รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย: -

2. โครงการวิจัย: ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศต่อความรุนแรงของโรคหลังการเก็บเกี่ยวและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตร

กิจกรรม: -

กิจกรรมย่อย (ถ้ามี): -

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย): ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และความสามารถในการสร้างสารพิษในธัญพืช

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): **Influence of temperature, water activity and carbon dioxide changes to growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in grains**

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง:

นางสาวเนตรา สมบูรณ์แก้ว	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

ผู้ร่วมงาน:

นางสาวศุภรา อัคคะสาระกุล	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
นางสาวสุพี วนศิรากุล	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

5. บทคัดย่อ:

สภาพอากาศในปัจจุบันมีความผันผวนและเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน และมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิด รวมถึงเชื้อราที่สร้างสารพิษ การทดลองนี้จึงมุ่งศึกษาผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ความชื้นและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญและการสร้างสารแอฟลาทอกซินของเชื้อรา Aspergillus flavus ทั้งในจานเลี้ยงเชื้อและในเมล็ดธัญพืช โดยนำ A. flavus ที่แยกได้จากเมล็ดถั่วลิสง เลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อ โดยปรับปริมาณน้ำอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 8 ระดับ เก็บในกล่องระบบปิดที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 3 ระดับ และเก็บในอุณหภูมิแตกต่างกัน 6 ระดับ วัดการเจริญเติบโตของเชื้อราทุก 2 วันเป็นเวลา 10 วัน และ วัดปริมาณสารแอฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างในวันที่ 14 ด้วยวิธี HPLC พบว่าระดับอุณหภูมิ ปริมาณน้ำอิสระ และความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการเจริญของเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อและปริมาณสารพิษที่เชื้อราสร้างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำผลิตผลเกษตร ได้แก่ เมล็ดถั่วลิสง ที่ผ่านการปลูกเชื้อ *A. flavus* เก็บรักษาในสภาพที่มีอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน พบปริมาณสารพิษ ถั่วลิสง จากสภาพการเก็บรักษาต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลจากการการทดลองสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำวิจัยต่อไป

6. Abstract:

Climate change e.g. warmer weather, greater precipitation, drought and elevated carbon dioxide will have various impacts to mycotoxins in agricultural products and food. The aim of current study was to determine effect of temperature, water stress and carbon dioxide concentrations and their interactions on growth and mycotoxin production by *Aspergillus flavus* in vitro and in stored peanut grain. In vitro, only temperature, water activity and temperature x water activity affected on growth of *A. flavus*, whilst elevated carbon dioxide did not influence to growth of this mycotoxigenic specie. However, the three main environmental factors and their interactions significantly caused *A. flavus* to produce different concentrations of aflatoxin B1. Increased carbon dioxide (300 to 1,000 ppm) resulted to higher contents of mycotoxins contamination. These results were found in in vitro and in agricultural product experiments. The obtained results are advantage for further study as baseline assumptions.

7. คำนำ:

สภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในปัจจุบัน ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทยโดยเฉพาะอุณหภูมิ ปริมาณความชื้นและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อพืชทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว รวมทั้งมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ติดมากับผลิตผลเกษตรทั้งในแหล่งปลูกและสถานที่เก็บรักษาภายหลังการเก็บเกี่ยว การศึกษาผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงระดับของอุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา การสร้างสารพิษของเชื้อรา รวมทั้งผลกระทบต่อคุณภาพผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว จึงมีความจำเป็นเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ในการประเมินความสูญเสียที่อาจเกิดขึ้นเมื่อสภาพอากาศเปลี่ยนแปลงไป

นอกเหนือจากความผันแปรตามธรรมชาติ การเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศอาจเป็นผลทางตรงหรือทางอ้อมจากกิจกรรมของมนุษย์ที่ทำให้องค์ประกอบของบรรยากาศเปลี่ยนแปลงไป ข้อมูลจากกรมอุตุนิยมวิทยา (2552) พบว่าปริมาณฝนของประเทศไทยระหว่าง พ.ศ. 2494 – 2551 มีแนวโน้มลดลงอย่างช้าๆ ขณะที่อุณหภูมิมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยอุณหภูมิเฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ พ.ศ. 2521 จนถึงปัจจุบัน และมีการคาดการณ์ว่าอุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ยของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2643 จะสูงขึ้นประมาณ 3-4°C เมื่อเทียบกับในช่วง พ.ศ. 2543 การเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศอาจส่งผลต่อความอ่อนแอของพืช รวมทั้งส่งผลกระทบต่อเชื้อราที่เป็นสาเหตุในการก่อให้เกิดโรคและการสร้างสารพิษในผลิตผลเกษตร อาจทำให้มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอาหารมากยิ่งขึ้น (Havelaar *et al*., 2010) และย่อมมีผลกระทบต่อความปลอดภัยของผู้บริโภคและความมั่นคงทางอาหาร ปัจจุบันมีการศึกษาผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศต่อเชื้อราและการสร้างสารพิษในพืชเศรษฐกิจของหลายประเทศ เช่น Wu *et al*. (2011) ได้รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ปริมาณน้ำฟ้า (precipitation) ความแห้งแล้ง และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ มีผลต่อการเข้าทำลายของเชื้อราและปริมาณสารพิษที่เชื้อราสร้างขึ้นในข้าวโพดที่ปลูก ณ ประเทศสหรัฐอเมริกา

