รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย :** ระบุชื่อชุดโครงการวิจัยตามแบบ ว1-ก ที่ผ่านการอนุมัติ
2. **โครงการวิจัย :** ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศต่อการสูญเสียผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว

   กิจกรรม: สภาวะการเปลี่ยนแปลงของเชื้อราในการสร้างสารพิษ
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย):** ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* และความสามารถในการสร้างสารพิษในผลิตผลเกษตร

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Effect of Changed Temperature Water Stress and Carbon dioxide Concentrations on *Aspergillus niger* Growth and Mycotoxin Production in Agricultural Commodities
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง: ศุภรา อัคคะสาระกุล

หน่วยงานต้นสังกัด กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

ผู้ร่วมงาน : บุญญวดี จิระวุฒิ

หน่วยงานต้นสังกัด กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

เนตรา สมบูรณ์แก้ว

หน่วยงานต้นสังกัด กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

สุพี วนศิรากุล

หน่วยงานต้นสังกัด กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

5. **บทคัดย่อ**

สภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงไปในปัจจุบันส่งผลกระทบต่อทั้งระบบนิเวศน์ รวมถึงจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการเพาะปลูกพืช รา *Aspergillus niger* จัดเป็นปัญหาหนึ่งที่สำคัญในการเข้าทำลายผลผลิตในโรงเก็บ รวมทั้งสร้างสารพิษโอคราทอกซินซึ่งจัดเป็นสารก่อมะเร็งที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค ดังนั้นการประเมินผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการคาดการณ์ความสามารถในการเจริญ และประสิทธิภาพในการสร้างสาร ochratoxin ของรา *A. niger* ในผลิตผลเกษตร โดยทดสอบการเจริญของเส้นใยบนอาหาร yeast extract sucrose agar (YES agar) เป็นระยะเวลา 10

วัน *A. niger* เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 17-38°C ปริมาณน้ำอิสระ 0.87-0.99 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 300-1,000 ppm และตรวจวิเคราะห์การสร้างสารโอคราทอกซินโดยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ที่ช่วงอุณหภูมิ 30-37°C ระดับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 800-1,000 ppm และ ระดับปริมาณน้ำอิสระ 0.90-0.99 สร้างสารพิษได้ดี โดยสร้างสารโอคราทอกซินมากกว่า 2 ppb แต่ระดับปริมาณน้ำอิสระ 0.75-0.85 รา *A. niger* ไม่สามารถเจริญบนอาหารได้ และในการทดสอบการสร้างสารโอคราทอกซินในเมล็ดกาแฟสารที่สภาพอากาศต่างๆ ที่อุณหภูมิ 15 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 60% รา *A. niger* สร้างสารโอคราทอกซินในเมล็ดกาแฟสารในระดับต่ำ โดยสร้างสารโอคราทอกซิน 0.8-2.6 ppb

Abstract

Nowadays, climate is changing, which may affect to ecological system including to microorganisms for planting. *Aspergillus niger* is an importance problem of damaged storage agricultural products and production ochratoxin which was classified as human carcinogen and harmful for consumption. Therefore, impacts of changed temperature, water stress and carbon dioxide (CO_2) concentrations on *A. niger* were evaluated for advantage information to predict the potential on growth and mycotoxin production by *A. niger* in agricultural products. Mycelium growth of *A. niger* was tested by grown on yeast extract sucrose agar (YES agar) for 10 days. The optimum conditions for *A. niger* growth were temperature 17-38 °C, water activity 0.87-0.99 (a_w) and CO_2 300-1,000 ppm. Moreover, ochratoxin production was tested by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Temperature 30-37 °C, CO_2 800-1,000 ppm and a_w 0.90-0.99 were occurred the appropriate ochratoxin production at the amount more than 2 ppb. Whilst, *A. niger* could not grow on YES agar at a_w level 0.75-0.85. In addition, ochratoxin production in green coffee beans was tested at the different conditions. At 15 °C and relative humidity 60% *A. niger* produced low level of ochratoxin at the amount ranging from 0.8 to 2.6 ppb in green coffee beans.

6. คำนำ

สภาพภูมิอากาศเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการสืบทอดเผ่าพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ ปัจจัยภูมิอากาศ เช่น ปริมาณน้ำฝน การกระจายของน้ำฝน การทิ้งช่วงของฝน พร้อมทั้งอุณหภูมิเฉลี่ย อุณหภูมิสูงสุด-ต่ำสุดที่เกิดขึ้นในที่ใด ๆ มีผลต่อที่อยู่อาศัย ชนิด และประชากรของสิ่งมีชีวิตทั้งสิ้น การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ (climate change) คือ การเปลี่ยนแปลงใดๆ ของอากาศ ซึ่งเกิดขึ้นจากกิจกรรมของมนุษย์ ทั้งทางตรงและทางอ้อม อันทำให้ส่วนประกอบของบรรยากาศโลกเปลี่ยนแปลงไป นอกเหนือจากการเปลี่ยนแปลงโดยธรรมชาติ ในช่วงเวลาเดียวกัน การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศอาจทำให้สิ่งมีชีวิตบางชนิดไม่สามารถปรับตัวได้ ทำให้เกิดแรงกดดันในการเคลื่อนย้ายเพื่อหาที่อยู่อาศัยใหม่ที่เหมาะสม ซึ่งในปัจจุบันอาจมีอุปสรรคจากการขยายตัวของเมืองและการพัฒนาโครงสร้างต่าง ๆ ทำให้สิ่งมีชีวิตหลายชนิดอาจสูญพันธุ์ไปจากที่อยู่อาศัยเดิม หรือ

ในกรณีที่รุนแรงอาจสูญเสียพันธุ์ไปจากโลกโดยไม่อาจคืนกลับได้ (กัณฑรีย์, 2548) สภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในปัจจุบันอันเนื่องมาจากการตัดไม้ทำลายป่า การใช้พลังงานเชื้อเพลิงอย่างสิ้นเปลือง และกิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจกเพิ่มขึ้นในชั้นบรรยากาศ ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศทั่วทุกภูมิภาค และอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อพืชทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนทั่วไปทั้งในแปลงปลูกและโรงเก็บรักษา

