การตรวจหาราจีนัสแอสเปอร์จิลลัสซึ่งแยกได้จากพริกป่น

Detection of Genus *Aspergillus* Isolated from Chili Powder

ศราวุธ แพวขุนทด[1] ลัดดาวัลย์ พะวร[2] พหล แสนสมชัย[2] และ อรอุมา จันทร์เสถียร[3]

บทคัดย่อ

ราในจีนัสแอสเปอร์จิลลัสสร้างสารพิษที่สำคัญ ได้แก่ อะฟลาท็อกซิน ซึ่งสัมพันธ์กับการก่อโรคมะเร็งตับในมนุษย์จากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษนี้ คนไทยใช้พริกป่นเป็นเครื่องปรุงรสอาหารมาตั้งแต่โบราณ ประกอบกับประเทศไทยมีภูมิอากาศแบบร้อนชื้นทำให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ดีและสร้างสารพิษได้ปริมาณมาก วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้เพื่อตรวจหาราจีนัสแอสเปอร์จิลลัสที่ปนเปื้อนในพริกป่น จากตลาดในเขตพื้นที่อำเภอเมืองนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา การตรวจวิเคราะห์ราได้ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการเกลี่ยเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และทำบริสุทธิ์เชื้อด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงบนแผ่นสไลด์ ตรวจสอบสัณฐานวิทยาของราด้วยการย้อมด้วยแลคโตฟีนอลคอตตอนบลู และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ผลการทดลองพบว่าพบราในจีนัสแอสเปอร์จิลลัสจำนวน 6 ตัวอย่าง จาก 75 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.00 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างพริกป่นจากตลาดในเขตพื้นที่อำเภอเมืองนครราชสีมาพบราที่สร้างสารพิษอะฟลาท็อกซินในปริมาณค่อนข้างต่ำ อาจเนื่องมาจากวัตถุดิบคือพริกมีคุณภาพดี และมิได้เน่าเสียจากเชื้อราก่อนนำมาคั่วบดและจัดจำหน่ายให้กับผู้บริโภค

คำสำคัญ: การตรวจหา, แอสเปอร์จิลลัส, พริกป่น

Abstract

Aspergillus can produce mycotoxin such as aflatoxin. The toxin is related to liver cancer in human who having food that contamination with aflatoxin. Thai have been using chili powder for seasoning. High relative humidity of Thailand is growth promotion of mold and its produce high mycotoxin. Objective research was to detect *Aspergillus* in chili powder collected from markets in Mueang Nakhonratchasima District, Nakhonratchasima Province. Spread plate technique was used as detection method. Slide culture technique was using for mold purification. Lactophenol cotton blue staining and microscopy detection was used for mold morphological characteristics. Six of seventy-five chili powder samples (8.00%) were found *Aspergillus* contamination. The result was showed low amount of aflatoxin-producing mold in chili powders that collected from markets in Mueang Nakhonratchasima District. Good quality of raw materials and mold decontamination of chili before grounded, therefore a good products of chili powders for comsumers.

[1] นักศึกษาระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ วิทยาลัยนครราชสีมา

[2] อาจารย์ประจำ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ วิทยาลัยนครราชสีมา

[3] Corresponding Author อาจารย์ประจำ คณะศึกษาศาสตร์และศิลปศาสตร์ วิทยาลัยนครราชสีมา

Keywords: Detection, *Aspergillus*, Chili Powder

ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

ราในจีนัสแอสเปอร์จิลลัสที่สร้างสารพิษชนิดอะฟลาท็อกซิน ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ซึ่งมีสีเขียวแกมเหลือง หรือสีเหลืองอ่อน เชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้พบได้ทั่วไปในอาหาร และวัตถุดิบทางการเกษตร ในประเทศที่อยู่ในแถบร้อนพบอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนในถั่วลิสง ข้าวโพด พริกแห้ง เครื่องเทศและผลิตผลทางการเกษตรต่างๆ มีรายงานการตรวจพบอะฟลาท็อกซินในหัวหอม กระเทียม กะปิ พริกแห้ง ปลาร้าและน้ำพริก ที่วางจาหน่ายตามตลาดทั่วไป และรายงานในต่างประเทศพบอะฟลาท็อกซินในเครื่องเทศที่นำเข้าจากประเทศแถบร้อนอยู่เสมอ ดังประเทศต่างๆมีการกำหนดค่าปนเปื้อนของสารอะฟลาท็อกซิน เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค เช่น ประเทศอิตาลีกำหนดให้มีการปนเปื้อนได้ไม่เกิน 50 ppb หรือ 50 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ประเทศออสเตรเลียกำหนดที่ 15 ppb และประเทศไทยตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 กำหนดให้มีการปนเปื้อนได้ไม่เกิน 20 ppb อย่างไรก็ตามการบริโภคอาหารแม้ปริมาณอะฟลาท็อกซินจะต่ำกว่ากำหนด แต่สารนี้จะสะสมในร่างกายและอาจร่วมกับสาเหตุอื่นๆเป็นตัวกระตุ้นร่วมทำให้เกิดมะเร็งตับได้ การวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นการตรวจสอบราในจีนัสแอสเปอร์จิลลัสซึ่งสามารถสร้างอะฟลาท็อกซินได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อตรวจหาราจีนัสแอสเปอร์จิลลัสที่ปนเปื้อนในพริกป่น จากตลาดในเขตพื้นที่อำเภอเมืองนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงสำรวจ โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างพริกป่นจากร้านค้าที่จัดจำหน่ายในตลาด โดยวิธีการสุ่มเลือกตลาดจำนวน 3 ตลาด/ตำบล ทุกตำบล (มีทั้งสิ้น 25 ตำบล) ในเขตอำเภอเมืองนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา รวมจำนวนตัวอย่าง 75 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างพริกป่นน้ำหนักประมาณ 50 กรัม โดยใช้ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ ปิดปากถุงให้แน่น นำส่งห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา วิทยาลัยนครราชสีมา เพื่อตรวจวิเคราะห์หาราในกลุ่มแอสเปอร์จิลลัส

