



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาวะอากาศต่อการเจริญและการสร้าง
สารไมโคทอกซินจากเชื้อราที่สร้างสารไมโคทอกซินที่พบในเมล็ดข้าว

The impact of climate change on growth and mycotoxin production by
mycotoxigenic fungi associated with stored rice grains

ดร. สุพรรณิการ์ สมใจเพ็ง

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559
มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการ 2559A10802005

สัญญาเลขที่ 115/2559

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาวะอากาศต่อการเจริญและการสร้าง
สารไมโคทอกซินจากเชื้อราที่สร้างสารไมโคทอกซินที่พบในเมล็ดข้าว

The impact of climate change on growth and mycotoxin production by
mycotoxigenic fungi associated with store rice grains

ดร. สุพรรณิการ์ สมใจเพ็ง
คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

กันยายน 2562

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

ข้าพเจ้า ดร.สุพรรณิการ์ สมใจเพ็ง ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่องผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาวะอากาศต่อการเจริญและการสร้างสารไมโคทอกซินจากเชื้อราที่สร้างสารไมโคทอกซินที่พบในเมล็ดข้าว (The impact of climate change on growth and mycotoxin production by mycotoxigenic fungi associated with store rice grains) รหัสโครงการ 2559A10802005 / สัญญาเลขที่ 115/2559 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 385,000 บาท (สามแสนแปดหมื่นห้าพันบาทถ้วน) ระยะเวลาดำเนินงาน 3 ปี 11 เดือน (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึงวันที่ 11 กันยายน พ.ศ. 2562)

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาวะภูมิอากาศ ได้แก่ water activity (aw), อุณหภูมิและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อ (ก) การตอบสนองการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน และ (ข) การสร้างสารอะฟลาทอกซิน ปี1 เชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซินที่คัดแยกได้จากเมล็ดข้าวในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีจำนวนทั้งหมด 3 ไอโซเลท ได้แก่ A. *flavus* BUU24, BUU52 และ BUU54 ที่สามารถสร้างสารอะฟลาทอกซิน ปี1 ที่ระดับความเข้มข้นที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยมีความเข้มข้นระหว่าง 2.5-480 ไมโครกรัม/กิโลกรัม

ในภาพรวมการเจริญของเชื้อราแต่ละไอโซเลทบนอาหารเลี้ยง 3% rice-milled agar มีรูปแบบการเจริญที่คล้ายคลึงกันที่อุณหภูมิ 20-40 °C, 0.85-0.99 aw และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 350-1200 ppm สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราคือที่ 30-35 °C และ 0.98-0.99 aw ภายใต้สภาวะเครียดเนื่องจากน้ำ (0.85 aw) เชื้อราเกือบทุกไอโซเลทไม่สามารถเจริญได้ไม่ว่าที่ระดับอุณหภูมิและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ใด จากการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงให้เห็นว่า aw และอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลต่อระยะ lag phase และอัตราการเจริญของเชื้อราภายใต้สภาวะที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในขณะที่อิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยที่ศึกษาไม่มีผลต่อการตอบสนองของเชื้อรา ($P > 0.05$) ระยะ lag phase เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเชื้อราเจริญภายใต้สภาวะที่มีระดับอุณหภูมิและ aw มากหรือน้อยกว่าระดับสภาวะที่เหมาะสม สำหรับผลของอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาวะภูมิอากาศต่ออัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อราที่คัดแยกได้ พบว่ามีรูปแบบการตอบสนองที่คล้ายคลึงกันที่อุณหภูมิ 30-40 °C, 0.90-0.99 aw และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 300-1200 ppm โดยอัตราการสร้างสปอร์เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญภายใต้สภาวะการเจริญที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 300

ppm ในขณะที่เมื่อเพิ่มปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (1200 ppm) อัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อราลดลง จากข้อมูลพื้นผิวการตอบสนองของเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์คือที่ 37-40 °C และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 300-550 ppm และมีปริมาณน้ำอิสระมาก (>0.97 aw) เชื้อราสามารถสร้างสปอร์ได้มากกว่า 4.0×10^5 สปอร์/กรัม/วัน จากการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงให้เห็นว่าชนิดของไอโซเลท, aw, อุณหภูมิ และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่ออัตราการสร้างสปอร์อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในขณะที่อุณหภูมิไม่มีผลต่ออัตราการสร้างสปอร์ ภายใต้สภาวะความเครียดเนื่องจากน้ำ (0.90-0.94 aw) ไม่ว่าที่ระดับอุณหภูมิและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ใด พบว่ามีผลยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราเล็กน้อย ส่วนอัตราการสร้างสปอร์เมื่อเชื้อราเจริญภายใต้สภาวะ 0.97-0.99 aw พบว่าอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย (ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มมากขึ้น \times อุณหภูมิ) มีผลต่อการสร้างสปอร์เพิ่มมากขึ้น

ในการประเมินผลกระทบของอิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิ (20, 30, 40 °C) และ aw (0.99, 0.95, 0.99) ต่ออัตราการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* BUU52 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3% rice-milled agar โดยการใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองสามารถสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อใช้ในการทำนายผลอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ โดยแบบจำลองที่ได้สามารถยอมรับได้เพื่อใช้ในการทำนาย ($R^2 = 0.86$) โดยแบบจำลองนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทำนายผลการเจริญของเชื้อราภายใต้สภาวะจริง

ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้น (1200 ppm) และมีอุณหภูมิสูง (30 °C) รวมทั้งมีปริมาณน้ำอิสระมาก (>0.85 aw) พบว่าเป็นสภาวะที่กระตุ้นให้เชื้อรา *A. flavus* BUU52 สร้างสารอะฟลาทอกซิน บี1 เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมได้แก่อุณหภูมิ aw และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีบทบาทสำคัญไม่เพียงแต่เฉพาะการสร้างสารทุติยภูมิแต่ยังมีผลต่อการเจริญของเชื้อราด้วย การศึกษาในครั้งนี้ได้ข้อมูลที่มีประโยชน์ที่อาจเป็นคำอธิบายเพิ่มเติม เกี่ยวกับผลของอิทธิพลร่วมระหว่างการเจริญและการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา นอกจากนี้ยังนำไปสู่งานวิจัยในอนาคตเพื่อเพิ่มความเข้าใจที่มากขึ้น เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อราในพืชอาหารอื่นที่สามารถเกิดขึ้นได้หลังการเก็บเกี่ยว

ABSTRACT

This study has investigated the interaction of climate change factors such as water activity (a_w), temperature and carbon dioxide on (a) the growth responses of aflatoxigenic *Aspergillus flavus*, and (b) the production of aflatoxin B1 by a strain of aflatoxigenic fungi. Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* were isolated from stored paddy rice grains from east regions of Thailand. Only 3 isolates including *A. flavus* BUU24, BUU52 and BUU54 exhibited the potent aflatoxin B1 producers. These isolates produced detectable aflatoxin B1 at concentration ranging from 2.5-480 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Overall, the growth of each isolate on 3% rice-milled agar was similar over the 20-40°C, 0.85-0.99 a_w and 350-1200 CO₂ ppm ranges. The growth was optimum at 30-35 °C and 0.98-0.99 a_w .

Under severe a_w stress (0.85 a_w), most of the isolates unable to grow regardless temperature and CO_2 levels used. Statistical analysis indicated that a_w and temperature significantly affected lag phase and growth rate within the range used in this study ($P < 0.05$). There was no evidence of statistical interaction effect on the lag phases prior to growth and growth rate of fungal isolates ($P > 0.05$). The lag phases were significantly increased at marginal temperature and a_w levels. For spore production rate, the similar profiles for rate of spore production over 30-40 °C, 0.90-0.99 a_w and CO_2 300-1,200 ranges were observed. Rate of spore production were significantly increased at CO_2 300 ppm, while the spore production were decreased under elevated CO_2 exposure (1,200 ppm). The optimal condition for spore production was found to be around 37-40 °C and CO_2 300-550 ppm with more freely available water condition ($> 0.97 a_w$), higher spore production was obtained ($> 4.0 \times 10^5$ spore/g/d). Statistical analysis indicated that fungal strains, a_w and CO_2 levels significantly affected rate of spore production at studied stress condition ($P < 0.05$). While the temperature had no significant effect on the spore yield ($P > 0.05$). Under severe a_w stress (0.90-0.94 a_w) regardless CO_2 and temperature used, slightly inhibitory effect of spore production was observed. Spore production under 0.97-0.99 a_w , the impact of the interaction between combined factors (elevated CO_2 x temperature) were pronounced.

Response surface methodology was used to evaluate the combined effects of different temperatures (20, 30, 40 °C) and a_w (0.99, 0.95, 0.90) on radial growth rate of *A. flavus* BUU52 on 3% rice-milled agar when glycerol was selected as a_w depressor. The established model provided an acceptable accuracy prediction for radial growth rate ($R^2 = 0.86$) These predictive models are a useful tool which can be applied to predict the growth under *in vivo* conditions.

Under elevated CO_2 (1200 ppm) with high temperature (30 °C) and more freely available water condition ($> 0.95 a_w$), the aflatoxin B1 production by a strain of aflatoxigenic *A. flavus* BUU52 was stimulated. These studies suggest that the ecological factors including temperature, a_w and CO_2 play a role in the productivity not only in fungal secondary metabolites, but also can impact on growth of fungi. This present study provided ecophysiological growth patterns and aflatoxin B1 production by aflatoxigenic *A. flavus* in the response to the combined climate-change stresses (a_w x temperature x CO_2) on a milled rice agar medium and rice grains. The maximum, optimum and minimum conditions for growth have been detailed. This useful information may be the additional explanation in interaction effects on growth and aflatoxin B1 production. Moreover, this rises some interesting questions in the responses of another

potential mycotoxigenic fungi to such stress conditions. Thus, this provides the challenge for intensive research to gain a better understanding in order to minimize fungal contamination which can occur during post-harvest handling of other commodities.

ข้อเสนอแนะ

- เพื่อเพิ่มความเข้าใจถึงผลกระทบของปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศต่อการเจริญเติบโตและการสร้างอะฟลาทอกซินในเมล็ดข้าว อาจต้องมีศึกษาเพิ่มเติมต่อชนิดของสายพันธุ์ข้าว รวมถึงระดับการสีข้าว เนื่องจากมีผลต่อการสร้างสารและการเจริญของเชื้อราที่ปนเปื้อน
- อาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในพืชอาหารชนิดอื่น เพื่อเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับการตอบสนองของเชื้อราสายพันธุ์อื่นต่อสภาวะเครียดมากยิ่งขึ้น รวมทั้งเป็นแนวทางจัดการลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนของเชื้อราและการสร้างสารพิษอื่นจากเชื้อราในพืชอาหารอื่นหลังการเก็บเกี่ยว

ผลผลิต

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในระดับชาติ

สุพรรณนิการ์ สมใจเพ็ง, เกษรา กระสังข์, ปานระวี โสภา และ ชนิดา น้อยชัยพฤกษ์. 2560. การประยุกต์ใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองในการทำนายอัตราการเจริญเติบโต ของเชื้อรา *Aspergillus* section *Flavi* ที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน: ผลของปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ, แก่นเกษตร. 45(ฉบับ พิเศษ 1): 1410-1416

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 115/2559

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 115/2559).

สารบัญ

	หน้า
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ก
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	6
บทที่ 4 ผลการทดลอง	10
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	33
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	34
รายงานสรุปการเงิน	36
เอกสารอ้างอิง	37
ประวัตินักวิจัย	42

สารบัญตาราง

	หน้า
Table 1 Experimental factors and their levels used in 6x5x3 factorial design.	7
Table 2 Experimental factors and their levels used in 7x4x3 factorial design.	9
Table 3 Radial growth rate and lag phase of <i>A. flavus</i> isolates at 25°C for 7 days on MEA, PDA and CMA agar.	12
Table 4 The statistical analyses examined in relation to both lag phase (λ , days) and the growth rate in relation to strain x a_w x temperature using the Kruskal-Wallis test (non-normality data). The significant factors are in bold.	19
Table 5 The statistical analyses of the six strains examined in relation to both lag phase (λ , days) and the growth rate using the Kruskal-Wallis test (non-normality data) and ANOVA (normality data).	20
Table 6 The statistical analyses examined in relation to spore production rate on rice grains in relation to strain x a_w x temperature x CO ₂ using the Kruskal-Wallis test (non-normality data). The significant factors are in bold.	27
Table 7 The statistical analyses examined in relation to spore production rate on rice grains in relation to a_w x temperature x CO ₂ using the Kruskal-Wallis test (non-normality data). The significant factors are in bold.	27

สารบัญภาพ

	หน้า
Figure 1 Reverse of CCA cultures of aflatoxigenic strains (A-C) showing a blue-green fluorescent ring around the colony and non-aflatoxigenic strain (D) of <i>A. flavus</i> observed under UV light after 10 days of incubation at 25 °C	10
Figure 2 <i>A. flavus</i> BUU24 colonies growth at 25°C on MEA, PDA and CMA agar.	11
Figure 3 <i>A. flavus</i> BUU52 colonies growth at 25°C on MEA, PDA and CMA agar.	11
Figure 4 <i>A. flavus</i> BUU54 colonies growth at 25°C on MEA, PDA and CMA agar.	12
Figure 5 Effect of $a_w \times CO_2 \times$ temperature on radial growth rate and the mean lag time of <i>A. flavus</i> BUU24 grown on 3% rice milled agar. Bars indicates standard error of the mean.	14
Figure 6 Main effects plot of the mean of radial growth rate of <i>A. flavus</i> BUU24.	15
Figure 7 Effect of $a_w \times CO_2 \times$ temperature on radial growth rate and the mean lag time of <i>A. flavus</i> BUU52 grown on 3% rice milled agar. Bars indicates standard error of the mean.	16
Figure 8 Main effects plot of the mean of radial growth rate of <i>A. flavus</i> BUU52.	17
Figure 9 Effect of $a_w \times CO_2 \times$ temperature on radial growth rate and the mean lag time of <i>A. flavus</i> BUU54 grown on 3% rice milled agar. Bars indicates standard error of the mean.	18
Figure 10 Main effects plot of the mean of radial growth rate of <i>A. flavus</i> BUU54.	19
Figure 11 The observed values with the model predicted values plot for <i>A. flavus</i> BUU52. A high correlation ($R^2=0.86$) between the predicted data and the experimental data was observed. The average error from the model is encapsulated in the RMSE (= 0.78). RSEP value was low as 13.33%.	21
Figure 12 Mean of contour plot of growth rate profile of <i>A. flavus</i> BUU52 in relation to $a_w \times$ temperature on a milled paddy rice agar.	22
Figure 13 Mean of contour plot of growth rate profile of <i>A. flavus</i> BUU52 in relation to $a_w \times CO_2$ on a milled paddy rice agar	23
Figure 14 Mean of contour plot of growth rate profile of <i>A. flavus</i> BUU52 in relation to $a_w \times$ temperature on a milled paddy rice agar.	23
Figure 15 Effect of $a_w \times CO_2 \times$ temperature on spore production rate of <i>A. flavus</i> BUU24, BUU52 and BUU54 grown on rice grains. Bars indicates standard error of the mean.	25

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
Figure 16 Interaction effects plot of the mean of spore production rate of <i>A. flavus</i> BUU24, BUU52 and BUU54 grown on rice grains.	26
Figure 17 Mean of contour plot of spore production rate profile of combined data (<i>A. flavus</i> BUU24, BUU52 and BUU54) in relation to a_w x temperature on paddy rice grains.	28
Figure 18 Mean of contour plot of spore production rate profile of combined data (<i>A. flavus</i> BUU24, BUU52 and BUU54) in relation to a_w x CO ₂ on paddy rice grains.	29
Figure 19 Mean of contour plot of spore production rate profile of combined data (<i>A. flavus</i> BUU24, BUU52 and BUU54) in relation to temperature x CO ₂ on paddy rice grains.	29
Figure 20 Effect of a_w x temperature x CO ₂ on aflatoxin B1 (AFB1) production by <i>A. flavus</i> BUU52 grown on 3% rice-milled agar for 10 days at 25°C and 30°C. Bars indicate standard error of the mean.	30
Figure 21 Effect of a_w x temperature x CO ₂ on aflatoxin B1 (AFB1) production by <i>A. flavus</i> BUU52 grown on stored irradiated rice grains for 10 days at 25°C and 30°C. Bars indicate standard error of the mean.	31

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของปัญหา

การปนเปื้อนของเชื้อราในข้าวที่เกิดขึ้นในขั้นตอนก่อนการเก็บเกี่ยว (pre harvest) และหลังการเก็บเกี่ยว (postharvest) สามารถส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อคุณภาพของข้าว, ความสามารถในการงอก และคุณค่าทางอาหารอย่างรวดเร็ว หนึ่งในปัญหาที่มีผลโดยตรงต่อคุณภาพข้าวในด้านความปลอดภัยของอาหาร (food safety) คือการปนเปื้อนของสารไมโคทอกซิน (Mycotoxin) เช่น อะฟลาทอกซิน (aflatoxin), ออกราทอกซิน เอ (ochratoxin A) และ ฟุโมนิซิน (fumonisins) เป็นต้น ซึ่งถูกสร้างขึ้นจากเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. และ *Fusarium* sp. เป็นต้น โดยสารไมโคทอกซินจะมีผลต่อสัตว์มีกระดูกสันหลัง รวมทั้งคน และสัตว์เลี้ยงถึงแม้จะมีปริมาณความเข้มข้นต่ำก็ตาม นอกจากนี้ไมโคทอกซินยังถูกจัดเป็นสารก่อมะเร็งในคนอีกด้วย

ความมั่นคงทางด้านอาหาร (food security) กลายเป็นหัวข้อที่มีความสำคัญไปทั่วโลก รวมทั้งผลกระทบที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ (climate change) ต่อผลผลิตทางการเกษตร และคุณภาพของอาหาร ที่นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแง่ของการวิเคราะห์ความเสี่ยง (risk analysis) หนึ่งในความสนใจคือการศึกษถึงผลกระทบของปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศต่อการปนเปื้อนของเชื้อราในที่สร้างไมโคทอกซินในพืชเกษตรกรรม และการสร้างสารพิษไมโคทอกซินจากเชื้อราได้อย่างไร ทั้งในแง่ของอนาคตอันใกล้ และไกล โดยปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศ (climate factors) ได้แก่ อุณหภูมิ, วอเตอร์แอกทิวิตี (water activity, a_w) และความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (elevated CO_2)