ราจัดเป็นจุลินทรีย์ที่มักพบการปนเปื้อนในผลิตผลเกษตร ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการก่อให้เกิดความเสียหายและทำลายคุณภาพผลผลิต นอกจากนี้ราบางชนิดสามารถสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและสัตว์เลี้ยง *Aspergillus niger* เป็นราที่พบทั่วไปในดิน เศษซากพืช และผลิตผลเกษตร สามารถเจริญได้ทั้งในเขตร้อนชื้นและเขตหนาว ซึ่งพบปนเปื้อนได้ในผลิตผลเกษตรหลายชนิด เช่น กาแฟ ถั่วลิสง ข้าวโพด หอมแดง หอมหัวใหญ่ องุ่น และเครื่องเทศ เป็นต้น (EPA, 1997) นอกจากนี้รา *A. niger* สามารถสร้างสารพิษและสารทุติยภูมิได้มากมายหลายชนิด เช่น สารพิษ ochratoxin A และ fumonisin B_2 และ B_4 (Kristian et al., 2009) ซึ่งเป็นสารพิษจากเชื้อราที่จัดอยู่ใน class 2B คือ เป็นสารที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งได้ในมนุษย์ ochratoxin A เป็นสารที่ก่อให้เกิดความผิดปกติต่อระบบการทำงานของไต (nephrotoxic) และการพัฒนาการเกิดความผิดปกติ (teratogenic) เป็นสารพิษที่อาจก่อให้เกิดมะเร็ง และทำให้ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ผิดปกติ fumonisins เป็นสารที่มักพบการปนเปื้อนในธัญพืช, ข้าวโพด ซึ่งมีผลต่อมนุษย์โดยอาจก่อให้เกิด มะเร็งหลอดอาหาร และยังเป็นพิษรุนแรงต่อสัตว์ เช่น ม้า, หมู และสัตว์ปีก (Edwin et al., 2010)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศในอนาคตด้วยรูปแบบจำลองการคาดการณ์การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศพบว่า ในทศวรรษที่ 2100 (ค.ศ. 2091-2100) อุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ยของประเทศไทยสูงขึ้นทุกพื้นที่ และส่วนใหญ่สูงขึ้นประมาณ 4-5 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับในช่วงทศวรรษที่ 2000 (ค.ศ. 1991-2000) (ศูนย์ภูมิอากาศ, 2553) และสอดคล้องกับ IPPC (2007) ที่รายงานว่า อุณหภูมิและคลื่นความร้อนที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อภาคการเกษตรและความปลอดภัยของอาหารแตกต่างกันไปในแต่ละภูมิภาคตามสภาพทางภูมิศาสตร์ ซึ่งผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นต่อภาคการเกษตร เช่น การเปลี่ยนแปลงการเพาะปลูกและผลผลิต ฤดูกาลเพาะปลูกที่เปลี่ยนแปลงไป คุณภาพของดิน การสูญเสียแร่ธาตุในดิน และการเปลี่ยนแปลงในระบบนิเวศน์จุลินทรีย์ดิน ในรายงานระบุว่าอุณหภูมิจะเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 4 องศาเซลเซียส ใน 100 ปี Paterson (2011) ได้อ้างถึงรายงานของ IPPC ในปี 2007 ว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นอาจส่งผลกระทบต่อสารพิษจากราเช่นเดียวกับการเจริญของราในอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น และการสร้างสารพิษอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มมากขึ้นในภูมิภาคที่มีอากาศหนาว ในขณะที่มีการสร้างสารพิษน้อยลงเมื่ออุณหภูมิสูงเกินไปในเขตที่มีอากาศร้อนอยู่แล้ว ดังนั้นการประเมินผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จึงเป็นการศึกษาเพื่อวิเคราะห์อัตราการเจริญของราที่เปลี่ยนแปลงไป และความสามารถของราในการสร้างสารพิษในผลิตผลเกษตรที่สภาพภูมิอากาศแตกต่างกัน เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ในการคาดการณ์อัตราการเจริญของรา *A. niger* และประสิทธิภาพในการสร้างสาร ochratoxin ในสภาวการณ์ที่อาจเกิดขึ้นเมื่อสภาพภูมิอากาศเปลี่ยนแปลงไป

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กล่องสำหรับจำลองสภาพอากาศ
2. อาหารสำหรับเลี้ยงรา Potato Dextrose Agar (PDA) และ Yeast Extract Sucrose Agar (YES)
3. เมล็ดกาแฟดิบ (กาแฟสาร)
4. กลีเซอรอล
5. ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้น 300, 600 และ 1,000 ppm
6. เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ
7. เครื่องบันทึกข้อมูลอุณหภูมิและความชื้น
8. ชุดเครื่องวัดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์
9. ตรวจสอบสารโอคราทอกซินสำเร็จรูป (Veratox®)

วิธีการ

<u>คัดเลือกรา *A. niger* โดยวิธี Direct plating method</u>

1. เก็บตัวอย่างผลผลิต นำมาแยกรา *A. niger* ที่ต้องการศึกษา โดยนำเมล็ดกาแฟแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite: NaOCl) 10% นาน 2 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และวางลงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 วัน

2. คัดเลือกรา *A. niger* นำมาแยกเลี้ยงให้บริสุทธิ์บนอาหาร PDA และเก็บรักษาในรูปของสารละลายสปอร์ (spore suspension) เพื่อใช้ในการทดลอง

<u>อัตราการเจริญและการสร้างสารโอคราทอกซินของรา *A. niger* บนอาหารเลี้ยงเชื้อในการจำลองสภาพอากาศ</u>

วางแผนการทดลองแบบ split plot จำนวน 3 ซ้ำ โดย

- main plot คือ ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 300, 500 และ 1,000 ส่วนในล้านส่วน (ppm)
- sub plot คือ ปริมาณน้ำอิสระ (water activity: a_w) 7 ระดับ ได้แก่ 0.75, 0.80, 0.85, 0.90, 0.93, 0.95, และ 0.99

ทำการทดลองที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 6 ระดับ ได้แก่ 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส (°C)

1. เตรียมอาหาร YES ในจานเลี้ยงเชื้อ ให้มีปริมาณน้ำอิสระแตกต่างกัน 7 ระดับ ด้วยการใช้กลีเซอรอลและน้ำกลั่น ในการปรับปริมาณน้ำอิสระในอาหาร (ภาพที่ 1)

2. การปลูกเชื้อบนอาหาร โดยหยด spore suspension (ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาณ 5 ไมโครลิตร (µL) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YES ที่มี a_w แตกต่างกันแต่ละระดับ (ภาพที่ 2) และใส่ในกล่องสำหรับจำลองสภาพอากาศ โดยเติมก๊าซ CO_2 ลงในกล่องที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน และนำไปเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ (ภาพที่ 3)

3. บันทึกข้อมูลอัตราการเจริญของรา *A. niger* ที่สภาพอากาศแตกต่างกัน โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของราทุก 2 วัน เป็นเวลา 10 วัน

