รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม

.....

ชุดโครงการวิจัย : ชุดโครงการวิจัยการลดการใช้สารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดศัตรูพืชหลังการเก็บเกี่ยว

โครงการวิจัย : โครงการวิจัยและพัฒนาการจัดการโรคและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวโดยไม่ใช้สารเคมี

กิจกรรม : การควบคุมโรคและสารพิษจากเชื้อราด้วยจุลินทรีย์

ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) : การใช้แบคทีเรียดินควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillusflavus* และยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Utilization of soil bacteria controlling *Aspergillusflavus* Growth and inhibit aflatoxin production

คณะผู้ดำเนินการ : นางอมรา ชินภูติ

ผู้ร่วมงาน : นางสาวอัจฉราพร ศรีจุดานุ

นางสาวสุพี วนศิรากุล

สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

นำแบคทีเรียดินที่คัดแยกจากดินในแปลงปลูกข้าวโพดแลถั่วลิสงภาคกลางจำนวน 59 ไอโซเลต มาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* โดยวิธี Dual culture พบว่าแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 40-60% และสารสกัดของแบคทีเรียจำนวน 21 จาก 59 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 46-75% เมื่อทดสอบโดยวิธี Poison plate method เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดแบคทีเรียในการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน ได้ทำการทดสอบโดยวิธี Tip culture method ผลการทดลองสามารถแบ่งประสิทธิภาพของสารสกัดแบคทีเรียได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้มากกว่า 50% (60.06 %-91.10%) และยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินได้ 50 % (86.14%-94.68%) มีจำนวน 8 ไอโซเลตได้แก่ C4 C6 C14 C25 C37 C38 C46 และ C52 กลุ่มที่ 2 สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้น้อยกว่า 50% (20.22%-36.26%) แต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารพิษได้มากกว่า 50%(58.18% - 92.69%) มีจำนวน 4 ไอโซเลตได้แก่ C9 C12 C18 และ C21 ขณะที่สารกสกัดกลุ่มที่ 3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรามากกว่า 50%(51.90% -91.10%) แต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสารพิษน้อยกว่า 50% (0%-36.80%) มีจำนวน 8 ไอโซ

เลตได้แก่ C31 C32 C40 C41 C43 C53 C57 และ C58 ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย และสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินจาก 3 การทดลองได้คัดเลือกแบคทีเรียมา 15 ไอโซเลต ได้แก่ C1 C2 C3 C5 C9 C12 C17 C21 C33 C36 C37 C46 C52 C53 และ C57มาทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการทำลายสารพิษโยตรง พบว่า C1 C2 C3 C5 C9 C12 C17 C21 C33 และ C57 สามารถทำลายสารแอฟลาทอกซินได้ (18%-66.49%) และพบว่าเซลล์แบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีสารแอฟลาทอกซินผสมอยู่ด้วย การทดสอบความเป็นของสารสกัดแบคทีเรียพบว่าไม่มีความเป็นพิษกับการงอกของเมล็ดข้าวเปลือกและเมล็ดถั่วเขียวเมื่อแช่เมล็ดในสารสกัดไว้นาน 24 ชั่วโมง นำแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลตมาทดสอบแกรมด้วย KOH test พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 11 ไอโซเลตได้แก่ C1 C2 C3 C9 C12 C17 C21 C37 C46 C53 และ C57 และแกรมบวก 4 ไอโซเลตได้แก่ C5 C33 C36 และ C52 เมื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียบางไอโซเลตด้วย API 50 CHB พบว่า เป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus sp* และเมื่อนำไปจำแนกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่า C33 C37 C46 เป็น *Bacillus tequilensis* C53 และ C57 คือ *Bacillus subtilis* subsp *inaquosorum* หลังจากนั้นได้นำสารสกัดแบคทีเรียไอโซเลต C33 C46 และ C53 มาทดสอบประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินในถั่วลิสง พบว่า สารสกัด C33 C46 สามารถลดการปนเปื้อนได้ 64.24 % และ 69.18% ตามลำดับ เมื่อนำเซลล์แบคทีเรีย C46 มาเพิ่มปริมาณและปรับวัดจำนวนเซลล์ให้เป็น $12X10^8$ $9X10^8$ และ $6X10^8$ และนำฝักถั่วลิสงมาแช่ในสารละลายแบคทีเรีย ปริมาณต่าง ๆกัน หลังเก็บถั่วลิสงไว้ 28 วัน พบว่า สารละลายแบคทีเรียปริมาณ $12X10^8$สามารถลดการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินได้ 85.98% และไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus flavus* เมล็ดถั่วลิสงเหล่านั้น

คำนำ

แอฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่สร้างโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* , *A. parasiticus* , *A. tamarii*และ *A. nomius*พบมากในเมล็ดธัญพืชและพืชน้ำมันชนิดต่างๆ เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าว ข้าวสาลี ถั่วลิสง พริก มะพร้าว เครื่องเทศ และสมุนไพร ในประเทศไทยมีการตรวจพบสารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตรดังกล่าวเช่นกัน และในผลิตภัณฑ์แปรรูปแทบทุกชนิดที่ใช้วัตถุดิบจากผลิตผลเกษตรที่มีเชื้อราชนิดนี้ปนเปื้อนอยู่ก่อน สารแอฟลาทอกซินที่พบตามธรรมชาติมีอยู่ 4 ชนิดคือ Aflatoxin B_1,B_2,G_1 และ G_2โดย Aflatoxin B_1จะมีความเป็นพิษสูงสุด รองลงมาได้แก่ AFB_2,AFG_1 และ AFG_2ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีแอฟลาทอกซินM_1และ M_2ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ B_1และ B_2 ปนเปื้อนอยู่ในน้ำนมด้วย (Moss,1998) สารแอฟลาทอกซินพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1960 มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับสุขภาพของมนุษย์โดยตรงและปัญหาทางการค้า สารแอฟลาทอกซินเป็นสารที่มีความเป็นพิษรุนแรง เพราะเป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogen) สารก่อลูกวิรูป (Tetratogen) และเป็นสารก่อกลายพันธุ์ (Mutagen) ในปัจจุบัน IARC (International Association Research Cancer) ได้จัดสารแอฟลาทอกซินเป็นสารก่อมะเร็ง (IARC,1993)

โดยทั่วไปแล้วการปนเปื้อนของสารพิษในอาหารคนและอาหารสัตว์เป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงและคาดการณ์ได้ยาก สารพิษอาจพบปนเปื้อนในอาหารทั้งที่ไม่พบเชื้อราบนอาหารนั้นเลยก็ได้ เพราะเชื้อราเหล่านั้นอาจจะตายหรือถูกล้างกำจัดออกไปหลังจากสร้างสารพิษแล้ว จึงเป็นสิ่งที่เป็นไปได้ยากมากในการใช้วิธีการเดียวในการป้องกันหรือกำจัดสารพิษจากเชื้อรา การปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในธรรมชาติเป็นแบบไม่สม่ำเสมอ การเก็บตัวอย่าง และการวิเคราะห์สารพิษอาจสับสนหรือเกิดความผิดพลาดได้ ดังนั้น สิ่งที่น่าจะเป็นไปได้ในการจัดการเพื่อลดความเสี่ยงในการบริโภคผลิตผลเกษตรที่มีการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราจึงควรจะใช้วิธีการแบบผสมผสาน (Integrated system) ควรทำในทุกขั้นตอนของการผลิต จากในแปลงปลูกสู่ผู้บริโภค ถึงแม้ว่าจะมีการจัดการป้องกันที่ดีแล้วก็ตาม การปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราก็ยังมีโอกาสเกิดขึ้นได้ ดังนั้นการควบคุมหลังการเก็บเกี่ยว และขั้นตอนการลดปริมาณสารพิษจึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการลดความเสี่ยงต่อการได้รับสารพิษของผู้บริโภค หลักการประเมินการเลือกใช้วิธีการลดปริมาณสารพิษควรต้องพิจารณาด้วยว่าวิธีการนั้นสามารถทำลายลดความเป็นพิษ หรือทำให้สารพิษหมดไปหรือไม่ วิธีการนั้นต้องไม่ทิ้งสิ่งที่เป็นพิษอย่างอื่นไว้ทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์ ยังคงทำให้คุณค่าทางโภชนาการของอาหารเหมือนเดิมหรือยอมรับได้ และต้องไม่ทำให้คุณสมบัติทางเทคโนโลยีของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนไป และวิธีการนั้นต้องทำลายสปอร์ของเชื้อราได้