จากการคาดการณ์ว่าสิ่งแวดล้อมในอีก 10-25 ปีข้างหน้า จะมีการเปลี่ยนแปลงของระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศเพิ่มขึ้นสองหรือสามเท่าจากปัจจุบัน (จาก 350 ถึง 1000 ppm) และมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้น +2 แล \pm +5°C นอกจากนี้ยังพบว่าการปนเปื้อนของเชื้อราที่สร้างไมโคทอกซินเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีอุณหภูมิ และความแห้งแล้งเพิ่มขึ้น ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศจึงส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมากต่อปริมาณของเชื้อราที่สร้างสารพิษไมโคทอกซิน

แม้ว่าจะมีงานวิจัยเกี่ยวกับการปนเปื้อนสารไมโคทอกซินในข้าวในประเทศไทย แต่ไม่พบข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาถึงผลของ interaction ระหว่าง climate factors ต่อการเจริญเติบโต และการสร้างสารไมโคทอกซินจากเชื้อราที่แยกได้จากข้าวในประเทศไทย ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจมากที่งานวิจัยนี้จะทำให้เกิดความเข้าใจถึงผลของ climate change ต่อเชื้อราที่สร้างไมโคทอกซิน และการสร้างสารไมโคทอกซิน เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปพัฒนาการจัดการผลผลิตการเกษตรเพื่อความปลอดภัยของอาหารต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1. การตัดแยกเชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซินปี 1 จากเมล็ดข้าว
2. ศึกษาผลของอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยอุณหภูมิ, a_w และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญของเชื้อราที่สร้างไมโคทอกซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. ศึกษาผลของอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยอุณหภูมิ, a_w และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่ออัตราการสร้างสปอร์และการสร้างสารอะฟลาทอกซิน ปี 1 ในเมล็ดข้าว

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ตัดแยกเชื้อราที่สร้างสารไมโคทอกซินได้แก่ อะฟลาทอกซิน ปี1 จากเมล็ดข้าว
2. ตัดแยกเชื้อราที่สร้างสารพิษไมโคทอกซินจากเมล็ดข้าวในพื้นที่ภาคตะวันออก
3. งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาผลของอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยความเครียดทางกายภาพ (abiotic stress factors) ทั้งหมด 3 ชนิดได้แก่ CO_2 , อุณหภูมิ และ a_w ต่อการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน ปี1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมล็ดข้าว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้องค์ความรู้การเข้าใจถึงผลกระทบของอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศที่มีผลต่อการเจริญ และการสร้างสารไมโคทอกซินจากเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดข้าว
2. องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปวิจัยต่อยอดเพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพัฒนาการจัดการผลผลิตการเกษตรชนิดอื่นๆ เพื่อความปลอดภัยของอาหารที่ถูกผลิตขึ้นภายใต้สภาวะการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศต่อไป ตัวอย่างของการนำไปวิจัยต่อยอดเช่นการประยุกต์ใช้ไอโซนในเมล็ดข้าวไทยเพื่อยืดอายุการเก็บ และการลดปริมาณสารไมโคทอกซิน เป็นต้น
3. ผลการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์โดยเป็นข้อมูลสำคัญเบื้องต้นต่อการประเมินความเสี่ยงของความปลอดภัยทางอาหารของข้าวไทยในด้านความเสี่ยงทางด้านสาธารณสุข ที่เกี่ยวเนื่องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ เรื่องความปลอดภัยของอาหารที่ถูกปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่สร้างสารไมโคทอกซิน โดยคาดว่าจะมีประโยชน์ต่อส่วนงานกรมวิชาการเกษตร และมหาวิทยาลัยบูรพา ในการนำไปเผยแพร่ และประยุกต์ใช้กับพืชเศรษฐกิจอื่นต่อไป

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

ข้าวเป็นหนึ่งในอาหารหลักทั่วโลก สายพันธุ์ข้าวที่หลากหลายมีการเพาะปลูกในพื้นที่ที่แตกต่างกันทั่วโลก บางชนิดถูกจำกัดพื้นที่การเพาะปลูกด้วยลักษณะทางภูมิศาสตร์เฉพาะ เช่น ข้าวบาสมати (basmati rice) ในประเทศอินเดีย และปากีสถาน หรือข้าวหอมมะลิ (jasmine rice) ในประเทศไทย จากข้อมูลสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรในปี 2556 ประเทศไทยมีการผลิตข้าวเปลือกประมาณ 38.3 ล้านตัน ส่งออกประมาณ 6.7 ล้านตัน มีมูลค่าการส่งออกประมาณ 142,976 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) การจัดการข้าวทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวที่ดี ส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพข้าวในด้านความปลอดภัยของอาหาร (food safety)

จากรายงานขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agricultural Organization, FAO) ว่ามีพืชอาหารทั่วโลกอย่างน้อย 25% พบการปนเปื้อนของสารไมโคทอกซิน (WHO, 1999) ถึงแม้ว่าการปนเปื้อนสารไมโคทอกซินในข้าวมีรายงานการพบน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับที่พบในธัญพืชชนิดอื่น แต่ข้าวจัดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ดี ที่สามารถสนับสนุนการเจริญเติบโตของเชื้อรา และการสร้างสารพิษ (toxigenesis) จากการทดสอบการใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบกิจกรรมการสร้างสารพิษจากเชื้อราที่แยกได้ (Bars and Bars, 1992) มีรายงานการพบไมโคทอกซินบางชนิดในข้าวจากประเทศไทย ได้แก่สารอะฟลาทอกซิน ปี 1 ในปริมาณความเข้มข้น 37 ไมโครกรัม/กก. (Tanaka et al., 2007) อมรา ซินญิตี และ ศุภรา อัครสาระกุล, 2552 รายงานการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซิน ปี 1 และสารโอคราทอกซิน เอ ในข้าวกล้องและข้าวขาวจากแหล่งจำหน่ายข้าวในกรุงเทพฯ โดยปริมาณเฉลี่ยของอะฟลาทอกซิน ปี 1 ที่พบในข้าวกล้องเท่ากับ 2.912 ไมโครกรัม/กก. และในข้าวขาวมีปริมาณที่พบเฉลี่ยเท่ากับ 0.702 ไมโครกรัม/กก. ส่วนปริมาณเฉลี่ยของอคราทอกซิน ที่พบในข้าวกล้องเท่ากับ 0.292 ไมโครกรัม/กก. และไม่พบการปนเปื้อนในข้าวขาว โดยมาตรฐานของประเทศไทยตามประกาศของ กระทรวงสาธารณสุข กำหนดให้มีการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินในอาหารได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัม/กก.

เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. และ *Fusarium* sp. เป็นเชื้อราที่มีรายงานการถูกคัดแยกได้จากเมล็ดข้าวที่พบได้ในเมล็ดข้าวเปลือก (paddy rice), ข้าวขาว (polished rice) และข้าวกล้อง (husked rice) และมีความสัมพันธ์กับการสร้างสารไมโคทอกซินในข้าว (Tonon et al., 1997; Trung et al., 2001; Park et al., 2005; Makun et al., 2007; Nguyen et al., 2007) เชื้อราทั้งสามกลุ่มถูกจัดเป็นกลุ่มเชื้อราที่มีความสำคัญมากที่สุดในธัญพืช และในอาหาร ทั้งนี้ไม่ได้เป็นเพราะความสามารถในการสร้างสารไมโคทอกซินได้หลายชนิด เช่น อะฟลาทอกซิน ปี 1, ฟุโมนิซิน ปี 1 (fumonisin B1), ออคราทอกซิน เอ, ทริโคเทซีน (trichothecenes) และ ซีราลีโนน (zearalenone) (Magan et al., 2003; Park et al., 2005; Tanaka et al., 2007; Magan et al., 2010; Magan et al., 2011; Medina et al., 2014) แต่จากการจัดกลุ่มสารก่อมะเร็ง โดยองค์การวิจัยโรคมะเร็งนานาชาติ, IARC (International Agency for Research on Cancer) อะฟลาทอกซินถูกจัดอยู่ในกลุ่มสารก่อมะเร็งกลุ่มที่ 1 โดยที่อะฟลาทอกซิน ปี 1 จัดเป็นสารก่อมะเร็งที่พบได้ทั้งในอาหารอาหารคน

และอาหารสัตว์ และมีความสามารถในการเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenic agents), สารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenic agents) และสารก่อให้เกิดความผิดปกติของการพัฒนาการร่างกายทารกในครรภ์ (teratogenic agents) มากที่สุด (IARC, 2012) นอกจากนี้ยังพบรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งในธัญพืช กับการเกิดมะเร็งตับในประเทศแอฟริกา และจีน (Bababunmi, 1978; Li et al. 2001) อะฟลาทอกซินเป็นสารที่ทนต่อความร้อน และถูกทำลายได้ยากในระหว่างกระบวนการผลิต ดังนั้นการได้รับสารอะฟลาทอกซินจึงสามารถก่อให้เกิดผลกระทบต่อทั้งแบบเฉียบพลัน และเรื้อรังต่อผู้บริโภคโดยเฉพาะอย่างยิ่งในทารก และเด็ก จึงทำให้เกิดการกำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซิน และไมโคทอกซินในอาหารในหลายประเทศทั่วโลก

สภาวะภูมิอากาศ, อุณหภูมิ, water activity, สายพันธุ์เชื้อรา, นิเวศวิทยาจุลินทรีย์ (Microbial ecology) และสภาวะในการจัดการเมล็ดข้าว เป็นส่วนหนึ่งในหลายปัจจัยที่มีอิทธิพลอย่างยิ่งต่อการสร้างสารไมโคทอกซิน (Magan et al, 2004; Park et al., 2005; Makun et al., 2007; Nguyen et al., 2007) ความชื้นข้าวเปลือกขณะเก็บเกี่ยวมีค่ามากกว่า 22% ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการเก็บเกี่ยว และสายพันธุ์ข้าว (สุพัตรา สุวรรณธาดา และคณะ, 2554; กรมส่งเสริมการเกษตร, 2556) การลดปริมาณความชื้นของเมล็ดข้าวเช่นวิธีการใช้แสงแดด หรือการใช้เครื่องอบลดความชื้น เพื่อลดปริมาณความชื้นให้เหลือประมาณ 12-14% มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มอายุในการเก็บรักษาข้าว และรักษาคุณภาพข้าว ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณความชื้น และอุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อกิจกรรมของเชื้อรา โดยที่ทั้งสองปัจจัยดังกล่าวจะมีความแปรผันมากหรือน้อยนั้น ขึ้นกับการออกแบบของไซโลเก็บข้าว, โรงเก็บ หรือโกดังขนาดใหญ่ การปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดข้าวอาจแบ่งได้ 2 ระยะ โดยระยะแรกเกิดจากการปนเปื้อนในระหว่างการพัฒนาของเมล็ดข้าว (ก่อนการเก็บเกี่ยว) และระยะที่สองเกิดการปนเปื้อนในเมล็ดข้าวที่พัฒนาสมบูรณ์แล้ว (หลังการเก็บเกี่ยว) ซึ่งเมื่อมีการปนเปื้อน และมีการสร้างสารไมโคทอกซินแล้ว สารดังกล่าวยังคงอยู่ถึงแม้เชื้อราที่ปนเปื้อนตายไป

การวิเคราะห์ความเสี่ยง (risk analysis) ของผลกระทบที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ (climate change) ต่อผลผลิตทางการเกษตร และคุณภาพของอาหาร กลายเป็นหัวข้อที่นักวิทยาศาสตร์ให้ความสำคัญไปทั่วโลกในแง่ของความมั่นคงทางด้านอาหารที่ลดลง (food security) เช่นเดียวกับการก่อให้เกิดความเสี่ยงทางด้านสาธารณสุข (public health risks) ซึ่งได้แก่ความปลอดภัยของอาหาร และแหล่งน้ำ (Miraglia et al., 2009; Peterson and Lima, 2011) จากปัญหาความปลอดภัยของอาหาร ที่เกี่ยวเนื่องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ ความปลอดภัยของอาหารที่ถูกปนเปื้อนด้วยเชื้อรา จึงเป็นหัวข้อที่มีความสำคัญอย่างชัดเจนเช่นกัน (IPCC, 2007) ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศ (climate factors) ได้แก่อุณหภูมิ, วอเตอร์แอกทิวิตี (water activity, a_w) และความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (elevated CO_2) มีผลต่อการสร้างสารไมโคทอกซินที่เพิ่มขึ้น จากการปนเปื้อนของเชื้อราที่สร้างไมโคทอกซิน ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว (Magan et al, 2004; Magan et al., 2010; Medina et al., 2014)

นอกจากนี้ยังพบว่าที่อุณหภูมิสูงขึ้น และความเครียดที่เกิดจากความแห้งแล้ง ยังเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเพิ่มความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน จากเชื้อรา *A. flavus* ที่ปนเปื้อนในข้าวโพด (Jones et al., 1980; Payne et al., 1985; Shearer et al., 1992; Todd and Narrod, 2006). ในประเทศที่มีภูมิอากาศกึ่งแห้งแล้ง

(semiarid climate) เช่น Kenya มีรายงานการพบอะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้น ในหลายปีที่หลังจากที่ประสบความแห้งแล้ง ในขณะที่ประเทศในเขตอบอุ่นมีรายงานการพบอะฟลาทอกซินในระดับอันตราย เมื่อมีฝนตกเมื่อเก็บเกี่ยว หรือใกล้ระยะการเก็บเกี่ยว (Shiferaw et al. 2011) ผลจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ ที่ทำให้อุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น หรือเกิดการแห้งแล้งในบางพื้นที่ การคุกคามของการปนเปื้อนสารไมโคทอกซินในพืชอาหารหลัก จึงเป็นปัญหารุนแรงที่คุกคามต่อ food security และ nutrient security ในหลายประเทศที่กำลังพัฒนาในเขตร้อน และเขตอบอุ่นของโลก (Magan et al., 2011) ประเทศไทยนับเป็นประเทศในเขตร้อนที่มีการผลิตข้าวที่สำคัญของโลก การเข้าใจถึงผลกระทบของ climate change ต่อการเจริญเชื้อราที่สร้างไมโคทอกซิน และการสร้างสารไมโคทอกซินในเมล็ดข้าวจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจศึกษา โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อราที่สร้างสารไมโคทอกซินจากเมล็ดข้าว และศึกษาผลของ interaction ระหว่างอุณหภูมิ และ a_w ต่อการเจริญของเชื้อรา และการผลิตไมโคทอกซิน รวมทั้งมีการศึกษาผลของ interaction ของ climate change factors ระหว่าง CO_2 , อุณหภูมิ และ a_w ต่อการเจริญของเชื้อรา และการผลิตไมโคทอกซิน เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปพัฒนาการจัดการผลผลิตการเกษตรเพื่อความปลอดภัยของอาหารต่อไป

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สถานที่ทำการวิจัย

คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซินจากเมล็ดข้าว

ตัวอย่างเมล็ดข้าวได้จากการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวม 7 จังหวัด ได้แก่จังหวัด ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ระยอง ตราด ปราจีนบุรี สระแก้ว โดยเก็บจำนวนตัวอย่างเมล็ดข้าวอย่างน้อย 500 กรัม ในถุงโพลีเอทิลีน (PE) ทำการแยกเชื้อราจากตัวอย่างเมล็ดข้าวโดยไม่ต้องมีการกำจัดเชื้อที่บริเวณผิวของเมล็ดข้าว (surface disinfection) โดยวางเมล็ดข้าวลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ dichloran 18% glycerol agar (DG18) หลังจากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5-7 วัน ทำการแยกเชื้อราไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ PDA โดยดูจากความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

การจัดจำแนกเชื้อราเบื้องต้นทำได้โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและตรวจสอบลักษณะโคโลนีบนอาหาร Aspergillus flavus and parasiticus agar (AFPA) การตรวจสอบการสร้างสารอะฟลาทอกซินเบื้องต้นทำได้โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราที่คัดแยกได้บนอาหาร coconut cream agar (CAM) บ่มที่ 25°C เป็นเวลา 10 วัน ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV (365 nm) โดยสังเกตการสร้างสีน้ำเงินหรือสีเขียวที่เรืองแสงรอบโคโลนี และทำการตรวจสอบเชิงคุณภาพเบื้องต้น (qualitative screening test) โดยใช้ชุดตรวจสอบสารอะฟลาทอกซินสำเร็จรูป ScreenEZ Aflatoxin ELISA test kit (บ. สยามอินเตอร์ควอลิตี้, กรุงเทพฯ) ตรวจสอบสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่คัดแยกได้บนอาหาร Yeast Extract Sucrose Agar (YES: 2% yeast extract, 15% sucrose, 0.05% MgSO₄ 7H₂O) บ่มที่ 25°C เป็นเวลา 10 วัน เก็บเชื้อราที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar (MEA) ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อทำการศึกษาต่อไป

2. การตรวจสอบการสร้างสาร Aflatoxin B1

นำเชื้อราที่คัดแยกได้ เลี้ยงบนอาหาร Yeast Extract Sucrose agar (YES: 2% yeast extract, 15% sucrose, 0.05% MgSO₄ 7H₂O) ที่ 25°C เป็นเวลา 10 วัน โดย agar plugs ได้จากการเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นใยของเชื้อราเจริญ โดยการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 mm ได้จำนวน 8 agar plug ใส่ลงใน Eppendorf tubes ขนาด 2 ml ที่มีการชั่งน้ำหนักหลอดเปล่าไว้เรียบร้อยแล้ว บันทึกน้ำหนักที่มี agar plug

เพิ่มขึ้น หลังจากนั้นเติม chloroform ปริมาณ 500 μL ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที ปิดฝา เฉพาะส่วนของ chloroform ใส่ลงในหลอดใหม่ ปล่อยให้ระเหยข้ามคืน

การวิเคราะห์ปริมาณ aflatoxin ด้วย HPLC ทำได้โดยการเติมสารละลาย hexane ลงในหลอดตัวอย่างปริมาณ 200 μL หลังจากนั้นเติมสารละลาย trifluoroacetic acid (TFA) ปริมาณ 50 μL ผสมให้เข้ากัน 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วเติม acetonitrile 10% ปริมาณ 950 μL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 30 วินาที และตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีเพื่อให้เกิดการแยกชั้น โดยชั้นของ hexane จะถูกกำจัดทิ้ง ปิดฝาระดับที่เหลือนำมาผ่านการกรองด้วย syringe nylon filters 0.22 μm และใส่ไว้ใน HPLC vial เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป ใช้ reversed-phase HPLC ในการวิเคราะห์ AFB1 ใช้ C18 column โดยมี mobile phase คือ methanol:water:acetonitrile (30:60:10, v/v/v) มี flow rate เท่ากับ 1.0 mL/min (Mohale, 2013)

3. การศึกษาผลของอิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิ a_w และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อระยะ lag phase และอัตราการเจริญ ของเชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3% rice-milled agar

การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ที่ใช้ในการทดลองเตรียมได้จากเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหาร MEA บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 7 วัน โดยเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 สปอร์/มล. หยดสารแขวนลอยสปอร์ลงในอาหารทดสอบที่เตรียมไว้ปริมาตร 7 ไมโครลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่ใช้ในการทดลองนี้คือ 3% rice milled agar (ดัดแปลงจาก Cairns-Fuller et. al, 2005) ที่มีการปรับค่า a_w ด้วย glycerol ให้มีค่า a_w เท่ากับ 0.85, 0.90, 0.92, 0.95, 0.98 และ 0.99 (ไม่ดัดแปลงค่า a_w) ตรวจสอบค่า a_w ด้วยเครื่อง water activity meter (Aqualab, Decagon device Inc., USA) นำจานเพาะเลี้ยงที่มีการถ่ายเชื้อราเรียบร้อยแล้วใส่ลงในกล่อง polyethylene โดยกล่องมีการออกแบบให้สามารถเติมอากาศที่มีระดับความเข้มข้น CO_2 ทดสอบ ได้แก่ atmospheric air ที่มีความเข้มข้น CO_2 เท่ากับ 350 ppm, synthetic air ที่มีความเข้มข้น CO_2 เท่ากับ 750 และ 1200 ppm ทำการปล่อยก๊าซทดสอบใหม่ที่ความเข้มข้นทดสอบทุก 2 วัน ที่ flow rate 2L/min นำไปบ่มที่อุณหภูมิทดสอบ 20, 25, 30, 35 และ 40°C ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางใน 2 ทิศทางทุกวัน เพื่อคำนวณหาอัตราการเจริญของเชื้อรา หลังจากบ่มไว้ 10 วัน เก็บตัวอย่าง agar plugs ของแต่ละ treatment เพื่อนำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ aflatoxin B1 ออกแบบการทดลองเพื่อให้สามารถศึกษาถึงผลของอิทธิพลร่วมระหว่าง water activity, อุณหภูมิ และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ ต่ออัตราการเจริญ และ aflatoxin B1 โดยใช้การวางแผนการทดลองแบบ 6x5x3 factorial design ทำ 3 ซ้ำ (Table 1)

Table 1 Experimental factors and their levels used in 6x5x3 factorial design.

