บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *Aspergillus flavus*

เชื้อรา *A. flavus* มีลักษณะที่สำคัญประกอบด้วยเส้นใยที่มีผนังกั้น (septum hyphae) ไม่มีสี หรือมีสีอ่อน (hyaline or subhyaline) มีก้านชูสปอร์ (conidiophore) เจริญจากเส้นใยโดยตรงมีลักษณะยาวและไม่แตกกิ่งก้านสาขา ปลายก้านชูสปอร์โป่งออกมีรูปร่างค่อนข้างกลม (vesicle) และเป็นที่เกิดของเซลล์ที่ทำให้เกิดสปอร์ (conidia) ซึ่งอาจมีหนึ่งชั้นหรือสองชั้น สปอร์เกิดต่อกันเป็นลูกโซ่ สปอร์รูปร่างกลมและผนังขรุขระ มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบใช้เพศและไม่ใช้เพศ แต่การสืบพันธุ์แบบใช้เพศเกิดขึ้นน้อยมาก (Alexopoulos and Mims, 1979) เมื่อสังเกตุเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารด้วยตาเปล่าจะพบว่ามีสีเหลืองจนถึงสีเขียวเข้ม เชื้อราชนิดนี้พบได้ทั้งในอากาศและในดินสามารถปะปนไปกับพืชและเมล็ดพืชตั้งแต่ในแปลงปลูก นอกจากนี้ยังจัดเป็น storage fungi คือ เชื้อราที่เข้าทำลายเมล็ดพืชในโรงเก็บ เชื้อรานี้สามารถเจริญเติบโตเป็น saprophyte ที่ไม่เฉพาะเจาะจงบนเศษซากพืช และอยู่กระจัดกระจายทั่วไปทั้งบนผิวดินและในดิน ซึ่งจัดเป็นแหล่ง primary inoculum เป็นที่อาศัยของสปอร์ และถือเป็นแหล่งผลิตโคนีเดียให้กระจายในดินที่สำคัญในฤดูปลูกต่อไป เชื้อรา *A. flavus* สามารถเจริญเติบโตได้ค่อนข้างกว้างถ้าความชื้นพอเพียง ตั้งแต่ช่วงอุณหภูมิ 12-48 องศาเซลเซียส และมีศักยภาพของน้ำในดิน (water potential) ระดับ -35 MPa แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตสูงสุดอยู่ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 75% (Richard and Payne, 2003)

สารพิษอะฟลาท็อกซินที่ถูกสร้างขึ้นโดย storage fungi หลายชนิด แต่ที่สร้างสารพิษได้ดีคือ *A. flavus* อะฟลาท็อกซินเป็นสารที่ได้จากการสังเคราะห์ในขบวนการเมทาบอลิซึมขั้นที่ 2 (secondary metabolite) สารพิษอะฟลาท็อกซินเป็นกลุ่มของสารเคมีพวก difranocoumarin ซึ่งมีอยู่หลายชนิด โดยทั่วไปที่ตรวจพบในธรรมชาติ แบ่งออกเป็น 4 ชนิดคือ aflatoxin B1, B2 ,G1 และ G2 ซึ่งจะมีคุณสมบัติประจำตัวที่สำคัญคือ อะฟลาท็อกซิน ชนิด B1 และ B2 สามารถเรืองแสงสีน้ำเงิน ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตช่วงคลื่นยาว ส่วนอะฟลาท็อกซิน ชนิด G1 และ G2 จะเรืองแสงสีเขียว สารพิษอะฟลาท็อกซิน B1 จะมีความเป็นพิษสูงสุดและตรวจพบได้มากที่สุด สารพิษ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อะฟลาท็อกซินมีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำและทนความร้อนได้สูงถึง 260 องศาเซลเซียส (ประสงค์, 2530)

2. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน

2.1 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อรา

เชื้อรา *A. flavus* แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างอะฟลาท็อกซินได้แตกต่างกันทั้งปริมาณ สัดส่วนและชนิดของสารพิษ เชื้อ *A. flavus* บางสายพันธุ์สามารถสร้างอะฟลาท็อกซินได้ครบทุกชนิด คือ B1, B2, G1 และ G2 บางสายพันธุ์สร้างเฉพาะ B1 หรือ G1 ส่วนใหญ่ที่สร้างสายพันธุ์ G1 มักสร้าง B1 ด้วย ในประเทศไทย Glinsukon *et al.* (1976) รายงานว่า 80% ของเชื้อรา *A. flavus* ที่พบสามารถสร้างอะฟลาท็อกซินและบางสายพันธุ์ไม่สร้างอะฟลาท็อกซินเลย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ อรุณศรี และคณะ (2527) ที่พบว่า ไอโซเลทของเชื้อรา *A. flavus* ที่แยกได้จากตัวอย่างถั่วลิสงจำนวน 157 ไอโซเลท จะมีเพียง 56 ไอโซเลทเท่านั้นที่สร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน นอกจากนี้ Ahmad and Singh (1994) ยังรายงานไว้ว่า เชื้อรา *A. flavus* ที่แยกได้จากดินจำนวน 321 ไอโซเลทและ 61 ไอโซเลทที่ได้จากอากาศในประเทศอินเดีย สามารถสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซินได้ถึง 57 และ 50% ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Okazaki and Saito (1992) พบว่า 28 ไอโซเลท ของเชื้อรา *A.flavus* ที่แยกได้จากดิน พบเพียง 5 ไอโซเลทเท่านั้น ที่สามารถสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซินได้ เชื้อรา *A. flavus* ที่ไม่สร้างสารพิษอะฟลาท็อกซินมีอยู่หลายสายพันธุ์ด้วยกัน เช่น *A. flavus* สายพันธุ์ PEVV 52 (ดุษณี, 2530), NRRL 21368 (Dorner *et al.*, 1998) และ NRRL 21882 (Dorner and Cole, 2002) เป็นต้น โดยปกติแล้วเชื้อรา *A. flavus* จะสร้างเส้นใยและสปอร์เท่านั้น เชื้อราจะเจริญและสร้างสปอร์ได้ช้าลง หากปริมาณธาตุอาหารถูกจำกัด Nessbitt *et al.* (1962) รายงานว่า ปริมาณธาตุอาหาร ฟอสเฟตและไนโตรเจน ถ้ามีจำกัด จะมีผลทำให้การเจริญเติบโตในระยะเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อราช้าลงไป

นอกจากนี้ปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรา *A. flavus* กับจุลินทรีย์อื่นๆ จะมีปฏิกิริยาต่อกัน โดยจะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการผลิตของสารพิษของเชื้อรา *A. flavus* ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อบน substrate พบว่า เชื้อราหลายชนิดมีความสัมพันธ์กันทั้งทางบวกและทางลบ จากการรายงานของ อรพิน และปรียา (2526) พบว่า เชื้อรา *Bacillus spp.*, *Rhizoctonia* spp. และ *A. niger* จะทำให้ *A. flavus* เจริญและสร้างสารพิษได้น้อยลง เช่นเดียวกับ Wells and Kreuzer (1972) พบว่าการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* จะลดลงเมื่อมีเชื้อรา *Trichoderma viride* และ *Penicillium*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

funiculosu เจริญอยู่ด้วย นอกจากนั้น Chourasia (1995) ที่พบว่า เชื้อรา *Flavobacterium odoratium* สามารถยับยั้งการสังเคราะห์สารพิษอะฟลาท็อกซินของเชื้อรา *A. flavus* ในเมล็ดถั่วลิสง

