การยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของ *Aspergillus flavus* โดยเชื้อแอคติโนมัยซีส

INHIBITION OF AFLATOXIN PRODUCTION IN *Aspergillus flavus* BY ACTINOMYCETES

มัทนี สีมา และ วิญญู ภักดี

Matthanee Seema and Winyou Puckdee

หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี เมือง จันทบุรี 22000

Division of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University, Muang, Chanthaburi 22000

บทคัดย่อ

อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่ถูกสร้างจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในการวิจัยนี้ได้ทำการตรวจวัดการสร้างสารดังกล่าวด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 365 nm พบว่ามีการผลิตได้สูงที่สุดในวันที่ 30 และให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น 2.72 ± 0.16 ทำให้ได้ค่า sub-optimum ของการสร้างอะฟลาทอกซิน (OD) เป็น 1.36 ในวันที่ 22 ของการเลี้ยง จากนั้นทำการทดสอบการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินด้วยเชื้อแอคติโน-มัยซิสจำนวน 63 ไอโซเลท ที่แยกได้จากพื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี พบจำนวน 11 ไอโซเลท ที่ยับยั้งได้โดยเชื้อแอคติโนมัยซีสรหัส B401 ยับยั้งได้มากที่สุด นอกจากนั้นยังได้นำทั้ง 11 ไอโซเลท มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. flavus* ด้วยวิธีขีดขวาง พบว่ายับยั้งได้ 5 ไอโซเลท โดยเชื้อแอคติโนมัยซีสรหัส E308-1 ยับยั้งได้มากที่สุด และเชื้อรหัส B401 ยับยั้งได้เป็นลำดับที่ 2 จากการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาพบว่าเชื้อรหัส E308-1 มีความคล้ายกับเชื้อ *Pseudonocardia* sp. ขณะที่อีก 4 ไอโซเลทไม่สามารถจัดจำแนกได้

ABSTRACT

Aflatoxin which is produced from *Aspergillus flavus* was tested by optical density (OD) method at 365 nm wave length. The results of this research showed that OD maximum of produced aflatoxin substance was 2.72 ± 0.16 with 30 days of culture time and sub-optimum OD was 1.36 and associated with about 22 days. Inhibition of the produced aflatoxin was tested from 63 isolates of actinomycetes collected from Plant Genetic Conservation Project area, Rambhai Barni Rajabhat University. It was found that eleven of sixty-three isolates inhibited aflatoxin production, and isolate no. B401 showed the best inhibition, as compared to that of the others isolates. In addition, 11 isolates of actinomycetes were also performed for inhibition of *A. flavus* by cross streak method. It was found that such *A. flavus* was inhibited with from 5 isolates of actinomycetes and isolate no. E308-1 was showing the maximum inhibition. In morphological characterization of 5 isolates, E308-1 was similar to *Pseudonocardia* sp., while the other 4 strains were unidentified.

คำสำคัญ : แอสเปอร์จิลลัส ฟลาวัส, แอคติโนมัยซีส, อะฟลาทอกซิน, ค่าการดูดกลืนแสง

Keywords : *Aspergillus flavus*, Actinomycetes, Aflatoxin, Optical density

*ติดต่อนักวิจัย: วิญญู ภักดี (อีเมล์: winp90@gmail.com)

*Corresponding author: Winyou Puckdee (Email: winp90@gmail.com)