4. ทดสอบความสามารถในการสร้างสารพิษของรา *A. niger* ในอาหาร YES ภายใต้การจำลองสภาพอากาศต่างๆ ในวันที่ 14 ของการเลี้ยง โดยการเจาะชิ้นวุ้นอาหารเพลทละ 5 ชิ้น ใส่ลงใน micro tube (ภาพที่ 4) แล้วนำไปสกัดด้วย Methanol หลอดละ 1 มิลลิลิตร (ml) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ดูดเฉพาะส่วนใสนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดเฉพาะส่วนใสกรองผ่าน filter 0.2 µm แล้วจึงนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซินสำเร็จรูป

5. นำข้อมูลที่ได้จัดทำ contour map แสดงผลของสภาพอากาศจำลองต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารพิษของรา *A. niger* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

<u>อัตราการเจริญและการสร้างสารโอคราทอกซินของรา *A. niger* บนเมล็ดกาแฟในการจำลองสภาพอากาศ</u>

วางแผนการทดลองแบบ split plot จำนวน 3 ซ้ำ โดย

- main plot คือ ความเข้มข้นของปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 3 ระดับ ได้แก่ 300, 600, 1000 ppm
- subplot คือ ปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ 3 ระดับ ได้แก่ 60, 70 และ 80%

ทำการทดลองที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 6 ระดับ ได้แก่ 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 °C

1. คัดเลือกเมล็ดกาแฟดิบที่กะเทาะเปลือกแล้ว บดให้เป็นเมล็ดกาแฟหยาบ และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนมาด้วยวิธีการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

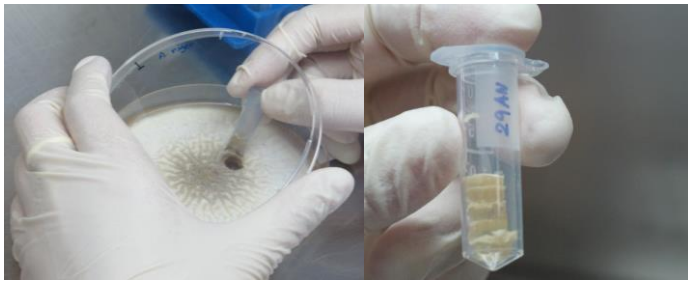
2. ชั่งเมล็ดกาแฟบดหยาบที่ฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในถ้วยพลาสติก ถ้วยละ 25 กรัม หยด spore suspension ของรา *A. niger* (ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 10 µL ลงบนเมล็ดกาแฟ ผสมให้ทั่ว จากนั้นเก็บรักษาภายใต้การจำลองสภาพอากาศ เป็นเวลา 14 วัน (ภาพที่ 5)

3. ทดสอบความสามารถของ *A. niger* ในการสร้างสารโอคราทอกซิน โดยนำกาแฟที่เลี้ยงรา *A. niger* ไว้เป็นเวลา 14 วัน มาสกัด และวิเคราะห์หาปริมาณสารโอคราทอกซินด้วยวิธี ELISA ตามคู่มือชุดตรวจสอบโอคราทอกซินสำเร็จรูป

ภาพที่ 1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำอิสระแตกต่างกันโดยกลีเซอรอลและน้ำกลั่น

ภาพที่ 2 การปลูกเชื้อโดยหยด spore suspension ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YES ที่มี a_w แตกต่างกันแต่ละระดับ

ภาพที่ 3 การเติม CO_2 ในกล่องและวัดปริมาณ CO_2 เพื่อจำลองสภาพอากาศในการเลี้ยงรา *A. niger*



ภาพที่ 4 การเจาะชิ้นวุ้นอาหาร YES agar ที่มีรา *A. niger* เจริญภายใต้การจำลองสภาพอากาศต่างๆ ในวันที่ 14 ของการเลี้ยง

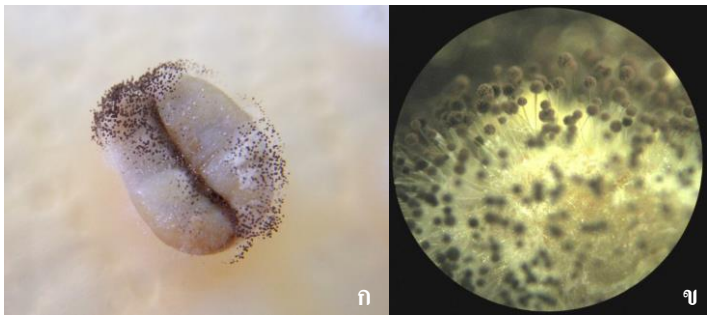
ภาพที่ 5 การทดสอบการเจริญของรา *A. niger* บนเมล็ดกาแฟภายใต้การจำลองสภาพอากาศ

เวลาและสถานที่ ระยะเวลาทำการทดลอง: เริ่มต้น ตุลาคม 2556 – กันยายน 2558
สถานที่ทำการทดลอง: กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

<u>คัดเลือกรา *A. niger* โดยวิธี Direct plating method</u>

ได้รา *A. niger* ที่ปนเปื้อนในเมล็ดกาแฟสำหรับการทดลองจากการทดสอบการปนเปื้อนโดยวิธี direct plate method (ภาพที่ 6) หลังจากนั้นทำการแยกเลี้ยงให้บริสุทธิ์สำหรับทำการทดลองในการจำลองสภาพอากาศต่างๆ

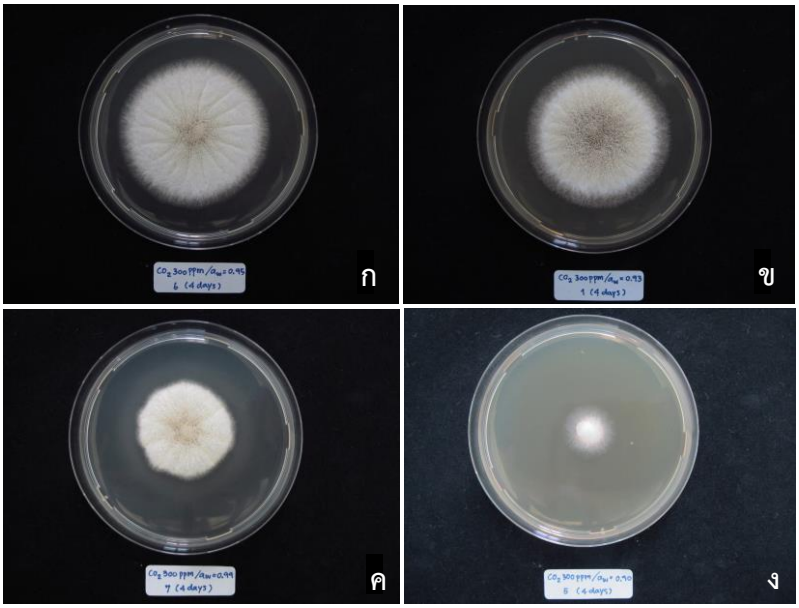


ภาพที่ 6 (ก) รา *A. niger* ที่เจริญบนเมล็ดกาแฟดิบที่นำมาทดสอบการปนเปื้อนการทดสอบการปนเปื้อนโดยวิธี direct plate method และ (ข) รา *A. niger* ภายใต้กล้อง stereo microscope