2.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเมล็ดและสภาพแวดล้อม

ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ และความชื้นภายในเมล็ดพืช จัดว่าเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซินมากที่สุด เชื้อรานี้จะเจริญได้น้อยเมื่ออากาศมีความชื้นต่ำกว่า 85 % หรือเมล็ดมีความชื้นต่ำกว่า 16% ซึ่ง Teitell (1958) รายงานว่า ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้น ระดับความชื้นสัมพัทธ์ที่มีผลต่อการตายของสปอร์ของเชื้อราก็จะเปลี่ยนไป เช่น จากค่าความชื้นสัมพัทธ์ 75% ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส มีผลต่อการตายของสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* Davis (1977) ได้รายงานว่า การเก็บเมล็ดถั่วลิสงที่มีความชื้น 9% และความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 80% มีผลทำให้เชื้อรา *A. flavus* จะถูกจำกัดการเจริญทาง vegetative เพราะความชื้นสูงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการงอกของสปอร์และการแทงผ่านของเชื้อรา การเก็บรักษาเมล็ดโดยวิธีการปรับสภาพแวดล้อมให้ประกอบด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 40% และออกซิเจนเพียง 1% จะมีผลทำให้การงอก sclerotia ของเชื้อรา *A. flavus* ลดลง (Menasherov *et al.*, 1992) นอกจากนี้อุณหภูมิก็มีบทบาทที่สำคัญ โดยเชื้อรา *A. flavus* มีช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญเติบโตได้ค่อนข้างกว้าง ถ้าความชื้นพอเพียง เชื้อจะเจริญเติบโตและสร้างสารพิษได้ดี ตั้งแต่ช่วงอุณหภูมิ 6-46 องศาเซลเซียส (Shantha and Sreenivasmurthy, 1981)

สภาพของเมล็ด ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่เอื้ออำนวยต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* โดยฝักที่เกิดบาดแผลจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย แมลง หรือเกิดจากการเก็บเกี่ยว และการกะเทาะเมล็ด ทำให้เชื้อราสามารถเข้าทำลายได้ดีกว่าฝักที่ไม่ได้รับความเสียหาย นอกจากนี้โครงสร้างและคุณสมบัติทางกายภาพของเมล็ด โดยเฉพาะความแตกต่างของธาตุอาหารที่เป็นองค์ประกอบของเมล็ด ความหนาของเปลือก และเยื่อหุ้มเมล็ด ยังสามารถต้านการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ได้ดี โดยมีรายงานว่าเปลือกฝักที่มีการสร้าง lignin ในส่วนของเนื้อเยื่อ sclerenchyma ได้เร็ว จะมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* (Petti *et al.*, 1989) และสารแทนนินที่มีอยู่ในเยื่อหุ้มเมล็ด ซึ่งเป็นสารพวก polyphenol สารนี้จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซินได้ (Azaizeh and Pittit, 1987) และ Azaizeh *et al.* (1990) รายงานสนับสนุนว่าปริมาณแทนนินที่มีอยู่สูงในเยื่อหุ้มเมล็ดของถั่วลิสงพันธุ์ PI337409 และ TX-798736 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* สามารถยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การเข้าทำลายของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของถั่วลิสง

3.1 ระยะก่อนการเก็บเกี่ยว

การเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในระยะก่อนการเก็บเกี่ยว ส่วนใหญ่เนื่องมาจากเชื้อราที่มีอยู่ในดิน จากการวัดปริมาณของประชากรเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* ของ Griffin and Garren (1974) ในพื้นที่ต่างๆของรัฐเวอร์จิเนีย ระหว่างปี 1971-1972 พบว่า เชื้อราสามารถเข้าทำลายฝักได้ถึงแม้ประชากรของเชื้อราในดินจะมีปริมาณที่ต่ำ และการปลูกถั่งลิสงก็ไม่สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อรา *A. flavus* ในดินได้มากกว่าก่อนปลูกได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ ทิพย์วรรณและธรรมศักดิ์ (2531) ที่ได้ทำการปลูกเชื้อรา *A. flavus* บริสุทธิ์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ (0.5 , 1.0, 1.5, 2.0, และ 2.5 กิโลกรัม/แถว) ลงในแปลงที่ปลูกถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 เก็บเกี่ยวผลผลิตมาตรวจสอบ พบว่า ยิ่งใส่ปริมาณเชื้อราลงไปในดินมากขึ้นมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายในเมล็ดและการเกิดอะฟลาท็อกซิน B สูงขึ้น และจำนวนโคโลนีของเชื้อราต่อดิน 1 กรัมมากยิ่งขึ้น

การเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* จะเริ่มตั้งแต่ระยะออกดอกจนกระทั่งถึงการออกฝัก (Wilson *et al.*, 1977) วุฒิศักดิ์ และคณะ (2534) รายงานว่าเชื้อรา *A.flavus* นี้สามารถเข้าทำลายถั่วลิสงได้ตั้งแต่ในระยะออกดอกแม้จะไม่ได้ปลูกเชื้อก็ตาม Griffin and Garren (1976) ให้การสนับสนุนว่า ระยะออกดอกมีความสำคัญต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา โดยพบเชื้อรา *A. flavus* ประมาณ 7% จากดอกถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อไว้แล้วประมาณ 3 ชั่งโมง เปรียบเทียบที่ระยะแทงเข็ม (peg) ยังไม่ฝังลงดินจะมีเชื้อรา *A. flavus* ในระดับที่ต่ำกว่าคือ 0.3 – 1.5% และให้ผลที่สอดคล้องกับงานทดลองของ ภพพร (2537) ซึ่งพบว่า ระยะการเจริญเติบโตของถั่วลิสงที่วิกฤติต่อการเข้าทำลายจะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ของถั่วลิสง แต่ช่วงที่วิกฤติที่สุดได้แก่ ระยะดอกแรกบานและระยะฝักแก่ นอกจากนี้ Styer *et al.* (1983) ได้ทำการปลูกเชื้อรา *A. flavus* ที่ดอกถั่วลิสง พบว่า หลังจากปลูกเชื้อแล้วภายใน 48 ชั่งโมงจะมีการเกิดเส้นใยและสร้างสปอร์จำนวนมาก สังเกตได้ที่ผิวของ Stigma และ pollen grain ซึ่งมีเส้นใยบางส่วนแทงลงไปใน style จนกระทั่งไปเจริญที่ ovary ทำให้มีเชื้อตั้งแต่ระยะออกดอก

การติดเชื้อในระยะที่สร้างเข็มอาจเกิดได้หลังจากการติดเชื้อผ่านทางดอกหรือเกิดได้จากเชื้อราที่ฟุ้งกระจายในอากาศมาสัมผัสเข็มที่อยู่เหนือดิน หรือเมื่อเข็มสัมผัสดินที่มีเชื้อราอยู่ และเชื้อราก็จะเจริญเข้าไปสะสมอยู่ในรังไข่ที่ปลายเข็มและเจริญอยู่จนกระทั่งมีการพัฒนาไปเป็นคัพภะ ซึ่ง Usha *et al.* (1991) รายงานว่า พบการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในระยะแทงเข็มของถั่วลิสงถึง 80 % และ Saleha (1996) ให้การสนับสนุนว่า ประชากรของเชื้อรา *A. flavus* ในดินบริเวณรอบฝัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ถั่วลิสง (pod zone) มีความหนาแน่นที่สูงกว่าในบริเวณรากพืช (root zone) และความหนาแน่นของปริมาณเชื้อราจะมีเพิ่มมากขึ้นไปจนถึงในระยะเก็บเกี่ยว นอกจากนั้น Ingram *et al.* (2002) ได้ศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในระยะแทงเข็มและระยะสร้างฝักของถั่วลิสง โดยใช้เชื้อรา *A. flavus* ที่มีคุณสมบัติพิเศษคือ มี Green Fluorescing Protein ที่สามารถเรืองแสงได้ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ซึ่งสามารถตรวจติดตามการเจริญของ mycelium ของเชื้อราบนเข็มของถั่วลิสงและที่ผิวนอกของฝักถั่วลิสงได้