Factors	Levels					
a_w	0.99	0.98	0.95	0.92	0.90	0.85
Temperature (°C)	20	25	30	35	40	
Carbon dioxide (ppm)	350	750	1200			

4. การประยุกต์ใช้วิธีพื้นผิวดตอบสนองในการทำนายอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน: ผลของปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ

วางแผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) เพื่อสร้างแบบจำลองในการทำนายผลของอัตราการเจริญของเชื้อราที่มีต่อ a_w (0.90, 0.95, 0.99), อุณหภูมิ (20, 30, 40°C) และปริมาณ CO_2 (350, 750, 1200 ppm) ออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Design Expert® version 8.0.7.1 (State ease, Inc, Minneapolis, USA) ในการตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง (validation) ใช้การวางแผนการทดลองแบบจำลอง (validation) ใช้การวางแผนการทดลองแบบ 3x3x3 factorial design ทำ 3 ซ้ำ มีค่า a_w ของอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานเท่ากับ 0.92, 0.95 และ 0.98 และมีระดับอุณหภูมิทดสอบเท่ากับ 30, 35 และ 40°C โดยมีระดับความเข้มข้นของก๊าซ CO_2 เท่ากับ 350, 750 และ 1200 ppm (สุพรรณิการ์ และคณะ, 2560)

5. ผลของอิทธิพลระหว่าง water activity, อุณหภูมิ และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ ต่ออัตราการสร้างสปอร์และสร้างสารไมโคทอกซินของเชื้อราในเมล็ดข้าว

การทดลองศึกษาผลของอิทธิพลร่วมในเมล็ดข้าวที่มีการฉายรังสีแกมมา 12 kGys ก่อนนำมาใช้ในการทดลองเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อราชนิดอื่น การดัดแปลง water activity ของเมล็ดข้าวทำได้โดยการเติมน้ำที่ปริมาตรต่างๆ ลงไปในเมล็ดข้าว 10 กรัม ปิดฝาเก็บไว้ที่ 4°C, 24 ชั่วโมง นำมาวัดค่า water activity ทำกราฟมาตรฐาน moisture adsorption curve ระหว่างปริมาณน้ำ (ml) และค่า water activity จากข้อมูลที่ได้เพื่อใช้ในการเตรียมเมล็ดข้าวที่มีการดัดแปลงค่า water activity ที่ระดับต่างๆ เตรียมเมล็ดข้าวให้มีค่า water activity ทดสอบเท่ากับ 0.99, 0.98, 0.97, 0.95, 0.94, 0.92 และ 0.90 a_w หลังจากนั้นเติมสารแขวนลอย spore (10^6 cfu/ml) เขย่าให้เข้ากัน นำตัวอย่างที่มีการถ่ายเชื้อราเรียบร้อยแล้วใส่ลงกล่อง polyethylene ภายในกล่องมีการรักษาความชื้นสัมพัทธ์สมดุล (equilibrium relative humidity) ให้ได้ระดับ water activity ทดสอบ ขั้นตอนการเติมอากาศให้ได้ระดับความเข้มข้น CO_2 ทดสอบทำได้ตามข้อ 3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิทดสอบ เก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0, 5, 7, 10 และ 14 เพื่อหาอัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อราทดสอบ ทำได้โดยเติม tween80 (0.01 %) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดตัวอย่าง เขย่าให้สปอร์หลุดออกจากเมล็ดข้าว นับสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ Hemocytometer โดยอัตราการสร้างสปอร์ทำได้จากการนำข้อมูลในวันที่ 0, 5, 7, 10 และ 14 มาเขียนกราฟเส้นตรงและหาสมการการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) ได้อัตราการสร้างสปอร์/กรัม/วัน และเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ aflatoxin B1 ออกแบบการทดลองแบบ Factorial design โดยมีปัจจัย 3 ปัจจัย คือ a_w , อุณหภูมิและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แสดงดังตารางที่ 3-2 ทำจำนวน 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิทดสอบ ทำการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ใหม่ทุก ๆ 2 วัน ที่อัตราการไหลของก๊าซเท่ากับ 2 ลิตร/นาที่ เก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0, 5, 7, 10 และ 14 ออกแบบการทดลองแบบ Factorial design โดยมีปัจจัย 3 ปัจจัย คือ a_w , อุณหภูมิและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Table 2)

Table 2 Experimental factors and their levels used in 7x4x3 factorial design.

Factors	Levels						
a _w	0.99	0.98	0.97	0.95	0.94	0.92	0.90
Temperature (°C)	30	35	37	40			
Carbon dioxide (ppm)	350	750	1200				

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab 16 (Minitab, Inc., USA) เมื่อข้อมูลที่ได้จากการทดลองมีการกระจายของข้อมูลแบบปกติจะทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) และใช้ Kruskal-Wallis nonparametric ANOVA เมื่อข้อมูลที่ได้จากการทดลองมีการกระจายของข้อมูลไม่ปกติ ($P < 0.05$)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การคัดแยกเชื้อราเบื้องต้นที่สามารถสร้างสารอะฟลาทอกซินทอกซิน

จากตัวอย่างเมล็ดข้าวในเขตพื้นที่ภาคตะวันออก ได้แก่จังหวัดจันทบุรี ระยอง ชลบุรี และตราด เมื่อทำการคัดแยกเชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน พบว่าสามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลทเป็นเชื้อราในสกุล *Aspergillus flavus* การทดสอบการสร้างสารอะฟลาทอกซินเบื้องต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ coconut cream agar (CCA) พบว่าเชื้อราที่คัดแยกได้ที่มีการสร้างสารสีเหลืองในอาหารทดสอบและเมื่อทำการทดสอบภายใต้แสง UV พบว่ามีการเรืองแสงสีน้ำเงิน ซึ่งจะไม่พบการเรืองแสงในไอโซเลทที่ไม่สามารถสร้างสารอะฟลาทอกซิน (Figure 1) แต่อย่างไรก็ตามยังมีบางไอโซเลทที่ไม่มีการเรืองแสงภายใต้แสง UV แต่มีความสามารถในการสร้างสารไม่โคทอกซินด้วย เมื่อทำการตรวจสอบเชิงคุณภาพเบื้องต้น (qualitative screening test) โดยใช้ชุดตรวจสอบสารอะฟลาทอกซินสำเร็จรูป ScreenEZ Aflatoxin ELISA test kit โดยทำการตรวจสอบสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่คัดแยกได้บนอาหาร Yeast Extract Sucrose Agar พบว่าไอโซเลทที่มีการเรืองแสงภายใต้แสง UV มีการสร้างสารอะฟลาทอกซิน สามารถคัดเลือกได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลทได้แก่ *Aspergillus flavus* BUU24, BUU52 และ BUU54 เมื่อทำการวิเคราะห์การสร้างสารอะฟลาทอกซินโดยใช้ HPLC เพื่อทำการยืนยันผลพบว่าทั้ง 3 ไอโซเลทมีการสร้างสารอะฟลาทอกซิน AFB1 ในปริมาณที่แตกต่างกันตั้งแต่ 2.5-480 $\mu\text{g}/\text{kg}$

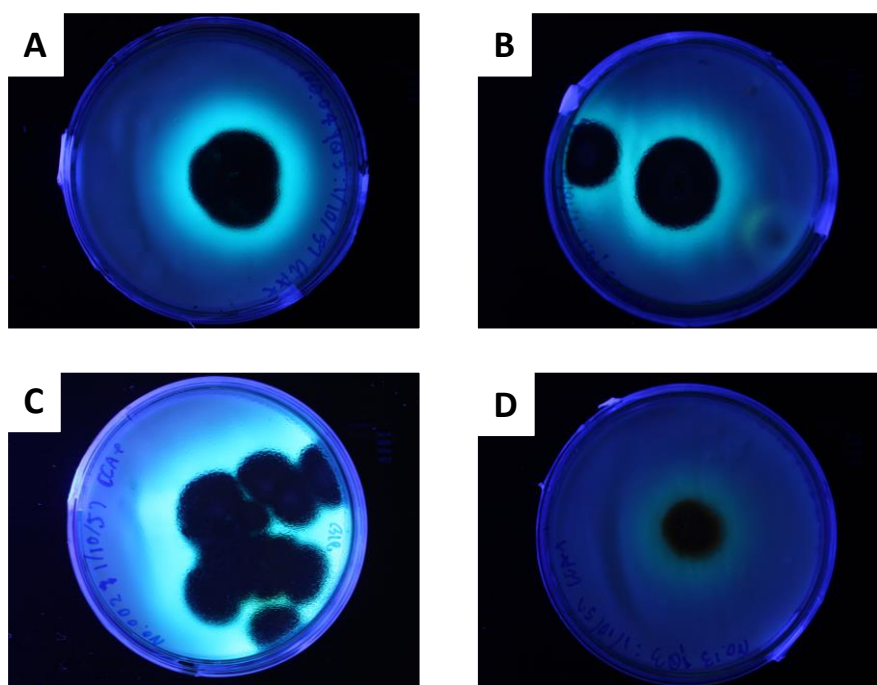


Figure 1 Reverse of CCA cultures of aflatoxigenic strains (A-C) showing a blue-green fluorescent ring around the colony and non-aflatoxigenic strain (D) of *A. flavus* observed under UV light after 10 days of incubation at 25 °C

2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซินที่ตัดแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อทำการศึกษาสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อรา *A. flavus* ทั้ง 3 ไอโซเลทที่ตัดแยกได้สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ PDA, MEA และ cornmeal agar (CMA) โดยเชื้อรา *A. Flavus* BUU24 มีอัตราการเจริญของเส้นใยสูงสุดเท่ากับ 4.723 mm/day เมื่อเจริญบนอาหาร CMA ที่อุณหภูมิ 25°C (Table 3) ลักษณะของเส้นใยเมื่อเจริญบนอาหาร PDA มีลักษณะฟูสีเขียวอ่อนโดยเส้นใยที่อายุน้อยที่อยู่ขอบโคโลนีมีสีขาว เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA เส้นใยของเชื้อรามีลักษณะฟูมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA ที่โคโลนีมีลักษณะเรียบ เส้นใยสั้น ขอบของโคโลนีเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าค่อนข้างกลม (Figure 2)

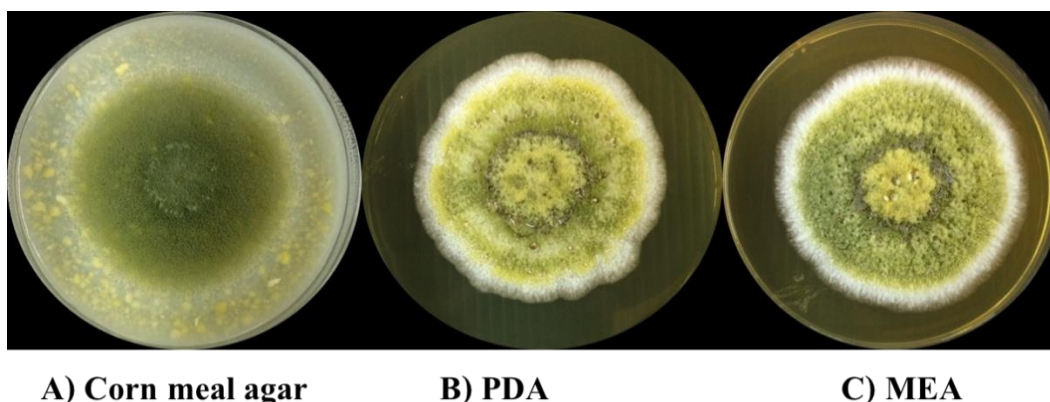


Figure 2 *A. flavus* BUU24 colonies growth at 25°C on MEA, PDA and CMA agar.

เชื้อรา *A. Flavus* BUU52 มีอัตราการเจริญของเส้นใยสูงสุดเท่ากับ 4.74 mm/day เมื่อเจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25°C (Table 3) ลักษณะของเส้นใยเมื่อเจริญบนอาหาร PDA และ MEA มีลักษณะเรียบ เส้นใยสั้นสีเขียวอ่อนโดยเส้นใยที่อายุน้อยที่อยู่ขอบโคโลนีมีสีขาว เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA โคโลนีมีลักษณะเรียบ สร้างเส้นใยสั้นกว่า ขอบของโคโลนีเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ MEA มีลักษณะค่อนข้างกลม (Figure 3)

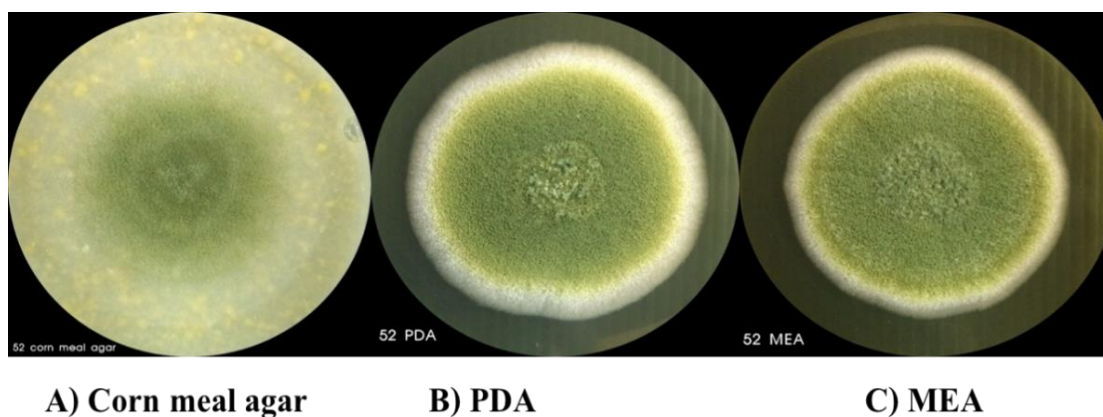


Figure 3 *A. flavus* BUU52 colonies growth at 25°C on MEA, PDA and CMA agar.

เชื้อรา *A. Flavus* BUU54 มีอัตราการเจริญของเส้นใยสูงสุดเท่ากับ 4.69 mm/day เมื่อเจริญบนอาหาร CMA ที่อุณหภูมิ 25°C (Table 3) ลักษณะของเส้นใยเมื่อเจริญบนอาหาร PDA และ MEA มีลักษณะเรียบ เส้นใยสีน้ำตาลซีดอ่อนโดยเส้นใยที่อายุน้อยที่อยู่ขอบโคโลนีมีสีขาว เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA โคโลนีมีลักษณะเรียบสร้างเส้นใยสีน้ำตาลของเส้นใยสีเข้มขึ้น เส้นใยรอบขอบโคโลนีมีสีขาวน้อยกว่าที่พบเมื่อเจริญบนอาหาร PDA และ MEA ขอบของโคโลนีเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิดมีลักษณะค่อนข้างกลม (Figure 4)

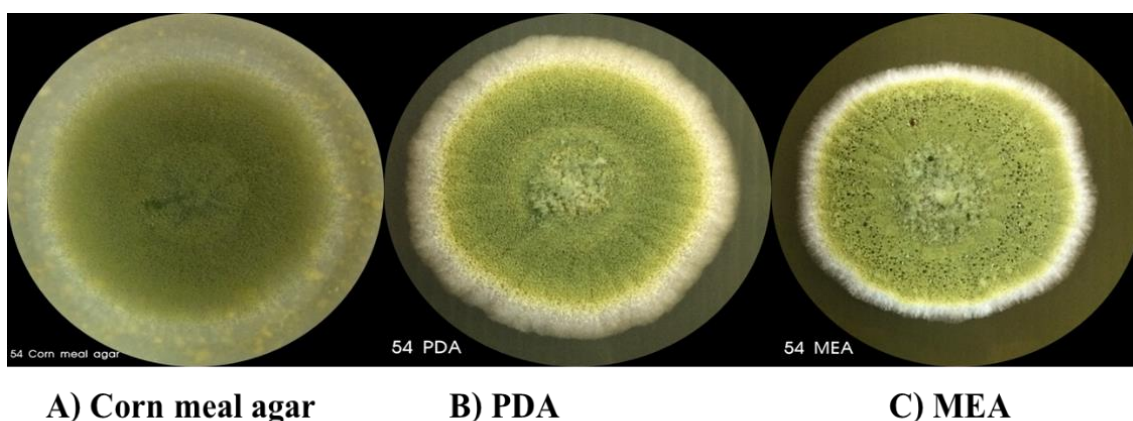


Figure 4 *A. flavus* BUU54 colonies growth at 25°C on MEA, PDA and CMA agar.

