

การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. ที่ปนเปื้อนในอาหารผลิตผลทางการเกษตร และดินเพาะปลูก และการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ปี 1

Identification of *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. Contaminated in Food, Agriculture Products and Cultivated Soil and Aflatoxin B1 Production

วัชรีย์ เสาร์เทพ¹ อรุณา เพี้ยซ้าย^{1*} และ พัชรวิภา ใจจักรคำ¹

Watcharee Saortap¹, Onuma Piasai^{1*} and Patcharavipa Chaijuckam¹

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

¹ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900 Thailand

รับเรื่อง: พฤศจิกายน 2559 Received: November 2016

รับตีพิมพ์: ธันวาคม 2559 Accepted: December 2016

* Corresponding author: agromj@ku.ac.th

ABSTRACT: Forty-seven samples of food, agriculture products and cultivated soil were collected from different locations. The direct isolation, soil plate and dilution plate methods were employed. Identification of the fungi isolates was based on morphological characteristics under stereo and compound microscopes. The results revealed that 76 isolates of *Aspergillus* spp. including *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. terreus* and *Aspergillus* sp. and 8 isolates of *Penicillium* spp. including *P. oxalicum*, *P. verrucosum*, *Penicillium* sp.1 and *Penicillium* sp.2 were found. Sclerotia formation with different characteristics were observed in *A. flavus* (KUFC10266, 10269, 10277 and 10284) and *A. ochraceus* (KUFC10327). Aflatoxin B1 productions were detected using enzyme-linked immunosorbent assay. The results showed that 9 isolates of *Aspergillus* spp. and 4 isolates of *Penicillium* spp. produced aflatoxin B1 less than 4 ppb whereas, 6 isolates of *A. flavus* (KUFC10266, 10268, 10272, 10277, 10280 and 10284) produced aflatoxin B1 greater than 40 ppb. However, there was no association between sclerotia production and aflatoxin B1 production.

Keywords: *Aspergillus*, *Penicillium*, sclerotium, contamination, aflatoxin B1

Agricultural Sci. J. (2017) Vol. 48(1): 127–138

ว. วิทย. กษ.(2560) 48(1): 127–138

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อน ผลิตผลทางการเกษตร และดินปลูกพืชจากแหล่งต่างๆ รวม 47 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อราด้วยวิธี direct isolation, soil plate และ dilution plate จัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ

stereo และ compound พบการปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus* spp. จำนวน 76 ไอโซเลท จำแนกชนิดได้แก่ *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. terreus* และ *Aspergillus* sp. และพบเชื้อรา *Penicillium* spp. จำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ *P. oxalicum*, *P. verrucosum*, *Penicillium* sp.1 และ *Penicillium* sp.2 พบเชื้อรา

A. flavus (KUFC10266, 10269, 10277 และ 10284) และ *A. ochraceus* (KUFC10327) ที่มีการสร้างสเคอโรเทียม ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษอะฟลาท็อกซิน ปี1 โดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* spp. จำนวน 9 ไอโซเลท และเชื้อรา *Penicillium* spp. จำนวน 4 ไอโซเลท มีการสร้างปริมาณสารพิษน้อยกว่า 4 ppb ในขณะที่เชื้อรา *A. flavus* จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ KUFC10266, 10268, 10272, 10277, 10280 และ 10284 มีการสร้างปริมาณสารพิษมากกว่า 40 ppb อย่างไรก็ตามพบว่าการสร้างสเคอโรเทียมของเชื้อราและการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน ปี1 ไม่มีความสัมพันธ์กัน

คำสำคัญ: *Aspergillus*, *Penicillium*, สเคอโรเทียม, ปนเปื้อน, อะฟลาท็อกซิน ปี1

บทนำ

อาหารเป็นปัจจัยพื้นฐานที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ การเลือกรับประทานอาหารที่ดีมีประโยชน์และสะอาดจะส่งผลดีต่อสุขภาพ ในทางตรงกันข้ามการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษจะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค ซึ่งสารพิษและสิ่งปนเปื้อนในอาหารที่ทำให้เกิดอาการเป็นพิษมี 2 ประเภทคือ สารพิษที่มนุษย์สร้างขึ้น และสารพิษที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ สารพิษที่มนุษย์สร้างขึ้น ได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการเกษตร และมลพิษที่เกิดจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เป็นต้น ส่วนสารพิษที่เกิดขึ้นเองจากธรรมชาติเกิดจากการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ เชื้อรา และแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในดิน น้ำ อากาศ ที่มีพิษต่อระบบทางเดินอาหาร (Chinaputi, 2012) เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่พบทั่วไปตามธรรมชาติ มีทั้งประโยชน์ และโทษ ซึ่งมีเชื้อรากลุ่มที่ก่อให้เกิดโทษกับมนุษย์ สัตว์ และ