เชื้อราที่พบมากในผลิตผลเกษตรในประเทศไทย คือ *Aspergillus flavus* เป็นราที่พบอยู่ทั่วไปในดิน พบปนเปื้อนได้ในผลิตผลเกษตรหลายชนิด เช่น หอมแดง ถั่วลิสง ข้าวโพด กาแฟ หอมหัวใหญ่ องุ่น และ เครื่องเทศ (Ghosh *et al*., 1997) สามารถเจริญเติบโตและผลิตสารแอฟลาทอกซิน (aflatoxin - AF) ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์สูง โดย *A. flavas* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35°C ที่ปริมาณน้ำอิสระ 0.95 a_w (Paterson and Lima, 2011) เชื้อราชนิดนี้สามารถเข้าทำลายและเจริญในถั่วเมล็ดแห้ง เช่น ถั่วลิสง ถั่วเหลือง และเมล็ดธัญพืช (Reddy

et al., 2009) ความรุนแรงของการเข้าทำลายผลิตผลเกษตรเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม โดยมีรายงานว่าถั่วลิสงที่ปลูกในสภาพอากาศแล้ง ฝักจะเกิดรอยแตกได้มากยิ่งขึ้น เพิ่มโอกาสการเข้าทำลายของเชื้อ *A. flavus* และการปนเปื้อนของสาร AF (Magan *et al*., 2011) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chauhan *et al*. (2008, 2010) ที่พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นและปริมาณความชื้นลดลง (อากาศร้อนและแห้ง) พบการปนเปื้อนของสาร AF ในข้าวโพดและถั่วลิสงเพิ่มขึ้น สาร AF เป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดมะเร็งได้ในมนุษย์และสัตว์ (Roebuck and Maxuitenko, 1994) ซึ่งทำให้ผู้มีปัญหาเกี่ยวกับตับ เช่น มีเชื้อไวรัสตับอักเสบ B และ C มีความเสี่ยงเป็นมะเร็งตับมากขึ้นถึง 30 เท่า (Groopman *et al*., 2008)

ปัจจัยที่เหมาะสมในการทำให้เกิดเชื้อราที่สร้างสารพิษ ได้แก่ ความชื้นในวัตถุดิบที่สูงกว่า 13% ในสภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 65-85% ระหว่างช่วงอุณหภูมิ 20-40˚C และมีก๊าซออกซิเจน ในปี 2556 National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) รายงานว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ทั่วโลกระหว่างปี พ.ศ. 2548-2556 มีค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 5.3% และ Magan *et al*. (2011) รายงานถึงผลของปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้นจะมีผลต่อการเจริญเติบโตและสร้างสารพิษของเชื้อรา อย่างไรก็ตามรายงานเกี่ยวกับระดับของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อปริมาณการผลิตสารพิษของเชื้อราในปัจจุบันยังมีไม่เพียงพอ

แม้มีรายงานว่าอุณหภูมิที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างสารพิษของเชื้อรามักจะเป็นอุณหภูมิต่ำและสลับเปลี่ยนไปเป็นอุณหภูมิสูงขึ้น และมีความชื้นสูง แต่ยังไม่มีการรายงานถึงระดับอุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณน้ำอิสระและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในการศึกษาเดียวกันต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus* spp. และการสร้างสารพิษของเชื้อรา หากทราบอิทธิพลของสภาพอากาศต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารพิษของเชื้อราจะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (contour map) ซึ่งสามารถนำไปสู่การสร้างสมการหรือแบบจำลองเพื่อคาดการณ์ความเสี่ยงในการเกิดสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรเมื่อสภาพอากาศเปลี่ยนแปลงได้ต่อไปในอนาคต ตัวอย่างแบบจำลองที่มีการศึกษาในปัจจุบัน เช่น the geographical emerging mycotoxin identification system (GEMIS) model ที่กำลังทดสอบในสหภาพยุโรป หรือ DONcast® ที่สามารถใช้ประเมินการปนเปื้อนของสาร DON ในธัญพืชในประเทศสหรัฐอเมริกา ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของระดับอุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณน้ำอิสระ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตและสร้างสารพิษของเชื้อรา *Aspergillus flavus* เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการประเมินความเสี่ยงการปนเปื้อนของสารพิษในผลิตผลเกษตรต่อไป

8. วิธีดำเนินการ:

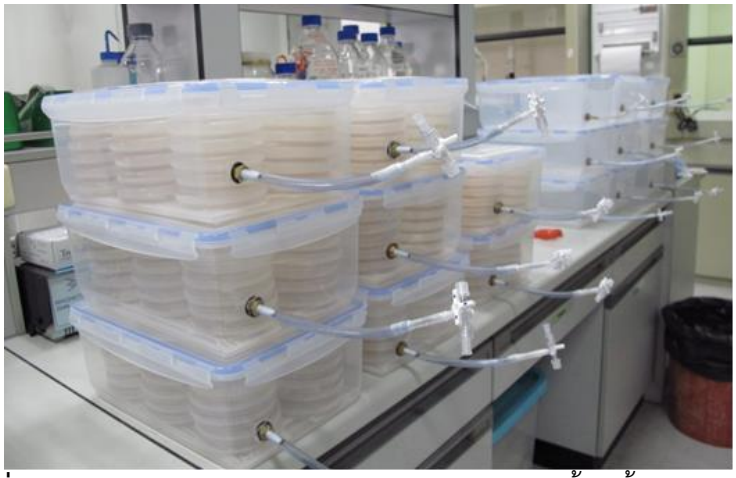
การทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. เก็บตัวอย่างธัญพืช นำมาแยกเชื้อสาเหตุโรค (*A. flavus*) ที่ต้องการศึกษา ด้วยวิธี Direct plating method โดยนำเมล็ดถั่วลิสงแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite - NaOCl) 10% นาน 2 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และวางลงบนอาหารวุ้น บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5-7 วัน