Table 3 Radial growth rate and lag phase of *A. flavus* isolates at 25°C for 7 days on MEA, PDA and CMA agar.

Isolate	Medium	Radial growth rate (mm/day)	Lag phase (day)
<i>A. flavus</i> BUU24	PDA	3.80	0.65
	MEA	4.34	0.34
	CMA	4.72	0.22
<i>A. flavus</i> BUU52	PDA	4.47	0.18
	MEA	3.87	0.65
	CMA	4.18	0.34
<i>A. flavus</i> BUU54	PDA	3.19	1.86
	MEA	3.55	1.35
	CMA	4.69	0.38

3. ผลของอิทธิพลร่วมระหว่าง water activity อุณหภูมิและความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ต่อการเจริญของเชื้อราที่สร้างไมโคทอกซินใน rice-based medium

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิ, water activity และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่ออัตราการเจริญของเส้นใยและระยะ lag phase ของเชื้อรา *A. flavus* ทั้ง 3 ไโซเลทพบว่า เชื้อรา *A. flavus* BUU24 ที่อุณหภูมิ 20°C และเกือบทุกระดับ a_w และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีระยะ lag phase เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิทดสอบอื่น โดยระยะ lag phase ที่น้อยกว่า 2 วันอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 25-40°C, 0.95-0.99 a_w และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 350-750 ppm และเชื้อราใช้ระยะเวลาก่อนเริ่มมีการเจริญมากกว่า 8 วันเมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 20-25°C และ 0.90 a_w อัตราการเจริญของเชื้อรามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณน้ำอิสระในอาหารเพิ่มขึ้น (0.98-0.99 a_w) ที่อุณหภูมิ 30-35°C โดยปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการเจริญของเชื้อราน้อย อัตราการเจริญของเชื้อรามากที่สุดเท่ากับ 8.87 ± 0.37 mm/day ที่อุณหภูมิ 35°C และ 0.99 a_w ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณน้ำอิสระน้อย (0.85 a_w) พบว่าเชื้อรา *A. flavus* BUU24 ไม่สามารถเจริญได้ (Figure 5) จากการวิเคราะห์กราฟอิทธิพลหลัก (main effects) ต่ออัตราการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* BUU24 (Figure 6) พบว่าเชื้อรามีอัตราการเจริญเฉลี่ยสูงเมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 30-35°C และที่ 0.98-0.99 a_w โดยปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการเจริญของเชื้อราน้อย การเจริญที่ 0.85 a_w และที่อุณหภูมิ 20 °C มีผลยับยั้งการเจริญมาก

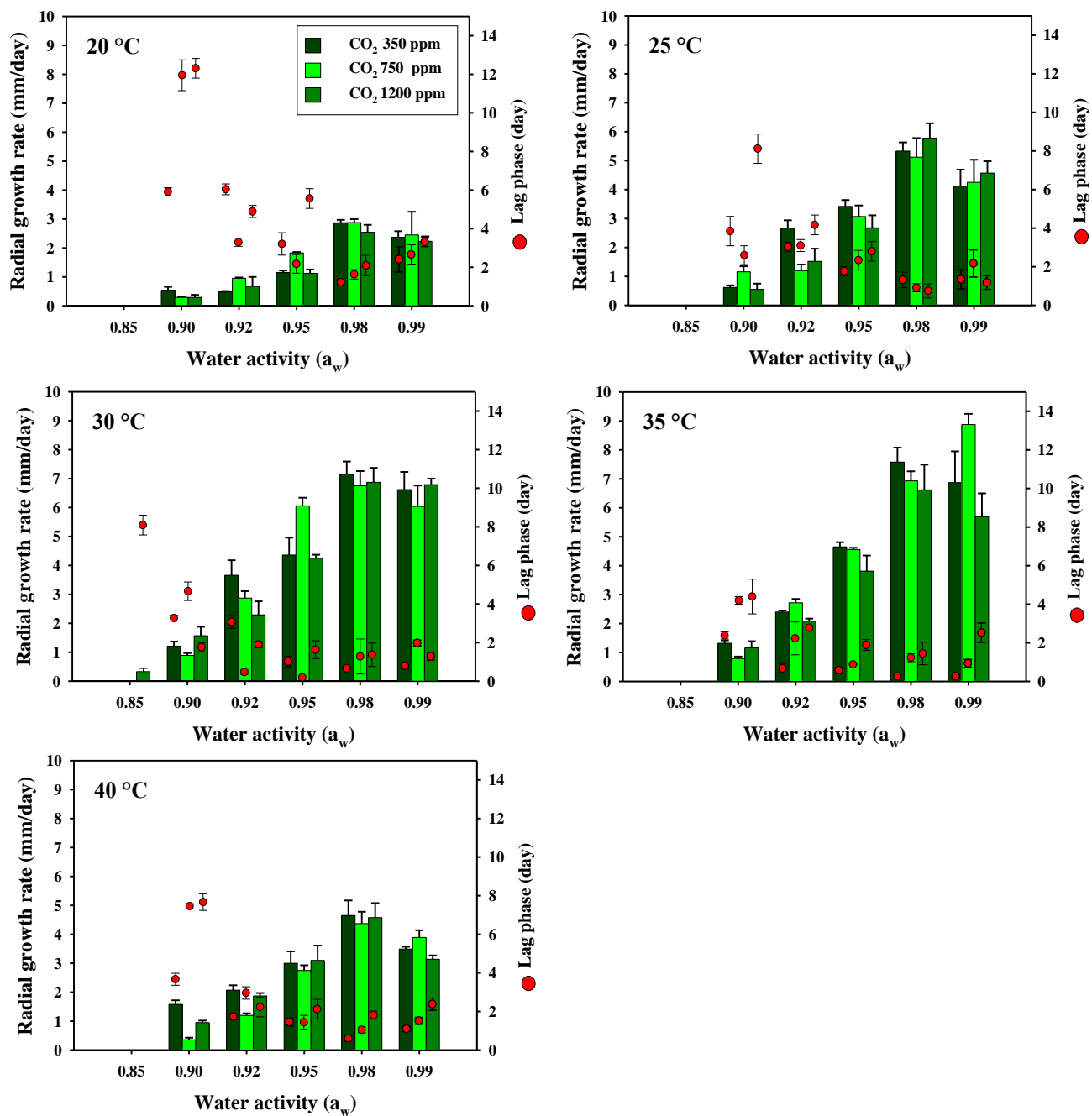


Figure 5 Effect of $a_w \times \text{CO}_2 \times$ temperature on radial growth rate and the mean lag time of *A. flavus* BUU24 grown on 3% rice milled agar. Bars indicates standard error of the mean.

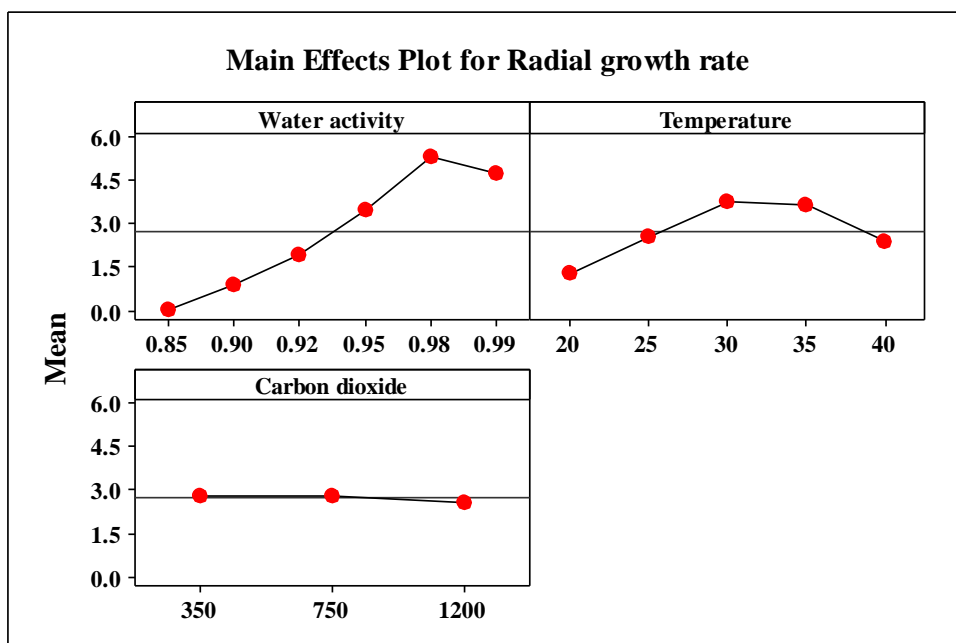


Figure 6 Main effects plot of the mean of radial growth rate of *A. flavus* BUU24.

อิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิ, aw และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่ออัตราการเจริญและระยะ lag phase เชื้อรา *A. flavus* BUU52 แสดงดัง Figure 7 พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อราลดลงเมื่อลดจากค่า aw ที่เหมาะสมต่อการเจริญไม่ว่าที่ระดับอุณหภูมิและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ใดก็ตาม โดยมีอัตราการเจริญสูงสุด (8.54 ± 0.51 มม./วัน) ที่อุณหภูมิ 35°C และ 0.99 aw และมีความต้านทานต่ออุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น (40°C) มากกว่าเชื้อราไอโซเลทอื่นที่ระดับ 0.95-0.99aw และเชื้อรา *A. flavus* BUU52 ไม่สามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะความเครียดเนื่องจากน้ำ (0.85 aw) ที่ทุกอุณหภูมิและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ทดสอบ ที่อุณหภูมิ 20°C และเกือบทุกระดับ aw และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีระยะ lag phase เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิทดสอบอื่น โดยระยะ lag phase ที่น้อยกว่า 1 วันอยู่ในช่วงอุณหภูมิ $30-40^{\circ}\text{C}$, 0.95-0.99aw และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 350-1200 ppm และเชื้อราใช้ระยะเวลาก่อนเริ่มมีการเจริญมากกว่า 6 วันเมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 20°C และ 0.90 aw จากการวิเคราะห์กราฟอิทธิพลหลัก (main effects) ต่ออัตราการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* BUU52 (Figure 8) พบว่าเชื้อรา *A. flavus* BUU52 มีการตอบสนองต่อปัจจัยทดสอบหลักเหมือนกับที่พบในไอโซเลทอื่น โดยมีอัตราการเจริญเฉลี่ยสูงเมื่อเจริญที่อุณหภูมิ $30-35^{\circ}\text{C}$ และที่ 0.95-0.99 aw โดยการเพิ่มปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 1200 ppm มีผลเพิ่มอัตราการเจริญเฉลี่ยของเชื้อราขึ้นเล็กน้อย การเจริญที่ 0.85aw และที่อุณหภูมิ 20°C มีผลยับยั้งการเจริญมาก

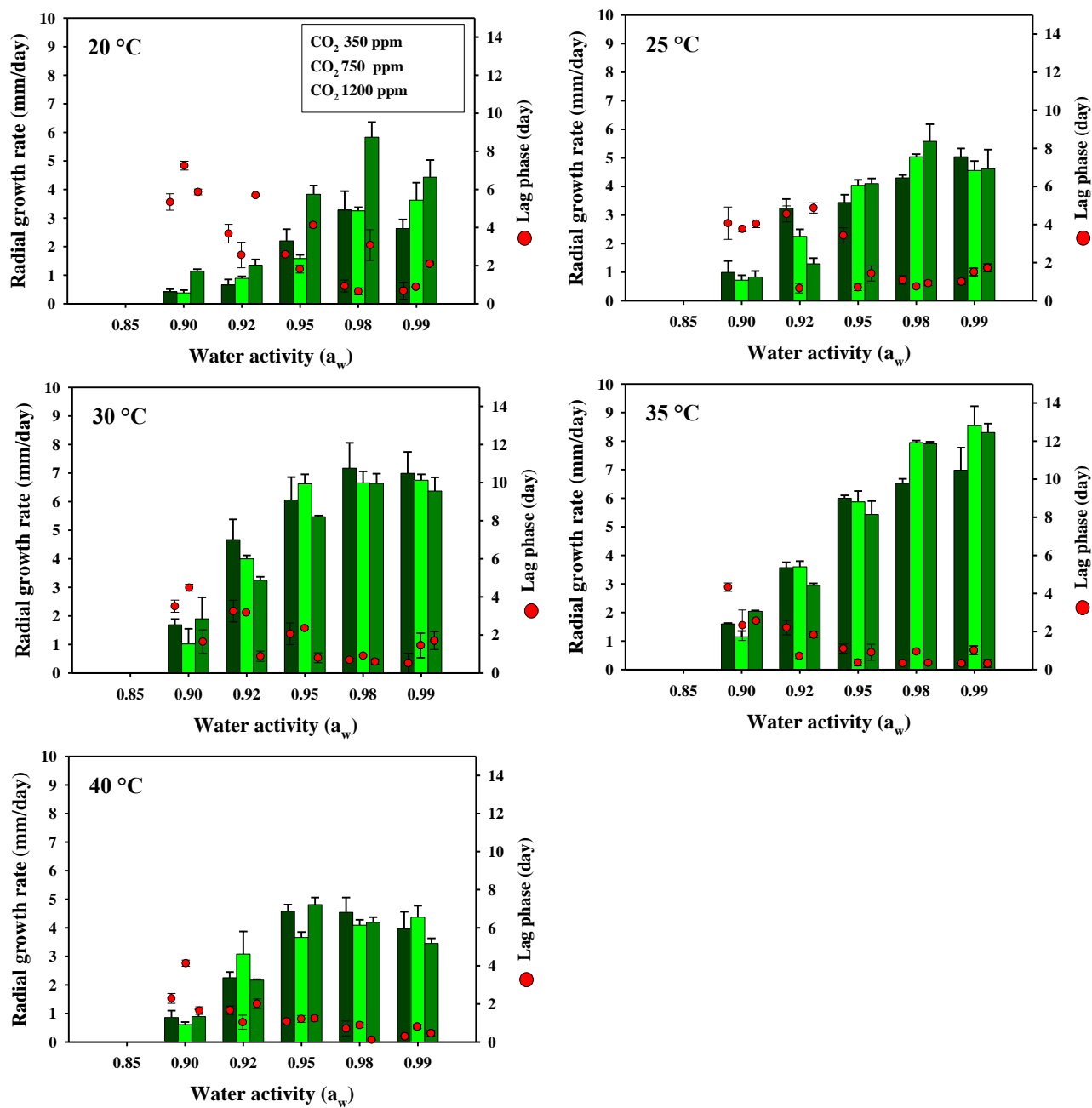


Figure 7 Effect of $a_w \times \text{CO}_2 \times \text{temperature}$ on radial growth rate and the mean lag time of *A. flavus* BUU52 grown on 3% rice milled agar. Bars indicates standard error of the mean.

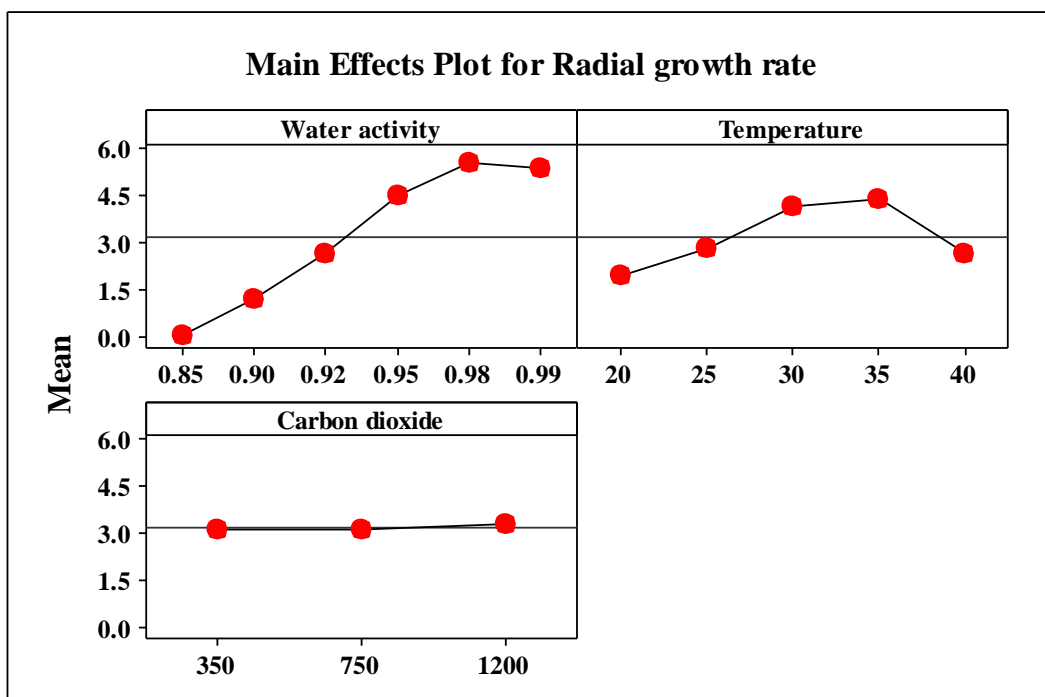


Figure 8 Main effects plot of the mean of radial growth rate of *A. flavus* BUU52.