วิธีการป้องกันกำจัดสารพิษจากเชื้อราโดยทั่วไป จะมี 3 วิธี คือวิธีทางกล วิธีทางเคมี และชีววิธี (Park, 1993)เพื่อลดการใช้สารเคมี ซึ่งอาจเป็นอันตราย จึงหันมานิยมชีววิธี เช่น การใช้จุลินทรีย์ จำพวก เชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ ในการทำลายสารพิษจากเชื้อรา เช่น สาร Aflastatin A ซึ่ง สร้างโดย *Streptomyces sp.* สามารถยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินโดย *Aspergillus parasiticus*ได้(Sakuda*et al*. (2007) และแบคทีเรีย *Flavobacterium aurantiacum* ก็สามารถทำลายสารแอฟลาทอกซินได้ถึง 74 % เมื่อบ่มสารพิษไว้กับเซลส์ของแบคทีเรียนาน 68 ชม.(Lillehoj et al.,1971)นอกจากนี้ขบวนการหมักธัญพืชที่มีการปนเปื้อนของสารพิษก็สามารถลดปริมาณสารพิษได้ เช่นการหมักโดยใช้ยีสต์สามารถลดปริมาณสารพิษ Patulinในน้ำผลไม้ได้ (Lopez-Garcia and Park, 1998) เชื้อรา *Aspergillus flavus*เชื้อราที่สร้างสารแอฟลาทอกซินเป็นเชื้อราที่อยู่ในดิน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงนำแบคทีเรียดินที่เก็บรวบรวมจากแปลงข้าวโพดและถั่วลิสงในเขตภาคกลางและได้ทำการคัดแยกเบื้องต้นได้จำนวน 59 ไอโซเลต มาคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา*Aspergillus flavus* และสามารถยับยั้งหรือทำลายสารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตรด้วย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1.แบคทีเรียดินจากภาคกลาง จำนวน 59 ไอโซเลต เก็บรวบรวมอยู่ที่ห้องปฏิบัติการ ชั้น 7 สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว

2. อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (Nutrient Agar, Nutrient Broth และ Potato Dextrose Agar)

3. เชื้อรา *Aspergillusflavus*สายพันธ์ที่สร้างสารพิษ

4. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dishes) หลอดแก้วทดลอง (Test tube) ขวดลูกชมพู่ (Flask)

5. แผ่นสไลด์แก้ว เข็มเขี่ยแบบลูปป์
6. เครื่องดูดปล่อยสารอัตโนมัติขนาด 1,000 200 50 และ 20 ไมโครลิตร
7.ชุดทดสอบชนิดแบคทีเรีย API 50 CHB
8.ชุดทดสอบสารแอฟลาทอกซินสำเร็จรูป DOA Aflatoxin ELISA Test Kit
9. สารพิษมาตรฐานแฟลาทอกซินB1
10. เครื่อง Spectrometer
11. เครื่องเขย่า (Shaker)
12. สารเคมี เช่น KOH ,Nacl
13. เมล็ดข้าว เมล็ดถั่วเขียว เมล็ดถั่วลิสง
14. หลอดพลาสติกขนาด 50, 7 และ 1.5 มิลลิลิตร
15. เครื่องอ่าน Micro ELISA Reader
16. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
17. กล้องจุลทรรศน์
18. ขวดแก้วดูแรน ขนาด 1,000 500 และ 250 มิลลิลิตร

วิธีการดำเนินการ:

1.การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียดินในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา*Aspergillus flavus*

นำแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินในแปลงปลูกถั่วลิสง และข้าวโพดในเขตภาคกลาง จำนวน 59 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากโครงการสำรวจ รวบรวม จำแนกและหาเทคโนโลยีการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ผลิตชีวภัณฑ์ มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 2 วิธี

1.1 วิธี Dual culture technique นำเซลล์แบคทีเรีย มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการของเชื้อราในการจานเลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว Nutrient broth เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำกระดาษกรองที่ตัดเป็นชิ้นกลมเล็ก จุ่มเซลล์แบคทีเรีย มาวางในจานเลี้ยง 4 จุดและมีก้อนวุ้นเส้นใยขนาด 0.5 มิลลิเมตรของเชื้อรา*Aspergillus flavus*อายุ 7 วันวางอยู่ตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราในจานเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในจานเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแบคทีเรีย ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำต่อไอโซเลตแบคทีเรีย

1.2 วิธี Poison plate technique นำแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมาเลี้ยงในอาหารเหลว (Nutrient broth) เป็นเวลา 4 วัน ดูดแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารมา 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที แยกเอาสารสกัดออกจากเซลล์แบคทีเรีย นำส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรองแบคทีเรีย

นำสารสกัดของแบคทีเรียที่ได้มาทดสอบความเป็นพิษต่อการเจริญของเชื้อราโดยนำสารสกัดแบคทีเรียปริมาณ 1 มิลลิลิตรผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 9 มิลลิลิตรเมื่ออาหารแข็งตัวจึงนำเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่ตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5 มิลลิเมตร มาวางตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ ทำการวัดขนาดของโคโลนีหลังการทดสอบ 7 วัน เปรียบเทียบกับขนาดโคโลนีของเชื้อราที่ไม่ใส่สารสกัดแบคทีเรีย ทำการทดลองจำนวน 3ซ้ำต่อไอโซเลตแบคทีเรีย

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราและการสร้างสารแอฟลาทอกซินโดยวิธี Tip culture method

นำไมโครไปเปตทิป ขนาด 1มิลลิลิตร มาเป็นอุปกรณ์ในการเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบ ใส่อาหารเหลว YES Mediumปริมาตร150 ไมโครลิตรในไมโครไปเปตทิป ตามด้วย 50 ไมโครลิตร ของสารสกัดแบคทีเรีย และ 5 ไมโครลิตร ของสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา บ่มหลอดทดสอบไว้เป็นเวลา 4 วันที่อุณหภูมิห้องหลังจากนั้นจึงนำหลอดทดสอบมาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อปั่นแยกของเหลว ออกจากเส้นใยที่อยู่ในไมโครไปเปตทิป นำส่วนของเหลวมาตรวจวัดปริมาณสารแอฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างโดยวิธี ELISA และนำเส้นใยไปชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบน้ำหนัก เส้นใยของเชื้อราที่เจริญในไมโครไปเปตทิปกับเส้นใยเชื้อราของชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารสกัดแบคทีเรียทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำต่อไอโซเลตแบคทีเรีย

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดแบคทีเรียในการทำลายสารพิษโดยตรง (Degradation)

นำสารสกัดแบคทีเรียทั้ง 59 ไอโซเลตมาทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายสารแอฟลาทอกซินโดยตรง โดยนำสารพิษมาตรฐานมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นเป็น 150 ไมโครกรัม/กิโลกรัม แล้วดูดมาใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตรปริมาตร 500 ไมโครลิตร/หลอด เติมสารสกัดแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไปในหลอด ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ/ไอโซเลตแบคทีเรีย หลังจากนั้น นำสารละลายในหลอดทดสอบมาตรวจวัดปริมาณสารแอฟลาทอกซิน โดยมีสารแอฟลาทอกซินมาตรฐานที่ใส่น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม และคำนวณเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายของสารพิษ

4. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียดินในการมีชีวิตอยู่ในอาหารที่มีสารพิษและการทำลายสารแอฟลาทอกซินโดยตรง (Degradation)

นำแบคทีเรียไอโซเลตที่คัดเลือกจากการทดสอบในข้อ 1 2 และ3จำนวน 15 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินมาทดสอบความสามารถในการมีชีวิตอยู่ในอาหาร Nutrient broth ที่มีสารแอฟลาทอกซินผสมอยู่ด้วย และการทำลายสารแอฟลาทอกซินมาตรฐานโดยตรง โดยนำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 มิลลิลิตร ที่มีสารแอฟลาทอกซินความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/กิโลกรัมผสมอยู่ด้วย โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารแอฟลาทอกซิน แต่ไม่ได้ใส่แบคทีเรียเป็นชุดควบคุม บ่มหลอด

ทดลองไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 4 วัน ตรวจดูความขุ่นของอาหารในหลอดทดลอง และทำการวัดปริมาณสารแอฟลาทอกซินที่เหลือโดยวิธี ELISA ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำต่อไอโซเลตแบคทีเรีย

5. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดแบคทีเรีย

นำสารสกัดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดที่มีผลกับการงอกของเมล็ดพืช โดยนำเมล็ดพืช 2 ชนิดมาทดสอบได้แก่เมล็ดข้าว เมล็ดถั่วเขียว มาแช่ในสารสกัดแบคทีเรียเป็นเวลา 1และ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเมล็ดมาวางบนกระดาษฟางที่ชื้นในจานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 20 เมล็ดต่อจาน จำนวน 5 จานต่อสารสกัดแบคทีเรีย ต่อชนิดเมล็ดทดสอบ ทำการนับจำนวนเมล็ดที่งอกหลังการทดสอบ 7วัน

6.การทดสอบชนิดแกรมและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

6.1 การทดสอบชนิดแกรม

นำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหาร NA ในหลอดแก้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบชนิดแกรมของแบคทีเรีย (Gram + และ Gram -) โดยวิธี KOH Techniqueเตรียมสารละลาย KOH ให้มีความเข้มข้น 3% ใน และเตรียมแบคทีเรียให้มีอายุ 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบโดยหยด 30%KOH ลงบนแผ่นสไลด์ 1หยด แล้วใช้ลูปป์เขี่ยแบคทีเรียให้เต็มลูปป์ มาผสมกับ KOH บนแผ่นสไลด์ โดยคนผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที แล้วอ่านผลจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

6.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา นำแบคทีเรียมาลี้ยงบนอาหาร NA จดบันทึกลักษณะการเจริญของโคโลนี รูปร่าง และสี รวมทั้งนำแบคทีเรียบางไอโซเลตไปศึกษาลักษณะรูปร่างภายใต้กล้อง Electron Microscope

7. การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย (Identification)

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน และไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต มาจำแนกโดยใช้ชุดทดสอบ API 50CHBและการจำแนกโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

7.1 การจำแนกโดยใช้ขุดทดสอบ API 50CHBซึ่งเป็นชุดทดสอบสำหรับการจัดจำแนกจุลินทรีย์ซึ่งต้องใช้ควบคู่ไปกับอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยอาศัยหลักการทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งอาหารของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยใช้คาร์โบไฮเดรตจำนวน 49 ชนิดรวมถึงการใช้ฐานข้อมูลของเชื้อทดสอบที่ใช้ในการเปรียบเทียบ ทำการทดสอบโดยนำแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร NA ให้มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง ขูดแบคทีเรียละลายในน้ำเกลือ (0.85% NaCl) ให้มีความเข้มข้นสูง โดยไม่เป็นก้อน นำอาหาร CHB medium มาวัดค่า blank ด้วยเครื่อง spectrophotometer หลังจากนั้นนำเชื้อที่ละลายใน NaCl มาละลายในอาหาร CHB medium และปรับวัดค่าให้มีค่า OD (optical density) = 0.45 ที่ 600 นาโนเมตรซึ่งมีความขุ่นเท่ากับ 2 McFarland ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ดูด CHM medium ที่มีแบคทีเรียมาใส่ลงใน strip ทดสอบ หลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง อ่านผลของปฏิกิริยาการเกิดสี จดบันทึก แล้วนำข้อมูลมาเข้าโปรแกรมเทียบผลกับ database

7.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยชีวโมเลกุล ทำการเตรียมตัวอย่างแบคทีเรียให้มีอายุ 24 ชั่วโมง แล้วนำส่งตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Single strand 16S rRNA sequencing ที่ National Center for Genetic Engineeringand Biotechnology. โดยนำส่งวิเคราะห์จำนวน 10 ตัวอย่างคือ C1, C33, C37, C38, C40, C42, C46, C51, C53 และ C 57 ซึ่งขั้นตอนในการวิเคราะห์ได้แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ

1. PCR amplification of 16S rDNAโดยใช้ Genomic DNA mini kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) ใช้ไพร์เมอร์ (primers) 2 ตัวคือ 20F และ 1500R หลังการเพิ่มจำนวนยีนด้วย PCR แล้วนำยีนที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย 0.8% (w/v) agarose gel electrophoresis

2. Direct sequencing of 16S rDNAนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ 1 มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ตัว คือ 27Fและ 518F

3. Sequence analyses นำข้อมูลลำดับของนิวคีลโอไทด์ ที่ได้จาก ไพรเมอร์ทุกตัวมารวมกัน แล้ววิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Cap contigassemblyและในการจำแนกกลุ่มจะใช้โปรแกรมBLASTIN

8. ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดแบคทีเรีย และเซลล์แบคทีเรียในการลดสารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร

8.1 การใช้สารสกัดของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียไอโซเลต C33, C38, C46, C52, C53มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว Nutrient broth ขนาด 500 มิลลิลิตร พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้น นำอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมแบคทีเรียมาเข้าเครื่องปั่นเหวียงที่ 15,000 รอบ/นาที กรองส่วนใสผ่านกระดาษกรอง และที่กรองแบคทีเรีย นำส่วนของสารสกัดที่ได้ไปคลุกเมล็ดถั่วลิสงที่มีการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินตามธรรมชาติทดสอบประสิทธิภาพในการลดสารแอฟลาทอกซินในถั่วลิสง โดยนำสารสกัดแบคทีเรียปริมาตร 400 มิลลิลิตร/ไอโซเลตมาคลุกเมล็ดถั่วลิสงน้ำหนัก 2,000 กรัมหลังจากนั้นผึ่งเมล็ดให้แห้งแล้วแบ่งตัวอย่างเก็บในถุงพลาสติกถุงละ ๆ 100 กรัม เก็บถุงถั่วลิสงไว้ที่อุณหภูมิห้อง สุ่มตัวอย่างถั่วลิสงมาตรวจการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินด้วยวิธี ELISA หลังเก็บรักษาเป็นเวลา 7 และ 14 วัน โดยมีตัวอย่างถั่วลิสงที่ไม่คลุกสารสกัดแบคทีเรียเป็นชุดควบคุม และได้ทำการทดสอบกับถั่วลิสงมีเปลือก

8.2. การใช้เซลล์แบคทีเรีย

นำแบคทีเรียไอโซเลต C 46มาเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth ใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นนำวัดปริมาณเซลล์แบคทีเรีย ด้วยเครื่อง Spectrophotometerที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วปรับความเข้มข้นของปริมาณแบคทีเรียให้เป็น 3 ระดับ คือ $12X10^8$, $9X10^8$และ $6X10^8$cfu

วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 กรรมวิธี คือระดับปริมาณแบคทีเรีย 3 ระดับ และชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่น โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำต่อกรรมวิธี เตรียมฝักถั่วลิสงจำนวน 100 กิโลกรัม หลังจากนั้นแบ่งออกเป็น 4 ส่วนๆละ 25 กิโลกรัม นำฝักถั่วลิสงแต่ละส่วนมาแช่ในสารละลายแบคทีเรียปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร ตามกรรมวิธี เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำมาผึ่งให้แห้งแบ่งชั่งถั่วที่แห้งแล้วใส่ถุงพลาสติกปริมาณ 1 กิโลกรัม/ถุง จำนวน 20 ถุงต่อกรรมวิธี เก็บตัวอย่างทดสอบในกล่องพลาสติกขนาดใหญ่ 5 กล่อง (ซ้ำ) โดยมีตัวอย่างของทุกกรรมวิธีต่อกล่อง ทำการสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินหลังเก็บรักษาไว้ 7, 14 และ 28 วัน

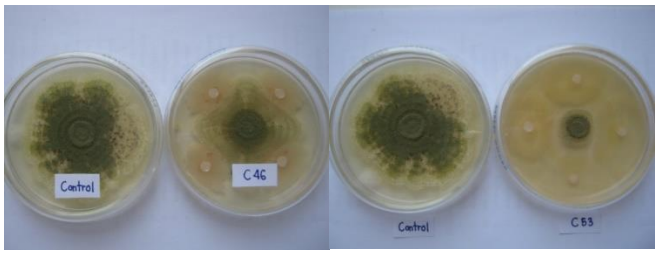
หลังจากเก็บตัวอย่างไว้ 28 วัน ได้นำฝักถั่วลิสงจากทุกกรรมวิธีมาแกะเมล็ด และนำเมล็ดถั่วไปตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DG18 ในจานเลี้ยงเชื้อ โดยวางเมล็ดถั่วลิสงจำนวน 25 เมล็ด/จานเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จึงนำมาตรวจนับการปนเปื้อนของเชื้อรา

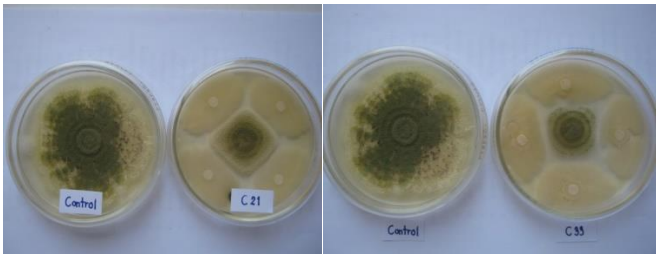
เวลา และสถานที่: สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