2. คัดเลือกรา *A. flavus* ที่ต้องการศึกษานำมาแยกเลี้ยงให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. เลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ split plot จำนวน 3 ซ้ำ โดย main plot คือ ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 300 600 และ 1,000 ส่วนในล้านส่วน (ppm) และ subplot คือ ปริมาณน้ำอิสระ 7 ระดับ ได้แก่ 0.75, 0.80, 0.85, 0.90, 0.93, 0.95 และ 0.99 a_w และ experimental unit เท่ากับ 3 ทำการทดลอง 6 ระดับอุณหภูมิ ได้แก่ 15, 20, 25, 30, 35 และ 40°C โดยหยด spore suspension (ความเข้มข้น 10^6 ต่อมิลลิลิตร) 1 หยดปริมาณ 5 ไมโครลิตร (µL) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละหน่วย (ภาพที่ 1) เก็บในกล่องควบคุมสภาพอากาศ (ภาพที่ 2) ก่อนอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้นข้นต่างๆ (ภาพที่ 3) ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (ภาพที่ 4)

ภาพที่ 1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำอิสระแตกต่างกันโดยกลีเซอรอลและน้ำกลั่น



ภาพที่ 2 กล่องสำหรับดัดแปลงสภาพบรรยากาศในการเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus*

ภาพที่ 3 การเติม CO_2 ในกล่องเพื่อดัดแปลงสภาพบรรยากาศในการเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus*

ภาพที่ 4 เก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

4. ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* ที่อุณหภูมิ ความชื้น และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับต่างๆ โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 10 วัน

5. ทดสอบความสามารถในการสร้างสารพิษของเชื้อ *A. flavus* ในอาหารวุ้นภายใต้การจำลองสภาพอากาศต่างๆ ในวันที่ 14 ของการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี ELISA หรือ HPLC

6. นำข้อมูลที่ได้จัดทำ contour map แสดงผลของสภาพอากาศจำลองต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารพิษของเชื้อรา *A. flavus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

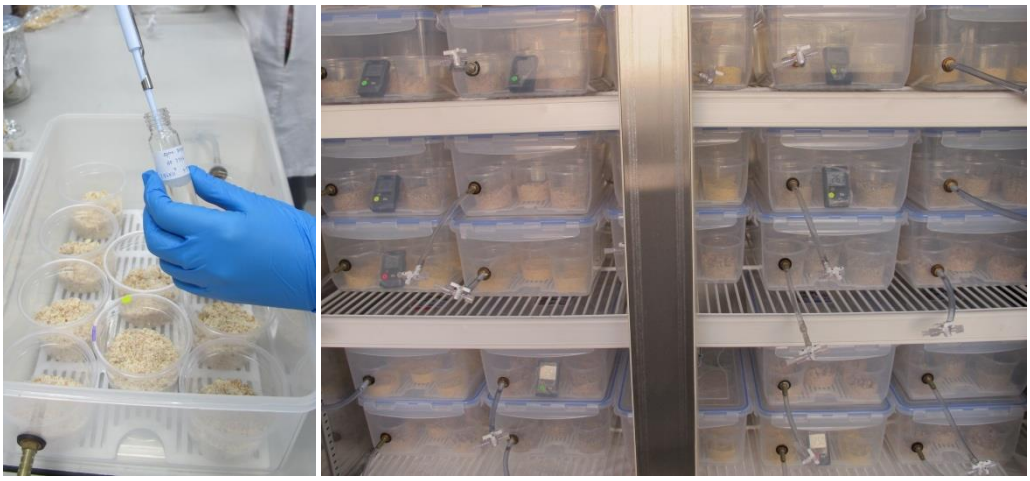
การทดสอบในเมล็ดถั่วลิสง

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 80%

โดยทำการทดลอง 6 ระดับอุณหภูมิ ได้แก่ 15, 20, 25, 30, 35 และ 40°C หยด spore suspension ของเชื้อรา *A. flavus* (ความเข้มข้น 10^7 ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (µL) ลงบนผลิตผลเกษตรที่เตรียมไว้ และเก็บในสภาพที่อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับต่างๆ (ภาพที่ 5) เป็นเวลา 14 วัน ทดสอบความสามารถในการสร้างสารแอฟลาทอกซินของเชื้อ *A. flavus* ในถั่วลิสงบดภายใต้การจำลองสภาพอากาศต่างๆ ในวันที่ 14 ของการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี ELISA



ภาพที่ 5 หยด spore suspension ของ *A. flavus* ลงบนถั่วลิสงบด และเก็บรักษาภายใต้สภาพอากาศต่างๆ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้นตุลาคม 2556 สิ้นสุดกันยายน 2558