ภายใต้สภาวะทดลองเชื้อรา *A. flavus* BUU54 มีรูปแบบการตอบสนองต่อปัจจัยทดสอบคล้ายคลึงกับที่พบในเชื้อราไอโซเลทอื่น (Figure 9) โดยที่อุณหภูมิ 20-25°C และที่ระดับ 0.90-0.95_{a_w} ทุกระดับของปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ทดสอบ มีระยะ lag phase เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิทดสอบอื่น โดยระยะ lag phase ที่น้อยกว่า 2 วันอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 25-40°C, 0.95-0.99 _{a_w} และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 350-1200 ppm และเชื้อราใช้ระยะเวลาก่อนเริ่มมีการเจริญมากกว่า 8 วันเมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 20°C และ 0.90 _{a_w} อัตราการเจริญของเชื้อรามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณน้ำอิสระในอาหารเพิ่มขึ้น (0.98-0.99_{a_w}) ที่อุณหภูมิ 30-35°C โดยปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการเจริญของเชื้อราน้อย อัตราการเจริญของเชื้อรามากที่สุดเท่ากับ 7.97 ± 0.52 mm/day ที่อุณหภูมิ 30°C และ 0.98_{a_w} ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณน้ำอิสระน้อย (0.85_{a_w}) พบว่าเชื้อรา *A. flavus* BUU54 ไม่สามารถเจริญได้ จากการวิเคราะห์กราฟอิทธิพลหลัก (main effects) ต่ออัตราการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* BUU54 (Figure 10) พบว่าเชื้อรามีอัตราการเจริญเฉลี่ยสูงเมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 30-35°C และที่ 0.98-0.99 _{a_w} โดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีต่อการเจริญของเชื้อราน้อย ในขณะที่การเจริญที่ 0.85_{a_w} และที่อุณหภูมิ 20 °C มีผลยับยั้งการเจริญมาก

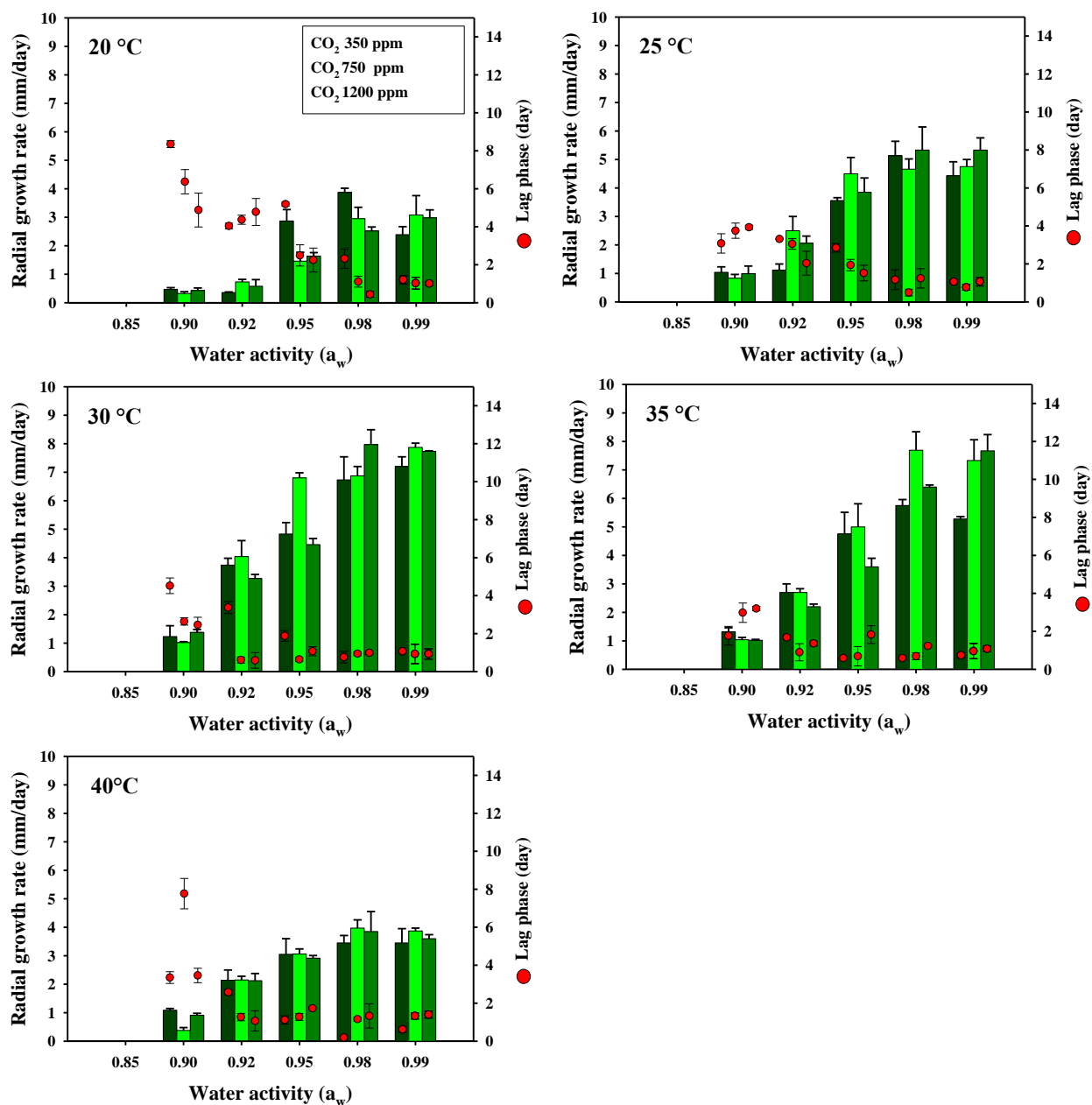


Figure 9 Effect of a_w x CO₂ x temperature on radial growth rate and the mean lag time of *A. flavus* BUU54 grown on 3% rice milled agar. Bars indicates standard error of the mean.

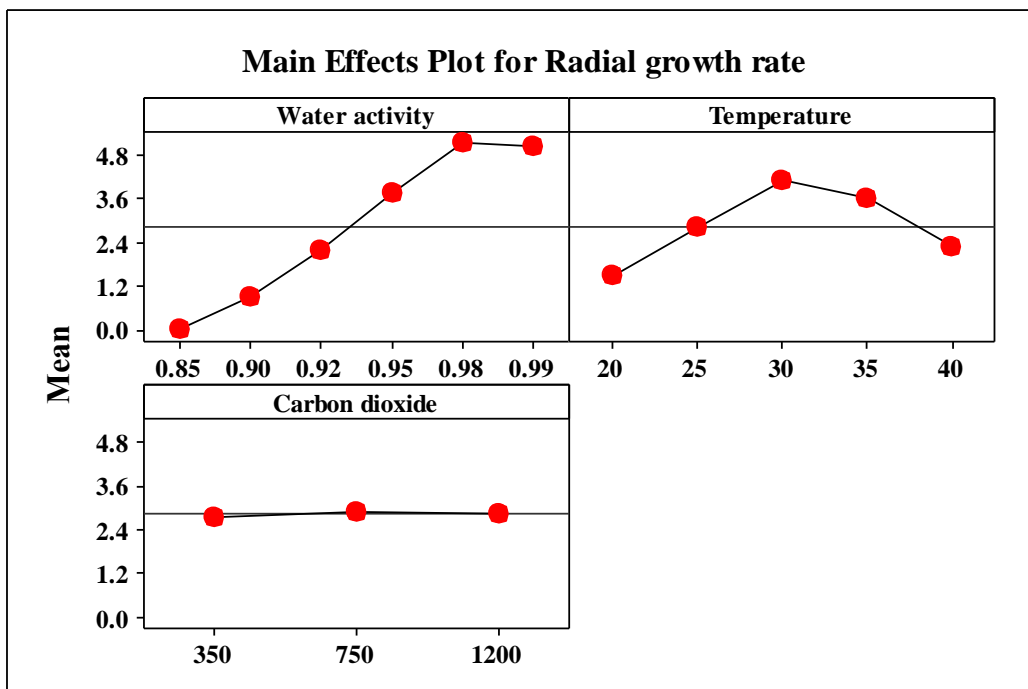


Figure 10 Main effects plot of the mean of radial growth rate of *A. flavus* BUU54.

เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยรวมทั้ง 3 ไอโซเลทพบว่าไอโซเลท, อุณหภูมิและ a_w มีผลต่อระยะ lag phase มากกว่า โดยไอโซเลทไม่มีผลต่ออัตราการเจริญของเส้นใย ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญของเส้นใยและระยะ lag phase ($P < 0.05$; **Table 4**) เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยแยกแต่ละไอโซเลท (**Table 5**) พบว่าอุณหภูมิ และ a_w มีผลต่ออัตราการเจริญและระยะ lag phase ในเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท โดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญของเส้นใยและระยะ lag phase ยกเว้นมีผลต่อระยะ lag phase ในเชื้อรา *A. flavus* BUU24

Table 4 The statistical analyses examined in relation to both lag phase (λ , days) and the growth rate in relation to strain $\times a_w \times$ temperature using the Kruskal-Wallis test (non-normality data). The significant factors are in bold.

Strain	Factors				
	Strain	a_w	Temperature (°C)	CO ₂ (ppm)	
<i>A. flavus</i> (BUU24, BUU52, BUU54)	P < 0.05*	P < 0.05*	P < 0.05*	P > 0.05	Lag phase (λ , days)
	P > 0.05	P < 0.05*	P < 0.05*	P > 0.05	Growth rate (mm/day)

* significant

Table 5 The statistical analyses of the six strains examined in relation to both lag phase (λ , days) and the growth rate using the Kruskal-Wallis test (non-normality data) and ANOVA (normality data).

Strains	Factors				
	a_w	Temperature (°C)	CO ₂ (ppm)	a_w X Temperature X CO ₂	
<i>A. flavus</i> BUU24	P < 0.05^{*,a}	P < 0.05^{*,a}	P < 0.05^{*,a}	N/A	Lag phase (λ , days)
	P < 0.05^{*,a}	P < 0.05^{*,a}	P > 0.05	N/A	Growth rate (mm/day)
<i>A. flavus</i> BUU52	P < 0.05^{*,a}	P < 0.05^{*,a}	P > 0.05	N/A	Lag phase (λ , days)
	P < 0.05^{*,a}	P < 0.05^{*,a}	P > 0.05	N/A	Growth rate (mm/day)
<i>A. flavus</i> BUU54	P < 0.05^{*,a}	P < 0.05^{*,a}	P > 0.05	N/A	Lag phase (λ , days)
	P < 0.05^{*,a}	P < 0.05^{*,a}	P > 0.05	N/A	Growth rate (mm/day)

* significant, ^a Kruskal-Wallis test, ^b ANOVA

4. การประยุกต์ใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองในการทำนายอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* BUU52 ที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน: ผลของปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ

*จากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ a_w และอุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* BUU52 ($P < 0.05$) แม้ว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะไม่มีผลต่ออัตราการเจริญในช่วง a_w (0.85, 0.90, 0.92, 0.95, 0.98, 0.99), อุณหภูมิทดสอบ (20-40°C) แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติในช่วง a_w (0.90, 0.95, 0.99) และอุณหภูมิทดสอบ (20, 30, 40°C) พบปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* BUU52 ดังนั้นปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศทั้ง 3 ปัจจัยได้แก่ a_w , อุณหภูมิและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จึงถูกเลือกให้เป็นปัจจัยเพื่อสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในการทำนายอัตราการเจริญในการศึกษาครั้งนี้ ผลการประยุกต์ใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองในการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ได้แบบจำลองแสดงเป็นค่ารหัส (coded values) ดังสมการ

$$y = 6.21 + 3.47x_1 + 1.40x_2 + 0.70x_3 - 0.40x_2x_3 - 1.45x_1^2 - 2.98x_2^2 + 0.40x_3^2 + 0.22x_1x_2x_3 - 1.31x_1^2x_2 - 0.41x_1^2x_3 - 2.09x_1x_2^2$$

เมื่อ y เท่ากับอัตราการเจริญของเชื้อรา (มม./วัน) โดย x_1 , x_2 และ x_3 คือปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ a_w , อุณหภูมิและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อทดสอบแบบจำลอง, ค่าสัมประสิทธิ์

(coefficients) และค่าการขาดความเหมาะสมของสมการ (lack of fit) ของแบบจำลองพบว่า แบบจำลองมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) สามารถนำไปใช้ในการพยากรณ์ตัวแปรตาม y ได้ นอกจากนี้ค่าสถิติที่เกี่ยวข้องอื่นที่รวมอยู่ในแบบจำลองมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ด้วยเช่นกัน ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจหรือค่า R^2 ของแบบจำลองมีค่าเท่ากับ 0.98 แสดงให้ทราบว่าแบบจำลองนี้สามารถอธิบายความผันแปรของการตอบสนองได้ 98% และค่า lack of fit ไม่มีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) แสดงว่าแบบจำลองมีความเพียงพอต่อข้อมูลที่ได้ การวิเคราะห์เศษตกค้างจากแผนภาพเศษตกค้าง (residual plots) พบว่ามี การกระจายตัวของเศษตกค้างอย่างอิสระตามแนวเส้นตรง แผนภาพเศษตกค้างร่วมกับการวิเคราะห์ค่าทำนายแสดงการกระจายตัวเป็นปกติของเศษตกค้าง (**Figure 11**) ในการตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง (validation) จากค่าสังเกตที่ได้จากการทดลอง พบว่าแบบจำลองสามารถทำนายค่าได้ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากค่าสังเกต มีค่า $R^2 = 0.86$ ในการพิจารณาความสอดคล้องระหว่างข้อมูลสังเกตและข้อมูลที่ทำนาย จากค่า Root mean squares error (RMSE) พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.78 และมีค่า Relative standard error of prediction (RSEP) เท่ากับ 13.33% นอกจากนี้การศึกษารูปแบบโครงสร้างยังช่วยเพิ่มความเข้าใจต่อรูปแบบการตอบสนองของเชื้อราที่มีต่ออิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยมากยิ่งขึ้น

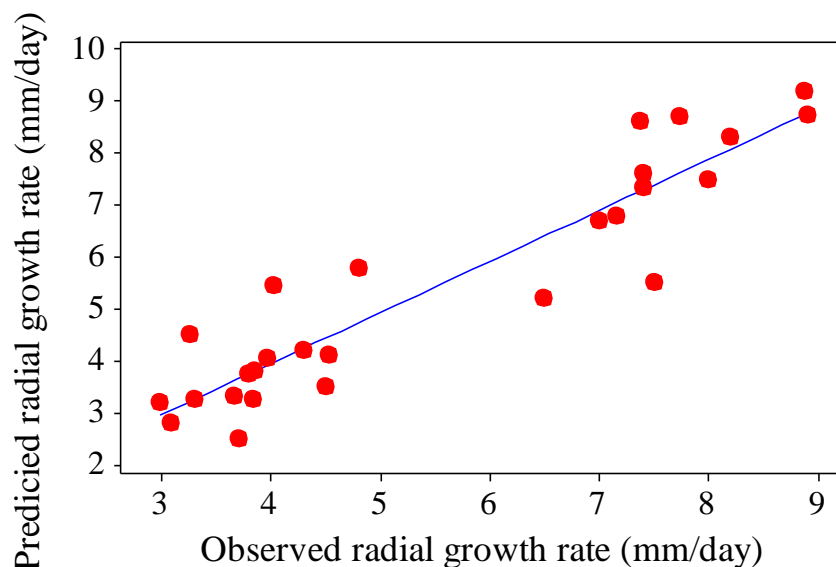


Figure 11 The observed values with the model predicted values plot for *A. flavus* BUU52. A high correlation ($R^2=0.86$) between the predicted data and the experimental data was observed. The average error from the model is encapsulated in the RMSE (= 0.78). RSEP value was low as 13.33%.

Figure 12 แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย aw และอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญของเชื้อรา พบว่ามีผลต่อการเจริญเติบโต โดยเชื้อรามีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นเมื่อ aw เพิ่มขึ้น (0.85-0.99 aw) สภาวะในการเจริญที่ทำให้เชื้อรามีอัตราการเจริญสูงคือที่อุณหภูมิ 30°C ไม่ว่าจะเพาะเลี้ยงที่ระดับ aw ใดก็ตาม และสภาวะในการเจริญที่เชื้อรามีอัตราการเจริญมากกว่า 7

มม./วัน คือที่อุณหภูมิ 26-38°C และที่ a_w มากกว่า 0.95 ในขณะที่อุณหภูมิน้อยกว่า 20.55 °C และ a_w น้อยกว่า 0.91 สามารถลดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ (น้อยกว่า 1.0 มม./วัน) เชื้อราจะมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นเมื่อ a_w เพิ่มขึ้น จากกราฟแสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย a_w และ CO_2 ต่ออัตราการเจริญของเชื้อรา (Figure 13) สภาวะในการเจริญที่เชื้อราที่มีอัตราการเจริญมากกว่า 7 มม./วัน คือที่ a_w มากกว่า 0.97 และมีปริมาณก๊าซ CO_2 ระหว่าง 976-1200 ppm ในขณะที่ภายใต้สภาวะเครียดเนื่องจากน้ำ (0.90-0.947 a_w) a_w เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญของเชื้อรามากกว่าปริมาณก๊าซ CO_2 แต่เมื่อระดับ a_w เพิ่มขึ้น (>0.97 a_w) ปริมาณก๊าซ CO_2 มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราเพิ่มขึ้น และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 21°C สามารถลดอัตราการเจริญของเชื้อราได้ (น้อยกว่า 2.5 มม./วัน) ไม่ว่าจะเพาะเลี้ยงที่ระดับปริมาณก๊าซ CO_2 ใดก็ตาม Figure 14 แสดงผลของอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยอุณหภูมิและปริมาณก๊าซ CO_2 พบว่าการเจริญที่ อุณหภูมิ 29-34.7°C และมีปริมาณก๊าซ CO_2 1130-1200 ppm เชื้อราที่มีอัตราการเจริญมากกว่า 7 มม./วันที่อุณหภูมิต่ำกว่า 21°C และมีปริมาณ CO_2 350-700 ppm สามารถลดอัตราการเจริญของเชื้อราได้ (น้อยกว่า 2.5 มม./วัน) ที่อุณหภูมิ 30°C ไม่ว่าจะเพาะเลี้ยงที่ระดับก๊าซ CO_2 ใดก็ตามเป็นระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา โดยที่ระดับก๊าซ CO_2 สูง (1200 ppm) อัตราการเจริญของเชื้อราจะขึ้นกับระดับอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง

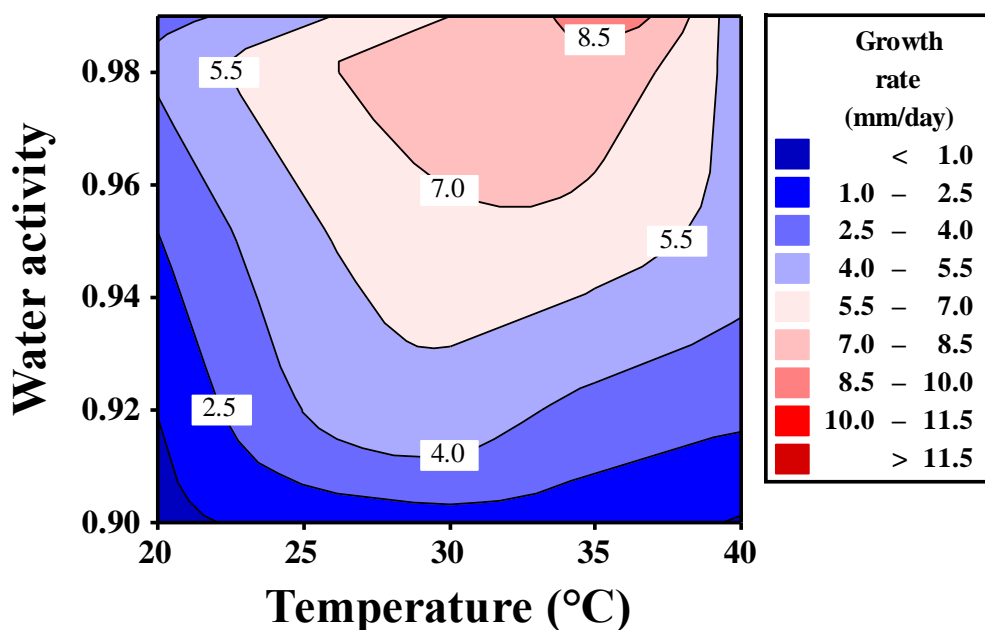


Figure 12 Mean of contour plot of growth rate profile of *A. flavus* BUU52 in relation to a_w x temperature on a milled paddy rice agar.