พืช โดยการสร้างสารพิษ (mycotoxins) ที่ทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยและเป็นสาเหตุโรคต่าง ๆ รวมทั้งทำความเสียหายกับข้าวของเครื่องใช้ ชนิดของเชื้อราที่มีรายงานปนเปื้อนในอาหารได้แก่ *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Emericella* และ *Eurotium* เป็นต้น นอกจากนี้เชื้อรายังสามารถพบได้ในอากาศ และสถานที่ที่มีความอับชื้น ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคระบบทางเดินหายใจและโรคมะเร็ง ได้แก่ *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Memnoniella* และ *Stachybotrys* เป็นต้น (Chinaputi, 2012; Poapolathep, 2012; Samson et al., 2002, 2007) จากความสำคัญของเชื้อราข้างต้นจึงกล่าวได้ว่า การปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในอาหารหรือในห่วงโซ่อาหาร จะส่งผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยของมนุษย์และสัตว์ โดยการได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารพิษอะฟลาท็อกซิน ปี1 (aflatoxin B1) ซึ่งเป็นสารพิษที่มีความเป็นพิษสูงและเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogens) นอกจากนี้ยังมีผลต่อระบบการผลิตพืช การส่งออกผลิตผลทางการเกษตร และระบบเศรษฐกิจของประเทศ (Chinaputi, 2012; Poapolathep, 2012; Samson et al., 2002, 2007) วัตถุประสงค์ในการวิจัยนี้เพื่อศึกษาชนิดของเชื้อราปนเปื้อนในอาหาร ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร และดินที่ใช้ทำการเกษตรรวมทั้งความสามารถในการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน ปี1 สำหรับเป็นข้อมูลในการสังเกต เฝ้าระวัง ป้องกัน ตลอดจนนำมาเป็นข้อมูลในการวางแผนการจัดการผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวในผลิตผลทางการเกษตรที่นำมาบริโภค และอาจนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเฝ้าระวัง และป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราในระบบการผลิตพืชรวมถึงการบริโภคอาหารในชีวิตประจำวัน ซึ่งจะเป็นการหลีกเลี่ยงการได้รับสารพิษจากเชื้อราที่ปนเปื้อนในอาหาร และผลผลิตทางการเกษตรในชีวิตประจำวันของผู้บริโภคได้อีกทางหนึ่ง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

สำรวจและสุ่มเก็บตัวอย่างอาหาร ผลไม้ ผลผลิตทางการเกษตร เมล็ดธัญพืชชนิดต่าง ๆ จำนวนรวม 35 ตัวอย่าง จากร้านค้าในตลาดสดบางเขน กรุงเทพมหานคร และดินที่ใช้ทำการเกษตร ได้แก่

ดินในแปลงปลูกอ้อย ดินในแปลงปลูกข้าว ดินในแปลงปลูกถั่วลิสง ดินในแปลงปลูกผักชี ดินในแปลงปลูกคะน้า และดินในแปลงปลูกต้นแมคคาเดเมีย ในจังหวัดเชียงใหม่ สระบุรี ลพบุรี นครสวรรค์ กำแพงเพชร กาญจนบุรี และกรุงเทพมหานคร จำนวน 12 ตัวอย่าง (Table 1 และ Figure 1) นำตัวอย่างมาแยกเชื้อราบนเบื่อนในห้องปฏิบัติการโดยวิธีการต่าง ๆ

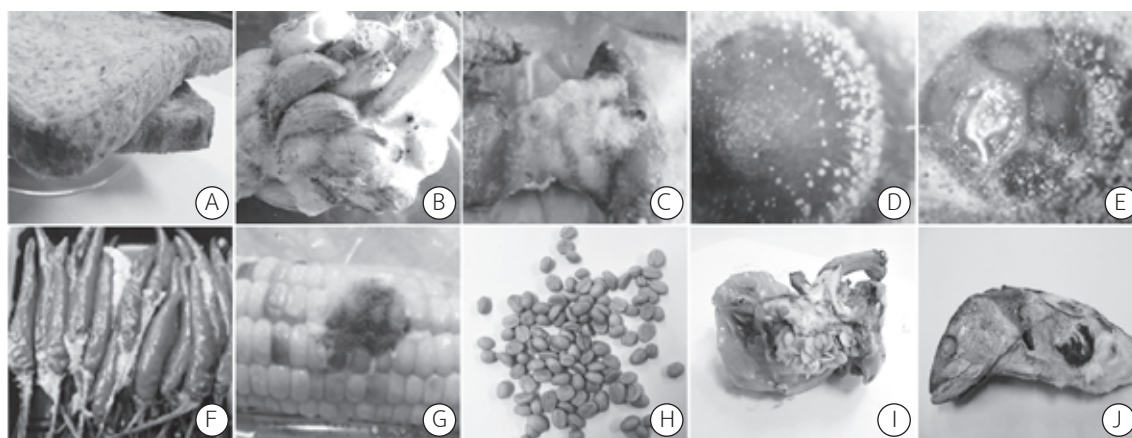


Figure 1 Food and agricultural products contaminated with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp.
: bread (A), garlic (B), salted fish (C), black pepper (D, E), chilli (F), corn (G), coffee (H), sweet pepper (I), mackerel (J)

Table 1 The occurrence of *Aspergillus* and *Penicillium* species found from various agricultural products and cultivated soil