3.2 ระยะหลังการเก็บเกี่ยว

ในระยะหลังการเก็บเกี่ยวถั่วลิสงอาจถูกเชื้อรา *A. flavus* เข้าทำลายได้เช่นกันหากมีการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวที่ไม่ดี ดังนั้นในระยะหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งได้แก่ในระยะตากแห้งหรือการเก็บรักษา ถ้าความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศและอุณหภูมิยังคงเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ก็สามารถที่จะสร้างความเสียหายให้แก่เมล็ดได้ และถ้าเมล็ดถั่วลิสงมีความชื้น 14-15% จะทำให้เมล็ดถั่วลิสงอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* แต่ถ้าเมล็ดมีความชื้นลดลงเหลือประมาณ 8% จะปลอดภัยต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* (Jackson, 1967) นอกจากนี้ ระยะเวลาที่ทำให้ฝักแห้งจะมีผลต่อการเกิดของสารอะฟลาท็อกซินด้วย ฝักซึ่งทำให้แห้งภายใน 4-6 วันจะไม่พบสารอะฟลาท็อกซิน แต่ฝักซึ่งทำให้แห้งในเวลา 8-12 วัน จะพบสารอะฟลาท็อกซิน 25-500 ppb ซึ่ง Petti and Taber (1970) รายงานว่าการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* และปริมาณของสารอะฟลาท็อกซินในฝักที่แห้งช้าจะสูงกว่าในฝักที่แห้งเร็ว ดังนั้นการทำให้ถั่วลิสงแห้งโดยเร็วที่สุดนั้นสามารถช่วยลดการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* และช่วยลดปริมาณการเกิดสารอะฟลาท็อกซินได้ การเก็บรักษาถั่วลิสงแบบทั้งฝัก หากไม่มีการคัดฝักเสีย และสิ่งเจือปนอย่างอื่นออกก่อนนำไปเก็บรักษาอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาท็อกซินได้ เนื่องจากฝักถั่วลิสงที่แตกหักหรือได้รับความเสียหายมีการเข้าทำลายของเชื้อรามากกว่าฝักปกติ (Bockelee and Giller, 1974)

3.3 ระยะการเก็บรักษา

เชื้อรา *A. flavus* จัดเป็น storage fungi ชนิดหนึ่งที่สามารถเข้าทำลายเมล็ดในโรงเก็บได้ เชื้อรานี้สามารถพบได้ทั่วไปโดยเฉพาะในโรงเก็บ ซึ่งจะเป็นแหล่งที่พบมากที่สุด เนื่องจากเป็นเชื้อราที่สามารถเจริญและสร้างสปอร์ได้มากมาย และล่องลอยไปในอากาศ เมล็ดจึงมีโอกาสติดเชื้อรานี้ได้ง่าย เชื้อราอาจติดอยู่ตามฝักหรือแทรกอยู่ตามรอยแตกรอยแยกของเปลือกเมล็ดอาจอยู่ในรูปสปอร์ที่พักตัวติดมากับส่วนนอกของเมล็ด เมื่ออยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราจะสามารถเจริญและลุกลามได้อย่างรวดเร็ว (Mycock and Berjak, 1995) เชื้อราที่อยู่นอกเมล็ดจะเกิดกระบวน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การย่อยสลาย หรือเกิดขบวนการเมตาโบลิซึม สปอร์เกิดขบวนการงอกจนพัฒนาเป็นโคโลนีและลุกลามเข้าทำลายเนื้อเยื่อเมล็ดได้ โดยอาจใช้วิธีผ่านผิวชั้นนอกเมล็ดที่แตกเสียหาย นอกจากนั้นเชื้อรายังสามารถเจริญผ่านขั้วเมล็ดและแทงทะลุผ่านรูเปิดทางธรรมชาติได้ มีรายงานว่า เชื้อรา *A. flavus* var. *columnaris* สามารถเข้าทำลายเมล็ดทางบาดแผลได้ดี นอกจากนี้เส้นใยยังสามารถแทงทะลุผ่านรูธรรมชาติของเมล็ดได้อีกด้วย (Mycock and Berjak, 1985)