บทนำ

เชื้อรา *A. flavus* เป็นเชื้อราที่พบได้ทั่วไป อยู่ได้ในที่ที่มีความชื้นไม่มากและในสภาพที่เป็นกรดอ่อนๆ จึงมักพบอยู่ได้ทั่วไป สามารถก่อโรคได้หลายรูปแบบ เช่น allergic aspergillosis, aspergilloma, invasive aspergillosis และ otomycosis (นงนุช, 2540) และที่สำคัญคือ ราชนิดนี้สามารถสร้างสารพิษที่ชื่อว่า aflatoxin โดยเมื่อได้รับและมีการสะสมเป็นระยะเวลานานอาจทำให้เป็นสาเหตุของโรคตับและมะเร็งตับได้ในที่สุด สาร aflatoxin สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่นในช่วง 365-450 nm (อนงค์, 2546) นอกจากนี้เชื้อรา *A. flavus* ยังเป็นปัญหากับพืชเศรษฐกิจอีกด้วย โดยเฉพาะพืชจำพวกถั่วเพราะเชื้อราจะเจริญบนเมล็ดถั่วและปลดปล่อยสารพิษ aflatoxin ออกมาและสะสมอยู่ในเมล็ดถั่วนั้น ซึ่งตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดไว้ว่าต้องมี aflatoxin ปนเปื้อนอยู่ในอาหารได้ไม่เกิน 20 μg ต่ออาหาร 1 kg หรือไม่เกิน 20 ppb (กระทรวงสาธารณสุข, 2529) ดังนั้นด้วยสภาพภูมิอากาศในประเทศไทยที่มีความชื้นสูง และอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา จึงเป็นการยากในการควบคุมการปนเปื้อนของราชนิดนี้ ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีสเป็นเชื้อแบคทีเรียมีลักษณะเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อรา แต่มีขนาดเล็กกว่ามักพบอาศัยอยู่ในดิน เชื้อชนิดนี้มีรายงานการสร้างสารต้านจุลชีพได้ ซึ่งเป็นสาร secondary metabolite ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของเชื้อนั้นๆ จากหลายๆ รายงานก่อนหน้านี้ พบว่าสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สามารถยับยั้งการเจริญของทั้งเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ฯลฯ (Okay, 2004) หรือเชื้อรา เช่น *Candida albicans*, *Phytopthera* sp. (รัตนาภรณ์, 2541; Park, 2002) และ *A. flavus* (อุษณีย์ และ วิญญู; 2009) ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงมีแนวคิดในการแยกและใช้เชื้อแอคติโนมัยซีสในการยับยั้งและควบคุมการสร้างสาร aflatoxin ของเชื้อ *A. flavus*

จุดประสงค์ของการทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาการสร้างสาร aflatoxin ของเชื้อ *A. flavus* และทดสอบความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินในป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี ในการยับยั้งการสร้างสาร afltoxin ของเชื้อรา *A. flavus*

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

<u>1. ตรวจวัดการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อ *A. flavus* ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 365 nm</u> เลี้ยงเชื้อ *A. flavus* บนอาหาร Czapek's Dox agar พร้อมกับเชื้อควบคุมที่มีลักษณะคล้ายกันคือ *A. oryzae* เมื่อครบ 3 วัน หรือจนเชื้อเจริญพร้อมทดลอง ทำการเจาะด้วย cork borer โดยเจาะเอาเชื้อพร้อมเนื้ออาหารบริเวณตรงกึ่งกลางระหว่างกลางโคโลนีและขอบโคโลนีใส่ถุง ทำการบดเนื้ออาหารที่มีเชื้อให้ละเอียดทั้ง 2 ชนิด แล้วเติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 2 ml นำของเหลวที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 365 nm ทำการทดลองทุกวันจนกว่าค่า OD ของเชื้อ *A. flavus* อยู่ในช่วง stationary phase และ decline phase (ทำ 3 ซ้ำ)

2. การเก็บตัวอย่างดิน ทำการสุ่มเก็บในพื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี จำนวน 10 จุดๆ ละ 5 ตัวอย่าง โดยตักดินที่อยู่ลึก 3-5 เซนติเมตร เก็บใส่ถุงพลาสติกเพื่อนำไปแยกเชื้อต่อไป

3. การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากดิน ทำการวัดค่า pH ของดินแต่ละตัวอย่างและแบ่งเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 อบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และส่วนที่สองอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ทั้งสองส่วน แล้วทำการเจือจางเป็นลำดับ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) ด้วย 0.85% normal saline จากนั้นทำการ spread plate โดยถ่ายสารละลายของดินที่อบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเข้มข้นที่ 10^{-3} และส่วนที่อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ใช้ความเข้มข้นที่ 10^{-2} ตัวอย่างละ 0.1 ml ลงบนอาหาร starch casein agar (SCA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นโดยพิจารณาจากโคโลนีที่ทึบแสง ผิวและขอบขรุขระ สีมีทั้งเทา เขียว ชมพู แดง ส้ม หรือเหลืองและลักษณะของโคโลนีที่ปุยคล้ายกำมะหยี่ แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และทำการย้อมแกรม เพื่อดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเชื้อที่มีลักษณะเป็นเส้นใย หรือเลือกที่มีลักษณะของ actinomycetes เก็บเชื้อที่ได้ในอาหาร tryptic soy agar (TSA) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาต่อไป

4. การยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อ *A. flavus* โดยแอคติโนมัยซีสด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. flavus* ในอาหาร Czapek's Dox agar บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 19 วัน และเริ่มเลี้ยงเชื้อ actinomycetes ในวันที่ 14 ของการเลี้ยงเชื้อ *A. flavus* บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ทำการเจาะเชื้อ *A. flavus* ในวันที่ 19 บริเวณตรงกลาง โคโลนีด้วย cork borer นำไปวัดค่า OD โดยทำเช่นเดียวกับข้อ 1 จะได้เป็นค่าก่อนการยับยั้ง เจาะเชื้อแอคติโนมัยซีสที่เลี้ยงครบ 5 วัน ด้วย cork borer นำมาใส่ตรงกลางโคโลนีของเชื้อ *A. flavus* แทนที่ตำแหน่งที่ถูกเจาะออกไป เลี้ยงเชื้อที่อยู่ร่วมกันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และนำเชื้อ *A. flavus* ที่เลี้ยงครบ 22 วัน มาเจาะด้วย cork borer 2 จุดต่อ 1 เพลท นำไปวัดค่า OD โดยทำเช่นเดียวกับข้อ 1 จะได้เป็นค่าหลังการยับยั้ง (ทำ 3 ซ้ำ) เปรียบเทียบค่า OD ที่ได้ก่อนและหลังการยับยั้ง

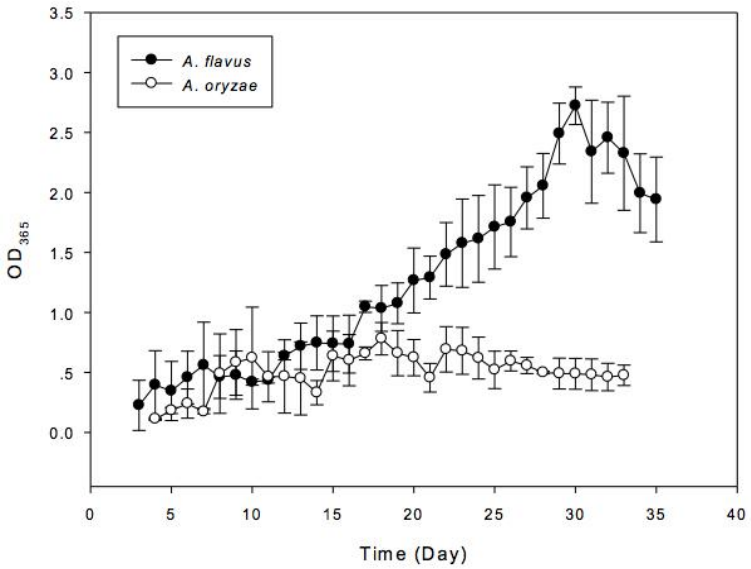
5. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* โดยวิธี cross streak method ทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสโดยการ streak ลงบนอาหาร Muller Hinton (MH) agar ให้ชิดขอบจานเพาะเชื้อให้ได้ขนาดพื้นที่เป็น 1 ใน 4 ส่วนของจานเพาะเชื้อ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เตรียมเชื้อ *A. flavus* ใน potato dextrose broth (PDB) บ่มที่อุญหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อที่ใหม่และพร้อมต่อการทดลอง แล้วใช้ไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อชุบในเชื้อทดสอบแล้วขีดตั้งฉาก และห่างจากรอยขีดของเชื้อแอคติโนมัยซีสเดิม 1 mm แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการยับยั้งของเชื้อทดสอบ ศึกษาลักษณะและสัณฐานวิทยาของเชื้อ actinomycetes โดยดูการสร้างสีโคโลนีของเชื้อบนอาหาร SCA ภายหลังบ่มนาน 14 วัน ลักษณะเส้นใยและสปอร์จาก cover slide culture

