

การยับยั้งอะฟลาทอกซิน บี 1 โดยการใช้สายพันธุ์ไม่ผลิต สารพิษของเชื้อรา *Aspergillus flavus*

Aflatoxin B1 Inhibition Using Atoxigenic *Aspergillus flavus* of Strains

กวิณทรา ข่งขัน^{1/} ทศวรรต อะโนราช^{1/} พยุงศักดิ์ อินตะวิชา^{2/} สมชาติ ธนะ^{2/}
โชค ไสรัจกุล^{2/} และ ขรรค์ชัย ดันเมฆ^{1/*}

Kawintra Khangkhan^{1/}, Tosawat Anorach^{1/}, Payungsak Intawicha^{2/}, Somchart Thana^{2/},
Choke Sorachakula^{2/} and Khanchai Danmek^{1/*}

Abstract: The inhibition of aflatoxin B1 (AFB1) production by toxigenic strain of *Aspergillus flavus* was examined in the laboratory tests using four of atoxigenic *A. flavus* strains including *A. flavus* UPA01 UPA02 UPA03 and UPA04 isolated from maize crop producing areas in Phayao Province, Thailand. The experiment was conducted to find out the colony radial growth rate (*Kr*) of fungi on solid medium using Potato Dextrose Agar (PDA) and incubated at 30°C in the dark. The results showed that the *Kr* values of all *A. flavus* strains did not appeared significantly difference between *A. flavus* strains. The average *Kr* values of all each *A. flavus* approximately showed as 0.7 cm/day. For the quantities of aflatoxin, *A. flavus* spore suspension at concentration of 1×10^5 spore/ml was inoculated in modified yeasted glucose sucrose (mYES) at 30°C in the dark for 7 day. Toxigenic strain of *A. flavus* NRRL3357 produced and showed AFB1 value as 5.361 ± 259.10 ng/ml but all four atoxigenic strains of *A. flavus* did not produce aflatoxins (AFB1, AFB2, AF1 and AFG2). When *A. flavus* NRRL3357 was co-incubated with each four atoxigenic *A. flavus* strains in modified yeasted glucose (mYEG), all atoxigenic *A. flavus* strains significantly greater inhibited AFB1 from toxigenic *A. flavus* strain with more seventy percentage of inhibition. The kinetic parameters were expressed by Monod's equation. The specific growth rates (μ) of all *A. flavus* were similar. On the other parameter including specific glucose consumption rate (q_s), toxigenic strain of *A. flavus* NRRL3357 was the highest q_s value (0.22 mmol/g cell/hr) but it strain was reduced in q_s value when

^{1/} สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

^{1/} Program of Biotechnology, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao 56000

^{2/} สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

^{2/} Program of Animal Science, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao 56000

* Corresponding author: E-mail address: khanchai.da@up.ac.th

co-cultured with atoxigenic strains of *A. flavus*. The results indicated atoxigenic strains of *A. flavus* inhibited AFB1 produced by toxigenic strain of *A. flavus* NRRL3357 with competitive exclusion of substrate (glucose) consumption.

Keywords: *Aspergillus flavus*, aflatoxin B1, aflatoxin inhibition

บทคัดย่อ: การยับยั้งการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน บี1 (AFB1) ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ได้ถูกทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้เชื้อรา *A. flavus* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. flavus* UPA01 UPA02 UPA03 และ UPA04 ซึ่งเป็นชนิดเดียวกันแต่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน คัดแยกได้จากดินบริเวณที่ปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในจังหวัดพะเยา ประเทศไทย การทดลองเริ่มจากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารแข็ง (Kr) โดยใช้ Potato Dextrose Agar (PDA) และบ่มเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 °C ในที่มืด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อรา *A. flavus* ที่ใช้ทดสอบ ผลการทดลองพบว่าค่า Kr ของเชื้อรา *A. flavus* ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ค่า Kr เฉลี่ยของเชื้อรา *A. flavus* มีค่าการเจริญ 0.7 ซม.ต่อวัน ในด้านการศึกษากการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินทำได้โดยนำสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* ความเข้มข้น 1×10^5 สปอร์ต่อมล มาบ่มเลี้ยงในอาหารสูตร modified yeasted sucrose (mYES) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C ในที่มืด เชื้อรา *A. flavus* NRRL3357 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินมีการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน บี1 คือ 5.361 ± 259.10 นกต่อมล ในขณะที่เชื้อรา *A. flavus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบไม่มีการผลิตอะฟลาทอกซิน (บี1 บี2 จี1 และ จี2) เมื่อนำไปเลี้ยงร่วมกันกับ *A. flavus* NRRL3357 ที่ผลิตอะฟลาทอกซินในอาหารสูตร modified yeasted glucose (mYEG) พบว่าเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์นี้สามารถยับยั้งการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน บี1 ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการศึกษากการเจริญของเชื้อราจะใช้สมการการศึกษาของ Monod ซึ่งพบว่าเชื้อรา *A. flavus* ที่นำมาทดสอบมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ที่ใกล้เคียงกัน ในค่าอื่น ๆ เช่น อัตราการใช้สับสเตรทจำเพาะ (q_s) เชื้อรา *A. flavus* NRRL3357 มีค่า q_s มากที่สุด (0.22 mmol/g cell/hr) แต่จะลดลงเมื่อมีการเลี้ยงร่วมกับสายพันธุ์ที่ไม่ผลิตอะฟลาทอกซิน ซึ่งทำให้เห็นว่าเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างอะฟลาทอกซินจะไปยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซิน บี1 จากเชื้อรา *A. flavus* NRRL3357 ได้โดยการแข่งขันการใช้สับสเตรทซึ่งคือน้ำตาลกลูโคส