การเตรียมตัวอย่าง

การเจือจางตัวอย่างอย่างเป็นลำดับส่วน ด้วยสารละลายสำหรับเจือจางโดยชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปริมาตร 225 ml เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:10 (10^{-1}) ปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 มา 1 ml ใส่ในสารละลาย 0.85 % NaCl ปริมาตร 9 ml เขย่าให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:100 (10^{-2}) ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้ตัวอย่างที่เจือจางตามต้องการ

การตรวจหาปริมาณ (enumeration) ราโดยวิธีการ Pour Plate Technique

การตรวจวิเคราะห์ราได้ทำการตรวจวิเคราะห์ตามวิธีของ Bacteriological Analytical Manual (BAM, Chapter 18) โดยปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่างๆปริมาตร 0.1 ml ลงในจานเพาะเชื้อระดับความเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ (Duplicate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)

เกลี่ยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อให้แห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 วันโดยไม่ต้องคว่ำจานเพาะเชื้อและวางซ้อนกันไม่เกิน 3 จานเพาะเชื้อ เมื่อครบ 5 วันถ้าไม่มีการเจริญของเชื้อให้บ่มต่ออีก 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีราเจริญ

การทำบริสุทธิ์รา

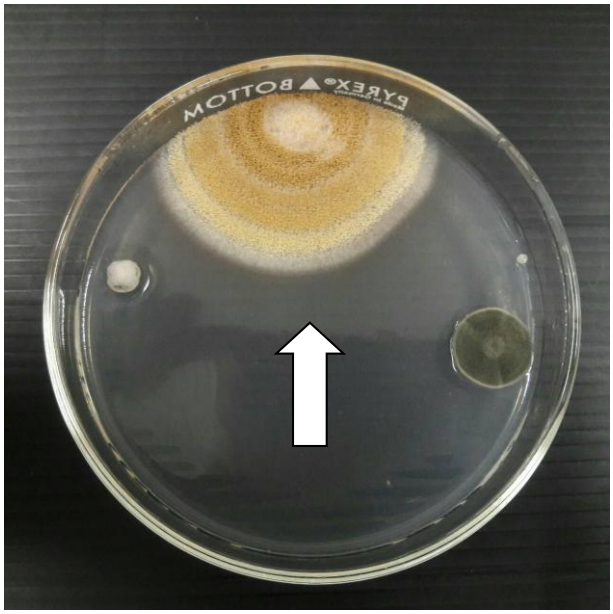
นำโคโลนีราที่มีสีเขียวแกมเหลือง ผิวหน้าคล้ายกำมะหยี่ จากจานเพาะเชื้อมาทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงบนแผ่นสไลด์ โดยใช้ชุดเพาะเลี้ยงเชื้อราปราศจากเชื้อ ประกอบด้วยแท่งแก้วงอ แผ่นกระจกสไลด์ และกระจกปิดสไลด์ (Cover Slip) นำอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 1.5 เซ็นติเมตร นำมาวางบนแผ่นกระจกสไลด์ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอย้ายราจากจานเพาะเชื้อลงบนมุมทั้ง 4 ด้านของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงในชุดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 วัน

การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยา

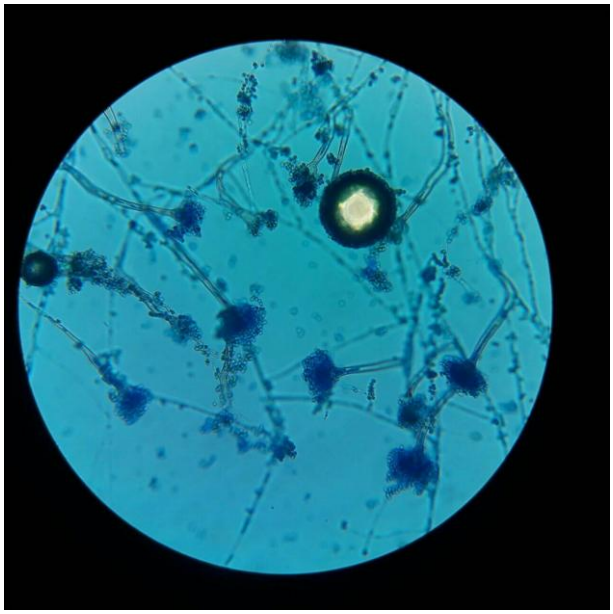
นำกระจกปิดสไลด์จากชุดการทำบริสุทธิ์ราจากจานเพาะเชื้อมาวางบนสีย้อม Lactophenol Cotton Blue และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 4X ถึง 40X

สรุปผลการวิจัย

ผลการทดลองพบว่าพบราในจีนัสแอสเปอร์จิลลัสจำนวน 6 ตัวอย่าง จากตัวอย่างพริกป่นจำนวน 75 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.00 ลักษณะโคโลนีของราในจีนัสแอสเปอร์จิลลัสในจานเพาะเชื้อแสดงดังรูปที่ 1. ราในจีนัสแอสเปอร์จิลลัสจะมีก้านชูสปอร์ (conidiophore) ตั้งตรงขึ้นมาจาก foot cell ปลายของก้านชูสปอร์พองออกเป็น vesicle มี phialide รูปร่างคล้ายแจกันตั้งอยู่โดยรอบ 2 ชั้น ถ้ามีแถวเดียวเรียก uniseriate phialide แต่บางสายพันธุ์มีเซลล์ที่เรียก metula รองซ้อนอีกชั้น เรียก biseriate phialide ที่ปลาย phialide มี conidia รูปกลมหรือรี อาจเรียบหรือหยาบต่อกันเป็นแถวยาวคล้ายโซ่เรียงโดยรอบ จากการทดลองเมื่อทำบริสุทธ์เชื้อและตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ราของในจีนัสแอสเปอร์จิลลัสแสดงดังรูปที่ 2.



รูปที่ 1. ลักษณะโคโลนีของราในกลุ่มแอสเปอร์จิลลัสในจานเพาะเชื้อ



รูปที่ 2. ลักษณะสัณฐานวิทยาของราในกลุ่มแอสเปอร์จิลลัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์

อภิปรายผล

การศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ ชาคริยา ฉลาด และคณะ (2555) ซึ่งพบเชื้อรา 4 สกุล ได้แก่ *Aspergillus*, *Fusarium*, *Syncephalastrum* และ *Penicillium* ตรวจพบในถั่วลิสงป่น ถั่วลิสงแห้ง พริกป่น และพริกแห้ง รวมทั้งการศึกษาของ วัชรี เสาร์เทพ และคณะ (2560) พบเชื้อรา *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. ที่ปนเปื้อนในอาหารผลิตผลทางการเกษตรและดินเพาะปลูก ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้พบราในจีนัสแอสเปอร์จิลลัสจำนวน 6 ตัวอย่าง จาก 75 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.00 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างพริกป่นจากตลาดในเขตพื้นที่อำเภอเมืองนครราชสีมาพบราที่สร้างสารพิษอะฟลาท็อกซินในปริมาณค่อนข้างต่ำ อาจเนื่องมาจากวัตถุดิบคือพริกมีคุณภาพดี และมิได้เน่าเสียจากเชื้อราก่อนนำมาคั่วบดและจัดจำหน่ายให้กับผู้บริโภค

ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะในการนำผลวิจัยไปใช้

(1) สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับผู้บริโภคและเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องด้านความปลอดภัยในอาหาร

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

(1) ควรมีการตรวจปริมาณสารพิษชนิดอะฟลาท็อกซินร่วมด้วย

เอกสารอ้างอิง

ชาคริยา ฉลาด และคณะ. (2555). อินทรีย์และสารพิษอะฟลาท็อกซินในอาหารที่จาหน่ายในจังหวัดตรัง. **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย.** 4(2): 56-69.

วัชรี เสาร์เทพ อรอุมา เพียซ้าย และพัชรวิภา ใจจักรคำ. (2560). การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. ที่ปนเปื้อนใน อาหารผลิตผลทางการเกษตร และดินเพาะปลูก และการสร้าง สารพิษอะฟลาท็อกซิน บี 1**. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร.** 48(1): 127-138.