การเก็บรักษาถั่วลิสงจะปลอดภัยจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* เมื่อเมล็ดมีความชื้นต่ำกว่า 8% แต่ในสภาพการเก็บรักษาที่ไม่ดีเมื่อเมล็ดได้รับความชื้นจากน้ำฝนหรือจากบรรยากาศ จะทำให้เชื้อรา *A. flavus* และเชื้อราอื่นๆ เข้าทำลายถั่วลิสงอย่างรวดเร็ว และสร้างสารอะฟลาท็อกซินขึ้นภายหลังทั้งในฝักและเมล็ด แสงทิวา (2540) ได้ทำการเก็บรักษาเมล็ดถั่วลิสงที่มีความชื้นต่ำกว่า 10 % บรรจุในภาชนะปิดสนิทและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าสามารถช่วยลดความเสียหายของเมล็ดถั่วลิสงจาการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ได้ ปัจจัยที่มีความสำคัญที่สุดในการเจริญเติบโตและการสร้างสารอะฟลาท็อกซินของเชื้อรา *A. flavus* ในระยะการเก็บรักษาได้แก่ ความชื้นสัมพัทธ์อากาศที่สูงกว่า 85% อุณหภูมิที่สูงกว่า 15 องศาเซลเซียส เวลาในการเก็บรักษาที่นานกว่า 4 เดือน และก๊าซในบรรยากาศที่มีปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มากเกินไป (Austwick and Ayerst, 1963) และยังพบอีกว่า การเก็บรักษาฝักถั่วลิสงไว้ทั้งฝักมีการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาท็อกซินที่ต่ำกว่าการเก็บแบบกะเทาะเปลือก (Wilson *et al.*, 1977)

4. การเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในดิน

เชื้อรา *A. flavus* ถูกจัดเป็น soil borne สามารถเจริญเติบโตและแพร่กระจายได้ดีในดิน การเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* ในดินจะสามารถผลิตสารอะฟลาท็อกซินได้มากน้อยแค่ไหนนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อ *A. flavus* การเจริญเติบโตของพืช การชะล้างสารอะฟลาท็อกซินในดินและพวก antagonist ในดิน (Arai *et al.*, 1967) เชื้อรา *A. flavus* ในดินส่วนใหญ่สามารถเจริญอยู่ในรูป mycelium, conidia และ sclerotium (Payne, 1998) ซึ่ง sclerotium จะมีลักษณะเป็นก้อนกลมภายในประกอบด้วยเส้นใยที่อัดแน่น มีรูปร่างกลมสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ ในธรรมชาติ sclerotium นี้สามารถคงอยู่ในดินได้นานเนื่องจากมีโครงสร้างที่พักตัว เมื่อพบสภาวะที่เหมาะสมจะเจริญเส้นใยออกมา นอกจากนี้ Wicklow *et al.* (1993) ยังพบว่า เชื้อรา *A. flavus* ยังสามารถสร้าง sclerotium ได้ก่อนที่จะมีสร้างสปอร์ และโคนีเดียของเชื้อรา *A. flavus* สามารถเจริญอยู่ในดินได้สั้นกว่าโคนีเดียของเชื้อรา *A. parasiticus* ในดินทรายอีกด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อรา *A. flavus* สามารถพบมากในพื้นที่ปลูกถั่วลิสงและข้าวโพด Horn *et al.* (1995) ได้สำรวจประชากรของเชื้อรา *A. flavus* ในดินที่ปลูกถั่วลิสงและข้าวโพด ใน 3 พื้นที่ของประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า ประชากรของเชื้อรา *A. flavus* จะพบมากที่สุดในพื้นที่ปลูกถั่วลิสงและตลอดฤดูกาลปลูกจะพบจำนวนประชากรเชื้อรามีความเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก นอกจากนี้การปลูกถั่วลิสงติดต่อกันโดยไม่ปลูกพืชอื่นหมุนเวียนนั้น มักจะพบ ปริมาณของเชื้อราในดินมากกว่าในพื้นที่ปลูกพืชอื่นหมุนเวียน (Petti *et al.*, 1971) เนื่องจากการปลูกพืชหมุนเวียนจะสามารถลดปริมาณเชื้อราในรูป sclerotial inoculum ของเชื้อได้ (Petti and Taber, 1968) จากการสำรวจปริมาณของเชื้อรา *A. flavus* ในดินที่ปลูกถั่วลิสงในหลายพื้นที่ สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ 0-105 propagules ต่อ 1 กรัมของน้ำหนักดินแห้ง ในมลรัฐเวอร์จิเนีย (Griffin and Garren, 1974) และพบประชากร ตั้งแต่ 0-2 $x10^3$ propagules ของ 1 กรัมของน้ำหนักดินแห้ง ในรัฐจอร์เจีย (Bell and Crawford, 1967) และ 10-1300 โคโลนีต่อดิน 1 กรัมในประเทศญี่ปุ่น (Takahashi and Onove, 1991) และในประเทศใต้หวัน จะพบตั้งแต่ 786 - 3467 propagules ของ 1 กรัมของน้ำหนักดินแห้ง (Lee and Chung, 1992) ส่วนในประเทศไทย อรุณศรี (2537) ได้สำรวจปริมาณเชื้อรา *A. flavus* ในดินขณะที่ถั่วลิสงเจริญเติบโตอยู่ในไร่ พบว่า ปริมาณเชื้อราจากดินในระยะถั่วลิสงกำลังออกดอก ลงเข็มและพัฒนาฝัก และขณะเก็บเกี่ยวมีค่าใกล้เคียงกัน โดยตรวจพบในปริมาณ 149, 177 และ 275 โคโลนีต่อดิน 1 กรัม ตามลำดับ และ Griffin (1972) ยังพบว่าประชากรของเชื้อราในบริเวณรากพืช (geocarposphere)ในระยะลงเข็ม จะพบตั้งแต่ 8±2.5 $x10^3$ propagules ต่อ 1 กรัมของน้ำหนักดินแห้ง และทำการตรวจไปจนถึงระยะฝักจะพบว่ามีประชากรของเชื้อราเพิ่มมากขึ้นเป็น 17.1±2 $x10^3$ propagules ต่อ 1 กรัมของน้ำหนักดินแห้ง