คำสำคัญ: เชื้อรา *Aspergillus flavus* สารพิษอะฟลาทอกซิน บี1 การยับยั้งสารพิษอะฟลาทอกซิน

คำนำ

อะฟลาทอกซิน (aflatoxins) เป็นสารประกอบทุติยภูมิที่มีความเป็นพิษและสารก่อมะเร็งที่สามารถพบได้ในธรรมชาติและในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ (Ehrlich and Cotty, 2004) โดยเฉพาะแปลงปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ถั่วลิสงและฝ้าย (Lillehoj *et al.*, 1974; Reddy *et al.*, 2007; Passone *et al.*, 2010) ประกอบไปด้วยอะฟลาทอกซิน 4 ชนิดหลัก คือ อะฟลาทอกซิน บี1 บี2 จี1 และ จี2 (AFB₁, AFB₂, AFG₁ และ AFG₂) (Klich, 2007) สำหรับสิ่งมีชีวิตหลักที่มีการผลิต อะฟลาทอกซิน คือ เชื้อราซึ่งมักจะผลิตอะฟลาทอกซินในระหว่างการเจริญเติบโต

ในธรรมชาติ เช่น เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* section *Flavi* โดยเฉพาะ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ซึ่งเชื้อรา *A. flavus* จะเป็นเชื้อราที่มักก่อปัญหากับผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรค่อนข้างมาก เพราะเป็นเชื้อราที่ผลิตอะฟลาทอกซินชนิดที่มีความเป็นพิษสูงและผลิตมาในปริมาณมาก คือ อะฟลาทอกซิน บี1 (Reddy *et al.*, 2009) ดังนั้นถ้ามีการปนเปื้อนอยู่ในธรรมชาติจำนวนมากโดยเฉพาะในแปลงปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์จะทำให้มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินดังกล่าวได้ ซึ่งจากรายงานของสำนักงานเกษตรจังหวัดพะเยา ในปี พ.ศ. 2556 พบว่าเป็นแหล่งปลูกและผลผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ติดอันดับ 1 ใน 20 จังหวัดแรก

ของประเทศไทยมาอย่างต่อเนื่อง มีพื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดทั้งจังหวัดมากกว่า 300,000 ไร่ แม้ว่าในพื้นที่ปลูกข้าวโพดดังกล่าวจะเป็นพื้นที่ปลูกพืชไร่ที่มีโอกาสพบการปนเปื้อน *A. flavus* สายพันธุ์ที่มีการผลิต อะฟลาทอกซิน (toxigenic strains) (Ehrlich and Cotty, 2004) อย่างไรก็ตามในธรรมชาติยังสามารถพบเชื้อรา *A. flavus* ชนิดเดียวกันแต่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ผลิตอะฟลาทอกซิน (atoxigenic strains) แต่จะมีอัตราการพบที่น้อยกว่า (Mellon and Cotty, 1995) ซึ่งเมื่อนำไปศึกษาการเจริญพบว่าเชื้อรา *A. flavus* แต่ละสายพันธุ์มีอัตราการเจริญที่ แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ อาทิ เช่น สายพันธุ์ของเชื้อรา ค่า water activity อุณหภูมิและอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น (Ramakrishna *et al.*, 1996) และเมื่อมีการเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *A. flavus* สายพันธุ์ที่มีการผลิตอะฟลาทอกซิน กับเชื้อรา *A. flavus* ชนิดเดียวกันแต่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ผลิตอะฟลาทอกซิน พบว่าปริมาณอะฟลาทอกซินลดลง อย่างมีนัยสำคัญ จึงเป็นแนวทางให้ในต่างประเทศมีนักวิจัยหลายท่านได้คัดแยกหาเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่ไม่ผลิตอะฟลาทอกซินไปควบคุม *A. flavus* ได้เป็นผลสำเร็จ (Ehrlich and Cotty, 2004) แต่การนำมาประยุกต์ใช้ในประเทศไทยยังเป็นข้อจำกัดค่อนข้างมาก เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาการพบเชื้อราดังกล่าวนี้และนำไปใช้ประโยชน์มักมีการจดลิขสิทธิ์โดยหน่วยงานและนักวิจัยต่างชาติ ดังนั้นถ้ามีแนวทางในใช้เชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ใหม่ไม่ผลิตอะฟลาทอกซินที่คัดแยกภายในประเทศไทยที่มีศักยภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินจะทำให้สามารถนำทรัพยากรของเชื้อรานี้ไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น ลดการใช้สารเคมีและยาฆ่าเชื้อยาในการผลิตด้านการเกษตร การผลิตข้าว การผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด และอาหารสัตว์ เป็นต้น ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้มีแนวทางที่นำเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่ไม่ผลิตอะฟลาทอกซิน ที่คัดแยกภายในประเทศไทยมาศึกษาการเจริญและการนำไปใช้ยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินโดยเฉพาะอะฟลาทอกซิน ปี 1 จากเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่ผลิตอะฟลาทอกซิน

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา

ในการทดลองนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 7 ชนิด ซึ่งมีส่วนประกอบและรายละเอียดในการเตรียมดังต่อไปนี้ คือ

- V8 juice medium (Cotty, 1988) ประกอบด้วย น้ำผลไม้ V8 5.0% (v/v) และ agar 2.0% (w/v)