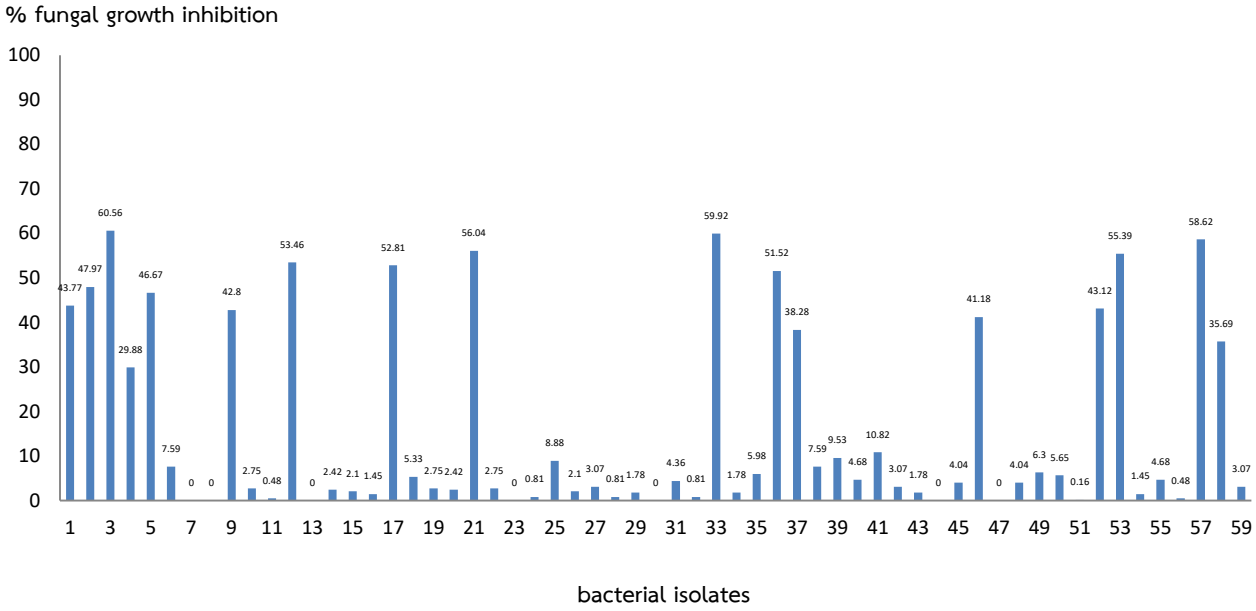
1.การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียดินในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา*Aspergillus flavus*

1.1 วิธี Dual culture technique ผลจากการนำเซลล์แบคทีเรียจำนวน 59 ไอโซเลต มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา*Aspergillus flavus*ในการจานเลี้ยงเชื้อ หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วันพบว่าแบคทีเรียสามารถยับยั้งการเจริญของ *A .flavus* ได้เมื่อเทียบกับขนาดของโคโลนีของ *A .flavus* ในชุดควบคุม (ภาพที่ 1) โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *A .flavus* สูงสุด 60.56% (ไอโซเลตที่ 3)รองลงมาได้แก่ ไอโซเลตที่ 33, 57, 21, 53,12 และ 17 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญที่ 59.92%, 58.68%, 56.04%, 55.39%, 53.46% และ 52.81 ตามลำดับ (ภาพที่ 2) ผลจากการทดสอบได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้มากกว่า 40% จำนวน 14 ไอโซเลต ได้แก่ C1 , C2, C3, C5, C9, C12, C17, C21, C33, C36, C46, C52, C53 และ C57 (ตารางที่ 1)





ภาพที่ 1 ลักษณะและขนาดโคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus flavus*ที่ถูกยับยั้งการเจริญด้วยแบคทีเรียดิน เปรียบเทียบกับโคโลนีของเชื้อราที่ไม่มี แบคทีเรียอยู่ด้วยเมื่อทดสอบด้วยวิธี Dual Culture method



ภาพที่ 2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* โดย แบคทีเรียดิน 59 ไอโซเลต ทดสอบโดยวิธี Dual culture method

ตารางที่ 1 แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* มากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ คัดเลือกการเป็นปฏิปักษ์โดยวิธี Dual Culture Method

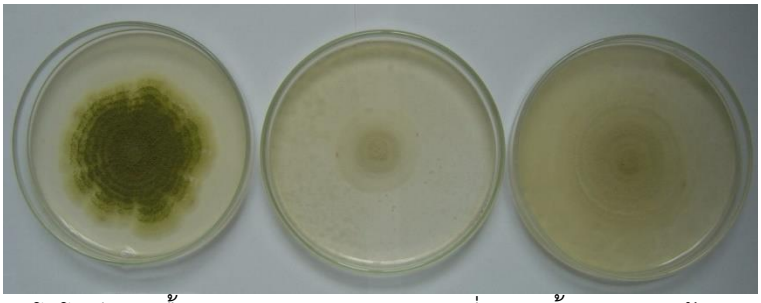
ลำดับที่	ไอโซเลตของแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี*A. flavus* (ซม.)	% การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา
1	C1	4.35	43.77
2	C2	4.03	47.97
3	C3	3.05	60.56
4	C5	4.13	46.67
5	C9	4.43	42.80
6	C12	3.60	53.46

7	C17	3.65	52.81
8	C21	3.40	56.04
9	C33	3.10	59.92
10	C36	3.75	51.52
11	C46	4.55	41.18
12	C52	4.40	43.12
13	C53	3.45	55.39
14	C57	3.20	58.62
	Control (ไม่มีแบคทีเรีย)	7.74	

% การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา =

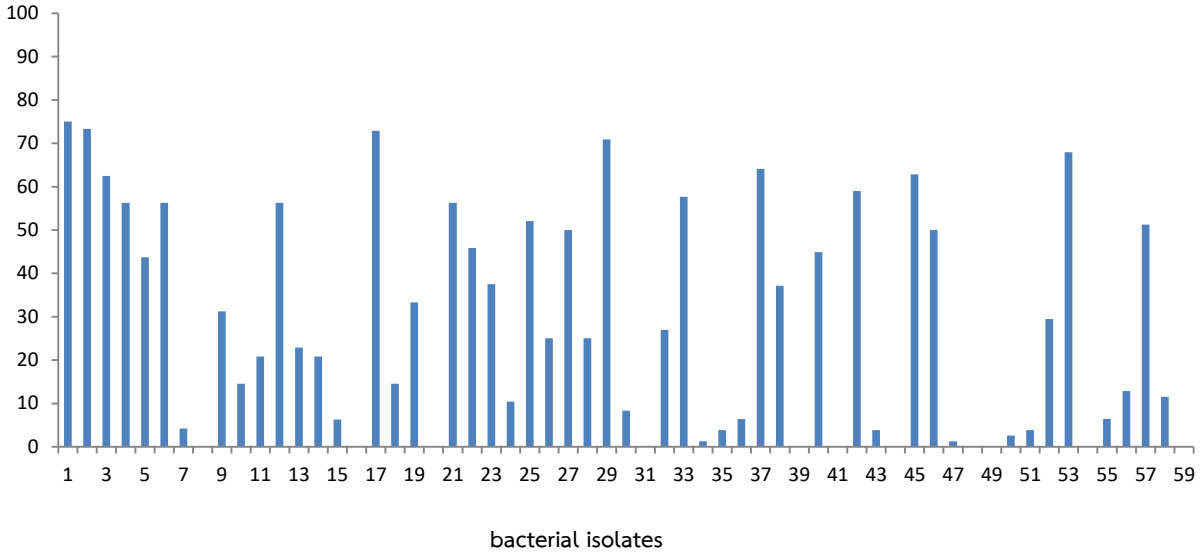
$$\frac{\text{ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเชื้อรา(control)-ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเชื้อราที่มีแบคทีเรีย X 100}}{\text{ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเชื้อรา(control)}}$$

1.2 วิธี Poison plate technique : ใช้สารสกัดของแบคทีเรียมาทดสอบในการเป็นพิษต่อการเจริญของเชื้อรา*A. Flavus* ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดของแบคทีเรียจำนวนหลายไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดโคโลนีของชุดควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดแบคทีเรีย ลักษณะโคโลนีจะเป็นสีขาว-เหลืองอ่อน และมีขนาดเล็ก (ภาพที่ 3) เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* โดยสารสกัดของแบคทีเรียทั้ง 59 ไอโซเลตแสดงใน ภาพที่ 4 สารสกัดของแบคทีเรียไอโซเลต C1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงถึง 75 % รองลงมาได้แก่ C2 และ C17 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 73.33 % และ 72.92% ตามลำดับ ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของ *A. Flavus* สามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้21ไอโซเลตที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง มากว่า 40 % ขึ้นไป (ตารางที่ 2)จะเห็นได้ว่าจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ มีจำนวนมาก กว่าแบคทีเรียที่มีเจริญแข่งขันกับเชื้อราและยับยั้งการเจริญเชื้อราได้ แต่ก็มีหลายไอโซเลตที่ตรงกันเช่น C1, C2 แต่เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง*A. flavus*โดยสารสกัดสูงกว่าแบบการแข่งขันการเจริญ



ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus flavus*ที่ถูกยับยั้งการเจริญด้วยสารสกัดของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับโคโลนีของเชื้อราที่ไม่มีสารสกัด เมื่อทดสอบด้วยวิธี Poison platemethod