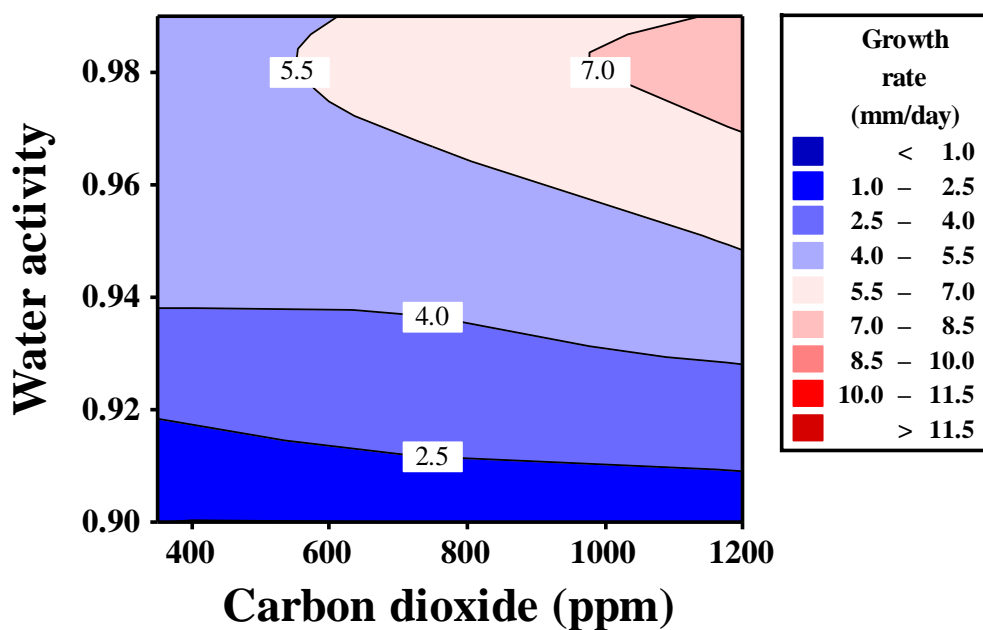


Figure 13 Mean of contour plot of growth rate profile of *A. flavus* BUU52 in relation to a_w x CO_2 on a milled paddy rice agar.

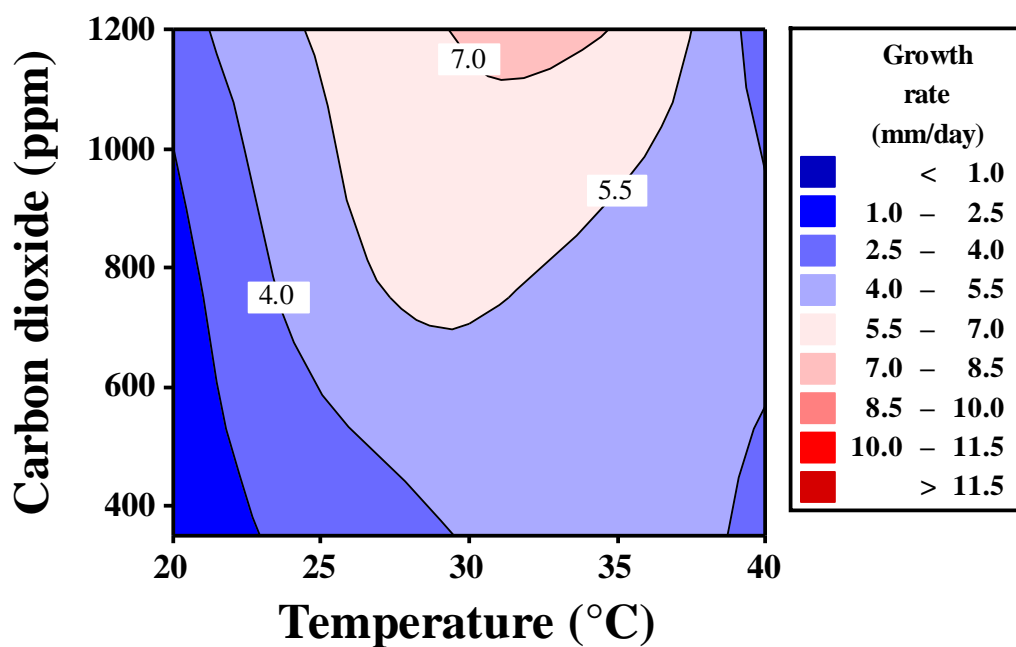


Figure 14 Mean of contour plot of growth rate profile of *A. flavus* BUU52 in relation to a_w x temperature on a milled paddy rice agar.

5. ผลของอิทธิพลร่วมระหว่าง water activity, อุณหภูมิ และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ ต่ออัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อราในเมล็ดข้าว

จากการศึกษาผลของ a_w , อุณหภูมิและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่ออัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อรา พบว่า เชื้อราส่วนใหญ่ที่ระดับค่า a_w ต่ำ (0.90-0.94 a_w) มีอัตราการสร้างสปอร์ต่ำไม่ว่าที่อุณหภูมิ และระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ใดก็ตาม โดยเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลทนี้ มีอัตราการสร้างสปอร์น้อยที่ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 1,200 ppm (0.5×10^5 สปอร์/กรัม/วัน) แต่เมื่อ a_w เพิ่มสูงขึ้น (0.97-0.99 a_w) และมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 300 ppm เชื้อราที่มีอัตราการสร้างสปอร์มากขึ้น ประมาณ 7×10^5 สปอร์/กรัม/วัน เชื้อรา *A. flavus* BUU24 ที่อุณหภูมิสูงสุดในการทดสอบ 40 องศาเซลเซียสและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 300 ppm พบว่ามีอัตราการสร้างสปอร์สูงสุดที่ระดับ a_w ระหว่าง 0.98-0.99 ส่วนเชื้อรา *A. flavus* BUU54 พบว่าที่สภาวะที่มีค่า a_w ต่ำ (0.97 a_w) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีอัตราการสร้างสปอร์สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *A. flavus* BUU24 และ *A. flavus* BUU52 แสดงให้เห็นว่า เชื้อรา *A. flavus* BUU54 สามารถทนต่อสภาวะที่มีความเครียดเนื่องจากน้ำและอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเชื้อราทดสอบอื่น (Figure 15)

5.1 ผลของอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย water activity, อุณหภูมิและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่ออัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus*

จากการศึกษาผลของอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย a_w และอุณหภูมิต่ออัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อรา พบว่า ที่ระดับ a_w ตั้งแต่ 0.90-0.94 a_w อิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย a_w และอุณหภูมิมีผลต่ออัตราการสร้างสปอร์น้อย แต่เมื่อระดับ a_w ตั้งแต่ 0.97-0.99 a_w และอุณหภูมิเพิ่มขึ้น (30-40 องศาเซลเซียส) พบว่าอัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อรา 3 ไอโซเลทขึ้นกับอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย (Figure 16)

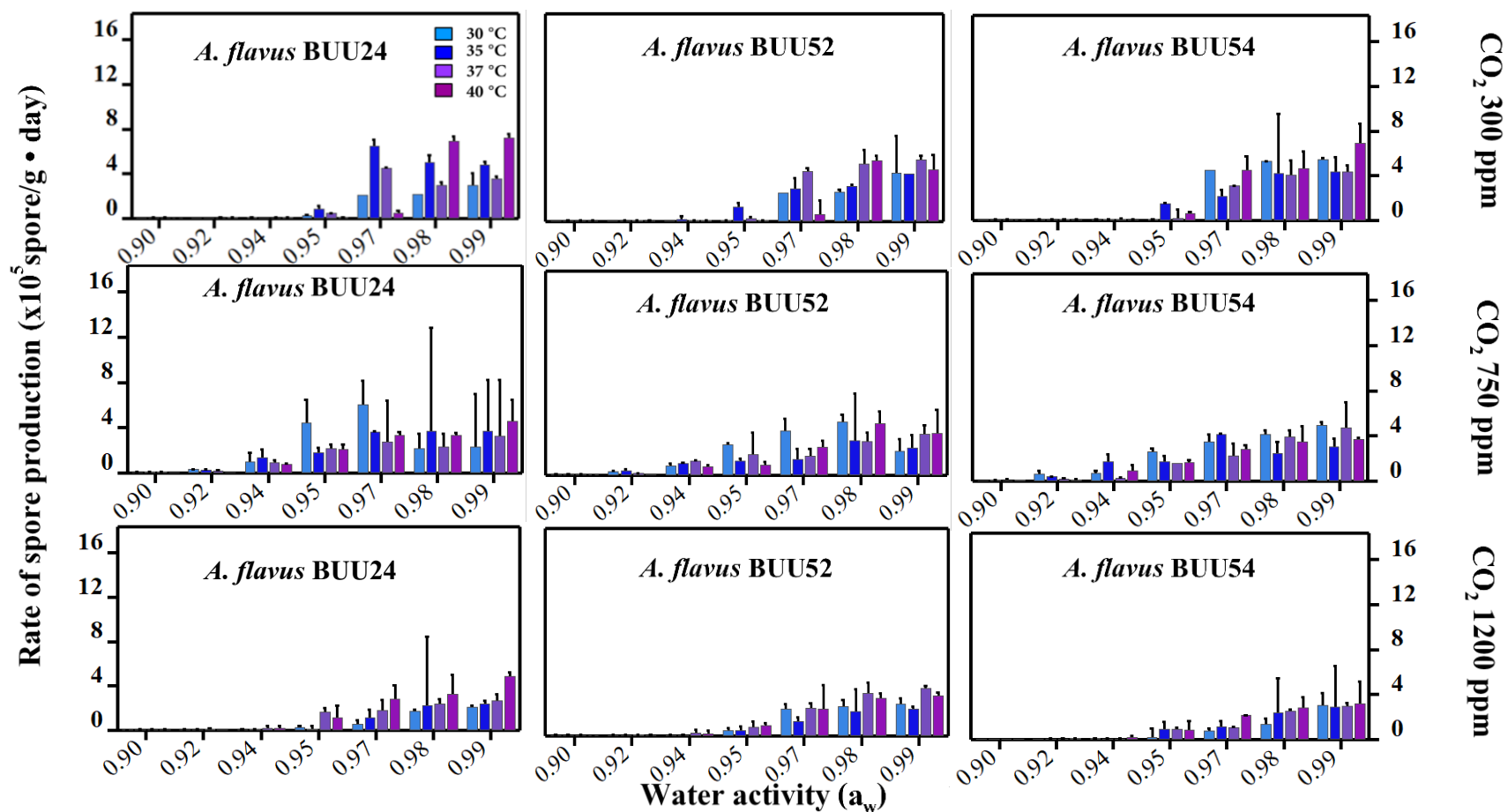


Figure 15 Effect of $a_w \times \text{CO}_2 \times \text{temperature}$ on spore production rate of *A. flavus* BUU24, BUU52 and BUU54 grown on rice grains. Bars indicates standard error of the mean.

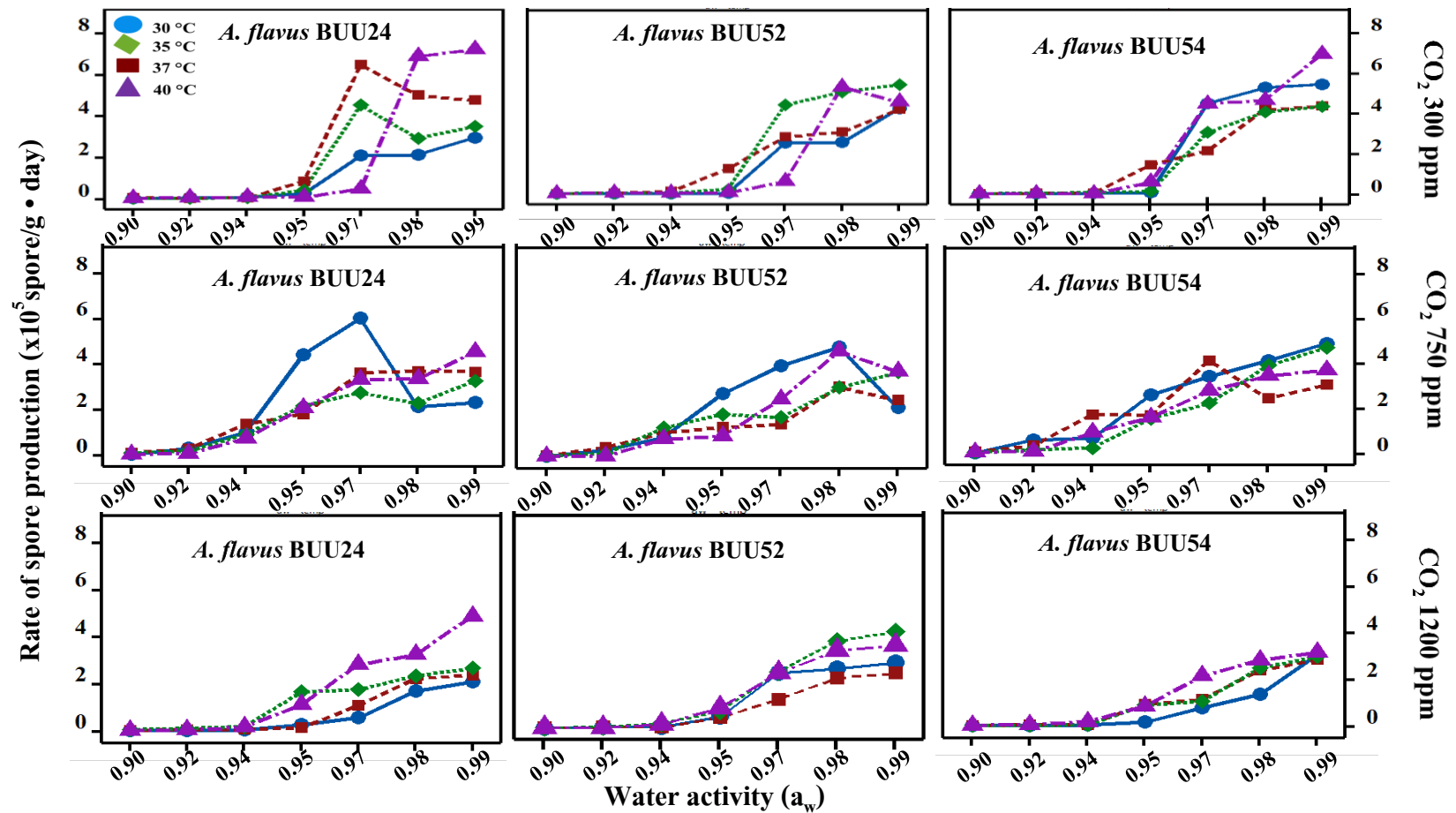


Figure 16 Interaction effects plot of the mean of spore production rate of *A. flavus* BUU24, BUU52 and BUU54 grown on rice grains.

จากการวิเคราะห์ทางสถิติต่อผลของปัจจัยได้แก่ สายพันธุ์เชื้อรา a_w อุณหภูมิ และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ต่ออัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* พบว่าปัจจัยสายพันธุ์เชื้อรา a_w และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่ไม่มีผลต่ออัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อรา ($P > 0.05$) (Table 6)

Table 6 The statistical analyses examined in relation to spore production rate on rice grains in relation to strain x a_w x temperature x CO_2 using the Kruskal-Wallis test (non-normality data). The significant factors are in bold.

		Factor					
Strain	Strain	a_w	Temp. (°C)	CO_2	a_w x Temp.(°C)	a_w x CO_2	Temp.(°C)x CO_2
<i>A. flavus</i>							
(BUU24, BUU52, BUU54)	P<0.05	P<0.05	P>0.05	P<0.05	N/A	N/A	N/A

และจากการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิเคราะห์ข้อมูลแยกในแต่ละไอโซเลท พบว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิไม่มีผลต่ออัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อราไอโซเลท *A. flavus* BUU24 และ BUU54 ($P > 0.05$) แต่ระดับ a_w และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่ออัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อราอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เชื้อรา *A. flavus* BUU52 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในการเจริญ และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไม่มีผลต่ออัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อรา ($P > 0.05$) แต่การเปลี่ยนแปลงค่า a_w มีผลต่ออัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อราอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (Table 7)

Table 7 The statistical analyses examined in relation to spore production rate on rice grains in relation to a_w x temperature x CO_2 using the Kruskal-Wallis test (non-normality data). The significant factors are in bold.