<u>อัตราการเจริญและการสร้างสารโอคราทอกซินของรา *A. niger* บนอาหารเลี้ยงเชื้อในการจำลองสภาพอากาศ</u>

ทำการทดสอบสูตรอาหาร Yeast Extract Sucrose agar (YES) ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับเชื้อราในการสร้างสาร secondary metabolites ให้มีปริมาณน้ำอิสระ (a_w) ตามกรรมวิธีที่ได้กำหนดไว้ โดยการใช้

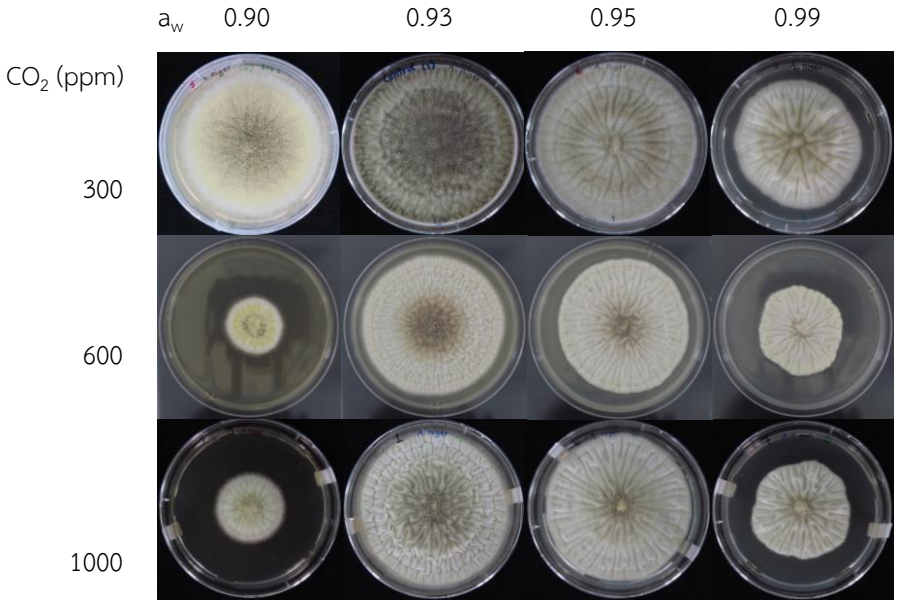
กลีเซอรอล และน้ำในการปรับสูตรอาหารให้มี a_w 7 ระดับ คือ 0.75, 0.80, 0.85, 0.90, 0.93, 0.95 และ 0.99 และจากการทดลองที่อุณหภูมิ 25 °C ปริมาณความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 300 ppm พบว่าที่ปริมาณน้ำอิสระ 0.93, 0.95 และ 0.99 ที่ระยะ 2 วัน *A. niger* เริ่มสร้างเส้นใย ขนาดโคโลนีบนอาหารมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.93-2.54 เซนติเมตร โดย *A. niger* จะเจริญได้ดีที่ a_w 0.93, 0.95 และ 0.99 โดยมีขนาดโคโลนีเฉลี่ย 2.41, 2.38 และ 1.96 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณน้ำอิสระ 0.75, 0.80, 0.85, 0.90 ยังไม่พบการเจริญของเชื้อรา แต่ที่ระยะ 4 วัน ปริมาณน้ำอิสระ 0.90 เชื้อราจึงเริ่มการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเฉลี่ย 1.84 เซนติเมตร และที่ a_w 0.95 เชื้อรา *A. niger* มีอัตราการเจริญสูงกว่าที่ a_w 0.93 และ 0.99 โดยมีขนาดโคโลนีเฉลี่ย 6.52, 6.21 และ 4.16 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 7)