นอกจากระบบการปลูกพืช และปริมาณของเชื้อรา *A. flavus* ที่อยู่ในดินจะมีผลต่อการเข้าทำลายของเชื้อราในถั่วลิสงแล้ว ชนิดของดิน (Mehan *et al.*, 1988) และอุณหภูมิของดิน (Sander *et al.*, 1984) ก็มีผลต่อการเจริญเติบโตและการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ได้เช่นเดียวกัน เนื่องจากความแตกต่างของช่องว่างอากาศของดิน ความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน และความเป็นกรดเป็นด่างของดิน Ahmad and Singh (1994) รายงานว่า ชนิดของดินที่แตกต่างกันมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* โดยดินร่วน ซึ่งประกอบด้วยอินทรียวัตถุสูงจะมีเชื้อรา *A. flavus* เจริญอยู่สูงกว่าในดินทรายที่มีอินทรียวัตถุต่ำ ตลอดจนอุณหภูมิของดินที่เหมาะสมต่อการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน จะอยู่ในช่วง 28-30.5 องศาเซลเซียส (Sander *et al.*, 1985) โดยที่อุณหภูมิของดินที่ 30 องศาเซลเซียสในสภาพที่แห้งจะมีความสมดุลกับอุณหภูมิของฝักที่ 34 องศาเซลเซียส ซึ่งจะมีผลทำให้เชื้อรา *A. flavus* สามารถที่จะสร้างเส้นใยและสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซินได้มากขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แต่ถ้าอุณหภูมิดินต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียสและมีอุณหภูมิของฝักถั่วลิสงที่ต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส จะทำให้มีปริมาณของเชื้อรา *A. flavus* ลดน้อยลงไป นอกจากนี้ Lee and Chung (1992) ได้หาความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของประชากรเชื้อรา *A. flavus* ในดินกับปัจจัยทางอุตุนิยมวิทยาและสมบัติดิน เช่น ความชื้นดิน ความเป็นกรดด่าง (pH) ค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity) และอินทรียวัตถุ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ต่อกัน ส่วนปัจจัยที่มีความสำคัญที่สุดที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากร คือ ความแปรปรวนของฤดูกาล