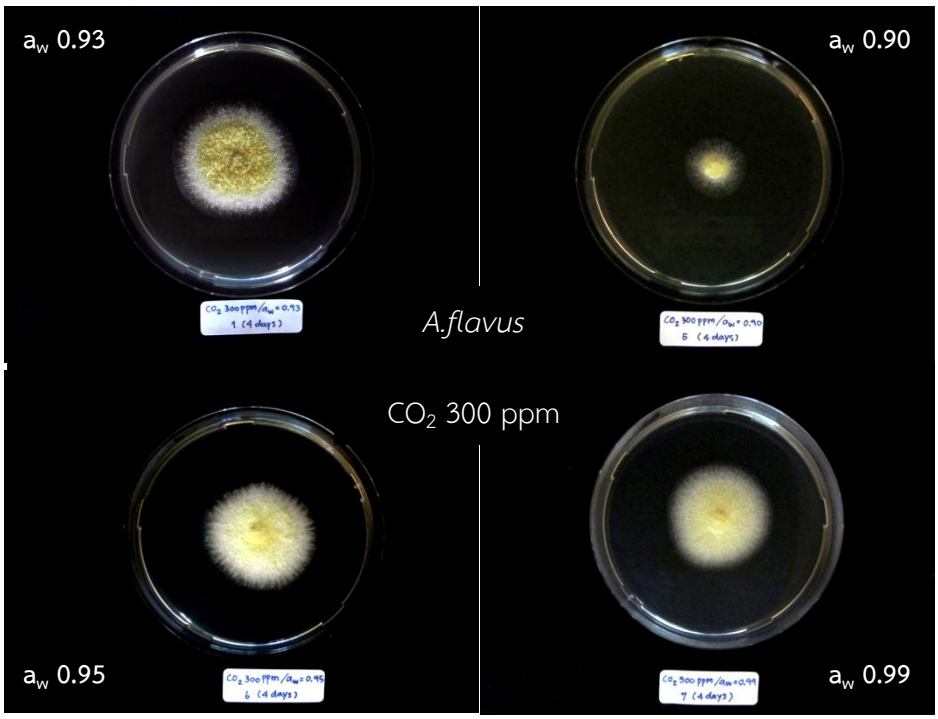
สถานที่ทำการวิจัย กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร

9. ผลการทดลองและวิจารณ์

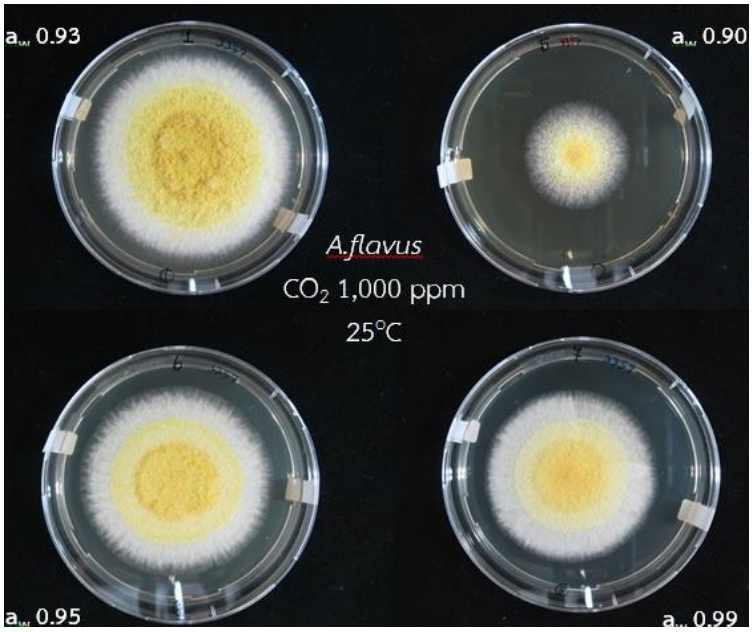
ลักษณะปรากฏ

ทำการทดสอบสูตรอาหารให้มี a_w ตามกรรมวิธีที่ได้กำหนดไว้ โดยการใช้กลีเซอรอล และน้ำในการปรับสูตรอาหาร และจากการทดลองที่อุณหภูมิ 25°C ปริมาณความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 300 และ 1,000 ppm พบว่าที่ a_w 0.90, 0.93, 0.95 และ 0.99 ที่ระยะ 6 วัน เชื้อราเริ่มสร้างเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดโคโลนีของเชื้อราในอาหาร a_w 0.93 0.95 และ 0.99 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใกล้เคียงกัน แต่พบเส้นใยราที่ a_w 0.93 มีความยาวกว่าที่ a_w 0.95 และ

0.99 ตามลำดับ (ภาพที่ 6) ในขณะที่ปริมาณน้ำอิสระ 0.75, 0.80, 0.85 ยังไม่พบการเจริญของเชื้อรา อย่างไรก็ตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราที่ 1,000 ppm (ภาพที่ 7) มีขนาดใหญ่กว่าเชื้อราที่เลี้ยงใน a_w เดียวกันในสภาพที่มี CO_2 300 ppm



ภาพที่ 6 ขนาดและลักษณะของเชื้อ *A. flavus* อายุ 6 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Extract Sucrose Agar (YES) ที่ระดับปริมาณน้ำอิสระ (a_w) ที่ 0.93 0.90 0.95 และ 0.99 ในสภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 300 ppm และอุณหภูมิ 25°C