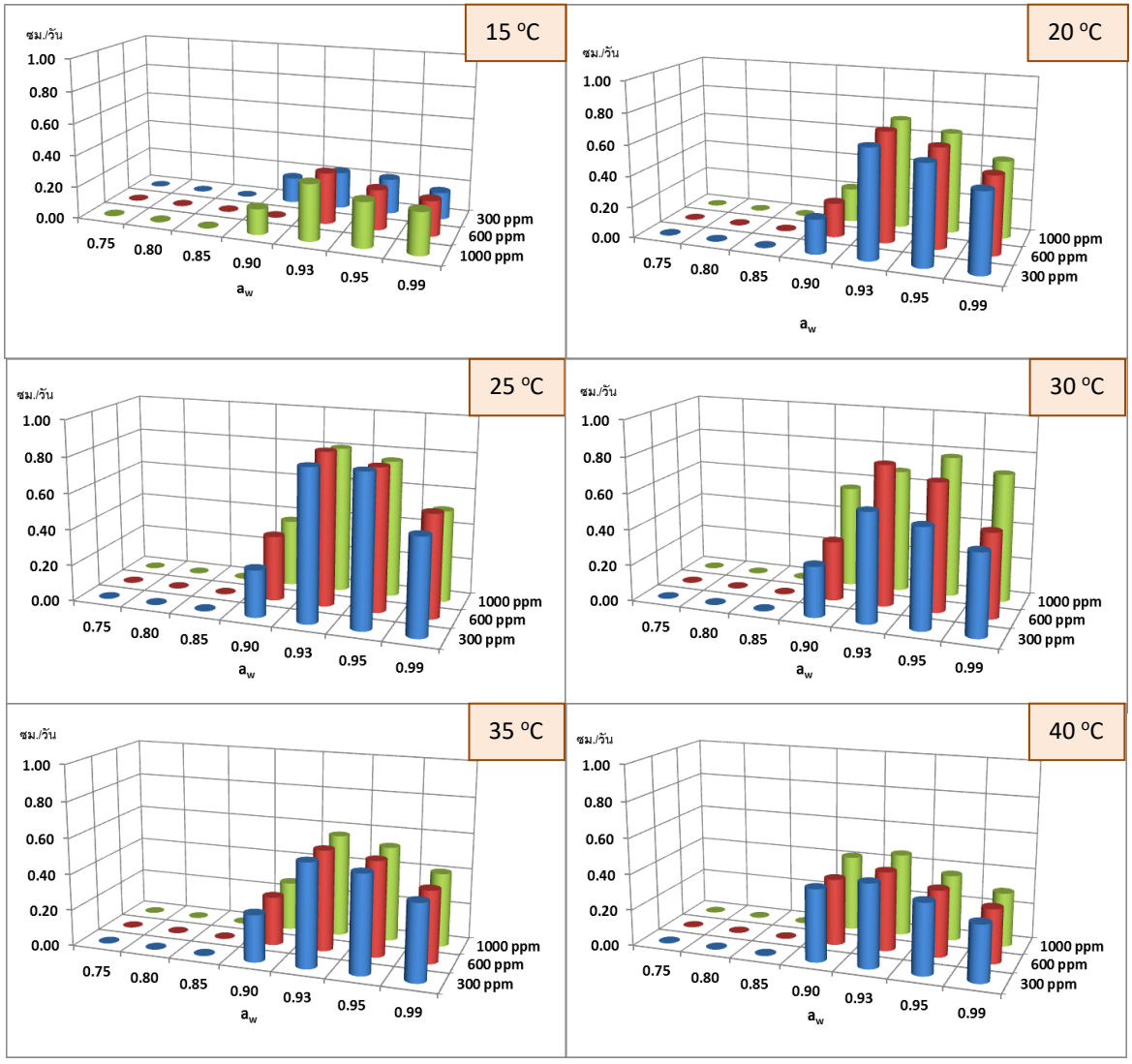
ภาพที่ 7 เชื้อรา *A. niger* ที่เจริญบนอาหาร YES agar ที่อุณหภูมิ 25°C ความเข้มข้นของ CO_2 300 ppm ระยะ 4 วัน โดยมีปริมาณน้ำอิสระที่ระดับแตกต่างกัน (ก) a_w 0.95, (ข) a_w 0.93, (ค) a_w 0.99 และ (ง) a_w 0.90

การทดสอบอัตราการเจริญของเชื้อรา *A. niger* ในสภาพอากาศต่างๆ พบว่าที่ระยะ 10 วัน รา *A. niger* มีอัตราการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิ 25 °C ระดับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 300 ppm และระดับปริมาณน้ำอิสระ 0.93, 0.95, 0.99 และ 0.90 โดยมีอัตราการเจริญของเส้นใยสูงสุดเฉลี่ย 0.83, 0.79, 0.54 และ 0.33 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ (ภาพที่ 8) นอกจากนี้รา *A. niger* ยังเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 20-40°C ปริมาณน้ำอิสระ 0.90-0.99 และที่ระดับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 300, 600 และ 1,000 ppm โดยภาพรวมของอัตราการเจริญของเชื้อราพบว่า *A. niger* จะเจริญได้ดีที่ปริมาณน้ำอิสระ 0.93, 0.95, 0.99 และ 0.90 ตามลำดับ ในช่วงปริมาณน้ำอิสระ 0.75-0.85 ในทุกช่วงอุณหภูมิและปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ทำการทดสอบ รา *A. niger* ไม่สามารถ

เจริญบนอาหาร YES agar ได้ ส่วนที่อุณหภูมิ 15°C รา *A. niger* มีอัตราการเจริญต่ำสุดเฉลี่ย 0.1-0.3 เซนติเมตรต่อวัน (ภาพที่ 9) งานวิจัยของ Astoreca *et al.* (2007) รายงานว่า ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของรา *A. niger*, *A. awamori* และ *A. carbonarius* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมเป็นวัตถุดิบจากอาหารที่แยกได้ (3% w/v substrate extract agar) คือ ที่อุณหภูมิ 30 °C และ a_w 0.97 เชื้อราเจริญได้ดีที่สุด

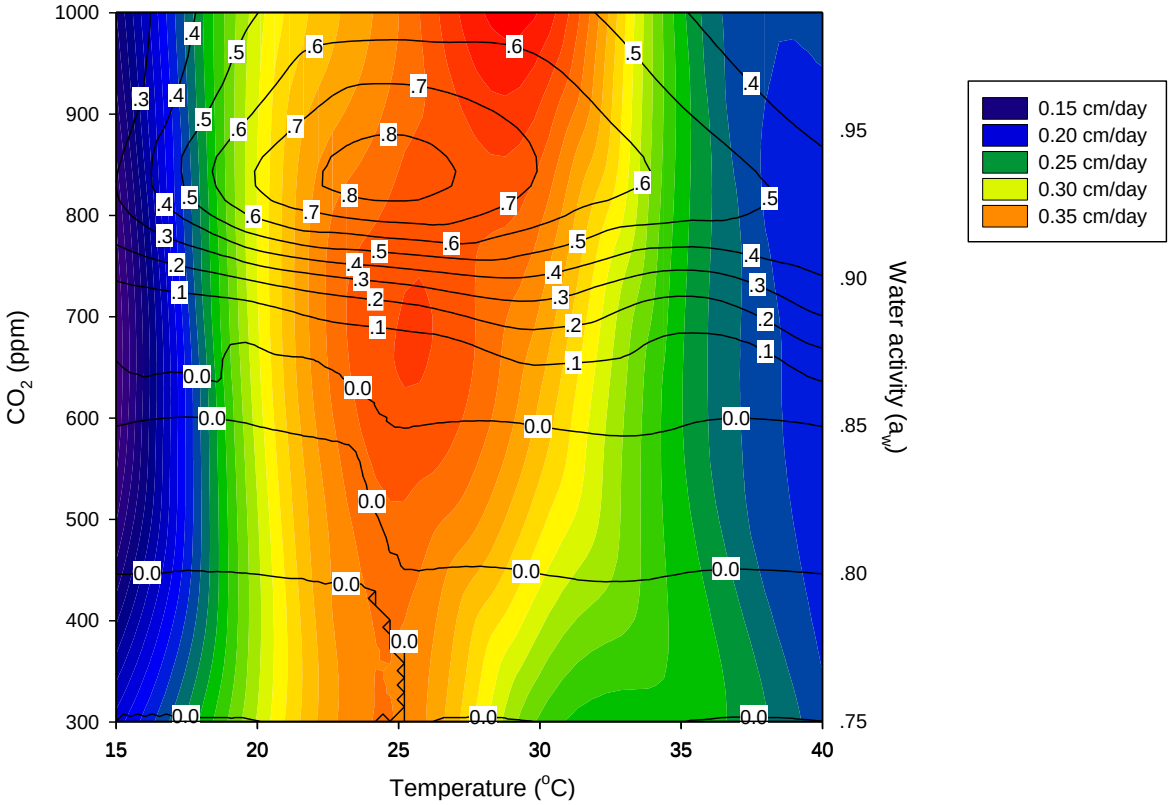


ภาพที่ 8 การเจริญของรา *A. niger* ที่ระยะ 10 วัน บนอาหาร YES agar ที่อุณหภูมิ 25 °C ปริมาณความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 300, 600 และ 1,000 ppm ปริมาณน้ำอิสระ 0.90, 0.93, 0.95 และ 0.99