Fungal species	KUFC	Source
<i>A. flavus</i>	10257, 10258, 10259	paper, soil from macadamia crop, soil from sugarcane crop
	10260, 10261, 10262	soil from sugarcane crop
	10263, 10264, 10265	soil from coriander crop, roasted peanut, ground peanut
	10266, 10267, 10268	boiled peanut, black bean, hairy basil seed
	10269, 10270, 10271	white pepper, white sesame, black sesame
	10272, 10273, 10274	job's tears, garlic, tomato
	10275, 10276, 10277	strawberry, corn, coffee
	10278, 10279, 10280	dried squid, dried chilli, bread
	10281, 10282, 10283	sweet pepper, paddy, shallot
	10284, 10285, 10286	black pepper, mackerel, oregano
<i>A. fumigatus</i>	10287, 10288, 10289	orange, coriander seed, salted fish
	10290, 10291, 10293	dried shrimp, paddy, black sesame
	10294, 10295, 10296	garlic, boiled peanut, oregano
	10297, 10298, 10299	carrot, salted fish, job's tears
<i>A. japonicus</i>	10300, 10301, 10302	boiled corn, chilli, hairy basil seed
	10303	peanut
<i>A. niger</i>	10304, 10305, 10306	soil from rice crop, soil from coriander crop, soil from Chinese kale crop
	10307, 10308, 10309	boiled peanut, peanut, job's tears
	10310, 10311, 10312	paddy, paper, salted fish
	10313, 10314, 10315	oregano, black pepper, roasted peanut
	10316, 10317, 10318	mackerel, bread, shallot
	10319, 10320, 10321	white pepper, corn, coffee
	10322, 10323, 10324	black sesame, chilli, sweet pepper
	10325, 10326	hairy basil seed, oat
<i>A. ochraceus</i>	10327, 10328, 10329	paddy, peanut, job's tears
<i>A. terreus</i>	10330, 10331, 10332	soil from peanut crop, soil from Chinese kale crop, sweet pepper
<i>Aspergillus</i> sp.	10333	soil from macadamia crop
<i>P. oxalicum</i>	10353	sweet pepper
<i>P. verrucosum</i>	10355, 10356, 10357	boiled corn, pepper, oregano
<i>Penicillium</i> sp.1	10354	shallot
<i>Penicillium</i> sp.2	10358, 10359, 10360	sweet pepper, soil from rice crop, soil from macadamia crop

2. การแยกเชื้อราปนเปื้อน

2.1 การแยกเชื้อราโดยตรงจากตัวอย่าง (Direct isolation) (Samson, 2002)

นำตัวอย่างอาหารมาตรวจสอบโครงสร้างเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo ใช้เข็มเขี่ยที่เผาจนไฟเพื่อฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) เพื่อเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์สำหรับการจัดจำแนกชนิด และตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษอะฟลาท็อกซิน ปี 1 ส่วนตัวอย่างที่ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo แล้วไม่พบโครงสร้างเชื้อรา เช่น เมล็ดธัญพืชต่าง ๆ จะนำมาแยกเชื้อราโดยนำตัวอย่างแช่ใน 10 % Clorox นาน 5 นาทีจากนั้นนำไปวางบนอาหาร PDA โดยใช้เมล็ดธัญพืช จำนวน 10 เมล็ด ต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28–30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–5 วัน เมื่อพบการเจริญของราออกมาจากตัวอย่าง ใช้เข็มเขี่ยที่เผาจนไฟเพื่อฆ่าเชื้อแล้ว ตัดปลายเส้นใยเชื้อราย้ายมาเลี้ยงบนอาหาร PDA

2.2 การแยกเชื้อราจากตัวอย่าง โดยวิธี Dilution plate method (a modified of Warcup, 1950)

ชั่งตัวอย่างแห้ง 1 กรัม หรือตวงตัวอย่างของเหลวปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่มีน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer จะได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-1} ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่มีน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-2} ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำเช่นนี้เป็นลำดับไปจนได้สารละลายที่ความเข้มข้น 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับจากนั้นใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อ ทำความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ จากนั้นเททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Gochenaux's

glucose ammonium nitrate agar (GAN) ค่อย ๆ หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ตัวอย่างกระจายทั่วจาน แล้วนำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–5 วัน เมื่อโคโลนีของราเจริญใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยเชื้อราแล้วย้ายมาเลี้ยงบนอาหาร PDA

2.3 การแยกเชื้อราจากตัวอย่าง โดยวิธี Soil plate method (a modified of Warcup, 1950)

ชั่งตัวอย่างดิน 0.005–0.015 กรัม ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ GAN ค่อย ๆ หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ตัวอย่างกระจายทั่วจาน แล้วนำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–5 วัน เมื่อโคโลนีของราเจริญใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยเชื้อรา แล้วย้ายมาเลี้ยงบนอาหาร PDA

3. การจัดจำแนกชนิดเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อราที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร czapek's agar (CZA) malt extract agar (MEA) และ PDA บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 และ 14 วัน บันทึกลักษณะการเจริญ และสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ศึกษาลักษณะโครงสร้างของเส้นใย โครงสร้างในการขยายพันธุ์ รูปร่างลักษณะสปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ ได้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo ยี่ห้อ Olympus รุ่น SZ-PT และ กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ยี่ห้อ Carl Zeiss รุ่น Scope. A1 (AXIO) ถ่ายภาพและวัดขนาดโครงสร้างของเชื้อรา โดยใช้โปรแกรม EOS Utility ในการถ่ายภาพ และวัดขนาดสปอร์โดยใช้โปรแกรม Axio Vision นำข้อมูลลักษณะสัณฐานที่บันทึกไว้มาจัดจำแนกชนิดโดยเปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิงที่มีรายงาน (Barron, 1968; Klich, 2002; Raper and Fennell, 1965; Samson *et al.*, 2002)

4. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษอะฟลาท็อกซิน ปี 1 โดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