ภาพที่ 7 ขนาดและลักษณะของเชื้อ *A. flavus* อายุ 6 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Extract Sucrose Agar (YES) ที่ระดับปริมาณน้ำอิสระ (a_w) ที่ 0.93 0.90 0.95 และ 0.99 ในสภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 1,000 ppm และอุณหภูมิ 25°C

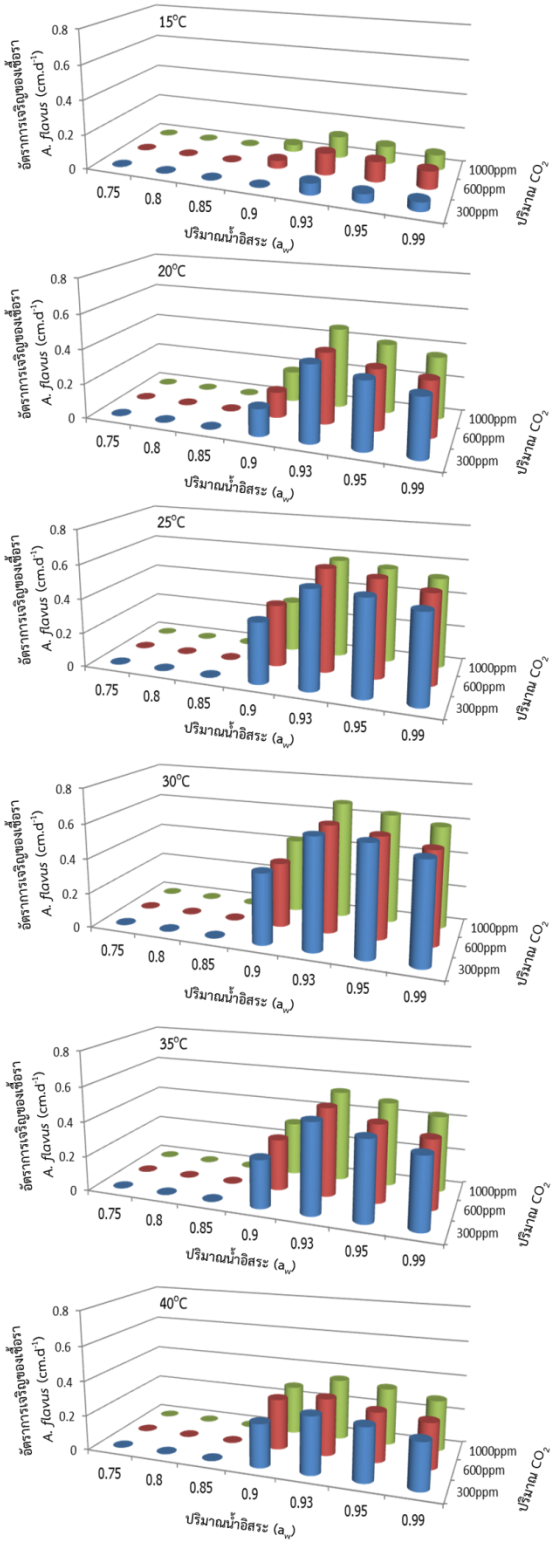
ปริมาณน้ำอิสระที่ต่ำกว่า 0.90 (a_w 0.75-0.85) ทำให้เชื้อรา *A. flavus* ไม่เจริญเติบโตและไม่สร้างสารพิษ ถึงแม้ว่าเชื้อราที่เลี้ยงในอาหารที่มี a_w ตั้งแต่ 0.95 มีขนาดรัศมีใกล้เคียงกับเชื้อราที่เลี้ยงใน 0.93-0.95 แต่เชื้อราที่เจริญในอาหาร a_w สูงกว่า 0.95 มีเส้นใยบางและจำนวนน้อยกว่า สำหรับการผลิตสารพิษพบว่าเชื้อราที่ปริมาณน้ำอิสระที่ 0.93-0.95 ในทุกอุณหภูมิมีการสร้างสารแอฟลาทอกซินสูงกว่าปริมาณน้ำอิสระระดับอื่น สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญและสร้างสารพิษของ *A. flavus* คือ 25-35°C (ภาพที่ 8) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Abdel-Hadi *et al.* (2012) ที่รายงานว่าเชื้อรา *A. flavus* เจริญได้ดีตั้งแต่อุณหภูมิ 25°C และลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 35°C นอกจากนี้ Abdel-Hadi ยังพบว่าเชื้อราในอาหารที่มีปริมาณน้ำอิสระสูงกว่ามีอัตราการเจริญดีกว่าในอาหารที่มีปริมาณน้ำอิสระต่ำ

อย่างไรก็ตาม Abdel-Hadi พบว่าปริมาณสารแอฟลาทอกซิน บี1 ในอาหารที่มีปริมาณน้ำอิสระ 0.99 มีค่ามากกว่าระดับอื่น ซึ่งไม่เป็นไปตามผลการทดลองที่ได้ในการทดลองนี้ ทั้งนี้อาจเป็นผลจากอาหารที่มีปริมาณน้ำอิสระสูงมาก ทำให้เชื้อรามีลักษณะโคโลนีแตกต่างไป มีจำนวนเส้นใยน้อยลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไป อาจส่งผลต่อการสร้างสารพิษที่น้อยลงของเชื้อราในการทดลองนี้

ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไม่มีผลต่อการเจริญ แต่มีผลต่อปริมาณสารแอฟลาทอกซินของเชื้อ *A. flavus* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Medina *et al*. (2014) ที่เลี้ยง *A. flavus* ในอาหารและเก็บในภาชนะปิดที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 350 650 และ 1,000 ppm พบว่า *A. flavus* ในแต่ละระดับ CO_2 สร้างสารแอฟลาทอกซินแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งอธิบายว่าปริมาณ

CO_2 ที่สูงขึ้นร่วมกับระดับของอุณหภูมิและปริมาณน้ำอิสระมีผลต่อการแสดงออกของยีนสำคัญ 2 ตัว ในกระบวนการสร้างสารแอฟลาทอกซิน ได้แก่ aflD และ aflR

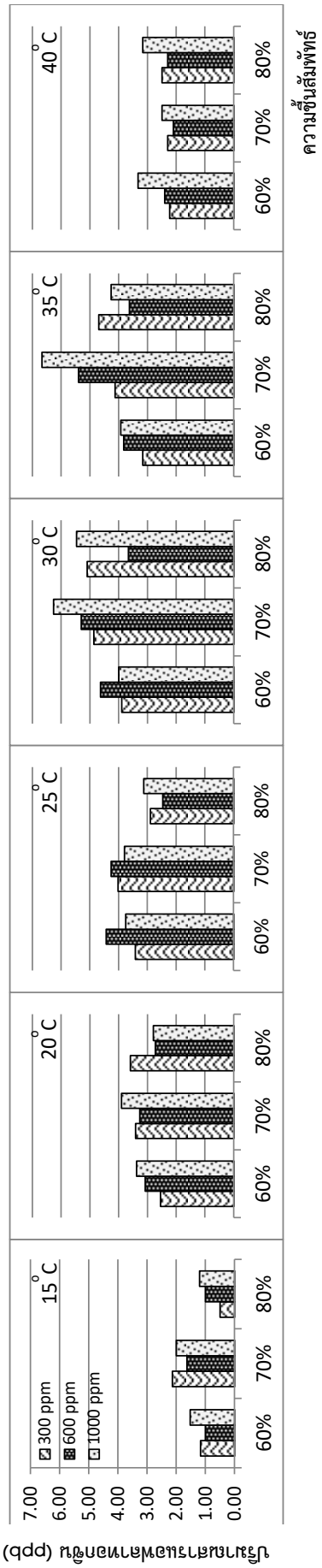
อัตราการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (ซม./วัน) **ปริมาณสารแอฟลาทอกซินที่สร้างโดย *A. flavus***



ภาพที่ 8 อัตราการเจริญของเชื้อ *A. flavus* (เซนติเมตรต่อวัน) และปริมาณสารแอฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างในสภาพที่มีปริมาณน้ำอิสระ ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และอณหภมิต่างๆ

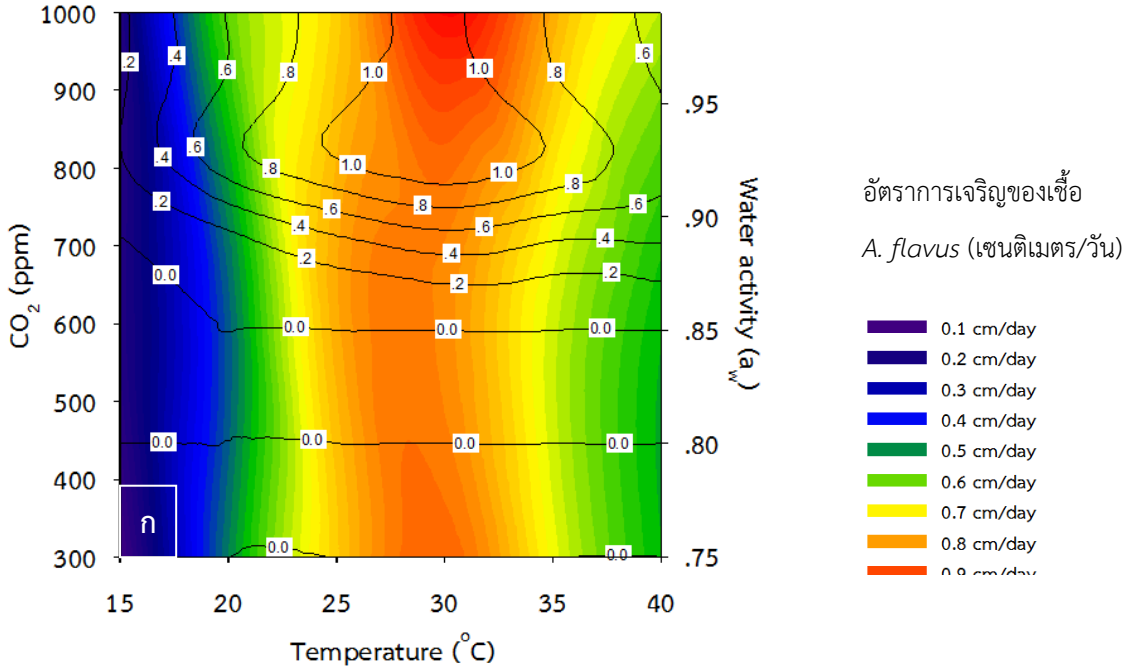
การทดสอบการสร้างสารแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ในถั่วลิสง (ความชื้นเมล็ด 5.62%) ที่เก็บรักษาในสภาพบรรยากาศแตกต่างกัน พบว่า ถั่วลิสงที่มีเชื้อ *A. flavus* ปนเปื้อนและเก็บที่อุณหภูมิ 25-35°C มีปริมาณสารแอฟลาซินสูงกว่าอุณหภูมิ อื่น โดยที่ 30°C มีปริมาณสารแอฟลาทอกซินสูงที่สุด สำหรับความชื้นสัมพัทธ์พบว่ามีผลต่อการสร้างสารแอฟลาทอกซิน โดยถั่วลิสงปนเปื้อนรา *A. flavus* เก็บรักษาที่ 70 %RH มีปริมาณสารแอฟลาทอกซินสูงที่สุด ตามด้วย 80 และ 60 %RH นอกจากนี้พบว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 0.03 0.06 และ 0.10% ไม่มีผลต่อการสร้างสารแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ในถั่วลิสง (ภาพที่ 9)