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

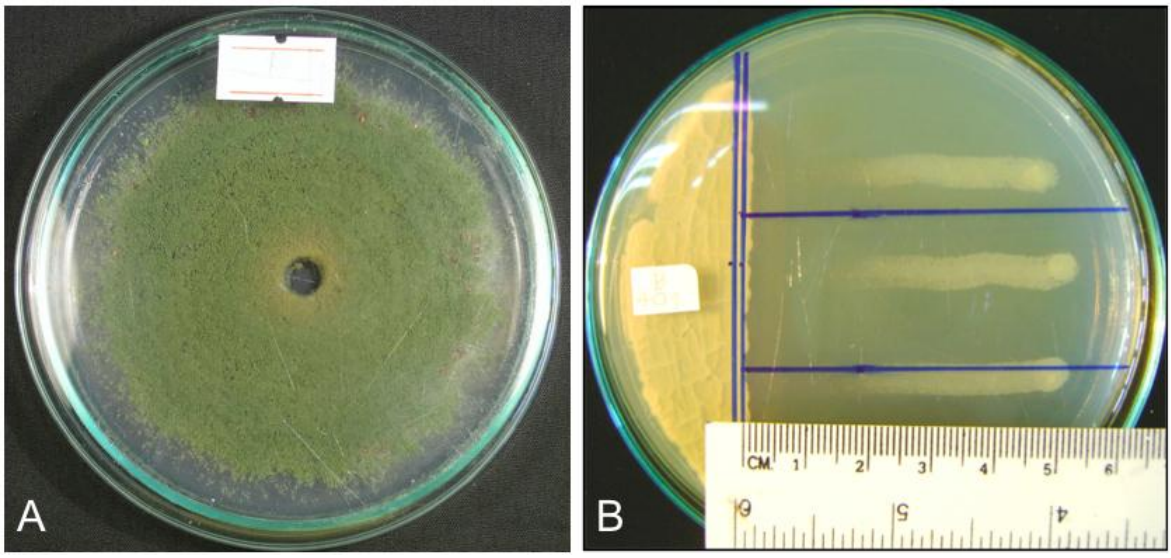
1. การสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ที่วัดด้วยวิธีการวัดค่า OD จากการเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* พร้อมกับเชื้อควบคุมคือ *A. oryzae* ในอาหาร Czapek Dox agar พบว่าเชื้อราผลิตสารอะฟลาทอกซินสูงสุด ในวันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยงโดยให้ค่า OD เท่ากับ 2.72 ± 0.16 ที่ความยาวคลื่น 365 nm และในวันที่ 22 ของการเพาะเลี้ยงได้ค่า OD เท่ากับ 1.48 ± 0.26 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่เป็นครึ่งหนึ่ง (sub-optimum) ของค่า OD สูงสุด คือ 1.36 ส่วนเชื้อรา *A. oryzae* ได้ค่า OD สูงสุดเป็น 0.781 ± 0.13 ในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในกราฟที่ 1

2. ผลการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อ *A. flavus* โดยเชื้อแอคติโนมัยซีส จากการเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* คู่กับเชื้อแอคติโนมัยซีสเป็นเวลา 3 วัน จนอายุของเชื้อ *A. flavus* ครบ 22 วัน พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 11 isolates จากทั้งหมด 63 isolates ที่สามารถยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อ *A. flavus* ได้เนื่องจากให้ค่า OD ที่ต่ำกว่าค่า OD ของ sub-optimum ได้แก่เชื้อรหัส B401, H308, D301, H309, H321, C402, H409, B303-3, E308-1, G401 และ G309 ซึ่งยับยั้งได้สูงสุดไปจนถึงต่ำสุดตามลำดับ โดยแอคติโนมัยซีสที่เหลือจำนวน 52 isolates ให้ผลการกระตุ้นการสร้างสารอะฟลาทอกซินเนื่องจากค่า OD ที่วัดได้มีค่าสูงกว่าค่า OD ของ sub-optimum

3. การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีส โดยวิธี cross streak method เชื้อแอคติโนมัยซีสที่ให้ผลยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินทั้ง 11 isolates เมื่อนำมาทำการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. flavus* ด้วยวิธี cross streak พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 5 isolates ที่ยับยั้งได้ อันได้แก่ E308-1, B401, C402, G309 และ H321 ซึ่งยับยั้งได้ 42.00 ± 4.04, 18.00 ± 0.00, 5.30 ± 0.58, 2.50 ± 0.50 และ 0.90 ± 0.79 mm ตามลำดับ โดยเมื่อศึกษาทางสัณฐานวิทยาพบว่าเชื้อ รหัส E308-1 มีความคล้ายกับเชื้อ *Pseudonocardia* sp. คือ โคโลนีมีลักษณะคล้ายผง มีสีเหลือง เส้นใย เป็นโซ่ยาวหยัก มีการแตกแขนงมาก เส้นใยใต้ผิวอาหารและเหนือผิวอาหารมีสีน้ำตาล-เหลือง เส้นใยมีการสร้างผนังกั้น และลักษณะของสปอร์เป็นปล้องหรือท่อน ขณะที่อีก 4 isolates ไม่สามารถจัดจำแนกได้



ภาพที่ 1 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงจากการสร้างสารอะฟลาทอกซินในเชื้อ *A. flavus* และ *A. oryzae*



ภาพที่ 2 A โคโลนีของเชื้อ *A. flavus* อายุ 19 วัน บนอาหาร Czapek's Dox agar, B การยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* โดยเชื้อแอคติโนมัยซีสรหัส B401

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบการผลิตสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร พบว่าเชื้อราผลิตสารอะฟลาทอกซินสูงสุด (maximum) ได้ค่า OD เท่ากับ 2.72 ในวันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง และค่า OD ครึ่งหนึ่ง (sub-optimum) เท่ากับ 1.361 ซึ่งจะใกล้เคียงกับวันที่ 22 ของการเพาะเลี้ยง และทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินโดยเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากพื้นที่ป่าอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จำนวนทั้งหมด 63 isolates ด้วยวิธีวัดค่า OD เช่นกัน พบว่ามีแอคติโนมัยซีทจำนวน 11 isolates ที่สามารถยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินได้ โดยเชื้อรหัส B401 ยับยั้งได้สูงสุด และเมื่อนำแอคติโนมัยซีททั้ง 11 isolates มาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. flavus* ด้วยวิธี cross streak พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 5 isolates ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังกล่าวได้ โดยเชื้อรหัส E308-1 ยับยั้งได้สูงสุดขณะที่เชื้อรหัส B401 ยับยั้งได้เป็นลำดับที่ 2 และเมื่อตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 5 isolates พบว่ามีลักษณะคล้าย *Pseudonocardia* sp. 1 isolates คือแอคติโนมัยซีทรหัส E308-1 ส่วนอีก 4 isolates ไม่สามารถจัดจำแนกได้

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี และโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงสาธารณสุข. **มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน**. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข 21 ม.ค. 2529 [cited 2011 Apr 29]; (98): [1 screen]. Available from: URL: http://www.fda.moph.go.th/fda-net/html/product/food/ntfmoph/ntf098.htm.

นงนุช วณิตย์ธนาคม. 2540. **วิทยาเชื้อราการแพทย์**. พี.บี. ฟอเรนบุ๊คส์เซ็นเตอร์. กรุงเทพฯ.

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์. 2541. การเก็บรวบรวมและการตรวจหา แอคติโนมัยซีส จากดินป่าชายเลนที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลชีพ. **วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา**. 6(1): 23-33.

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์. 2549. **แอคติโนมัยซีท**. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลมหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี.

อนงค์ บิณฑวิหค. 2546. **สารพิษจากเชื้อรา : อะฟลาทอกซิน**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อุษณีย์ ศรณรินทร์ และวิญญู ภักดี. 2550. การยับยั้ง *Aspergillus flavus* โดยเชื้อแอคติโนมัยซีส. น. 310 – 313. **การประชุมวิชาการทรัพยากรไทย: ประโยชน์แท้แก่มหาชน**. ชลบุรี.

Lukic, A., Welty, R.E. and Lucus, G.B. 1972. Antifungal spectra of actinomycetes isolated from Tobacco. **Antimicrob. Agents Chemother.** 1(4): 363-365.

Oskay, M., Tamer, A.U. and Azeri, C. 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. **Afr. J. Biotechnol.** 3(9): 441-446.

Park, J.O., El-Tarabily, K.A., Ghisalberti, E.L. and Sivasithamparam, K. 2002. Pathogenesis of *Streptoverticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. **Lett. Appl. Microbiol.** 35: 361-365