เตรียมตัวอย่างทดสอบตามกรรมวิธีของ Abbas *et al.* (2004) โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cock borer เจาะโคลนเชื้อราจำนวน 20 ชิ้น ใส่ในหลอดทดสอบแล้วเติมเมทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากันโดยวางหลอดทดสอบบนเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 2–3 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ขึ้นวันและเส้นใยเชื้อราตกตะกอนเป็นเวลา 5 นาที และนำมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 เพื่อแยกเก็บเฉพาะส่วนใสซึ่งเป็นสารตัวอย่าง จากนั้นนำมาเจือจางโดยใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.01 M phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และนำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน บี1 โดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) วิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณปริมาณสารพิษเป็นหน่วยไมโครกรัมต่อกิโลกรัมหรือพีพีบี (µg/kg, ppb) โดยใช้สูตรคือ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสง} = \frac{B}{B_0} \times 100$$

โดย B = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างหรือสารพิษมาตรฐานที่ระดับต่าง ๆ และ B₀ = ค่าดูดกลืนแสงของสารพิษมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0 ppb

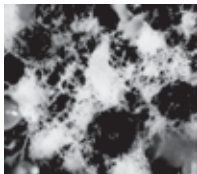
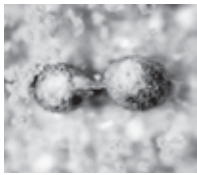
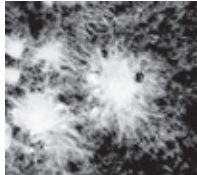
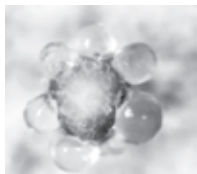
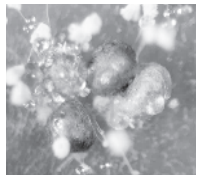
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การจัดจำแนกชนิดเชื้อราบนเปื้อน

จากการทดสอบปริมาณเชื้อราที่ปนเปื้อนใน

ตัวอย่างอาหาร และผลผลิตทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ จำนวน 35 ตัวอย่าง จากร้านค้าในกรุงเทพมหานคร และตัวอย่างดินที่ใช้ในการเพาะปลูกพืชในพื้นที่ต่าง ๆ จำนวน 12 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อราที่พบการปนเปื้อนมากที่สุด คือเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. สามารถแยกได้ทั้งหมด 76 ไอโซเลท โดยจำแนกเป็นเชื้อรา *A. flavus* มากที่สุด จำนวน 33 ไอโซเลท รองลงมา คือ *A. niger* 23 ไอโซเลท และ *A. fumigatus* 12 ไอโซเลท ในขณะที่ *A. ochraceus* และ *A. terreus* พบเท่ากันจำนวน 3 ไอโซเลท ส่วน *A. japonicus* และ *Aspergillus* sp. พบชนิดละ 1 ไอโซเลท (Table 1) โดยการจัดจำแนกชนิดเชื้อรา *Aspergillus* spp. จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ สี และลักษณะโคโลนี ตลอดจนโครงสร้างของเชื้อราใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่มีลักษณะรูปร่าง และขนาดที่แตกต่างกัน โดยพบว่าราที่สร้าง conidial head แบบกลม (radiate) ได้แก่ *A. japonicus*, *A. niger* และ *A. ochraceus* ในขณะที่ conidial head แบบแท่ง (columnar) พบในรา *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus* และ *Aspergillus* sp. เชื้อรา *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. terreus* และ *Aspergillus* sp. มีการสร้าง metulae และ phialide เป็นแบบ biserial *Aspergillus* ส่วนเชื้อรา *A. fumigatus* และ *A. japonicus* เป็นแบบ uniseriate *Aspergillus* เชื้อรา *A. flavus*, *A. terreus* และ *Aspergillus* sp. มีการสร้าง conidium รูปร่างกลมผิวเรียบ ส่วนเชื้อรา *A. fumigatus*, *A. japonicus*, *A. niger* และ *A. ochraceus* สร้าง conidium รูปร่างค่อนข้างกลมและมีผิวขรุขระ (Figure 2) พบเชื้อรา *A. flavus* (KUFC10266, 10269, 10277 และ 10284) และ *A. ochraceus* (KUFC10327) ที่มีการสร้างสเคอโรเทียม (sclerotium) ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน (Table 2)

Table 2 Macroscopic characteristics of *Aspergillus* spp. isolated from agricultural products on PDA incubated at 28 °C for 14 days

Fungal species	KUFC number	Source	Morphological characteristics of sclerotium on PDA	
<i>A. flavus</i>	10266	boiled peanut	Sclerotia produced in 4–5 days, globose or nearly, pale brown to dark brown, smooth and thicken wall, 1.0–1.2 mm in diameter.	
<i>A. flavus</i>	10269	white pepper	Sclerotia produced in 6–7 days, globose or oval, pale brown, smooth and thicken wall and quite hard, 1.0–1.5 mm in diameter.	
<i>A. flavus</i>	10277	coffee	White to pale yellow sclerotia are produced in middle colony in 14–15 days, smooth wall 1.0–2.0 mm in diameter.	
<i>A. flavus</i>	10284	black pepper	Sclerotia produced with exudates around in 6–7 days, globose to subglobose, white to cream, smooth and thicken wall, 1.0–1.5 mm in diameter.	
<i>A. ochraceus</i>	10327	paddy	Sclerotia produced with exudates around in 3–5 days, globose to subglobose, pinkish, smooth and thicken wall and quite hard, 1.0–1.2 mm in diameter.	