- modified yeast extract-sucrose (mYES) (Horn *et al.*, 2000) ประกอบด้วย sucrose 0.5% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v) ส่วนอาหาร modified yeast extract-glucose (mYEG) ประกอบด้วย glucose 0.5% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v)

- *Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar (AFPA) (Frandsberg *et al.*, 2003) ประกอบด้วย peptone 1.0% (w/v) yeast extract 2.0% (w/v) ferric ammonium citrate 0.05% (w/v) dichoran 0.2% (w/v) ที่ละลายในเอทานอลปริมาตร 1.0 ml และ agar 1.5% (w/v)

- Czapek medium containing Avid[®] (Danmek *et al.*, 2011) ประกอบด้วย sucrose 3.0% (w/v) sodium nitrate 0.3% (w/v) potassium phosphate dibasic anhydrous 0.1% (w/v) magnesium sulfate (anhydrous) 0.05% (w/v) potassium chloride 0.05% (w/v) ferrous sulfate 0.001% (w/v) และ agar 2.0% ภายหลังจากการ autoclave ทำการเติม Avid (0.15 EC, Novartis Crop Protection, Greensboro, NC 27419)) ปริมาตร 40 µl ต่ออาหาร 1 ลิตร

- Potato Dextrose Agar (PDA) และ Malt Extract Agar (MEA) เตรียมตามอัตราส่วนและวิธีการเตรียมของบริษัท Difco, USA

อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดปรับ pH ด้วย HCl 1.0 N เพื่อให้มี pH เท่ากับ 6.0 และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ UPAG01 UPAG02

UPAG03 และ UPAG04 เป็นเชื้อราที่คัดแยกจากแปลงปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในจังหวัดพะเยา ประเทศไทย ปัจจุบันถูกเก็บรักษาที่สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ประเทศไทย และ CBS-KNAW FUNGAL DIVERSITY CENTER ประเทศเนเธอร์แลนด์ ในขณะที่เชื้อรามารฐาน *A. flavus* NRRL 3357 (toxigenic strain) และ NRRL 21882 (atoxigenic strain) ได้รับจากภาควิชา Plant Pathology and Crop Physiology Agcenter Louisiana State University ประเทศสหรัฐอเมริกา เชื้อราทั้งหมดเก็บไว้บนอาหาร PDA ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C ซึ่งสามารถเตรียมให้อยู่ในรูปสารละลายสปอร์โดยการนำมาถ่ายเชื้อบนอาหาร V8 juice medium บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลาประมาณ 7 วัน เพื่อให้สปอร์ของเชื้อราเจริญเต็มที่ จากนั้นจึงทำเป็นสารละลายสปอร์ในน้ำกลั่นที่เติม Tween 80 ความเข้มข้น 0.01% (v/v) และปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้เท่ากับ 10^5 spore/ml (Cotty and Misaghi, 1984)

การศึกษาลักษณะของเชื้อรา *A. flavus*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งตามวิธีการของ Klich (2002) และ Danmek *et al.* (2011) โดยศึกษาลักษณะต่าง ๆ เช่น ขนาดของโคโคนี สีของโคโคนี สีของสปอร์ ลักษณะของ conidia ขนาดของ sclerotia และสีด้านหลังของโคโคนี เป็นต้น ส่วนการศึกษาระดับชีวโมเลกุลทำตามวิธีของ Glass and Donaldson (1995) โดยทำการเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* บนอาหารสูตร MEA ที่อุณหภูมิ 30°C เพื่อให้มีการเจริญของเส้นใยและสปอร์ จากนั้นจึงนำมาสกัด DNA โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป MoBio-Ultraclean™ Microbial DNA Isolation Kit ขึ้นส่วนของ DNA ที่มี gene ของ β -tubulin gene จะถูกจำลองโดยใช้ primers Bt2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) และ Bt2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) และนำไปหาลำดับเบสโดยการทำให้ PCR โดยใช้ชุดตรวจสอบตรา ABI Prism® Big Dye™ Terminator v. 3.0 Ready Reaction Cycle sequenced Kit และทำการตรวจสอบชนิดของ

เชื้อรา *A. flavus* โดยใช้โปรแกรม Seq Man the Laser Gene package

การเจริญของเชื้อราบนอาหารแข็ง

ตัดโคโคนีของ *A. flavus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA ขนาด 0.2 cm มาวางใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร PDA ใหม่ จากนั้นจึงทำการบ่มเชื้อราที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลาประมาณ 7 วัน ในแต่ละวันทำการวัดรัศมีการเจริญของโคโคนีของเชื้อรา (cm) เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์หาค่าอัตราการเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง (colony radial growth rate (K_r)) ตามวิธีการของ Morrison and Righelato (1974) ซึ่งหาได้จากสมการเส้นตรงการถดถอย ($K_r = dr/dt$) โดยที่ dr/dt คืออัตราการเจริญของรัศมีโคโคนีเชื้อราที่ได้บันทึกในวันที่สังเกต ($time_o$) ต่อวันเริ่มทำการทดลอง ($time_i$)

การผลิตอะฟลาทอกซินและการเจริญของเชื้อราบนอาหารเหลว

นำสารละลายสปอร์ของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ (10^5 spore/ml) ปริมาตร 15 μ l ใส่ลงในอาหาร mYES และ mYEG medium ปริมาตร 1.0 ml ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 5.0 ml ตามวิธีดัดแปลงของ Horn *et al.* (2000) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 7 วัน และนำตัวอย่างมาสกัดอะฟลาทอกซินด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบปริมาณอะฟลาทอกซิน ปิ1 (ng/ml) ด้วยวิธี High performance liquid chromatography ตามวิธีดัดแปลงของ Sweany *et al.* (2011)