% fungal growth inhibition



ภาพที่ 4 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* โดย สารสกัดแบคทีเรียดิน 59 ไอโซเลต

ตารางที่ 2 สารสกัดแบคทีเรียแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* มากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบโดยวิธี poison plate technique

ลำดับที่	ไอโซเลตของแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี*A. flavus* (ซม.)/ชุดควบคุม	% การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา
1	C1	2.00/8.00	75.00
2	C2	2.13/8.00	73.33
3	C3	3.00/8.00	62.50
4	C4	3.50/8.00	56.25
5	C5	4.50/8.00	43.75
6	C6	3.50/8.00	56.25
7	C12	3.50/8.00	56.25
8	C17	2.17/8.00	72.92
9	C18	3.08/8.00	54.44
10	C21	3.50/8.00	56.25
11	C22	4.30/8.00	45.83
12	C25	3.8/8.00	52.08
13	C27	4.0/8.00	50.00
14	C29	2.3/8.00	70.83
15	C33	2.75/6.50	57.69
16	C37	2.33/6.50	64.10

17	C42	2.67/6.50	58.97
18	C45	2.42/6.50	62.82
19	C46	3.25/6.50	50.00
20	C53	2.1/6.50	67.95
21	C57	3.20/6.50	51.28

% การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา =

$$\frac{\text{ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเชื้อรา(ชุดควบคุม) - ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเชื้อราที่มีแบคทีเรีย} \times 100}{\text{ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเชื้อรา(ชุดควบคุม}}$$

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราและการสร้างสารแอฟลาทอกซินโดยวิธี Tip culture method

ผลจากการทดลองนี้สามารถบอกได้ถึงความประสิทธิภาพของสารสกัดแบคทีเรียว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน หรือไม่ยับยั้งการเจริญเชื้อราแต่สามารถยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน ได้นำสารสกัดของแบคทีเรียทั้ง 59 ไอโซเลตมาทดสอบทั้งหมดพบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียได้เป็น 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้มากกว่า 50% และยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินได้มากว่า 50% ได้แก่ ไอโซเลต C4, C6,C14, C37, C38, C46 และ C52 (ตารางที่ 3) การทำให้เชื้อราไม่เจริญถือว่าเป็นการยับยั้งการสร้างสารพิษแน่นอน

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของสารสกัดแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆที่ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรามากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์และยับยั้งกระบวนการสร้างสารแอฟลทอกซินมากกว่า 50 % ทดสอบโดยวิธี Tip Culture Method

ลำดับที่	ไอโซเลตของแบคทีเรีย	น้ำหนักเส้นใยของ *A. flavus*ที่ใส่สารสกัดแบคทีเรีย/น้ำหนักเส้นใยของ *A. flavus* ควบคุม (กรัม)	% ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. flavus**	% สารแอฟลาทอซินที่ถูกยับยั้งในการสร้าง**
1	C4	0.0047/0.0118	60.06	87.15
2	C6	0.0035/0.0118	70.26	86.14
3	C14	0.0042/0.0118	64.58	93.95
4	C25	0.0044/0.0118	62.88	88.16
5	C37	0.0019/0.0184	89.66	89.57
6	C38	0.0031/0.0184	82.94	94.68
7	C46	0.0016/0.0184	91.10	89.36
8	C52	0.0057/0.0184	68.96	92.64

*% ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. flavus*

$$= \frac{\text{น้ำหนักเส้นใยเชื้อราชุดควบคุม-น้ำหนักเส้นใยเชื้อราที่มีสารสกัดแบคทีเรีย}}{\text{น้ำหนักเส้นใยเชื้อราชุดควบคุม}} \times 100$$

**% สารแอฟลาทอซินที่ถูกยับยั้งในการสร้าง

$$= \frac{\text{ปริมาณสารแอฟลาทอกซินของเชื้อราชุดควบคุม-ปริมาณสารแอฟลาทอกซินของเชื้อราที่มีสารสกัดแบคทีเรีย}}{\text{ปริมาณสารแอฟลาทอกซินที่เชื้อราชุดควบคุมสร้าง}} \times 100$$

กลุ่มที่ 2 แบคทีเรียไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้น้อยกว่า 50% แต่มีประสิทธิภาพยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินได้มากกว่า 50% ได้แก่ ไอโซเลต C9, C12, C18 และ C21 (ตารางที่ 4) แสดงว่าสารกัดของแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ แต่สามารถยับยั้งกระบวนการสร้างสารพิษที่เชื้อราสร้างขึ้นมาได้ทันที

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของสารสกัดแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆที่ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และ ยับยั้งกระบวนการสร้างสารแอฟลทอกซินมากกว่า 50 % ทดสอบโดยวิธี Tip Culture Method

ลำดับที่	ไอโซเลตของแบคทีเรีย	น้ำหนักเส้นใยของ *A. flavus*ที่ใส่สารสกัดแบคทีเรีย/น้ำหนักเส้นใยของ *A. flavus* ควบคุม (กรัม)	% ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. flavus**	% สารแอฟลาทอซินที่ถูกยับยั้งในการสร้าง**
1	C9	0.0075/0.0118	36.26	78.84
2	C12	0.0082/0.0118	30.31	92.69
3	C18	0.0094/0.0118	20.11	58.18
4	C21	0.0071/0.0118	39.94	81.10

กลุ่มที่ 3 แบคทีเรียไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้มากกว่า 50% แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน (ยับยั้ง <50%) ได้แก่ ไอโซเลตC31, C32, C33, C34, C40, C41, C43, C53 และ C57 (ตารางที่ 5)

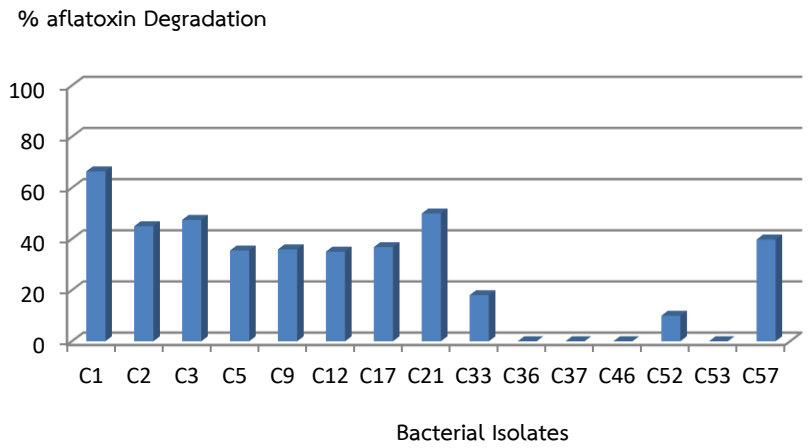
ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของสารสกัดแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆที่ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรามากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และ ยับยั้งกระบวนการสร้างสารแอฟลทอกซินน้อยกว่า 50 % ทดสอบโดยวิธี Tip Culture Method

ลำดับที่	ไอโซเลตของแบคทีเรีย	น้ำหนักเส้นใยของ *A. flavus*ที่ใส่สารสกัดแบคทีเรีย/น้ำหนักเส้นใยของ *A. flavus* ควบคุม (กรัม)	% ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. flavus**	% สารแอฟลาทอซินที่ถูกยับยั้งในการสร้าง**
1	C31	0.0058/0.0184	68.47	0

2	C32	0.0023/0.0184	87.29	14.51
3	C40	0.0016/0.0184	91.10	0.40
4	C41	0.0088/0.0184	51.90	0
5	C43	0.0049/0.0184	73.50	0
6	C53	0.0029/0.0184	86.56	36.80
7	C57	0.0024/0.0184	86.93	36.40
8	C58	0.0054/0.0184	70.78	9.40

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดแบคทีเรียในการทำลายสารพิษโดยตรง (Degradation)

ผลการนำสารสกัดแบคทีเรียของ 15 ไอโซเลตได้แก่ C1, C2, C3, C5, C9, C12, C17, C21, C33, C36, C37, C46, C52, C53 และ C57มาทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายสารแอฟลาทอกซินโดยตรง หลังจากนำสารละลายในหลอดทดสอบมาตรวจวัดปริมาณสารแอฟลาทอกซิน พบว่าปริมาณสารแอฟลาทอกซินลดลงจากชุดควบคุมแตกต่างกันไปโดยสารสกัดของแบคทีเรียไอโซเลต C1สามารถทำลายสารแอฟลาทอกซินได้สูงถึง 66.49% (ภาพที่ 5) ขณะที่ สารสกัดของแบคทีเรียไอโซเลตที่ C36 C37 C46 และ C53, ไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายสารพิษเลยซึ่งผลการทดลองจะสอดคล้องกับการผลการทดลองของการทำ Tip Culture Method ที่พบว่า ไอโซเลต C40 C41 และ C53 เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่สารสกัดไม่สามารถยับยั้งการสร้างสารพิษหรือไม่ทำลายสารพิษเช่นกัน