และเมื่อพิจารณาจากแหล่งที่พบการปนเปื้อนของเชื้อรา พบว่าสามารถแยกเชื้อราปนเปื้อนได้จากเมล็ดธัญพืชมากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเมล็ดถั่วลิสงประเภทต่าง ๆ ได้แก่ เมล็ดถั่วลิสงคั่ว ถั่วลิสงคั่วกระเพาะเปลือก ถั่วลิสงคั่วบด และถั่วลิสงต้ม นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อราปนเปื้อนได้จากอาหาร และ ดินที่เพาะปลูกพืชชนิดต่าง ๆ

(Table 1) จากผลการทดลองพบเชื้อราเพียง 5 ไอโซเลท คือ *A. flavus* (KUFC10266, 10269, 10277) และ 10284 และเชื้อรา *A. ochraceus* (KUFC10327) ที่มีการสร้างโครงสร้างสเคอโรเทียม โดยมีรูปร่าง ลักษณะ สี และขนาดที่แตกต่างกัน (Table 2) ส่วนเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* spp. สามารถแยกได้รวม 8 ไอโซเลท ได้แก่ *P. oxalicum*

จากพริกหยวกเหลือง 1 ไอโซเลท *P. verrucosum* 3 ไอโซเลท แยกได้จากข้าวโพดต้ม พริกป่น และผงออริกาน *Penicillium* sp.1 ได้ 1 ไอโซเลท และ *Penicillium* sp.2 ได้ 3 ไอโซเลท ซึ่งจากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ได้จากการทดลอง ยังไม่สามารถจัดจำแนกสปีชีส์ได้ (Table1)

เชื้อรา *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. มีรายงานว่าสามารถพบปนเปื้อนได้ทั่วไปเจริญได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิอบอุ่นและความชื้นสูง โดยเฉพาะในประเทศเขตร้อนและเขตอบอุ่น

(Samson *et al.*, 2007) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารจำพวกถั่วลิสง เนยถั่วลิสง ถั่วลิสงป่น กากถั่วลิสง น้ำมันถั่วลิสง พริกป่น พริกไทย ข้าว ข้าวโพด และเมล็ดธัญพืชต่าง ๆ (Ginting and Rahmianna, 2014; Marin *et al.*, 2008) และจากการวิเคราะห์ตัวอย่างดินในแปลงปลูกพืช และดินที่ไม่ได้ทำการเกษตร จำนวน 10 จังหวัดในประเทศไทยพบว่าทุกตัวอย่างดินพบประชากรเชื้อรา *A. flavus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีรายงานการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินมากที่สุด (Ehrlich *et al.*, 2007)

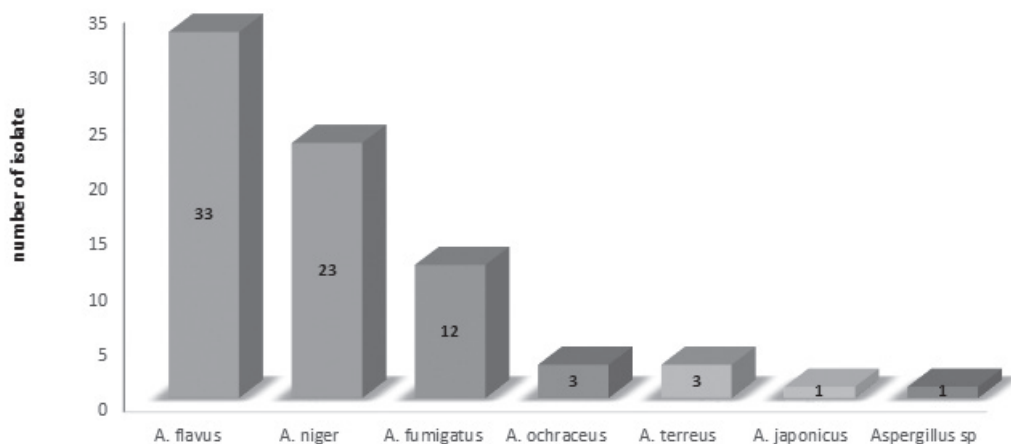


Figure 2 Number of contaminated *Aspergillus* species isolated from various agricultural products and cultivated soil

อย่างไรก็ตามเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. อื่นๆ ก็มีรายงานการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ตัวอย่างเช่น *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. ruber*, *A. wentii*, *P. citrinum*, *P. puberrulum*, *P. variable* และ *Rhizopus* spp. (Goldblatt, 1968) เชื้อรากลุ่มนี้ทำให้มนุษย์และสัตว์ก่อโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินหายใจ เนื่องจากการได้รับสปอร์ของเชื้อราเข้าสู่ร่างกาย และที่สำคัญคือเป็นสาเหตุของโรคมะเร็งในอวัยวะต่าง ๆ เนื่องจากเชื้อรากลุ่มนี้สามารถสร้างสารพิษได้หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารพิษอะฟลาทอกซิน ปี1(de Hoog and Guarro, 1995;