สำหรับการศึกษาการเจริญของเชื้อราบนอาหารเหลวทำโดยนำสารละลายสปอร์ของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ (10^5 spore/ml) ปริมาตร 150 μ l ใส่ลงในอาหาร mYEG medium ปริมาตร 10.0 ml จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยในแต่ละวันทำการนำตัวอย่างมาวิเคราะห์การเจริญของเชื้อราโดยการชั่งน้ำหนักแห้ง (g/l) ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหาร (g/l) และปริมาณอะฟลาทอกซิน (mg/l) เพื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของเชื้อราตามสมการของ Monod (1) (1942) ดังนี้ คือ

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (1)$$

โดยที่ S แทนค่าของปริมาณความเข้มข้นของซับสเตรทและ K_s คือค่าคงที่ที่อิ่มตัวของซับสเตรท ซึ่งจากสมการที่ (1) สามารถนำมาปรับเพื่อหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) โดยใช้การคำนวณจากค่าการเจริญของเชื้อราต่อหน่วยเวลา ตามสมการที่ (2) คือ

$$\mu = \frac{\ln x_1 - \ln x_0}{t_1 - t_0} \quad (2)$$

สำหรับค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($\mu_{\max}$) สามารถคำนวณหาได้โดยการสร้างกราฟข้อมูลตามวิธีการของ Lineweaver-Burk plot และสามารถสร้างสมการได้ (3) คือ

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{\max}} \quad (3)$$

ส่วนอัตราการใช้ซับสเตรตจำเพาะ (q_s) และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์จำเพาะ (q_p) สามารถหาได้จากการคำนวณโดยใช้สมการที่ (4)

$$q_s = \mu/Y_{x/s} \text{ and } q_p = \mu \cdot Y_{p/s} \quad (4)$$

การวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง กลูโคสและอะฟลาทอกซิน ปี 1

การหาน้ำหนักแห้งของเชื้อราทำได้โดยนำตัวอย่างมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้นจึงนำ เชื้อราไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นระยะเวลา 7 วัน หรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ ทำการจดบันทึกน้ำหนักของเชื้อราที่เกิดขึ้น

การหาปริมาณกลูโคสทำได้โดยดูการเกิดปฏิกิริยาของน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้สารละลาย DNS (Miller 1959) ตามวิธีการของ Ghose (1987) โดยเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 3.0 ml ในสารตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบปริมาตร 1.0 ml จากนั้นจึงนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจากนั้นจึงเติมน้ำกลั่น 20.0 ml ผสมให้เข้ากันและนำไปวัดค่า

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในตัวอย่างด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 nm และคำนวณหาค่าน้ำตาลโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

การหาปริมาณอะฟลาทอกซิน ปี 1 ในตัวอย่างมาสดักอะฟลาทอกซินด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบปริมาณอะฟลาทอกซิน ปี 1 (ng/ml) ด้วยวิธี High performance liquid chromatography ตามวิธีดัดแปลงของ Sweany *et al.* (2011)

สถิติที่ใช้ในงานวิจัย

กำหนดให้ทำการทดลองอย่างต่ำ 3 ซ้ำ การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อทดสอบสมมติฐานทางสถิติ และในแต่ละกลุ่ม การทดลองทำการทดสอบเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทีตเมนต์แต่ละกลุ่มด้วยวิธีใช้ความแตกต่างที่มีนัยสำคัญน้อยที่สุด (least significant difference (LSD)) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

ผลและวิจารณ์

เชื้อรา *A. flavus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ UPAG01 UPAG02 UPAG03 และ UPAG04 เป็นเชื้อราใน *Aspergillus section Flavi* ซึ่งมีลักษณะเด่น คือ เมื่อเลี้ยงในอาหาร AFPA จะเกิดสีส้มเหลืองภายใต้โคโลนี (Pitt *et al.*, 1983) แต่จะผลิตสปอร์ได้น้อยมากและเมื่อเลี้ยงบนอาหาร Czapek medium containing Avid[®] จะเกิดโครงสร้างคล้าย synnema สอดคล้องกับการรายงานของ Damann *et al.* (2004) และ Danmek *et al.* (2011) บนอาหาร PDA มีการผลิตสปอร์สีเขียวผนังเรียบเรียบ conidia บน conidiophore เมื่อศึกษาทางระดับชีวโมเลกุลตามวิธีของ Glass and Donaldson (1995) พบว่ามีลำดับเบส 100 เปอร์เซ็นต์ตรงกับเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้เป็นเปรียบเทียบของ CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre ประเทศเนเธอร์แลนด์ สำหรับการทดลองนี้ได้ทำการศึกษ้อัตราการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ทั้งสายพันธุ์ที่ผลิตอะฟลาทอกซิน (toxigenic strains) และสายพันธุ์ที่ไม่ผลิตอะฟลาทอกซิน