Strain	a_w	Temp. (°C)	CO_2	a_w x Temp.(°C)	a_w x CO_2	Temp.(°C)x CO_2
<i>A. flavus</i> BUU24,	P<0.05	P>0.05	P<0.05	N/A	N/A	N/A
<i>A. flavus</i> BUU52	P<0.05	P>0.05	P>0.05	N/A	N/A	N/A
<i>A. flavus</i> BUU54	P<0.05	P>0.05	P<0.05	N/A	N/A	N/A

5.2 ผลของอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยต่ออัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อรารวมทั้ง 3 ไอโซเลท *A. flavus* BUU24, BUU52 และ BUU54

การศึกษากราฟ Contour ช่วยเพิ่มความเข้าใจต่อรูปแบบการตอบสนองของเชื้อราที่มีต่ออิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยมากยิ่งขึ้น จากการรวมข้อมูลอัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* ทั้ง 3 ไอโซเลท (Figure 17) พบว่าเชื้อราที่มีอัตราการสร้างสปอร์เพิ่มขึ้น เมื่อระดับ a_w เพิ่มขึ้น (0.90-0.99 a_w) สภาวะในการเจริญที่ทำให้เชื้อราที่มีอัตราการสร้างสปอร์สูงคือที่อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส ที่ระดับ 0.975-0.99 a_w โดยมีอัตราการสร้างสปอร์มากกว่า 4.0×10^5 สปอร์/กรัม/วัน และที่ระดับ a_w ระหว่าง 0.90-0.965 ไม่ว่าจะเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิใดก็ตามตั้งแต่ 30-40 องศาเซลเซียส มีอัตราการสร้างสปอร์เท่ากับ 2.5×10^5 สปอร์/กรัม/วัน จากกราฟแสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย a_w และ ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ต่ออัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อรา (Figure 18) พบว่า สภาวะในการเจริญที่เชื้อราที่มีอัตราการสร้างสปอร์มากกว่า 4.0×10^5 สปอร์/กรัม/วัน คือที่ 0.98-0.99 a_w และมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ระหว่าง 300-550 ppm ในขณะที่ภายใต้สภาวะเครียดเนื่องจากน้ำ (0.90-0.9324 a_w) a_w เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อรามากกว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แต่เมื่อระดับ a_w เพิ่มขึ้น (มากกว่า 0.94 a_w) ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ มีผลต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อราเพิ่มขึ้น (Figure 19) แสดงผลของอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยอุณหภูมิและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ พบว่า เชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ มีอัตราการสร้างสปอร์ต่ำประมาณ 0.6×10^5 สปอร์/กรัม/วัน เมื่อมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่าง 1,100-1,200 ppm ที่อุณหภูมิ 30-36.5 องศาเซลเซียส

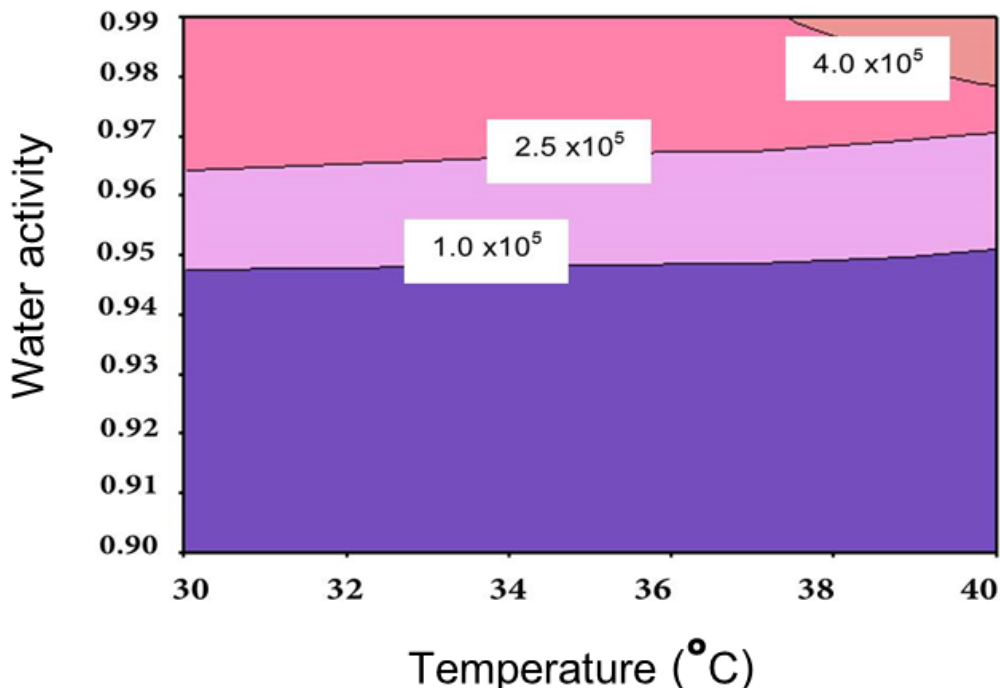


Figure 17 Mean of contour plot of spore production rate profile of combined data (*A. flavus* BUU24, BUU52 and BUU54) in relation to a_w x temperature on paddy rice grains.

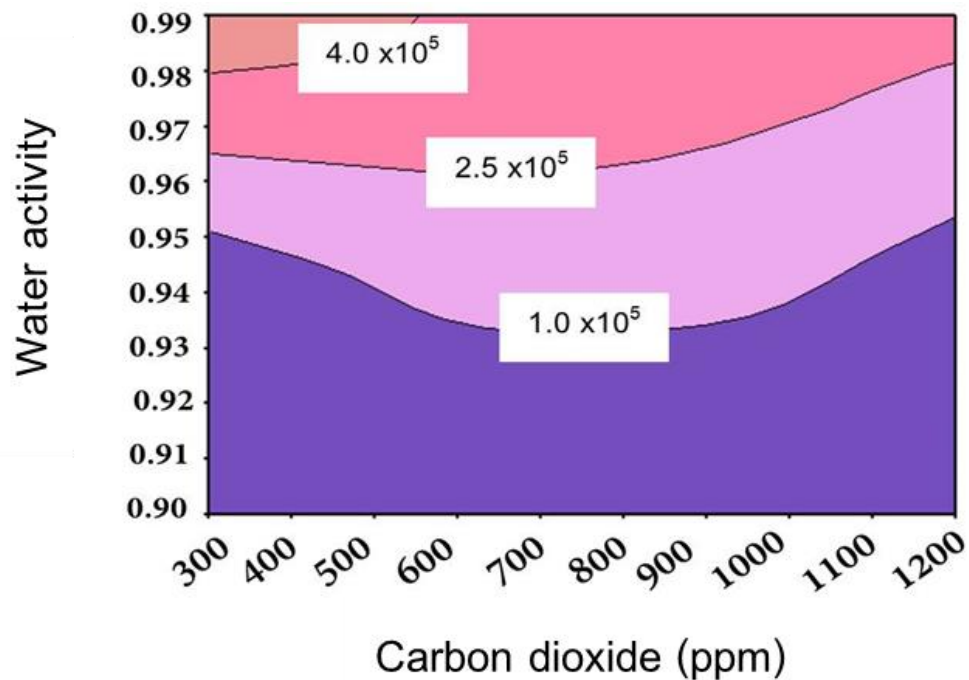


Figure 18 Mean of contour plot of spore production rate profile of combined data (*A. flavus* BUU24, BUU52 and BUU54) in relation to $a_w \times CO_2$ on paddy rice grains.

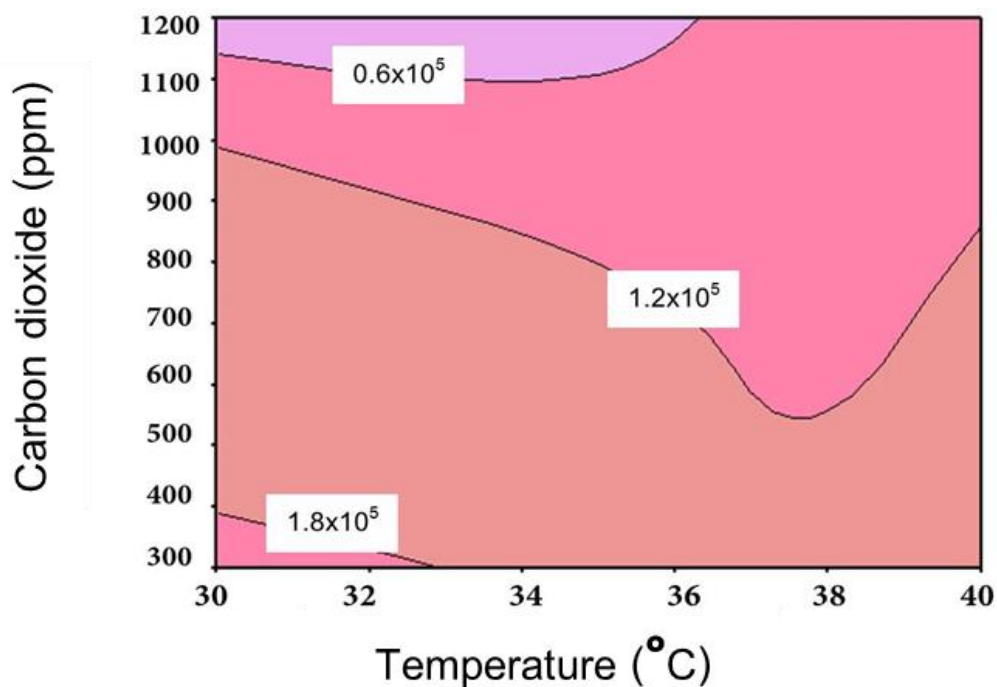


Figure 19 Mean of contour plot of spore production rate profile of combined data (*A. flavus* BUU24, BUU52 and BUU54) in relation to $Temperature \times CO_2$ on paddy rice grains.

BUU24, BUU52 and BUU54) in relation to temperature x CO₂ on paddy rice grains.

6. ผลของอิทธิพลร่วมระหว่าง water activity, อุณหภูมิ และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* BUU52 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3% rice-milled agar

จากข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา อัตราการสร้างสปอร์และปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างขึ้นพบว่าเชื้อรา *A. flavus* BUU52 เป็นไอโซเลทที่มีถูกเลือกเพื่อศึกษาผลของอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศต่อการสร้างสารอะฟลาทอกซินทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเมล็ดข้าว จากผลการทดลองพบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นที่ระดับ 30°C, 0.98 aw และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 1200 ppm เชื้อรามีการสร้างสารอะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้น ภายใต้สภาวะเครียดเนื่องจากน้ำ (0.92 aw) ไม่ว่าจะที่ระดับอุณหภูมิและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ใด พบว่าปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างขึ้นไม่มีความแตกต่างกัน (P<0.05) (Figure 20)

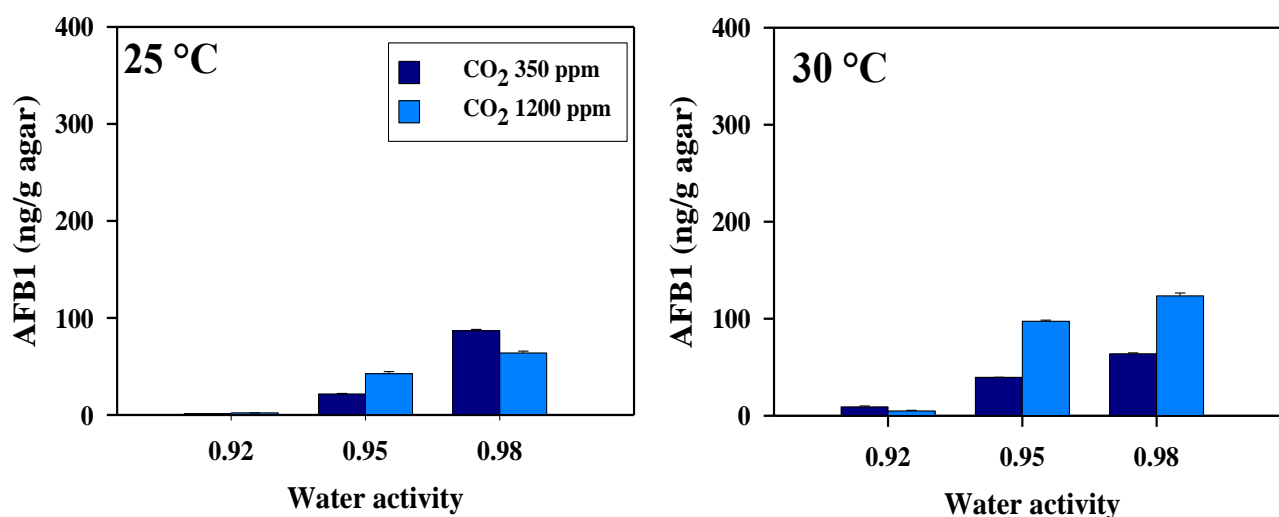


Figure 20 Effect of a_w x temperature x CO₂ on aflatoxin B1 (AFB1) production by *A. flavus* BUU52 grown on 3% rice-milled agar for 10 days at 25°C and 30°C. Bars indicate standard error of the mean.

7 ผลของอิทธิพลร่วมระหว่าง water activity, อุณหภูมิ และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* BUU52 ในเมล็ดข้าวเปลือก

Figure 21 แสดงผลของการสร้างสารอะฟลาทอกซินภายใต้สภาวะที่ได้รับปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 350 ppm และ 1200 ppm ที่ระดับ aw ที่แตกต่างกัน (0.92, 0.95 และ 0.98 aw) บนเมล็ดข้าวที่ผ่านการฉายรังสี

เปรียบเทียบระหว่างที่อุณหภูมิ 25°C และ 30°C พบว่าที่ 0.98 aw, 30°C และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 1200 ppm เชื้อรา *A. flavus* BUU52 สร้างสารอะฟลาทอกซินได้มากที่สุด (271.2 ng/g) เมื่ออุณหภูมิในการเจริญของเชื้อราเพิ่มขึ้นเป็น 30°C เมื่อเปรียบเทียบกับที่ 25°C และที่ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้น การสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* BUU52 เพิ่มขึ้น ที่ระดับ aw ที่เพิ่มขึ้นเป็น 0.98aw เมื่อเปรียบเทียบกับที่ 0.92aw (CO₂ 1200 ppm) ปริมาณของสารอะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้น 12.5 เท่า ในขณะที่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง aw จาก 0.95 ไปเป็น 0.98 (CO₂ 350 ppm และ 1200 ppm) พบว่าปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างขึ้นไม่มีความแตกต่างกัน (P<0.05) และที่ 0.92 aw ที่ระดับอุณหภูมิ 25°C และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ใด พบว่าปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างขึ้นไม่มีความแตกต่างกัน (P<0.05)

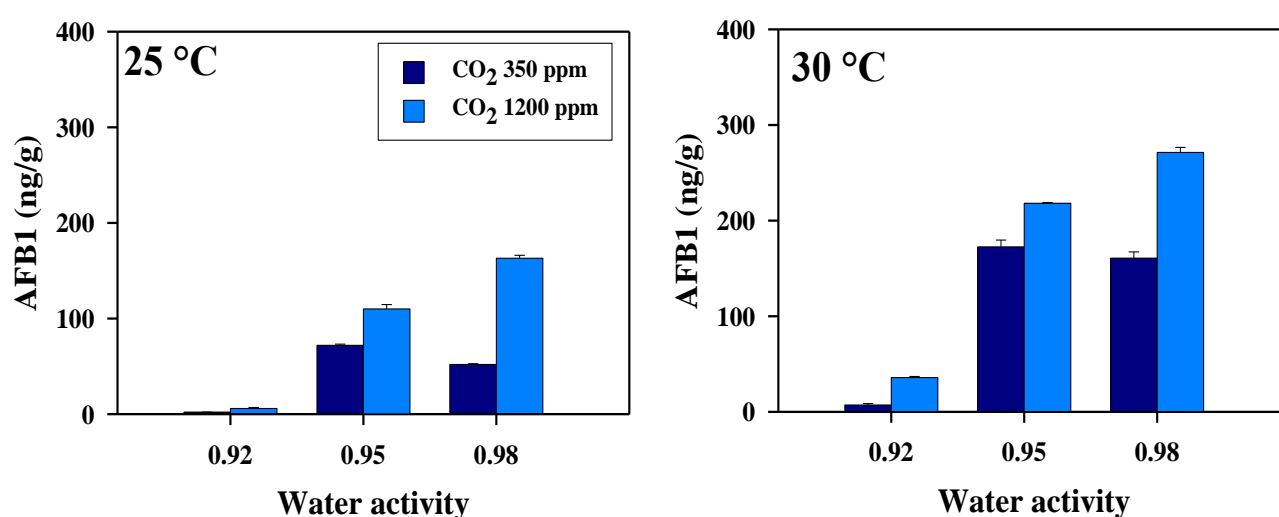


Figure 21 Effect of a_w x temperature x CO₂ on aflatoxin B1 (AFB1) production by *A. flavus* BUU52 grown on stored irradiated rice grains for 10 days at 25°C and 30°C. Bars indicate standard error of the mean.