Pitt and Hocking, 1997) มีการรายงานว่าพบเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* หลายชนิด เช่น เชื้อรา *A. fumigatus* ปนเปื้อนในอาหาร และในอาคารบ้านเรือน ซึ่งเป็นสาเหตุโรค aspergillosis ในมนุษย์และสัตว์ ทำลายระบบทางเดินอาหารและเป็นสาเหตุของโรคปอดและโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ เชื้อรา *A. niger* เป็นเชื้อราที่สร้างสารพิษโอคราทอกซิน (ochratoxin) ในองุ่นและโกโก้ และสร้างสารพิษฟูโมนิซิน (fumonisin) ในเมล็ดคากาแฟ (Samson *et al.*, 2007) และเชื้อรา *A. ochraceus* สร้างสารพิษโอคราทอกซินเอ (ochratoxin A) ซึ่งเป็นพิษกับมนุษย์และสัตว์และเป็นสาเหตุโรค antromycosis (de Hoog and Guarro, 1995)

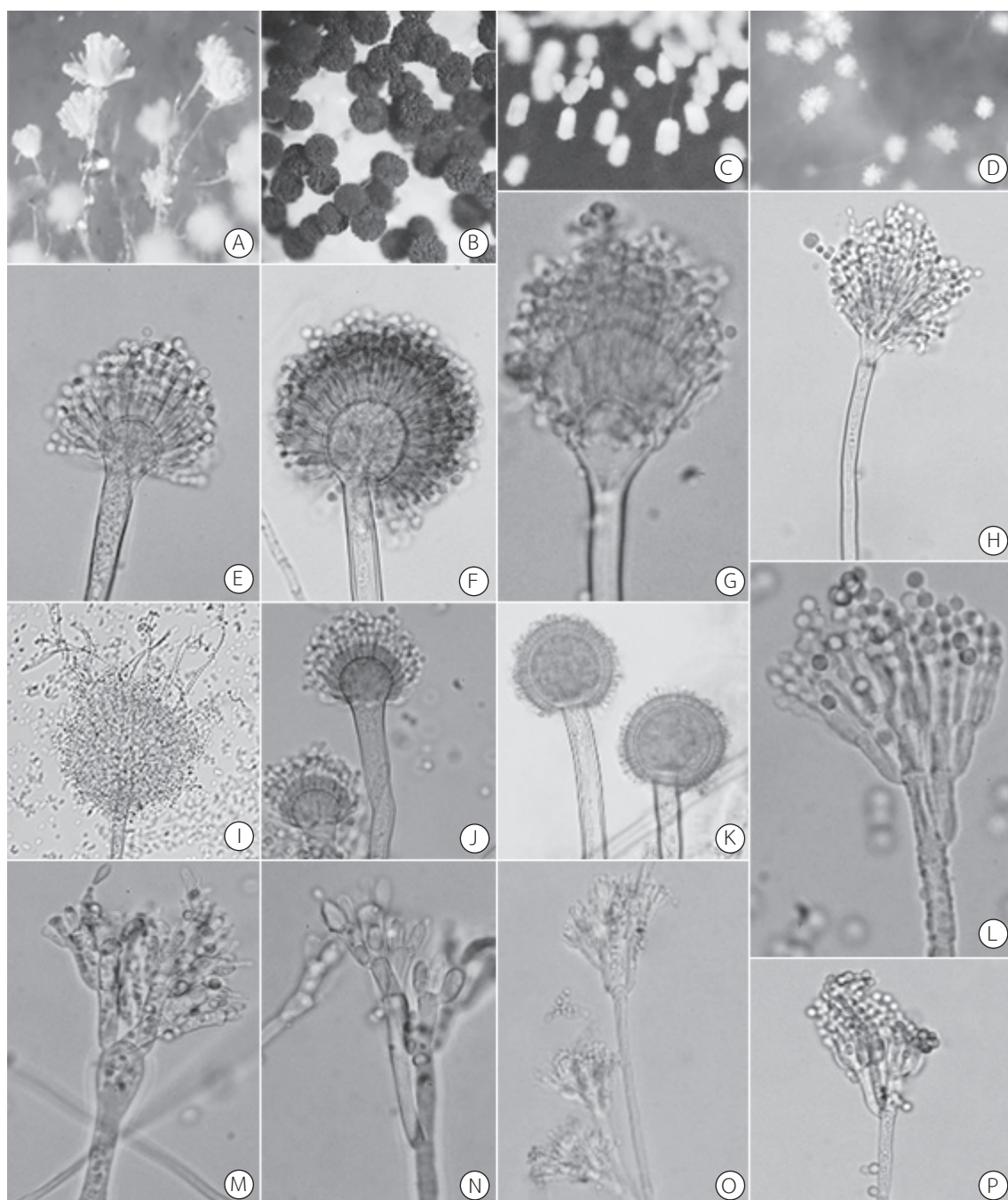


Figure 3 Microscopic characters of *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. under stereo (A-D) and compound (E-P) microscopes showing conidial head, conidiophores and conidia: *A. flavus* (A, E), *A. niger* (B, F), *A. terreus* (C, G), *Aspergillus* sp. (D, H), *A. ochraceus* (I), *A. fumigatus* (J), *A. japonicus* (K), *P. verrucosum* (L), *Penicillium* sp.1 (M, N), *Penicillium* sp.2 (O), *P. verrucosum* (P)