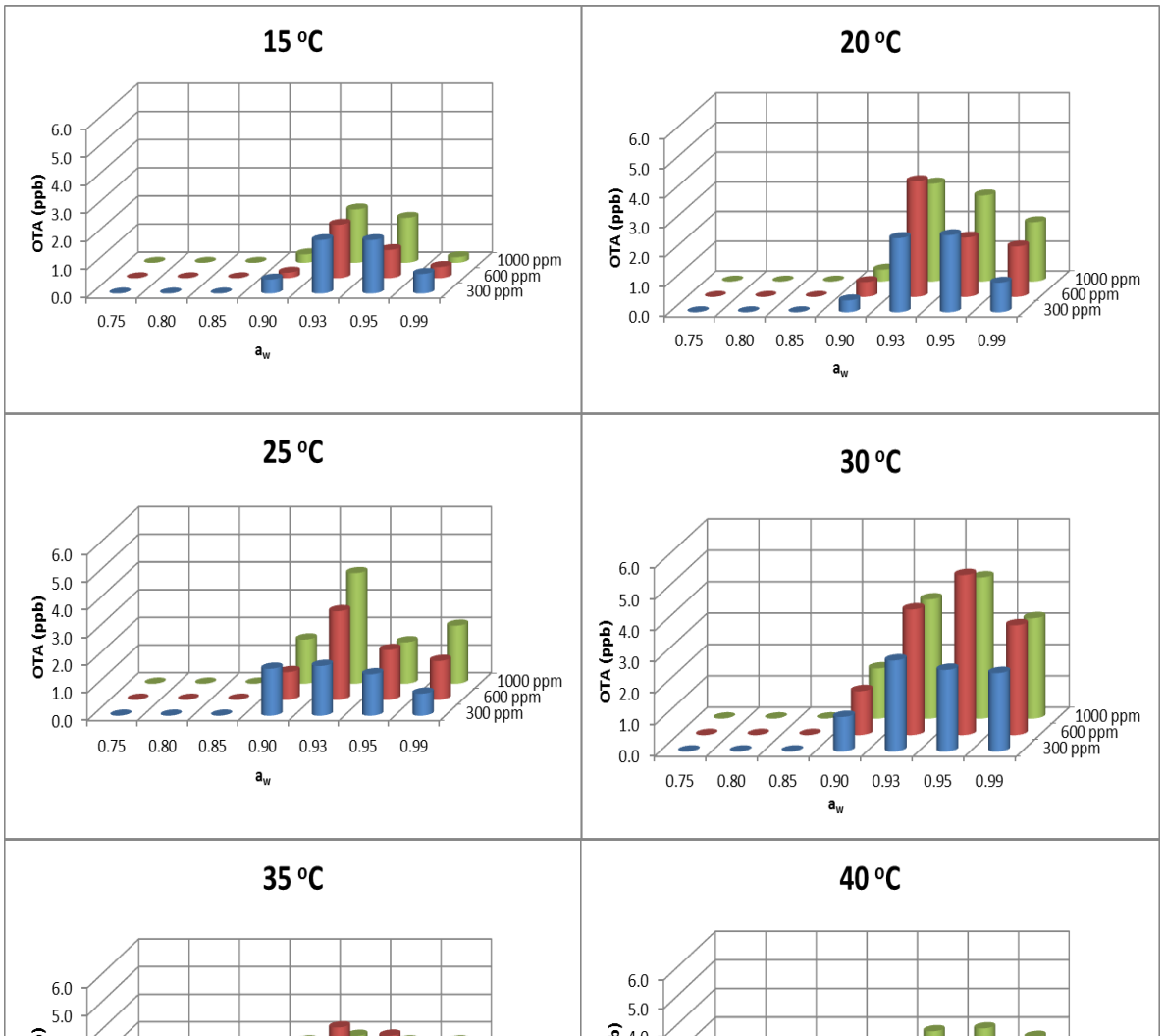
ภาพที่ 9 อัตราการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* (เซนติเมตรต่อวัน) ที่สภาพอากาศ (ปริมาณน้ำอิสระ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ และอุณหภูมิ) แตกต่างกัน

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองทำ contour map เพื่อดูอิทธิพลผลของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของรา *A. niger* พบว่าราจะเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 17-38°C ปริมาณน้ำอิสระ 0.87-0.99 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 300-1000 ppm และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 24-32 °C ปริมาณน้ำอิสระ 0.89-0.99 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 800-1000 ppm โดยมีอัตราการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่า 0.3 เซนติเมตรต่อวัน (ภาพที่ 10)

