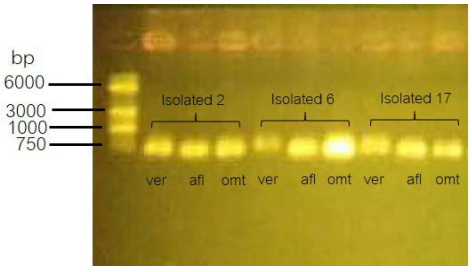

Figure 2 DNA expression band of non-mycotoxigenic (isolate 2 and 6) and mycotoxigenic (isolate 17) from *A. flavus* with multiplex-PCR (ver,afl, omt primer)

วิจารณ์ผลการทดลอง

การจำแนกเชื้อรา *A. flavus* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาก็เป็นปัจจัยสำคัญเบื้องต้นในการใช้จำแนกเชื้อรา (Raper and Fennell, 1977) แต่การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ AFPA จะส่งผลให้เกิดสีที่มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Aspergillus* spp. ชนิดอื่นและ ในด้านการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน ในรายงานของ Frisvad *et al*. (2019) มีการสนับสนุนเกี่ยวกับเชื้อรา *A. flavus* ที่มีการสร้างเม็ด sclerotium จะมีโอกาสการสร้างสารพิษ สำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลด้วย primer afl, ver และ omt พบว่าในเชื้อรา *A. flavus* ที่มีความสามารถสร้างสารพิษและไม่สร้างสารพิษ พบจำนวน 3 แถบ ซึ่งไม่สอดคล้องตามรายงานของ Kim *et al.* (2011) ดังนั้นการตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลสำหรับ *A. flavus* จึงต้องรอการยืนยันการตรวจสอบด้วยเทคนิคเบื้องต้น เป็นองค์ประกอบพื้นฐาน

สรุปผลการทดลอง

การใช้ลักษณะการสร้างเม็ด sclerotium ของเชื้อรา *A. flavus* จะมีโอกาสพบการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซินได้มากกว่าและในการยืนยันผลการทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ AFPA และการรมด้วยแอมโมเนียมไฮดรอไซด์ สามารถยืนยันว่าเป็น *A. flavus* ที่มีการสร้างสารพิษได้ ในขณะที่วิธีการตรวจด้วย PCR โดยใช้ ver, afl และ omt primer ยังให้ผลการยืนยันได้อย่างไม่ชัดเจน ในการจำแนกชนิดของเชื้อรา *A. flavus* ที่มีความสามารถเกี่ยวกับการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ได้ให้การสนับสนุนทุน เพื่อใช้ในกระบวนการศึกษาวิจัย ผลงานชิ้นนี้จนประสบความสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

สนั่น จอกลอย, วีระ ภาคอุทัย, ธนาภรณ์ กระสวยทอง, ถวัลย์ เกษมาลา, ดรุณี พวงบุตร, นันทวุฒิ จงรั้งกลาง, โสภณ วงศ์แก้ว, และทักษิณา ศันสยะวิชัย. 2554. การศึกษาวิเคราะห์การกำหนดมาตรฐานอาหารและสินค้าเกษตร เรื่อง ถั่วลิสงเพื่อเป็นมาตรฐานบังคับ. รายงานผลการวิจัยเสนอสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่น. 9 หน้า.

Bintvihok, A., S. Treebonmuang, K. Srisakwattana, W. Nuanchun, K. Patthanachai and S. Usawang. 2016. A rapid and sensitive detection of aflatoxin-producing fungus using an optimized polymerase chain reaction (PCR). Toxicological Research 32(1): 81-87.

Ehrlich, C.K. 2014. Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: advantages and limitations. Frontiers in microbiology 5(50): 1-9.

Frisvad, C.J., V. Hubka, C.N. Ezekiel, S.-B. Hong, A. Nováková , A.J. Chen, M. Arzanlou, T.O. Larsen, F. Sklenár, W. Mahakarnchanakul, R.A. Samson and J. Houbraken. 2019. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. Studies in mycology 93: 1-63.

Kim, M.D., S.H. Chung and H.S. Chun. 2011. Multiplex PCR assay for the detection of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic fungi in meju, a Korean fermented soybean food starter. Food Microbiology 28: 1402-1408.

Raper, B.K. and D.I. Fennell. 1977. The genus *Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing company, New York. 686.

Saito, M. and S. Machida, 1999. A rapid identification method for aflatoxin producing strains of *A. flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. Mycoscience 40(2): 205-208.

Wogan, G.N. 1966. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. Bacteriology Reviews 30:460-47.