2. ปริมาณสารพิษอะฟลาท็อกซิน ปี1 จากเชื้อราปนเปื้อน

คัดเลือกเชื้อราที่แตกต่างกันจำนวน 19 ไอโซเลท ได้แก่ *Aspergillus* spp. 15 ไอโซเลท และ *Penicillium* spp. 4 ไอโซเลท (Table 3) โดยพิจารณาจากชนิดของเชื้อรา ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การสร้างโครงสร้างสเคอโรเทียม (Table 2) ตลอดจนแหล่งที่พบการปนเปื้อน นำมาตรวจวิเคราะห์สารพิษอะฟลาท็อกซิน ปี1 พบว่า เชื้อรา *A. flavus* สามารถสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน ปี1 ได้ในปริมาณมากกว่าเชื้อราชนิดอื่น โดยพบว่า เชื้อรา *A. flavus* จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ KUFC10266, 10268, 10272, 10277, 10280 และ 10284 มีการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน ปี1 ในปริมาณมากกว่า 40 ppb โดยเป็นเชื้อราที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรต่าง ๆ (Table 3) ส่วนเชื้อรา *A. fumigatus* (KUFC10302) ที่แยกได้จากเมล็ดแมงลัก และ *A. ochraceus* (KUFC10327) ที่แยกได้จากเมล็ดข้าว พบปริมาณสารพิษอะฟลาท็อกซิน ปี1 เท่ากับ 4 ppb ในขณะที่เชื้อราชนิดอื่นที่แยกได้พบปริมาณการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน ปี1 น้อยกว่า 4 ppb (Table 3)

เชื้อรา *A. flavus* ไอโซเลทที่พบการสร้างโครงสร้างสเคอโรเทียมส่วนใหญ่พบการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน ปี1 ที่มีปริมาณสูงมาก ได้แก่ *A. flavus* KUFC10266, 10277 และ 10284 พบปริมาณสาร เท่ากับ 186.2, 163.7 และ 134.9 ppb ตามลำดับ ยกเว้นเชื้อรา *A. flavus* (KUFC10269) ที่พบมีการ

สร้างสเคอโรเทียมเช่นกัน แต่ตรวจพบปริมาณสารพิษอะฟลาท็อกซิน ปี1 ได้น้อยกว่า 4 ppb ทั้งนี้ Maggon *et al.* (1969) และ Mehan and Chohan (1973) รายงานว่าเชื้อรา *A. flavus* ที่มีการสร้างสเคอโรเทียมเป็นจำนวนมากจะสามารถผลิตสารพิษอะฟลาท็อกซิน ปี1 ได้ในปริมาณสูง แต่จากผลการทดลองนี้พบว่า เชื้อรา *A. flavus* (KUFC10272, 10268 และ 10280) ไม่พบการสร้างสเคอโรเทียม ก็สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษได้ที่ระดับสูงมากเช่นกัน โดยพบปริมาณสาร เท่ากับ 186.3, 143.3 และ 120.0 ppb ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mehan *et al.* (1995) ซึ่งได้ศึกษาประสิทธิภาพการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน ของเชื้อรา *A. flavus* จากดินปลูกถั่วลิสงในประเทศอินเดีย และรายงานว่ามีปริมาณของสเคอโรเทียมไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารพิษอะฟลาท็อกซินที่เชื้อราสร้างขึ้น และถึงแม้ว่าเชื้อราบางชนิดจะไม่พบการสร้างสเคอโรเทียมแต่ก็พบว่าเชื้อรามีการสร้างสารพิษอยู่ในระดับสูงได้ (Okoth *et al.*, 2016) อย่างไรก็ตามปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับปริมาณของสารพิษและการสร้างสเคอโรเทียมของเชื้อรา *A. flavus* นั้นขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่าง และแหล่งอาหารของเชื้อรา ได้แก่ ปริมาณสารโซเดียมไนเตรตแอมโมเนียมซัลเฟต และแหล่งไนโตรเจน มีรายงานว่าเมื่อผสมสารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อราสามารถสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน ได้ในปริมาณมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมโซเดียมไนเตรต (Cotty, 1988)

Table 3 Source of *Aspergillus* and *Penicillium* isolates and their sclerotia and aflatoxin B1 production

Fungal species	KUFC	Source	Sclerotial Production (+/-)	Aflatoxin B1 (ppb)
<i>A. flavus</i>	102661*	boiled peanuts	+	186.2
<i>A. flavus</i>	102841*	black pepper	+	134.9
<i>A. flavus</i>	10268	hairy basil seed	-	143.3
<i>A. flavus</i>	102691*	white pepper	+	2.9
<i>A. flavus</i>	10280	bread	-	120.0
<i>A. flavus</i>	102771*	coffee	+	163.7
<i>A. flavus</i>	10279	dried chilli	-	2.9
<i>A. flavus</i>	10272	job's tears	-	186.3
<i>A. fumigatus</i>	10302	hairy basil seed	-	4.2
<i>A. japonicus</i>	10303	peanut	-	2.2
<i>A. niger</i>	10308	peanut	-	1.9
<i>A. niger</i>	10325	hairy basil seed	-	2.0
<i>A. ochraceus</i>	103271*	paddy	+	4.1
<i>A. terreus</i>	10330	soil from peanut crop	-	2.1
<i>Aspergillus</i> sp.	10333	soil from macadamia crop	-	1.4
<i>P. oxalicum</i>	10355	sweet pepper	-	3.0
<i>P. verrucosum</i>	10356	pepper	-	1.6
<i>Penicillium</i> sp.1	10354	shallot	-	3.0
<i>Penicillium</i> sp.2	10360	soil from macadamia crop	-	2.8