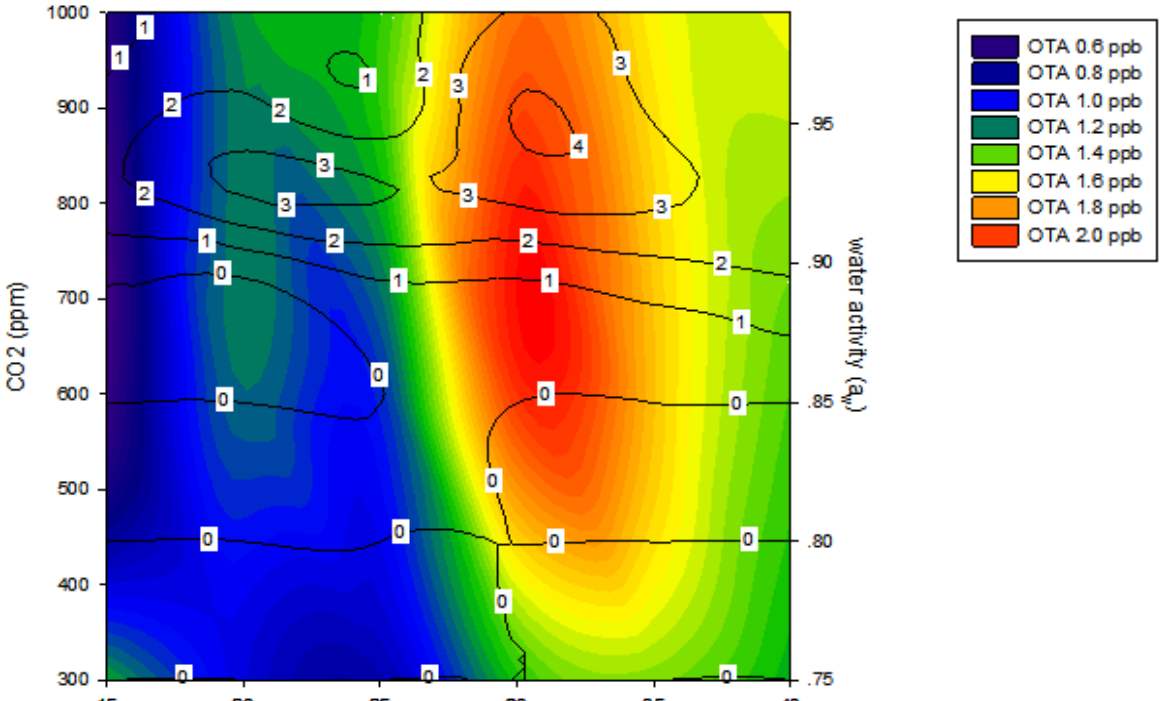


ภาพที่ 10 อิทธิพลของอุณหภูมิ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ และปริมาณน้ำอิสระ ที่มีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* (เซนติเมตรต่อวัน)

จากการทดสอบปริมาณสารโอคราทอกซินที่รา *A. niger* สร้างในอาหาร YES agar ที่สภาพอากาศแตกต่างกัน พบว่า *A. niger* สามารถสร้างสารโอคราทอกซิน ได้ทุกช่วงอุณหภูมิ (15-40 °C) โดยจะสร้างสารโอคราทอกซินสูงที่อุณหภูมิ 30°C ปริมาณน้ำอิสระมีผลต่อการสร้างสารพิษของเชื้อรา พบว่าในทุกระดับอุณหภูมิและทุกระดับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ทดสอบ เชื้อรา *A. niger* สร้างสารพิษได้ที่ระดับปริมาณน้ำอิสระ 0.90-0.99 โดยสร้างสารพิษเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.2-5.1 ppb ในส่วนของปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์พบว่า ที่ 600 และ 1,000 ppm ที่ช่วงอุณหภูมิ 25-40°C เชื้อรา *A. niger* สร้างสารโอคราทอกซินเฉลี่ยสูงกว่าที่ระดับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 300 ppm (ภาพที่ 11) และเมื่อพิจารณาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารโอคราทอกซินของรา *A. niger* พบว่า รามีการสร้างสารพิษได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิ 30-37°C ระดับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 800-1000 ppm และ ระดับปริมาณน้ำอิสระ 0.90-0.99 โดยสร้างสารโอคราทอกซินมากกว่า 2 ppb (ภาพที่ 12) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Esteban *et al*. (2006) ที่ศึกษาผลกระทบของปริมาณน้ำอิสระ (a_w 0.82-0.99) ที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารโอคราทอกซิน โดยราในกลุ่ม *A. niger* aggregate ที่เลี้ยงบนอาหาร CYA และ YES เป็นเวลา 30 วัน พบว่าราในกลุ่ม *A. niger* aggregate สามารถสร้างสารโอคราทอกซินได้ในช่วง a_w 0.90-0.99 ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ



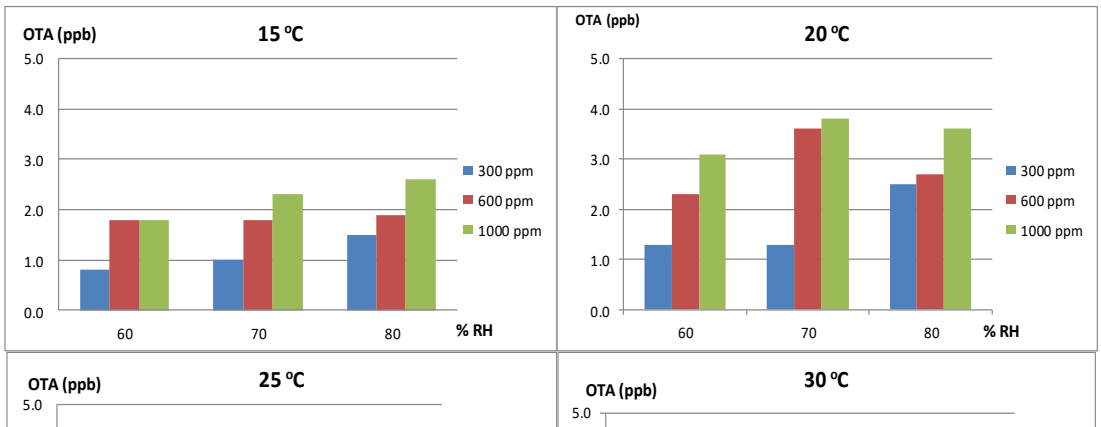
ภาพที่ 11 ปริมาณสารโอคราทอกซินที่สร้างโดยเชื้อรา *A. niger* ที่สภาพอากาศ (ปริมาณน้ำอิสระ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ และอุณหภูมิ) แตกต่างกัน



ภาพที่ 12 อิทธิพลของอุณหภูมิ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ และปริมาณน้ำอิสระ ที่มีผลต่อการสร้างสารโอคราทอกซินของเชื้อรา *A. niger*

<u>อัตราการเจริญและการสร้างสารโอคราทอกซินของรา *A. niger* บนเมล็ดกาแฟในการจำลองสภาพอากาศ</u>