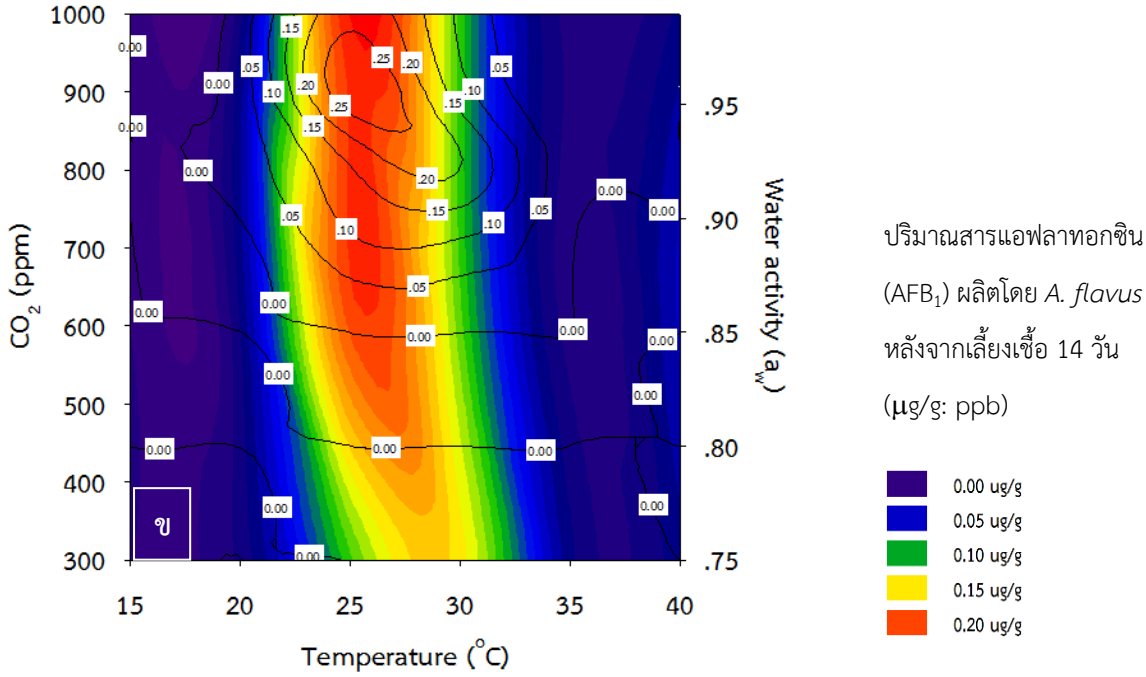
หลังจากนั้นนำผลการทดลองจัดทำแผนภาพ Contour เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของการเปลี่ยนแปลงระดับอุณหภูมิ ปริมาณน้ำอิสระ และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ต่อการเจริญและการสร้างสารแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* (ภาพที่ 10) โดยสรุปได้ว่าเชื้อราสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 23-35°C ปริมาณน้ำอิสระ 0.90-0.93 และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้นถึง 0.01% ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราชนิดนี้ เชื้อรายังเจริญได้ตามปกติ (ภาพที่ 10ก) แต่เมื่อศึกษาอิทธิพลของปัจจัย 3 ปัจจัยข้างต้นต่อปริมาณสารแอฟลาทอกซิน พบว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะต่อการสร้างสารแอฟลาทอกซินอยู่ในช่วง 25-30°C ปริมาณน้ำอิสระ 0.93-0.98 และปริมาณสารแอฟลาทอกซินมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อปริมาณ CO_2 เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 10ข) โดย Medina *et al*. (2014)



ภาพที่ 9 ปริมาณสารแอฟลาทอกซินในถั่วลิสงที่มีเชื้อรา *A. flavus* ปนเปื้อน ณ อุณหภูมิ 15 20 25 30 35 และ 40°C โดยแต่ละอุณหภูมิมีความชื้นสัมพัทธ์ 60 70 และ 80%RH และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 300 600 และ 1 000 ppm