โดยทั่วไปแล้วเชื้อราในกลุ่ม *A. flavus* สามารถเจริญได้ที่ระดับค่า aw กว้างและทนต่อสภาวะแห้งแล้งได้ดี ถึงแม้ว่าเจริญภายใต้สภาวะแห้ง (aw 0.80) (Pitt and Mscamble 1995; Astoreca et. al., 2012; Mousa et. al., 2013) ซึ่งช่วง aw ที่เชื้อราสามารถเจริญได้ค่อนข้างต่ำกว่าค่าที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ โดยที่ระดับ 0.85 aw ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* ที่คัดแยกได้ส่วนมากไม่ว่าจะเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิทดสอบใดก็ตาม อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของพื้นที่ในเก็บตัวอย่างเพื่อคัดแยกสายพันธุ์เชื้อรา รวมทั้งการปรับตัวของเชื้อราภายใต้สภาวะเครียดชนิดต่างๆ เช่นสภาวะเครียดที่เกิดจากอุณหภูมิสูงสภาวะเครียดเนื่องจากน้ำ เป็นต้น ที่อุณหภูมิสูงมากกว่า 40°C เชื้อราในกลุ่ม *A. flavus* จะมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำหรือไม่มีการเจริญเติบโต (Niles et. Al., 1985; Astoreca et. al., 2012; Mousa et.al., 2013) จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าที่สภาวะแห้ง (0.90 aw) และมีอุณหภูมิสูง (40°C) เชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งอาจกลายมาเป็นปัญหาสำคัญเมื่อเชื้อรามีการเจริญภายใต้

สภาวะการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศที่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับอุณหภูมิอย่างมาก รวมทั้งมีสภาวะเครียดที่เกิดจากความแห้งแล้งและมีปริมาณ CO₂ ที่เพิ่มมากขึ้นจากการศึกษาผลของอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยของปริมาณก๊าซ CO₂ และ aw ในครั้งนี้พบว่าที่ระดับปริมาณ CO₂ ปานกลาง (350-750 ppm) และที่ 0.90-0.95 aw จะชะลออัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* ลง อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Penicillium verrucosum*, *A. ochraceus*, *A. flavus* และ *A. carbonarius* สามารถถูกยับยั้งได้ประมาณ 50-70% เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีปริมาณ CO₂ 50-75% ทั้งนี้ขึ้นกับระดับ aw (Cairns-Fuller et. al., 2005; Pateraki et. Al., 2007; Giorni et. Al., 2008) การตอบสนองของเชื้อราต่อปริมาณก๊าซ CO₂ อาจมีความแตกต่างกัน โดยอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. flavus* ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อระดับ CO₂ เพิ่มขึ้น (350-100 ppm) แต่พบว่าภายใต้อิทธิพลร่วมระหว่าง aw x อุณหภูมิ x ปริมาณ CO₂ สามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารอะฟลาทอกซิน และปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ aw= 0.95 (Giorni et. al., 2008; Medina et.al., 2014)

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

โดยทั่วไปแล้วเชื้อราในกลุ่ม *A. flavus* สามารถเจริญได้ที่ระดับค่า aw กว้างและทนต่อสภาวะแห้งแล้งได้ดี ถึงแม้ว่าเจริญภายใต้สภาวะแห้ง (aw 0.80) (Pitt and Mischamble 1995; Astoreca et. al., 2012; Mousa et. al., 2013) ซึ่งช่วง aw ที่เชื้อราสามารถเจริญได้ค่อนข้างต่ำกว่าค่าที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ โดยที่ระดับ 0.85 aw ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* ที่คัดแยกได้ส่วนมากไม่ว่าจะเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิทดสอบใดก็ตาม อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของพื้นที่ในเก็บตัวอย่างเพื่อคัดแยกสายพันธุ์เชื้อรา รวมทั้งการปรับตัวของเชื้อราภายใต้สภาวะเครียดชนิดต่างๆ เช่นสภาวะเครียดที่เกิดจากอุณหภูมิสูงสภาวะเครียดเนื่องจากน้ำ เป็นต้น ที่อุณหภูมิสูงมากกว่า 40°C เชื้อราในกลุ่ม *A. flavus* จะมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำหรือไม่มีการเจริญเติบโต (Niles et. Al., 1985; Astoreca et. al., 2012; Mousa et.al., 2013) จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าที่สภาวะแห้ง (0.90 aw) และมีอุณหภูมิสูง (40°C) เชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งอาจกลายมาเป็นปัญหาสำคัญเมื่อเชื้อรามีการเจริญภายใต้สภาวะการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศที่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับอุณหภูมิอย่างมาก รวมทั้งมีสภาวะเครียดที่เกิดจากความแห้งแล้งและมีปริมาณ CO₂ ที่เพิ่มมากขึ้นจากการศึกษาผลของอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยของปริมาณก๊าซ CO₂ และ aw ในครั้งนี้พบว่าที่ระดับปริมาณ CO₂ ปานกลาง (350-750 ppm) และที่ 0.90-0.95 aw จะชะลออัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* ลง อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Penicillium verrucosum*, *A. ochraceus*, *A. flavus* และ *A. carbonarius* สามารถถูกยับยั้งได้ประมาณ 50-70% เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีปริมาณ CO₂ 50-75% ทั้งนี้ขึ้นกับระดับ aw (Cairns-Fuller et. al., 2005; Pateraki et. Al., 2007; Giorni et. Al., 2008) การตอบสนองของเชื้อราต่อปริมาณก๊าซ CO₂ อาจมีความแตกต่างกัน โดยอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. flavus* ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อระดับ CO₂ เพิ่มขึ้น (350-100 ppm) แต่พบว่าภายใต้อิทธิพลร่วมระหว่าง aw x อุณหภูมิ x ปริมาณ CO₂ สามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารอะฟลาทอกซิน และปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ aw= 0.95 (Giorni et. al., 2008; Medina et.al., 2014)

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

(1) เชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน B1 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างข้าวเปลือก

- จากตัวอย่างข้าวเปลือกที่เก็บตัวอย่างในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สามารถคัดแยกเชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน B1 ได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลท ได้แก่เชื้อรา *A. flavus* BUU24, BUU52 และ BUU54 โดยจัดจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับ ITS1 และ ITS2 gene
- ปริมาณสารอะฟลาทอกซิน B1 ที่เชื้อราสร้างขึ้นพบในปริมาณที่แตกต่างกันตั้งแต่ 2.5-480 $\mu\text{g}/\text{kg}$ เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Extract Sucrose agar เป็นเวลา 10 วัน โดยเชื้อรา *A. flavus* BUU52 เป็นไอโซเลทที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน B1 ปริมาณมากที่สุด

(2) ผลของอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศต่อการเจริญของเชื้อรา *A. flavus*

- ปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศได้แก่ aw และอุณหภูมิ มีผลต่อการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลทอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเจริญบนอาหาร 3% rice-milled agar โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลทคือที่ระดับ 0.99-0.98 aw และที่อุณหภูมิในการเจริญเท่ากับ 30-35°C โดยปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา เชื้อรา *A. flavus* BUU24 มีอัตราการเจริญของเส้นใยมากที่สุด
- การสร้างสปอร์ของเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลทเมื่อเจริญบนเมล็ดข้าวเปลือกภายใต้สภาวะทดสอบ มีอัตราการสร้างสปอร์ต่ำเมื่อลดปริมาณน้ำอิสระในเมล็ดข้าว (0.90-0.94 a_w) ไม่ว่าจะเจริญที่ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญก็ตาม การเพิ่มปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (1200 ppm) มีผลยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท เชื้อรา *A. flavus* BUU54 สามารถทนต่อสภาวะที่มีความเครียดเนื่องจากน้ำและอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเชื้อราทดสอบอื่น

(3) การประยุกต์ใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองในการสร้างแบบจำลองทำนายอัตราการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* BUU52 ภายใต้อิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ

- จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้นเพื่อใช้ทำนายอัตราการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* BUU52 ภายใต้สภาวะเครียดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ (aw, อุณหภูมิและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 3% rice-milled agar ผลจากการตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง (validation) ค่าสังเกตที่ได้จากการทดลองและค่าทำนายที่ได้จากแบบจำลองมีค่าใกล้เคียงกัน ($R^2=0.86$)

(4) ผลของอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศต่อการสร้างสารอะฟลาทอกซิน B1 ของเชื้อรา *A. flavus* BUU52

- เชื้อรา *A. flavus* BUU52 มีการสร้างอะฟลาทอกซิน B1 มากที่สุดที่ 0.98 aw, 30°C และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 1200 ppm ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3% rice-milled agar และในเมล็ดข้าวเปลือก
- การสร้างสารอะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญภายใต้สภาวะอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ เมื่อเชื้อราเจริญภายใต้ aw x อุณหภูมิ x 1200 ppm CO₂ เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะควบคุม (350 ppm CO₂)

ข้อเสนอแนะ

- เพื่อเพิ่มความเข้าใจถึงผลกระทบของปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศต่อการเจริญเติบโตและการสร้างอะฟลาทอกซินในเมล็ดข้าว อาจต้องมีศึกษาเพิ่มเติมต่อชนิดของสายพันธุ์ข้าว รวมถึงระดับการสีข้าว เนื่องจากมีผลต่อการสร้างสารและการเจริญของเชื้อราที่ปนเปื้อน
- อาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในพืชอาหารชนิดอื่น เพื่อเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับการตอบสนองของเชื้อราสายพันธุ์อื่นต่อสภาวะเครียดมากยิ่งขึ้น รวมทั้งเป็นแนวทางจัดการลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนของเชื้อราและการสร้างสารพิษอื่นจากเชื้อราในพืชอาหารอื่นหลังการเก็บเกี่ยว

ผลผลิต

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในระดับชาติ

สุพรรณิการ์ สมใจเพ็ง, เกษรา กระสังข์, ปานระวี โสภา และ ชนิดา น้อยชัยพฤษ์. 2560. การประยุกต์ใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองในการทำนายอัตราการเจริญเติบโต ของเชื้อรา *Aspergillus* section *Flavi* ที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน: ผลของปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ, แก่นเกษตร. 45(ฉบับ พิเศษ 1): 1410-1416

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2559A10802005 สัญญาเลขที่ 115/2559
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559
มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศต่อการเจริญและการสร้างสารไมโคทอกซินจากเชื้อราที่สร้างสารไมโคทอกซินที่พบในเมล็ดข้าว

The impact of climate change on growth and mycotoxin production by mycotoxigenic fungi associated with store rice grains

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ดร. สุพรรณนิการ์ สมใจเพ็ง

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึงวันที่ 11 กันยายน พ.ศ. 2562

ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี 11 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2558

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ	บาท	เมื่อวันที่
งวดที่ 1 (50%)	173,250	19 มกราคม พ.ศ. 2559
งวดที่ 2 (40%)	154,000	23 กันยายน พ.ศ. 2560
งวดที่ 3 (10%)	38,500	30 กันยายน พ.ศ. 2562
รวม	385,000	

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่จ่ายจริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	34,650	34,650	0
2. ค่าจ้าง	35,000	35,000	0
3. ค่าวัสดุ	204,850	204,850	0
4. ค่าใช้สอย	72,000	72,000	0
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
6. ค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน	38,500	38,500	0
รวม	385,000	385,000	0

เอกสารอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร. การเก็บเกี่ยวและวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวข้าว โครงการถ่ายทอดองค์ความรู้ เรื่องพืชเศรษฐกิจ (ข้าว) กลุ่มพัฒนาเทคโนโลยีการเผยแพร่ สำนักพัฒนาการถ่ายทอดเทคโนโลยี กรมส่งเสริมการเกษตร. 1-3.
- ปิ่นพิศา ทาเอื้อ และ สุพรรณนิการ์ สมใจเพ็ง. 2559. ผลกระทบ ของ water activity และอุณหภูมิต่อระยะ lag phase และอัตราการเจริญของเชื้อรา aflatoxigenic *Aspergillus flavus* ที่คัดแยกได้จากเมล็ดข้าว. เกษตร. 44(ฉบับ พิเศษ 1): 1104-1111
- สุพรรณนิการ์ สมใจเพ็ง, เกษรา กระสังข์, ปานระวี โสภา และ ชนิดา น้อยชัยพฤกษ์. 2560. การประยุกต์ใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองในการทำนายอัตราการเจริญเติบโต ของเชื้อรา *Aspergillus section Flavi* ที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน: ผลของปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ, เกษตร. 45(ฉบับ พิเศษ 1): 1410-1416
- สุพัตรา สุวรรณธาดา, กัญญา เชื้อพันธุ์ และ สอวาง ไชยรินทร์. (2554). การพัฒนาวิธีการประเมินคุณภาพข้าวเปลือกชั้นภายใต้ระบบตรวจสอบคุณภาพ. สัมมนาวิชาการกลุ่มศูนย์วิจัยข้าวภาคเหนือตอนบนและภาคเหนือตอนล่าง. 309-326.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2556). สถิติการส่งออกข้าว. ระบบแสดงข้อมูลสถิติ สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. www.oae.go.th
- อมรา ชินภูติ และ ศุภรา อัคระสาระกุล. (2552). การปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซิน ปี 1 และสารโอคราทอกซิน เอ ในข้าวกล้องและข้าวขาว. วารสารวิชาการข้าว ปีที่ 3 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม – ธันวาคม. 57-65
- Akbar, A. and Magan, N. (2014). The impact of water and temperature interactions on lag phase, growth and potential ochratoxin A production by two new species, *Aspergillus aculeatinus* and *A. sclerotii carbonarius*, on a green coffee-based medium. International Journal of Food Microbiology, 188,116-121.
- Astoreca, A., G. Vaanonde, A., Dalcerro, A.J. Ramos, and S. Marin. 2012. Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn. Int. J. Food Microbiol. 156: 60-67.
- Bababunmi, E.A; Uwaifo, A.O. and Bassir, O. (1976). Hepatocarcinogens in Nigerian Food stuffs. World Review of Nutrition and Dietetics, 28, 188-209.
- Bars, L.J. and Bars, L.P. (1992). Fungal contamination of aromatic herbs, aflatoxinigenesis and residues in infusions. Microbiology Alim. Nutr, 10, 267-271.

- Cairns-Fuller, V., Aldred, D. and Magan, N. (2005). Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *Journal of Applied Microbiology* 2005, 99, 1215–1221.
- Garcia D, AJ. Ramos V, Sanchis S. Marín. 2011. Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Food. Microbiol.* 28: 406-17.
- Giorni, P., Paloa, B., Pietri, A., and Magan, N. 2008. Effect of aw and CO₂ level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *Int. J. Food. Micro.* 122: 109-113.
- IARC. (2012). Agent classified by the IARC monographs. Vol. 1e104. International Agency for Research on Cancer. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>
- Jones, R., Duncan, H., Payne, G. and Leonard, K., (1980). Factors influencing infection by *Aspergillus flavus* in silk-inoculated corn. *Plant Disease*, 64, 859-863.
- Kebede, H., H. K. Abbas, D. K. Fisher, and N. Bellaloui, 2012. Relationship between Aflatoxin Contamination and Physiological Responses of Corn Plants under Drought and Heat Stress. *Toxins*. 4(11): 1385-1403.
- Lahlali, R., M. N. Serrhini, and M. H. Jijakli. 2005. Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. *Int. J. Food Microbiol.* 103: 315-322.
- Li, F; Yoshizawa, T; Kawamura, O; Luo, X. and Li, Y. (2001). Aflatoxins and fumonisins in corn from high incidence area of human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4122-4126.
- Magan, N., Hope, R., Cairns, V. and Aldred, D. (2003). Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 723-730.

- Magan, N; Sachis, V. and Aldred, D. (2004). Role of spoilage fungi in seed deterioration. In: Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications, Aurora, D.K. (Ed.), Marcell Dekker, New York, Ch 28, pp 311-323.
- Magan, N., Aldred, D., Hope, R. and Mitchell, D. (2010). Environmental factor and interactions with mycobiota of grain and grapes: effects on growth, deoxynivalenol and ochratoxin production by *Fusarium culmorum* and *Aspergillus carboarius*. (2010). *Toxin*, 2, 353-366.
- Magan, N., Medina, A. and Aldred D. (2011). Possible climate change effect on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathology*, 60, 150-163.
- Makun, H.A., Gbodi, T.A., Akanya, O.H., Salako, E.A. and Ogbadu, G.H. (2007). Fungi and some mycotoxins contaminating rice (*Oryza sativa*) in Niger State, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 6(2), 99-108.
- Medina, A., Rodriguez, A. and Magan, N. (2014). Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. *Frontiers in Microbiology*, 5,1-7.
- Miraglia, M., H. J. P Marvin, G. A. Kleter, P. Battilani, C. Brera, E. Coni, F. Cabbada, L. Croci, B. De Santis, S. Denkers, L. Filippi, R. W. A Hutjes, M. Y. Nordan, M. Disante, G. Piva, A. Prandini, L. Toti, G. van den Boon, A. Vespermann, (2009). Climate change and food safety. An emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1009–1021.
- Mohale, S.A. (2013). Impact of Ecophysiological Factors on Biocontrol of Aflatoxin Contamination of Maize by Atoxigenic *Aspergillus flavus* Strains. PhD Thesis, Cranfield University, UK
- Mousa, W., Ghazali, F.M., Jinap, S., Ghazali, H.M., Radu, S. 2013. Modeling growth rate and assessing aflatoxins production by *Aspergillus flavus* as a function of water activity and temperature on polished and brown rice. *J. Food Sci.* 78: M56-M63.
- Nguyen, M.T., Tozlovanu, M., Tran, T.L. and Pfohl-Leskowicz, A. (2007). Occurance of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chemistry*, 105, 42-47.
- Niles, E. V., Norman, J. A., D. Pimbley. 1985. Growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in wheat and barley. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 84: 259-266.

- Park, J.W., Choi, S.Y., Hwang, H.J. and Kim, Y.B. (2005). Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 305-314.
- Parra, R., D. Aldred, and N. Magan. 2005. Medium optimization for the production of the secondary metabolite squalestatin S1 by a *Phoma* sp. combining orthogonal design and response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*. 37: 704-711.
- Pardo, E., M. Malet, S. Mar­Ãn, V. Sanchis, A. J. Ramos. 2006. Effects of Water Activity and Temperature on Germination and Growth Profiles of Ochratoxigenic *Penicillium verrucosum* Isolates on Barley Meal Extract Agar. *International Journal of Food Microbiology* 106:25-31.
- Pateraki, M., A. Dekanea, D. Mitchell, D. Lydakis, and N. Magan. 2007. Influence of sulphur dioxide, controlled atmospheres and water availability on in vitro germination, growth and ochratoxin A production by strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *Postharvest biology and technology*. 44: 141-149.
- Paterson, P.R.M. and N. Lima, (2011). Further mycotoxin effects from climate change. *Food Research International*, 44, 2555-2566.
- Payne, G.A., Cassel, D.K. and Adkins, C.R., (1985). Reduction of aflatoxin levels in maize due to irrigation and tillage. *Phytopathology*, 75, 1283-1283.
- Pitt J.I., Miscamble B.F. 1995. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *J. Food Prot.* 58: 86-90.
- Setti, B., M. Bencheikh, and J. E. Henni. 2011. Applications of response surface methodology approach to determine the effect of temperature, time of incubation and light conditions on germination and germ tube growth of *Puccinia coronata* f.sp. *avenae* urediospores. *African Journal of Biotechnology*. 10: 9421-9427.
- Shearer, J., Sweets, L., Baker, N. and Tiffany, L., (1992). A study of *Aspergillus flavus* /parasiticus in Iowa crop fields: 1988-1990. *Plant Disease*, 76, 19-22.
- Shiferaw, B., B. M. Prasanna, J. Hellin, and M. Bänziger. (2011). Crops That Feed the World 6. Past Successes and Future Challenges to the Role Played by Maize in Global Food Security. *Food Security*, 3 (3), 307–327.

- Tanaka, K., Saga, Y., Zheng, Y., Nakagawa, H. and Kushiro, M. (2007). Mycotoxins in rice. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 59-66.
- Todd, E. C. D., and C. Narrod. (2006). Understanding the Links between Agriculture and Health: Agriculture, Food Safety, and Foodborne Diseases. Focus 13, Brief 5 of 16. Washington, DC: International Food Policy Research Institute.
www.ifpri.org/sites/default/files/publications/focus13_05.pdf.
- Tonon, S.A., Marucci, R., Jerke, G. and Garcia, A. (1997). Mycoflora of paddy and milled rice produced in the region of Northeastern Argentina and Southern Paraguay. *International Journal of Food Microbiology*. 37, 231-235.
- Trung, T.S., Bailly, J.D., Querin, A., Bars, P. LL. And Guerre, P. (2001). Fungal contamination of rice from south Vietnam, mycotoxinogenesis of selected strains and residues in rice. *Revue Med. Vet.* 152, 7, 555-560.
- WHO (1999). Basic Food Safety for Health Workers. World Health Organization, Geneva, Switzerland.