(atoxicogenic strains) บนอาหารแข็ง PDA ที่ค่า pH 6.0 เนื่องจากเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราดังกล่าว โดยเฉพาะค่า pH ในช่วง 5.0 ถึง 7.5 จะไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (Brancato and Golding, 1953; Cotty 1988; Thompson, 1990; Yoder *et al.*, 2008) โดยในการศึกษานี้ เชื้อราทั้ง 6 สายพันธุ์ มีการเจริญเติบโตที่ดี มีการผลิตโคโคนีสีขาวและสปอร์เป็นสีเขียวซึ่งสามารถเจริญเติบโตเต็มที่ยอดอาหารแข็ง PDA ในจานเพาะเชื้อขนาด 9.0 cm ภายในวันที่ 6 ของการบ่มเชื้อราที่อุณหภูมิ 30°C เมื่อนำข้อมูลของการเจริญเติบโตมาคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง (Kr) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 โดยแต่ละสายพันธุ์มีค่าเฉลี่ยของอัตราการเจริญบนอาหารแข็งประมาณ 0.70 cm/day อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อพิจารณาค่าอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารแข็งในแต่ละช่วงเวลาพบว่าเชื้อราทั้ง 6 สายพันธุ์ แสดงอัตราการเจริญเหมือนกัน คือ เริ่มต้นเชื้อรา *A. flavus* จะมีการเจริญเติบโตของเส้นใยและโคโคนีในแนวราบ (วันที่ 1, 2 และ 5) และเมื่อเจริญไประยะหนึ่ง คือเวลาประมาณ 2 วัน จะสร้างก้านชูเพื่อผลิตสปอร์ซึ่งมีการเจริญในแนวตั้งซึ่งสังเกตได้จากค่าอัตราการเจริญที่ลดลงในวันที่ 3, 4 และ 6 (ภาพที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Rodríguez-Urra *et al.* (2009) นอกจากนี้เมื่อนำมาศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์อื่น ๆ พบว่าเชื้อรา *A. flavus* แต่ละสายพันธุ์มีอัตราการเติบโต (Kr) ที่แตกต่างกัน

เช่น เชื้อรา *A. flavus* ATTC 16872 และ *A. flavus* สายพันธุ์ที่คัดแยกมาจากน้ำผึ้งในธรรมชาติมีอัตราการเจริญเติบโตบนอาหารแข็งเท่ากับ 0.24 และ 0.23 cm/day (Yoder *et al.*, 2008; Lopez-Malo *et al.*, 1998) เมื่อพิจารณาถึงผลของสภาพแวดล้อม เช่น ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดหรือด่างสูงหรือต่ำเกินไป การเติมสารเคมีบางชนิด เช่น สารประกอบโบรโมเนต วานิลิน และอะบาเม็คตินจะมีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารแข็ง ซึ่งถ้ามีปริมาณมากจะทำให้อัตราการเจริญลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Lopez-Malo *et al.*, 1995; Rodríguez-Urra *et al.*, 2009; Danmek *et al.*, 2011)

ในการศึกษาการผลิตอะฟลาทอกซิน ปี 1 จากเชื้อราทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลกลูโคสและซูโครส ร่วมกับค่า pH 5.0 ถึง 7.0 เป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตอะฟลาทอกซินโดยเฉพาะจากเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* (Klich 2007) ซึ่งจากการเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร mYES พบว่ามีเพียงเชื้อรามาตรฐาน *A. flavus* NRRL3357 ที่ผลิตอะฟลาทอกซินและผลิตในปริมาณมากจะมีการผลิตอะฟลาทอกซินอย่างเห็นได้ชัดในวันที่ 2 สอดคล้องกับการ 5.361 ± 259.10 ng/ml (ภาพที่ 2) ในขณะที่เชื้อราอีก 5 สายพันธุ์ คือ เชื้อรามาตรฐาน *A. flavus* NRRL21882 และอีก 4 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากประเทศไทย คือ UPAG01 UPAG01 UPAG01 และ UPAG01 เป็นสาย รายงานของ Lillehoj *et al.* (1974) Ramakrishna *et al.* (1996) และ Daigle and Cotty (1995) และเมื่อเลี้ยงถึงวันที่ 7 พบว่ามี