ภาพที่ 5. เปอร์เซ็นต์สารแอฟลาทอกซินที่ถูกทำลายโดยสารสกัดแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ

4. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียดินในการมีชีวิตอยู่ในอาหารที่มีสารพิษและการทำลายสารแอฟลาทอกซิน (Degradation)

นำเซลล์แบคทีเรียไอโซเลตที่คัดเลือก 15 ไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการมีชีวิตอยู่ในอาหาร Nutrient brothที่มีสารแอฟลาทอกซินผสมอยู่ด้วยเพื่อนำไปใช้เป็น Carbon Source ในการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียเอง จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีสารแอฟลาทอกซินโดยมีค่าความขุ่นของสารละลาย(Turbidity) ที่ +2 และ +3 (ตารางที่ 6) เปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณสารแอฟลาทอกซินที่เติมลงไปแสดงถึงการนำสารแอฟลาทอกซินไปใช้ในการเจริญเติบโต

ตารางที่ 6 ความสามารถของเซลล์แบคทีเรียที่เจริญในอาหารทีมีสารแอฟลาทอกซินผสมอยู่

ไอโซเลตของแบคทีเรีย	การเจริญของแบคทีเรีย (ความขุ่นของสารละลาย)*	% การลดลงของสารแอฟลาทอกซิน**
C1	+2	20.13
C2	+3	28.45
C3	+3	12.72
C5	+3	10.5
C9	+2	0
C12	+2	6.68
C17	+3	1.22
C21	+3	1.42
C33	+2	6.77
C36	+2	11.66
C37	+3	0
C46	+3	1.80
C52	+3	5.01
C53	+2	10.21
C57	+3	15.65

*0 =สารละลายใส +1 =สารละลายขุ่นน้อย +2 = สารละลายขุ่นปานกลาง
+3 = สารละลายขุ่นมาก

** % การลดลงสารแอฟลาทอกซิน=

$$\frac{\text{ปริมาณสารแอฟลาทอกซินชุดควบคุม - ปริมาณสารแอฟลาทอกซินที่ใส่ในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย}}{\text{ปริมาณสารแอฟลาทอกซินชุดควบคุม}} \times 100$$

5. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดแบคทีเรีย

ผลการทดลองพบว่า เมล็ดข้าว และถั่วเขียวที่แช่ในสารสกัดแบคทีเรียก่อนนำไปเพาะ มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้จะมีการแช่เมล็ดนาน 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 7) เมล็ดถั่วเขียวจะมีการงอกสูงกว่าเมล็ดข้าว โดยเมล็ดข้าวเปลือกมีการงอกอยู่ระหว่าง 88-100 % และถั่วเขียวมีการงอกสูง 96-100% แสดงว่าสารสกัดแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลตไม่มีความเป็นพิษต่อการงอกของเมล็ดพืช ชี้ให้เห็นถึงความปลอดภัยในระดับหนึ่งที่จะนำสารสกัดแบคทีเรียไปใช้ในการลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตรได้

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าวเปลือกและเมล็ดถั่วเขียวที่แช่ด้วยสารสกัดแบคทีเรียเป็นเวลา 1 และ 24 ชั่วโมงก่อนเพาะเมล็ด

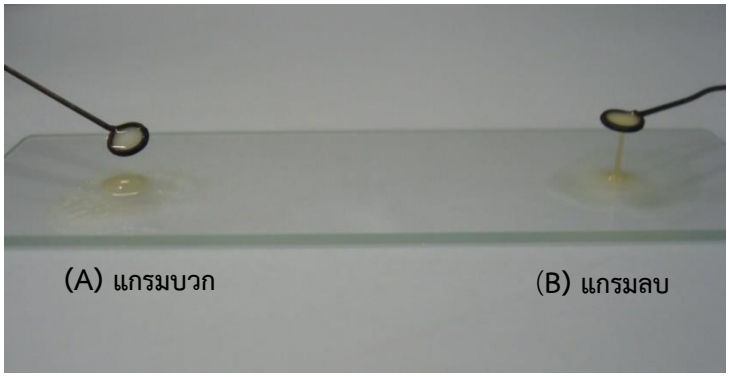
ไอโซเลตของแบคทีเรีย	%การงอกของเมล็ดข้าวเปลือก*		%การงอกของเมล็ดถั่วเขียว	
	1 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	1 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
C1	92	90	96	98
C2	96	94	100	100
C3	98	84	100	100
C5	96	92	100	98
C9	96	88	94	100
C12	100	88	100	100
C17	90	92	98	100
C21	98	96	98	100
C33	98	92	100	100
C36	100	94	100	100
C37	94	90	100	94
C46	92	88	100	100
C52	96	88	98	100
C53	100	96	100	100
C57	92	92	98	100
น้ำกลั่น	92	98	96	98

*%การงอก = $\frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอก}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะ}} \times 100$

6.การทดสอบชนิดแกรมและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

จากการทดสอบโดยใช้ KOH test ในการจำแนกชนิดแกรมของแบคทีเรียนั้น ถ้าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะของเซลล์แบคทีเรียที่ทำปฏิกิริยากับ KOH จะมีลักษณะ สีเหลืองขุ่นและมีความเหนียวหนืด สามารถดึงยืดขึ้นมาจากแผ่นสไลด์ที่ใช้ทดสอบได้ ขณะที่แบคทีเรียแกรมบวก จะมีลักษณะใสไม่หนืด (ภาพที่ 6) แบคทีเรีย

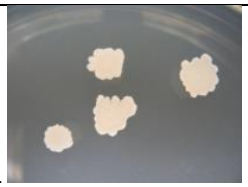
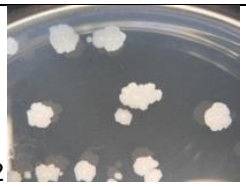
ทั้ง 15 ไอโซเลต หลังการทดสอบจำแนกเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram – negative) จำนวน 7 ไอโซเลต และเป็นแกรมบวก (gram –positive)จำนวน 8 ไอโซเลตส่วนผสมที่มีลักษณะเหนียวหนืดของแกรมลบ เนื่องจากเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบเกิดการ lysisในสารละลายที่เป็นด่าง DNA ไหลออกมาทำให้สารแขวนลอยเกิดลักษณะเหนียวหนืด (Power,1995)

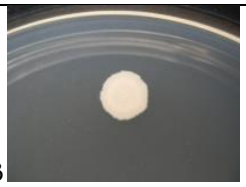
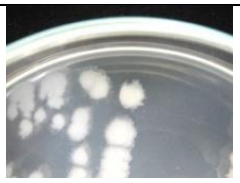


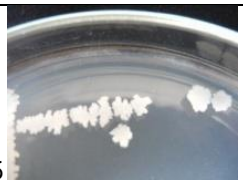
ภาพที่ 6 การจำแนกชนิดแกรมแบคทีเรียโดยวิธี KOH Test (A) แบคทีเรียมีลักษณะใสไม่หนืด เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (B) แบคทีเรียหลังทำปฏิกิริยามีลักษณะ เหนียวหนืดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ

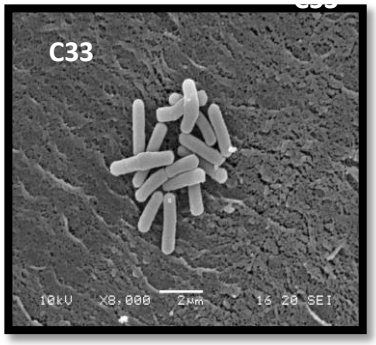
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าลักษณะการเจริญของโคโลนี รูปร่าง และสี จะมีความแตกต่างกันไม่มาก ส่วนใหญ่ โคโลนีจะมีสีขาวขุ่น ขอบหยัก และไม่หยัก (ตารางที่ 8) เมื่อนำเซลล์แบคทีเรียบางไอโซเลตไปศึกษาลักษณะรูปร่างภายใต้กล้อง Electron Microscope พบว่าแบคทีเรียจะมีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนขนาดต่าง ๆ (ภาพที่ 7)