การทดสอบการสร้างสารโอคราทอกซินของรา *A. niger* ในเมล็ดกาแฟ (โดยทดสอบในกาแฟสารบดละเอียด มีความชื้นเมล็ด 6.22%) ที่สภาพอากาศแตกต่างกันพบว่า รา *A. niger* สร้างสารโอคราทอกซินในเมล็ดกาแฟได้ในช่วงอุณหภูมิ 15-40°C โดยสร้างสารพิษในระดับต่ำที่อุณหภูมิ 15 และ 40°C ในส่วนของระดับความชื้นสัมพัทธ์ที่ 70 และ 80% ส่วนใหญ่เชื้อราจะสร้างสารพิษได้ดีกว่าที่ความชื้นสัมพัทธ์ 60% ในสภาพอากาศที่ทำการทดสอบช่วงอุณหภูมิ 15-40°C ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 60-80% ระดับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 300, 600 และ 1000 ppm *A. niger* สร้างสารโอคราทอกซิน อยู่ระหว่าง 0.6-7.2 ppb ในภาพรวมพบว่าสภาพอากาศที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 600 และ 1000 ppm *A. niger* สร้างสารโอคราทอกซินได้มากกว่าที่ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 300 ppm (ภาพที่ 13) Palacios-Cabrera *et al*. (2004) รายงานว่า จากการศึกษาผลของระดับความชื้นสัมพัทธ์ 80%, 87% และ 95% ที่อุณหภูมิ 25 °C ในช่วงกลางวัน และ 14 °C ในช่วงกลางคืน รา *A. ochraceus* สร้างสารโอคราทอกซินในเมล็ดกาแฟดิบได้ที่ความชื้น 80% และสร้างมากขึ้นที่ความชื้นสัมพัทธ์ 87% โดยอุณหภูมิที่มีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลงจะช่วยให้การสร้างสารพิษเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าการที่มีอุณหภูมิคงที่ และจากการรายงานของ Mohammadreza and Khatib (2011) ได้ให้ข้อคิดเห็นว่า water activity อาจจะเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่มีผลต่อการงอก การเจริญของเชื้อราบนอาหารที่มีสารอาหารที่เหมาะสม และการลด a_w ให้ต่ำกว่า 0.85 เป็นแนวทางแรกที่จะช่วยควบคุมการสร้างสารโอคราทอกซิน อย่างไรก็ตามขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความชื้น และสภาพอากาศในการเก็บรักษาด้วย



ภาพที่ 13 ปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ที่สร้างโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ในกาแฟ ที่สภาพบรรยากาศ (ความชื้นสัมพัทธ์ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ และอุณหภูมิ) แตกต่างกัน

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สภาพอากาศที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 15 °C ปริมาณ a_w น้อยกว่า 0.85 และปริมาณ CO_2 ต่ำกว่า 300 ppm ทำให้ *A. niger* มีอัตราการเจริญต่ำ แต่เมื่ออุณหภูมิ, a_w และ CO_2 สูงขึ้น ส่งผลให้ *A. niger* มีการเจริญเพิ่มขึ้นจนถึงจุดสูงสุดที่อุณหภูมิประมาณ 28 °C aw 0.93 และ CO_2 700 ppm และการเจริญของเชื้อรานี้มีแนวโน้มลดลง เมื่ออุณหภูมิ ปริมาณน้ำอิสระ และ CO_2 เพิ่มสูงขึ้น ขณะที่ *A. niger* ที่อยู่ภายใต้สภาพอากาศเย็น (<25 °C) ปริมาณน้ำอิสระน้อยกว่า 0.93 และ CO_2 ต่ำกว่า 600 ppm ความสามารถในการผลิตสารโอคราทอกซินอยู่ในระดับต่ำ แต่เมื่อระดับอุณหภูมิ ปริมาณน้ำอิสระ และ CO_2 เพิ่มขึ้น ทำให้มีการผลิตสารโอคราทอกซินเพิ่มมากขึ้น เมื่อนำข้อมูลนี้ไปทดสอบเก็บรักษาเมล็ดกาแฟพบว่าสภาพอากาศที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเมล็ดกาแฟควรอยู่ที่ ≤15 °C ความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่า 60% และมีปริมาณ CO_2 ไม่เกิน 300 ppm

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้ข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ในการคาดการณ์สภาวะการณ์ที่อาจเกิดขึ้นเมื่อสภาพภูมิอากาศเปลี่ยนแปลงไป

2. การควบคุมการเจริญของรา *A. niger* โดยเก็บรักษาผลผลิตที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 °C ปริมาณ a_w น้อยกว่า 0.85 และปริมาณ CO_2 ต่ำกว่า 300 ppm ทำให้ *A. niger* มีอัตราการเจริญต่ำ

3. การควบคุมการสร้างสารโอคราทอกซินในกาแฟ โดยเก็บรักษาผลผลิตที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 15 °C ความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่า 60% และมีปริมาณ CO_2 ไม่เกิน 300 ppm

11. คำขอบคุณ

12. เอกสารอ้างอิง

กัณฑรีย์ บุญประกอบ. 2548. ความเชื่อมโยงของอนุสัญญาสหประชาชาติว่าด้วยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศกับอนุสัญญาความหลากหลายทางชีวภาพ. การประชุมเชิงปฏิบัติการความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้และสัตว์ป่า: ความก้าวหน้าของผลงานวิจัยและกิจกรรม ปี 2548. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง. หน้า 1-17.

ศูนย์ภูมิอากาศ. 2553. เอกสารวิชาการ ความผันแปรและการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศของประเทศไทยและการคาดการณ์ในอนาคต. กรมอุตุนิยมวิทยา. แหล่งที่มา http://www.tmd.go.th/info/climate_future.pdf

Astoreca, A., Magnolia, C., Ramirez, M.L., Combina, M. and A. Dalcero. 2007. Water activity and temperature effects on growth of *Aspergillus niger*, *A. awamori* and *A. carbonarius* isolated from different substrates in Argentina. Int. J. of Food Microbiol. 119: 314-318.

Edwin R. Palencia, Dorothy M. Hinton, and Charles W. Bacon. 2010. *Review* The Black *Aspergillus* Species of Maize and Peanuts and Their Potential for Mycotoxin Production. Toxins 2, 399-416.

Environmental Protection Agency (EPA). 1997. *Aspergillus niger* Final Risk Assessment. Biotechnology program under the toxic substances control act (TSCA). Available Source: http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra006.htm

Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R. and F.J. Cabanes. 2006. Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. Int. J. Food Microbiol. 108: 188-195.

IPPC. 2007. Intergovernmental panel on climate change report. Climate change 2007: Synthesis Report. 55 p.

Kristian F.N., M.M. Jesper, J. Maria, O.L. Thomas and J.C. Frisvad. 2009. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. Anal Bioanal Chem (2009) 395:1225–1242.

Mohammadreza, K. and N. Khatib. 2011. The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production. Environmental Toxicology and Pharmacology 32: 113-121.

Palacios-Cabrera, H., Taniwaki, M.H., Menezes, H.C. and B.T. Iamanaka. 2004. The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures. Food Control 15: 531-535.

Paterson R.R.M. and N. Lima. 2011. Further mycotoxin effects from climate change. Food Research International 44: 2555-2566.

13. ภาคผนวก