* = species forming sclerotia

สรุป

จากการทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus* และ *Penicillium* ในอาหาร ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร และดินที่ทำการเกษตร จำนวน 47 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus* spp. มากที่สุดจำนวน 76 ไอโซเลต จำแนกชนิดได้ 7 species ได้แก่ *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. terreus* และ *Aspergillus* sp. และพบเชื้อรา *Penicillium* spp. จำนวน 8 ไอโซเลต จำแนกชนิดได้ 4 species ได้แก่ *P. oxalicum*, *P. verrucosum*, *Penicillium* sp.1 และ *Penicillium* sp.2 โดยแยกเชื้อราได้จากเมล็ดธัญพืชมากที่สุด รองลงมาคือ อาหาร และดินในแปลงเพาะปลูกพืชโดยเชื้อรา *A. flavus* KUFC10266, 10284, 10269 และ

10277 และ *A. ochraceus* KUFC10327 มีการสร้างโครงสร้างสเคอโรเทียม ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน ผลการตรวจวิเคราะห์สารพิษอะฟลาท็อกซินปี1 โดยวิธี Enzyme-Linked immunosorbent assay พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* จำนวน 9 ไอโซเลต และ *Penicillium* จำนวน 4 ไอโซเลต สร้างสารพิษน้อยกว่า 4 ppb ในขณะที่เชื้อรา *A. flavus* จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ KUFC10266, 10268, 10272, 10277, 10280 และ 10284 สามารถสร้างสารพิษได้มากกว่า 40 ppb ซึ่งเป็นปริมาณที่เกินค่ามาตรฐานประเทศไทยกำหนด และพบว่าการสร้างโครงสร้างสเคอโรเทียมของเชื้อรา *A. flavus* ตลอดจนถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสเคอโรเทียมที่แตกต่างกัน ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน ปี1 ของเชื้อรา

เอกสารอ้างอิง

- Abbas, H.K., W.T. Shier, B.W. Horn and M.A. Weaver. 2004. Cultural methods for aflatoxin detection. J. Toxicol. 23(2-3): 295-315.
- Barron, G.L. 1968. The Genera of Hyphomycetes from Soil. Waverly Press, Inc., USA.
- Chinaputi, A. 2012. Mycotoxin producing fungi, p. 91-98. In O. Piasai, Editor. Thai fungal database. Biodiversity based economy development (Public Organization), Bangkok.
- Cotty, P.J. 1988. Aflatoxin and sclerotium production by *Aspergillus flavus* influence of pH. Phytopathology 78: 1250-1253.
- De Hoog, G.S. and J. Guarro. 1995. Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn and Delft, The Netherlands.
- Ehrlich, K.C., K. Kobbeman, B.G. Montabano and P.J. Cotty. 2007. Aflatoxin producing *Aspergillus* sp. from Thailand. Int. J. Food Microbiol. 114: 153-159.
- Ginting, E. and A.A. Rahmianna. 2014. Infection of *Aspergillus flavus* and physical quality of peanut collected from farmers. Procedia Food Sci. 3: 280-288.
- Goldblatt, L.A. 1968. Aflatoxin and its control. Econ. Bot. 22(1): 51-62.
- Klich, M.A. 2002. Identification of common *Aspergillus* specie. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht. The Netherlands.
- Maggon, K.K., L. Viswanathan and T.A. Venkitasubramanian. 1969. Aflatoxin production by some Indian stains of *Aspergillus flavus* Link ex Fries. J. Gen. Microbiol. 59: 119-124.
- Marin, S., C. Colom, V. Sanchis and A.J. Ramos. 2008. Modelling of growth of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolations from red chilli powder as a function of water availability. Int. J. Food Microbiol. 128(3): 491-496.
- Mehan, V.K. and J.S. Chohan. 1973. Aflatoxin B1 producing potential of isolates of *Aspergillus flavus* Link ex Fries from cotton, maize and wheat. Mycopathol. Mycol. Appl. 49: 263-274.
- Mehan, V.K., S.V. Reddy, S. Nahdi, D. McDonald and S. Jayanthi. 1995. Aflatoxin potential of strains of *A. flavus* from groundnut fields in different soil types. IAN 15(1): 42-43.
- Okoth, S.A., B. Nyongesa, V. Joutsjoki, H. Korhonen, V. Ayugi, E.K. Kong' ethe. 2016. Sclerotia formation and toxin production in large sclerotial *Aspergillus flavus* isolates from Kenya. Adv. Microbiol. 6: 47-56.
- Pitt, J.I. and A.D. Hocking. 1997. Fungi and Food Spoilage. Academic Press, New Sydney. 593 p.
- Poapolathep, A. 2012. Mycotoxins. p. 99-93. In O. Piasai, Editor. Thai fungal database. Biodiversity based economy development (Public Organization), Bangkok.
- Raper, K.B. and D.I. Fennell. 1965. The Genus *Aspergillus*. The William & Wilkins Company: Baltimore.
- Samson, R.A., E.S. Hoekstra and C.A.N. van Oorschot. 2002. Introduction to Food-Borne Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Samson, M.R., S. Hong, S.W. Peterson, J.C. Frisvad and J. Varga. 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. Stud. Mycol. 59: 147-203.
- Warcup, J.H. 1950. The soil-plate method for isolation of fungi from soil. Nature. 166: 117-118.