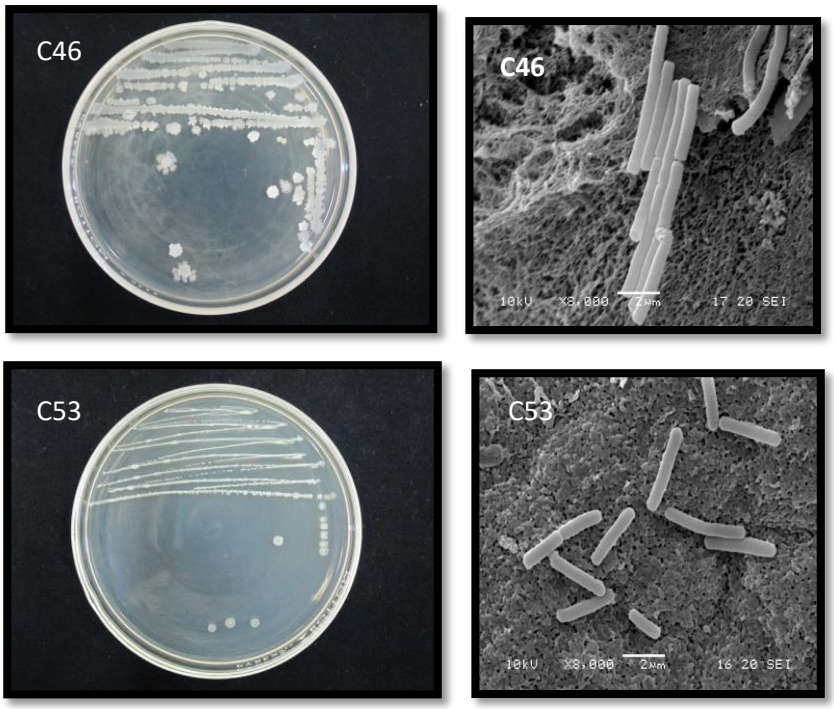
ตารางที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีแบคทีเรียที่คัดเลือก และชนิดของแกรมแบคทีเรีย

No. Isolate	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย				ชนิดของแกรม (KOH Test)
	Form	Elevation	Surface	Edge	
C1 	Irregular	Raised	Smooth	Lobate	-
C2 	Irregular	Raised	Smooth	Undulate	-

C3 	Circular	Raised	Smooth	Entire	-
C5	Rhizoid	Raised	Smooth	Filamentous	+
C9	Rhizoid	Raised	Smooth	Filamentous	-
C12	Rhizoid	Raised	Smooth	Filamentous	-
C17	Irregular	Flat	Smooth	Erose	-
C 21 	Rhizoid	Raised	Smooth	Filamentous	-
C33	Rhizoid	Raised	Smooth	Filamentous	+
C36	Rhizoid	Raised	Smooth	Filamentous	+
C37	Rhizoid	Raised	Smooth	Filamentous	-

C46 	Irregular	Flat	Smooth	Lobate	-
C52	Rhizoid	Raised	Smooth	Filamentous	+
C53	Circular	Convex	Smooth	Entire	-
C57	Irregular	Flat	Smooth	Undulate	-





ภาพที่ 7 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย ไอโซเลต C33 C46 และ C53 บนอาหาร Nutrient Agar และลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรีย ภายใต้กล้อง Electron Microscope ที่กำลังขยาย 10 KV X8,000

7. การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย (Identification)

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน และไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต มาจำแนกโดยใช้ชุดทดสอบ API 50CHB และการจำแนกโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลผลจากการจำแนกโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB นั้น แบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลตจะเป็นกลุ่ม *Bacillus spp.* (ภาพที่ 8)และผลจากการนำแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลต ไปจำแนกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลพบว่าทุกไอโซเลตคือ *Bacillus spp* ซึ่งแต่ละไอโซเลตจะมี species ที่ต่างกัน จำแนกได้ เป็น *Bacillus tequilensis* จำนวน 6 ไอโซเลต *Bacillus cereus* จำนวน 2 ไอโซเลต และ *Bacillus subtilis* subsp *.inaquuosorum* จำนวน 2 ไอโซเลต (ตารางที่ 10)

ภาพที่ 8 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ API 50 CHB/E mediumบันทึกการเปลี่ยนแปลงของสีหลังการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 10 ชนิดของแบคทีเรียที่จำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (Single Strand 16S rDNASequencing)

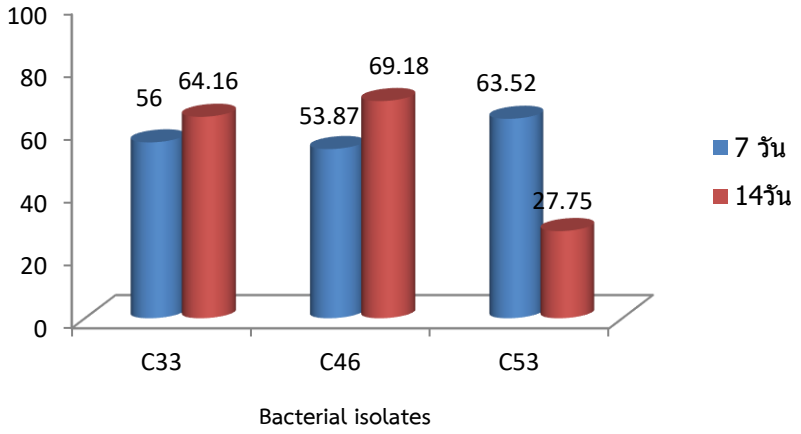
ลำดับที่	ไอโซเลต	ชนิดแบคทีเรีย
1	C1	*Bacillus tequilensis*
2	C33	*Bacillus tequilensis*
3	C37	*Bacillus tequilensis*
4	C38	*Bacillus tequilensis*
5	C40	*Bacillus cereus*
6	C42	*Bacillus tequilensis*
7	C46	*Bacillus tequilensis*
8	C51	*Bacillus cereus*
9	C53	*Bacillus subtilis*subsp.*inaquuosorum*
10	C57	*Bacillus subtilis*subsp.*inaquuosorum*

8. ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดแบคทีเรีย และเซลล์แบคทีเรียในการลดสารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร

8.1 การใช้สารสกัดของแบคทีเรีย

ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดแบคทีเรียไอโซเลต C33 C46และ C53สามารถลดการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินได้เมื่อเทียบกับตัวอย่างถั่วลิสงก่อนทดลองที่ไม่ได้คลุกสารสกัดแบคทีเรีย หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 7 และ 14 วัน (ภาพที่ 9) โดยสารสกัดของแบคทีเรียไอโซเลต C33 C46 สามารถลดปริมาณสารแอฟลาทอก

ซินได้สูงกว่าไอโวเลต C53 คิดเป็น 55.18 % , 53.87%และ 49.37% ตามลำดับ หลังการคลุกเมล็ดถั่วลงด้วยสารสกัด 7 วัน และปริมาณสารแอฟลาทอกซินลดลง 64.24% 69.18% และ 27.67% ตามลำดับหลังการคลุกเมล็ด 14 วัน



ภาพที่ 9 ปริมาณสารแอฟลาทอกซินทีปนเปื้อนในถัวลิสงหลังจากคลุกเมล็ดด้วยสารสกัดแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆเป็นเวลา 7 และ 14 วัน เปรียบเทียบกับปริมาณสารแอฟลาทอกซินก่อนการทดลอง

8.2. การใช้เซลล์แบคทีเรีย

การนำเซลล์นำแบคทีเรียไอโซเลต C46 มาเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth ปรับความเข้มข้นของปริมาณแบคทีเรียให้เป็น 3 ระดับ คือ $12X10^8$, $9X10^8$และ $6X10^8$CFU/ml แล้วนำฝักถั่วลิสงแต่ละส่วนมาแช่ในสารละลายแบคทีเรียปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร ตามกรรมวิธี เป็นเวลา 1 นาที หลังจากทำการสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินหลังเก็บรักษาไว้ 7, 14 และ 28 วันพบว่าตัวอย่างฝักถั่วลิสงที่แช่สารละลายแบคทีเรียปริมาณ$12X10^8$ CFU/ml ตรวจไม่พบการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซิน ที่ 7 วันหลังการทดลอง ขณะที่ ตรวจพบสารแอฟลาทอกซิน 3.14 11.32 และ 7.28 ไมโครกรัม/กิโลกรัมในตัวอย่างที่แช่สารละลายเซลล์แบคทีเรียปริมาณ $9X10^8$$6X10^8$CFU/ml และแช่น้ำกลั่น ตามลำดับ (ตารางที่ 11) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์แบคทีเรีย $12X10^8$ CFU/ml มีประสิทธิภาพควบคุมการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินได้นานถึง 28 วัน สามารถลดการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินจากชุดควบคุมได้ 85.98 % ผลการทดลองนี้จะสอดคล้องกับการทดลองของ Jermnak *et al*, 2013 ที่พบว่าเซลล์แบคทีเรียมีประสิทธิภาพในยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินได้

จากการที่นำเมล็ดถั่วลิสงที่แช่สารละลายเซลล์แบคทีเรียทุกระดับความเข้มข้น $12X10^8$, $9X10^8$และ $6X10^8$CFU/ml และชุดควบคุม ที่เก็บไว้เป็นเวลา 28 วัน มาตรวจการปนเปื้อนของเชื้อรา พบว่าถั่วลิสงที่แช่แบคทีเรีย $12X10^8$ CFU/ml ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus flavus*ในทุกตัวอย่าง พบรา *A. niger* 3 ตัวอย่าง ขณะที่ถั่วลิสงของชุดควบคุมพบการปนเปื้อนของ *A flavus*และ *A. niger* ทุกตัวอย่าง (ตารางที 12)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียดินไอโซเลต C46 สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา และลดการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินในถั่วลิสงได้