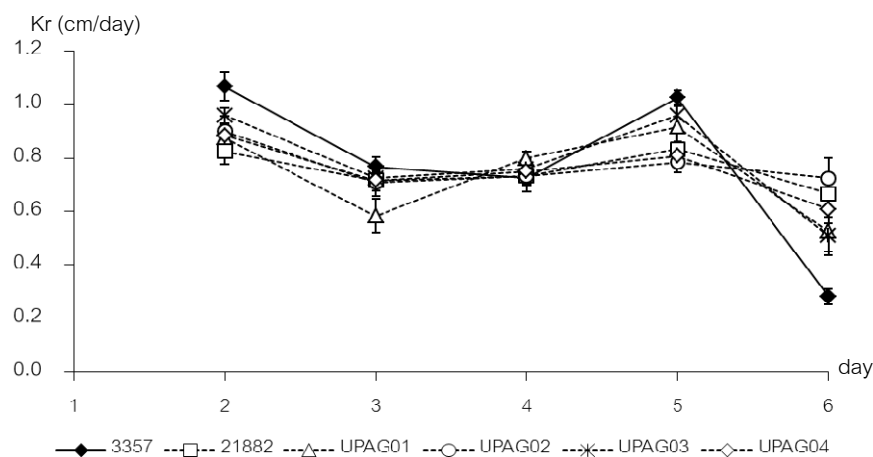


Figure 1 Kr pattern of *A. flavus* strains on PDA incubated at 30°C in the dark

ปริมาณอะฟลาทอกซิน ปี 1 สะสมเท่ากับ พันธุ์ที่ไม่ผลิตอะฟลาทอกซิน และเมื่อนำไปทดสอบการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินจากเชื้อรา *A. flavus* NRRL3357 ในอาหาร mYEG พบว่าทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการผลิต อะฟลาทอกซินในอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากกว่า 70% (ภาพที่ 3) จึงแสดงให้เห็นว่าเมื่อเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่ผลิตอะฟลาทอกซินถูกเลี้ยงร่วมกับเชื้อราชนิดเดียวกันแต่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ผลิตอะฟลาทอกซินจะทำให้มีการผลิตอะฟลาทอกซินลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Cotty (1994) โดยใช้เชื้อรามาตรฐานทางการค้า *A. flavus* AF36 ที่ไม่ผลิตอะฟลาทอกซินเพื่อควบคุมการผลิตดังกล่าวโดยเชื้อรา *A. flavus* ชนิดเดียวกันและ

เชื้อราอื่น ๆ อย่างไรก็ตามแม้ว่าการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่ผลิตอะฟลาทอกซินสามารถทำได้โดยใช้เชื้อราชนิดเดียวกัน แต่ก็มีรายงานการศึกษาโดยการใช้เชื้อราชนิดอื่น ๆ เพื่อควบคุมการสร้างอะฟลาทอกซินดังกล่าวได้ด้วย เช่น *A. niger* และ *Trichoderma viride* (Klich, 2007)

เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อรา การใช้ขั้วสตรีและการผลิตอะฟลาทอกซิน ซึ่งแสดงในตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเชื้อราเดี่ยว ๆ จะมีน้ำหนักเซลล์น้อยกว่าการเลี้ยงร่วมกันระหว่างเชื้อรา *A. flavus* NRRL3357 ที่สร้างอะฟลาทอกซินและเชื้อรา *A. flavus* ที่ไม่สร้างอะฟลาทอกซินทั้ง 4 สายพันธุ์ และค่า

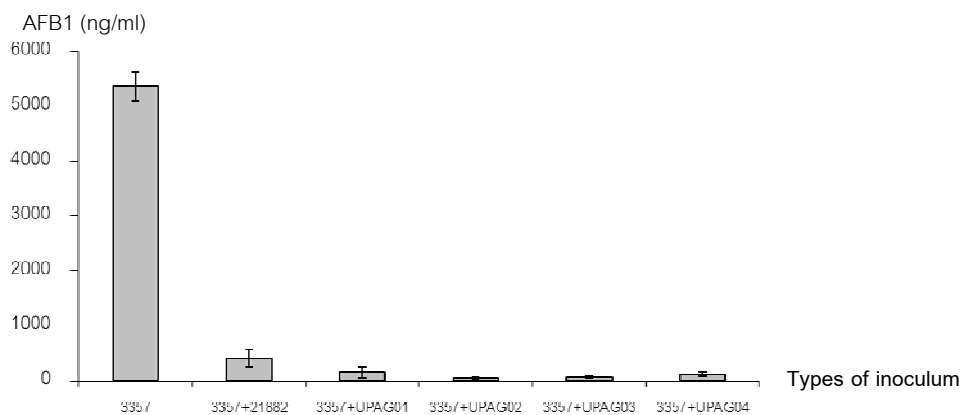


Figure 2 AFB₁ values obtained from co-cultivated toxigenic *A. flavus* strain NRRL 3357 with each atoxigenic strains in mYEG at 30°C in the dark for 7 days

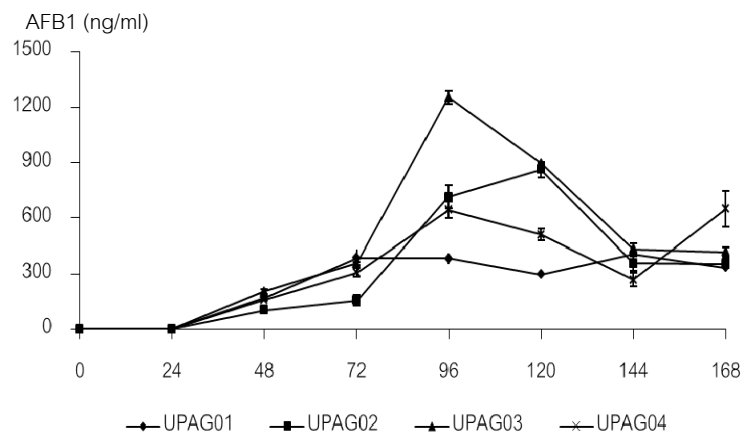


Figure 2 AFB₁ values obtained from co-cultivated toxigenic *A. flavus* strain NRRL 3357 with each atoxigenic strains in mYEG at 30°C in the dark for 7 days