พบว่าอิทธิพลร่วมของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ water stress และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อ gene expression (aflD, aflR) และการผลิตสารพิษของเชื้อรา *A. flavus* โดยเชื้อที่เลี้ยงที่ 37°C / a_w 0.92-0.95 / CO_2 650-1,000 ppm ผลิตสารพิษมากกว่าที่ a_w 0.99 / CO_2 350 ppm





ภาพที่ 10 อิทธิพลของอุณหภูมิ ปริมาณน้ำอิสระ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ต่อการเจริญของเชื้อ *A. flavus* (ก) และ การปริมาณสารแอฟลาทอกซิน บี1 (ข) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Extract Sucrose Agar (YES) เป็นเวลา 14 วัน

10. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ:

สภาพอากาศที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 20°C, ปริมาณ a_w น้อยกว่า 0.85 และปริมาณ CO_2 ต่ำกว่า 700 ppm ทำให้ *A. flavus* มีอัตราการเจริญต่ำ แต่เมื่ออุณหภูมิ, a_w และ CO_2 เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ *A. flavus* มีการเจริญเพิ่มขึ้นจนถึงจุดสูงสุดที่อุณหภูมิประมาณ 30°C และมีแนวโน้มลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ขณะที่ *A. flavus* สามารถเจริญได้ดีเมื่อมีปริมาณ และ CO_2 เพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม *A. flavus* ที่อยู่ภายใต้สภาพอากาศเย็น (<25°C) ปริมาณน้ำอิสระน้อยกว่า 0.90 และ CO_2 ต่ำกว่า 500 ppm สามารถสาร แอฟลาทอกซิน (AFB1) อยู่ในระดับต่ำ แต่เมื่อปริมาณน้ำอิสระ และ CO_2 เพิ่มขึ้น ทำให้มีการผลิตสาร AFB1 เพิ่มมากขึ้น เมื่อนำข้อมูลนี้ไปทดสอบเก็บรักษาเมล็ดถั่วลิสงพบว่าสภาพอากาศที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเมล็ดถั่วลิสงควรอยู่ที่ ≤15°C ความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่า 60% และมีปริมาณ CO_2 ไม่เกิน 300 ppm

11. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์:

ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับนักวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อไป โดยเฉพาะการวางแผนลดผลกระทบการเปลี่ยนแปลงของสภาวะอากาศ

12. คำขอบคุณ (ถ้ามี) :

ขอขอบคุณเจ้าหน้าห้องปฏิบัติการทดลองสารพิษจากเชื้อรา กวป. ทุกท่านที่สนับสนุนการดำเนินงาน และขอขอบคุณ Prof. Naresh Magan สำหรับข้อแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

13. เอกสารอ้างอิง:

กรมอุตุนิยมวิทยา. 2552. ความรู้อุตุนิยมวิทยา เรื่อง การเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศ. แหล่งที่มา http://www.tmd.go.th/info/info.php?FileID=86#q7 เข้าถึงแหล่ง 2 สิงหาคม 2556.

Abdel-Hadi A., Schmidt-Heydt M., Parra R., Geisen R., Magan N. (2012). A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by Aspergillus flavus. *Journal of The Royal Society Interface*, 9: 757–767.

Chauhan Y. S., Wright G. C., Rachaputi R. C. N., Holzworth D., Broome A., Krosch S., et al. 2010. Application of a model to assess aflatoxin risk in peanuts. *Journal of Agricultural Science*, 148: 341–351.

Chauhan Y.S., Wright G.C. and Rachaputi, N.C. 2008. Modelling climatic risks of aflatoxin contamination in maize. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48: 358–366.

Ghosh S.K., Desa,i M.R., Pandya, G.L. and Venkaiah, K. 1997. Airborne aflatoxin in the grain processing industries in India. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 58(8): 583-586.

Groopman, J.D., Kensler, T.W. and Wild, C.P. 2008. Protective interventions to prevent aflatoxin-induced carcinogenesis in developing countries. *Annual Review of Public Health*, 29: 187–203.

Havelaar, A. H., Brul, S., de Jong, A., de Jonge, R., Zwietering, M. H., & ter Kuile, B. H.

Magan, N., Medina, A. and Aldred, D. 2011. Possible climate change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and post-harvest. *Plant Pathology*, 60: 150–163.

Medina, A., Rodriguez, A., and Magan, N. 2014. Effect of climate change on Aspergillus flavus and aflatoxin B1 production. *Frontiers in Microbiology*, 5: 348.

National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). Climate Change and Variability. แหล่งที่มา https://www.ncdc.noaa.gov/climate-information/climate-change-and-variability เข้าถึงแหล่ง สิงหาคม 2556.

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

Reddy, K.R.N., Reddy, C.S. and Muralidharan, K. 2009. Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by Aspergillus flavus infecting rice grains. *Food Control*, 20(2): 173-178.

Roebuck, B.D. and Maxuitenko, Y.Y. 1994. Biochemical mechanismsand biological implications of the toxicity of aflatoxins as related to aflatoxin carcinogenesis. In *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health,Veterinary, and Agricultural Significance*. Eaton, D. L. and Groopman, J. D. (Eds.) Academic Press, San Diego. pp. 27-44.

Wu, Z., Dijkstra, P., Koch, G,W,, Peñuelas, J. and Hungate, B.A. 2011. Responses of terrestrial ecosystems to temperature and precipitation change: A meta-analysis of experimental manipulation. *Global Change Biology*, 17: 927–942.