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพของสารละลายเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต C46 ระดับความเข้มข้นต่าง ๆในการลดปริมาณสารแอฟลาทอกซิน ในถั่วลิสง

ระดับความเข้มข้นของสารละลายแบคทีเรีย (cfu/ml)	ปริมาณสารแอฟลาทอกซิน (ไมโครกรัม/กิโลกรัม) ระหว่างการเก็บรักษา		
	7 วัน	14 วัน	28 วัน
$12X10^8$	ND	5.62	1.78
$9 X10^8$	3.14	16.46	15.90
$6 X10^8$	11.32	27.72	35.28
น้ำกลั่น	7.28	24.7	12.70

ตารางที่ 12การปนเปื้อนของเชื้อราในถั่วลิสงที่แช่สารละลายเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต C46 ระดับความเข้มข้นต่าง ๆหลังเก็บรักษาเป็นเวลา 28 วัน

ระดับความเข้มข้นของสารละลายแบคทีเรีย (cfu/ml)	จำนวนเมล็ดที่ปนเปื้อนเชื้อรา*	
	Aspergillus flavus	*Aspergillus niger*
$12X10^8$	0	3
$9 X10^8$	0	4
$6 X10^8$	3	5
น้ำกลั่น	5	5

*จำนวนเมล็ดที่พบปนเปื้อนเชื้อรา จากจำนวนเมล็ดที่ทดสอบทั้งหมด 125 เมล็ด

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การนำแบคทีเรียดินที่คัดแยกมาจากดินในแปลงปลูกถั่วลิสงและข้าวโพดในเขตภาคกลางจำนวน 59 ไอโซเลต มาทดสอบประสิทธิภาพในการแข่งขันการเจริญเติบโตกับเชื้อรา *Aspergillusflavus*สายพันธ์ที่สร้างสารแอฟลาทอกซิน โดยวิธี Dual culture methodพบว่า แบคทีเรีย 14 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 41.18 –60.56% และสารสกัดของแบคทีเรียจำนวน 21 จาก 59 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้

43.75-75.0% เมื่อทดสอบด้วยวิธี Poison plate method และในการทดสอบด้วยวิธี Tip culture method ทำให้ทราบว่าสารสกัดแบคทีเรียสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตามประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา และสามารถยับยั้งกระบวนการสร้างสารแอฟลาทอกซินได้ กลุ่มที่ 1 ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา มากกว่า 50 % (62.88%- 91.10%) ทำให้สารแอฟลาทอกซินถูกยับยั้งไปด้วย (86.14%-94.68%)ได้แก่ C4 C6 C14 C25 C43 C37 C8 C46 และ C52 กลุ่มที่ 2 มี 4 ไอโซเลต ที่ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราน้อยมาก (20.11%-39.94%) แต่สามารถยับยั้งกระบวนการสร้างสารแอฟลาทอกซินได้สูงมาก (58.18%-92.69%)ได้แก่ C9 C12 C18 และ C21 กลุ่มที่ 3 ยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ (51.90%-91.10%) แต่ไม่สามารถยับยั้งกระบวนการสร้างสารพิษได้เลยได้แก่ C31 C32 C40 C41 C43 C53 C57 และ C58

คัดเลือกแบคทีเรียจาก3 การทดลองข้างต้นมา 15 ไอโซเลตที่มีคุณสมบัติเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา*A. flavus* แบบแข่งขัน และไอโซเลตที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และการสร้างสารพิษได้ได้แก่ C1 C2 C3 C5 C9 C12 C17 C21 C33 C36 C37 C46 C52 C53 และ C57 นำสารสกัดจากแต่ละไอโซเลตมาทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายสารพิษโดยตรงพบว่า C1 สามารถทำลายสารแอฟลาทอกซินได้สูงถึง 66.49% ขณะที่สารสกัดของแบคทีเรียไอโซเลตที่ C36 C37 C46 และ C53, ไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายสารพิษโดยตรง และเมื่อนำเซลล์แบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารที่มีสารแอฟลาทอกซินผสมอยู่ด้วย พบว่าเซลล์แบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถเจริญเพิ่มปริมาณได้โดยมีค่าความขุ่นอยู่ระดับ +2 และ +3 นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดของแบคทีเรียทุกไอโซเลตไม่มีความเป็นพิษต่อการงอกของเมล็ดข้าวเปลือกและถั่วเขียว แสดงว่าสารสกัดแบคทีเรียมีความปลอดภัยที่จะนำใช้กับผลิตผลเกษตร

การจำแนกชนิดแกรมของแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลตด้วย KOH test พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ C3 C9 C12 C21 C37 C46 C53 และ C57ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่ม *Bacillus sp*เมื่อนำ ไอโซเลต C33 C46 และ C53 มาส่องใต้กล้อง electron microscope พบว่าจะมีรูปร่างเป็นท่อน ขนาดต่างกัน และผลจากการใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB พบว่า แบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลตเป็นกลุ่ม Bacillus และผลจากการจำแนกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (Single Strand16S rDNA sequencing) จำนวน 10 ไอโซเลตพบว่าเป็น Bacillus spทั้ง 10 ไอโซเลต โดย C33 แล C46 คือ *Bacillus tequilensis* C53 และ C57 คือ *Bacillus subtilis subsp. Inaquosorum*

นำสารสกัดแบคทีเรียของไอโซเลต C33C46 C53 มาทดสอบประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนถั่วลิสงตามธรรมชาติพบว่า สารแอฟลาทอกซินลดลง64.24% 69.18% และ 27.67%ตามลำดับหลังการคลุกเมล็ดถั่วลิสง 14 วัน และเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต C46 ทีมีปริมาณแบคทีเรีย $12X10^8$สามารถลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินในฝักถั่วลิสงได้ถึง 85.98% เมื่อเทียบกับปริมาณรแอฟลาทอกซินของชุดควบคุมที่ 28 วันหลังการแช่ฝักถั่วลิสง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียดินไอโซเลต C46 ทั้สารสกัดแบคทีเรียและเซลล์แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ในการลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในเมล็ดถั่วลิสงกะเทาะเปลือก และไม่กระเทาะเปลือกก็ได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผู้เกี่ยวข้องทั้งภาครัฐและเอกชน ผู้ประกอบการแปรรูป รวมทั้งเกษตรกร สามารถนำผลการทดลองนี้ไปใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Aspergillus flavus*และยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตรทุกขั้นตอนการผลิตตั้งแต่ในแปลงปลูก ช่วงการเก็บรักษา และก่อนนำไปผลิตผลเกษตรไปแปรรูปเป็นอาหาร และอาหารสัตว์ ซึ่งจะทำให้ผลิตผลเกษตร และผลิตภัณฑ์ มีคุณภาพปลอดภัยจากการปนเปื้อนของเชื้อรา และสารแอฟลาทอกซินนอกจากนี้ยังสามารถนำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพที่ได้จากการทดลองนี้ไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เพื่อผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

IARC. 1993. Aflatoxins. *In* Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines, and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 56. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.pp 245-395.

Jermnak, U. A. Chinaphuti., A. Poapolathep., R. Kawai.,H. Nagasawa and S. Sakuda.2013. Prevention of afaltoxin contamination by soil bacterium of *Stenotrophomonas* sp. that produces aflatoxin production inhibitors. Microbiology.159,902-912

Lillehoj, E. B., R.D. Stubblefield, G. M. Shannon and O.L. Shotwell. 1971. Aflatoxin M1 removal from aqueous solutions by *Flavobacteriumaurantiacum* . MycopathologiaetMycologia applicata, vol. 45: 259-266

Lopez-Garcia, R. and D.L. Park. 1998 Effectiveness of post-harvest procedures in management of mycotoxinhazards.*In*. Mycotoxins in agriculture and food safety. D.Bhatnagar and S. Sinha.(Eds). New York, Marcel Dekker. pp .407-433.

Moss, M.O., 1998.Recent studies of mycotoxins.Joirnal of Applied Microbiology. Symposium supplementary 84:62S-76S

Park, D.L. 1993. Controllongaflatoxin in food and feed. Food Technology .October : 92-96.

Power,E.M. 1995. Effecacy of the Rye Nonstaining KOH technique for rapidly determine Gram reactions of Food –Borne and Water borne bacteria and yeasts. Appl Environ

Microbial.61(10):3756-3758

Sakuda, S., T. Yoshinari., K. Nakamura., T. Akiyama., Y.Takahashi., Y. Muraoka., Y. Nonomura and H. Nagasawa. 2007. Studies on inhibitors for mycotoxin production. .*In*Preceeding of International Symposium of Mycotoxicology "New Strategies for Mycotoxin Research in Asia. Pages 135-140