Table 1 Kinetic parameters of *A. flavus* cultures

Kinetic parameters	Single culture*					Co-culture with <i>A. flavus</i> NRRL 3357*			
	3357	UPAG01	UPAG02	UPAG03	UPAG04	UPAG01	UPAG02	UPAG03	UPAG04
Dry weight (g/L)	6.75 ^b	6.67 ^{bc}	6.90 ^b	7.38 ^a	6.48 ^c	7.25 ^{ab}	7.46 ^{ab}	7.49 ^{ab}	7.91 ^a
Glucose (g/L)	38.21 ^b	41.27 ^a	40.82 ^{ab}	41.00 ^a	40.60 ^{ab}	40.08 ^a	39.23 ^b	39.55 ^{ab}	40.42 ^a
μ (h ⁻¹)	0.0084 ^a	0.0069 ^{bc}	0.0076 ^b	0.0086 ^a	0.0070 ^b	0.0083 ^{ab}	0.0080 ^{ab}	0.0090 ^a	0.0084 ^{ab}
μ_{max} (h ⁻¹)	0.0152 ^a	0.0067 ^c	0.0077 ^c	0.0128 ^b	0.0099 ^{bc}	0.0075 ^b	0.0087 ^{ab}	0.0081 ^{ab}	0.0103 ^a
$Y_{x/s}$ (g cell/ mol sub)	38.71 ^d	46.10 ^c	53.28 ^b	66.33 ^a	57.19 ^b	63.06 ^a	57.64 ^b	51.90 ^c	57.04 ^b
q_s (mmol/g cell/hr)	0.22 ^a	0.15 ^b	0.14 ^b	0.13 ^b	0.13 ^b	0.15 ^{ab}	0.16 ^{ab}	0.17 ^a	0.14 ^{ab}
$Y_{p/s}$ (mg AFB1/g sub)	0.427	0	0	0	0	0.044 ^b	0.039 ^b	0.061 ^a	0.049 ^b
q_p (μ g AFB1/g cell/hr)	3.52	0	0	0	0	0.43 ^b	0.32 ^{bc}	0.61 ^a	0.44 ^b

*Significant level (p=0.05), sample (n=3)

อัตราการเจริญเติบโตเฉพาะเชื้อรา *A. flavus* แต่ละสายพันธุ์มีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามแม้ว่าการเลี้ยงเชื้อราพร้อมกันระหว่าง *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างและไม่สร้างอะฟลาทอกซินจะทำให้เชื้อราที่มีมวลรวมและอัตราการเจริญเติบโตเฉพาะเพิ่มขึ้น แต่ก็ไม่ได้ทำให้มีการผลิตอะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้น เมื่อศึกษาถึงอัตราการใช้ซับสเตรท ซึ่งคือกลูโคสแม้ว่า *A. flavus* NRRL3357 มีการใช้กลูโคสได้เร็วและปริมาณมากกว่าในการทดลองอื่น ๆ คือ มีปริมาณกลูโคสเหลือเท่ากับ 38.21 g/L อัตราการใช้ซับสเตรทเท่ากับ 38.72 g cell/mol และอัตราการใช้ซับสเตรทเฉพาะเท่ากับ 0.22 mmol/g cell/hr แต่เมื่อมาเลี้ยงร่วมกับเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างอะฟลาทอกซินกลับพบว่าอัตราการใช้กลูโคสลดลง จึงอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อรา *A. flavus* ที่ไม่สร้างอะฟลาทอกซินสามารถไปยับยั้ง *A. flavus* NRRL3357 โดยมีผลให้เชื้อราดังกล่าวใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ช้าลง ทำให้มีผลต่อการยับยั้งผลิตอะฟลาทอกซิน โดยดูได้จากค่าอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์เฉพาะในตารางที่ 1 นอกจากนี้ยังอาจเกิดได้จากอีกหลายปัจจัย เช่น การยับยั้งในลักษณะของ competitive exclusion การผลิตสารบางชนิด และกระบวนการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเลี้ยง เป็นต้น (Cotty and Bayman, 1993; Ehrlich and Cotty, 2004)

สรุป

จากการศึกษาทั้งหมดนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าเชื้อรา *A. flavus* ที่ไม่สร้างอะฟลาทอกซินทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากประเทศไทย มีประสิทธิภาพสูงและสามารถนำไปใช้ยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินจากเชื้อราชนิดเดียวกันได้ โดยในการทดลองนี้เชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างอะฟลาทอกซินได้ไปยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซิน ปี1 จากเชื้อรา *A. flavus* NRRL3357 โดยการแข่งกันการใช้ซับสเตรทอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามกระบวนการศึกษายังเป็นแค่การทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น ซึ่งจะมีแนวทางการนำไปศึกษาในระดับปฏิบัติการกับเชื้อรา *Aspergillus* spp. ชนิดอื่น ๆ เช่น *Aspergillus parasiticus* ที่ผลิตอะฟลาทอกซินจีอะฟลาทอกซินในกลุ่มอื่น ๆ (ปี1 ปี2 จี1 และจี2) และการทดลองภาคสนามต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากโครงการวิจัยเพื่อพัฒนาเชิงพื้นที่ งบประมาณร่วมทุนระหว่าง มพ. -สกว. ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 (สัญญาเลขที่ ABC57001) มหาวิทยาลัยพะเยา และสถานีวิจัยทดสอบพันธุ์สัตว์พะเยา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา สำหรับสถานที่ในการวิจัย ขอขอบคุณ Professor Dr. Kenneth E. Damann, Jr. จากภาควิชา Plant Pathology & Crop Physiology Agcenter

Louisiana State Univeristy ประเทศสหรัฐอเมริกาสำหรับเชื้อรามาตรฐาน *A. flavus* และ Professor Dr. Dr. h. c. R. A. Samson และ Martin Meijer จาก CBS-KNAW fungal biodiversity center, The Netherlands สำหรับการมีส่วนช่วยวิเคราะห์เชื้อราในระดับชีวโมเลกุล

เอกสารอ้างอิง

- Brancato, F. P. and N. S. Golding. 1953. The diameter of the mold colony as a reliable measure of growth. *Mycologia* 45: 848-864.
- Cotty, P. J. 1988. Aflatoxin and sclerotial production by *Aspergillus flavus*: Influence of pH. *Phytopathology* 78: 1250-1253.
- Cotty, P. J. 1994. Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the population of *A. flavus* infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cotton seed. *Phytopathology* 84: 1270-1277.
- Cotty, P. J. and P. Bayman. 1993. Competitive exclusion of a toxigenic strain of *Aspergillus flavus* by an atoxigenic strain. *Phytopathology* 83: 1283-1287.
- Cotty, P. J. and I. J. Misaghi. 1984. Zinniol production by *Alternaria* sp. *Physiology and Biochemistry* 74(7): 785-788.
- Daigle, D. J. and P. J. Cotty. 1995. Formulating Atoxigenic *Aspergillus flavus* for field release. *Biocontrol Science and Technology* 5: 175-184.
- Damann, K., R. Sweany and C. DeRobertis. 2004. Frequency of colonization of corn kernels by atoxigenic *Aspergillus flavus* applied as a potential biocontrol agent. *Phytopathology* 94: 938-945.
- Danmek, K., S. Prasongsuk, P. Lotrakul, K. E. Damann, D. E. Eveleigh and H. Punnapayak. 2011. Effect of Avid[®] on the synnema-like formation of *Aspergillus flavus* grown on Czapek medium. *African Journal of Microbiology Research* 5(18): 2812-2815.
- Ehrlich, K. C. and P. J. Cotty. 2004. An isolate of *Aspergillus flavus* used to reduce aflatoxin contamination in cottonseed has a defective polyketide synthase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 473-478.
- Frandberga, E., J. Pitt and M. Olsena. 2003. Quality control of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* agar and comparison with dichloran 18% glycerol agar: a collaborative study. *International Journal of Food Microbiology* 89: 99-102.
- Glass, N. L. and G. C. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied Environmental and Microbiology* 61(4): 1323-1330.
- Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulase activities. *International Union of Pure and Applied Chemistry* 59: 257-268.
- Horn, B. W., R. L. Greene and J. W. Dörner. 2000. Inhibition of aflatoxin B1 production by *Aspergillus parasiticus* using nonaflatoxigenic strains: role of vegetative compatibility. *Biological Control* 17: 147-154.
- Klich, M. A. 2007. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience* 48: 71-80.
- Klich, M. A. 2002. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia* 94(1): 21-27.

- Lillehoj, F. B., W. J. Garcia and M. Lambrow. 1974. *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production in corn: influence of trace elements. Applied Microbiology 28(5): 763-767.
- Lopez-Malo, A., S. M. Alazamora and A. Argaiz. 1995. Effect of natural vanillin on germination time and radial growth of moulds in fruit-based agar systems. Food Microbiology 12: 213-219.
- Lopez-Malo, A., S. M. Alazamora and A. Argaiz. 1998. Vanillin and pH synergistic effects on mold growth. Journal of Food Science 63(1): 143-146.
- Mellon, J. E. and P. J. Cotty. 1995. Expression of elastinolytic activity among isolates in *Aspergillus* section *Flavi*. Mycopathologia 131: 115-120.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analysis of Chemistry 31: 426-428.
- Monod, J. 1942. Recherches sur la croissance des Cultures Bactériennes (Thèse 151 Doctorat ès Sciences Naturelles). Hermann, Paris.
- Morrison, K. B. and R. C. Righelato. 1974. The relationship between hyphal branching, specific growth rate and colony radial growth rate in *Penicillium chrysogenum*. Journal of General Microbiology 81(5): 517-520.
- Passone, M. A., L. C. Rosso, A. Ciancio, and M. Etcheverry. 2010. Detection and quantification of *Aspergillus* section *Flavi* spp. in stored peanuts by real-time PCR of nor-1 gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production. International Journal of Food Microbiology 138: 261-281.
- Pitt, J. I., A. Hocking and D. R. Glenn. 1983. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Journal of Applied Bacteriology 54: 109-114.
- Ramakrishna, N., J. Lacey and J. E. Smith. 1996. *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin B1 formation in barley grain during interaction with other fungi. Mycopathologia 136: 53-63.
- Reddy, K. N., H. K. Abbas, R. M. Zablotowicz, C. A. Abel and C. H. Koger. 2007. Mycotoxin occurrence and *Aspergillus flavus* soil propagules in a corn and cotton glyphosate-resistant cropping systems. Food Additives and Contaminants 24(12): 1367-1373.
- Reddy, K. R. N., Ch. R. Reddy, P. N. Kumar, C. S. Reddy and Muralidharan. 2009. Genetic variability of aflatoxin B1 producing *Aspergillus flavus* strains isolated from discolored rice grains. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25: 33-39
- Rodríguez-Urra, A. B. C. Jimenez, M. Duenas and U. Ugalde. 2009. Bicarbonate gradients modulate growth and colony morphology in *Aspergillus nidulans*. Federation of European Microbiological Societies 300: 216-221.
- Sweany, R. R., K. E. Jr. Damann and M. D. Kaller. 2011. Comparison of soil and corn kernel *Aspergillus flavus* populations. Phytopathology 101(8): 952-959 p.
- Thompson, D. P. 1990. Influence of pH on the fungitoxic activity of naturally occurring compounds. Journal of Food Protection 53: 482-429.

Yoder, J. A., B. S. Christensen, T. J. Croxall, J. L. Tank and D. Sammataro. 2008. Suppression of growth rate of colony-associated fungi by high fructose corn syrup feeding supplement, formic acid, and oxalic acid. Journal of Apicultural Research and Bee World 47(2): 26-130.