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินอาจมีความสัมพันธ์ทั้งในแง่ของการสนับสนุน หรือส่งเสริมกันในการดำรงชีวิต หรือเป็นในแง่ของการกีดกันหรือยับยั้งการดำเนินชีวิต จุลินทรีย์ดินที่เป็นปฏิปักษ์ (Antagonist) กับเชื้อรา *A. flavus* มีอยู่หลายชนิดด้วยกัน เช่น เชื้อ *Tricoderma spp.* สามารถลดประชากรของเชื้อรา *A. flavus* ในระยะเมล็ดเริ่มงอกและระยะลงเข็มของถั่วลิสงได้ และเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ในดินบริเวณเขตรากถั่วลิสงได้ดีอีกด้วย (Vanamala *et al.*, 2001) สอดคล้องกับ Srilakshmi *et al.* (2001) รายงานว่า 39ไอโซเลทของเชื้อ *Tricoderma spp.* เช่น *T. koningii, T. hamatum, T. viride, T. longibrachiatun, T. pseudokoningii* และ *T. harzianum* เป็นต้น สามารถต้านการเจริญเติบโตเชื้อรา *A. flavus* (Af 11-4) ในดินได้ดี นอกจากนี้ Mickler *et al.* (1995) รายงานไว้ว่า เชื้อ *Bacillus subtilis* จำนวน 7 สายพันธุ์ สามารถลดการเข้าทำลายเชื้อรา *A. flavus* ในฝักถั่วลิสงได้

5. ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำกับการเข้าทำลายของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในดิน

5.1 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสภาวะแห้งแล้ง

ความแห้งแล้งเป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* และการเกิดอะฟลาท็อกซินในระยะก่อนการเก็บเกี่ยว ถั่วลิสงจะอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* สาเหตุส่วนใหญ่เนื่องมาจาก ระยะก่อนการเก็บเกี่ยวถั่วลิสงมักจะประสบปัญหาสภาพแห้งแล้ง ซึ่งสภาพแห้งแล้งดังกล่าวมีผลกระทบต่ออุณหภูมิดิน และความชื้นของดินและความชื้นในฝัก โดย Cole *et al.* (1985) พบว่า เมื่อถั่วลิสงได้รับสภาพขาดน้ำในระยะ 4-6 สัปดาห์ก่อนการเก็บเกี่ยว ทำให้อุณหภูมิดินมีค่าอยู่ระหว่าง 26-30 องศาเซลเซียส และทำให้เกิดการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาท็อกซินในปริมาณสูง สอดคล้องกับงานทดลองของ Sanders *et al.* (1993) พบว่าถั่วลิสงเมื่อได้รับสภาวะความเครียดน้ำ อุณหภูมิดินรอบๆฝักถั่วลิสงจะมีค่าต่ำกว่า 26 องศาเซลเซียส ซึ่งมีผลต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* และการเกิดสารพิษอะฟลาท็อกซินในเมล็ด และพบว่าฝักที่ได้รับความเสียหายจะมีปริมาณของสารพิษอะฟลาท็อกซิน อยู่สูงถึง 198-734 ppb. ในระยะก่อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเก็บเกี่ยวถ้าถั่วลิสงได้รับความเครียดน้ำ แล้วจะมีผลต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ได้ดี ซึ่ง Mehan *et al.* (1988) ทดลองในแปลงปลูกถั่วลิสง โดยให้ถั่วลิสงได้รับสภาพแห้งแล้งในช่วงระยะเวลาต่างๆกันก่อนการเก็บเกี่ยว พบว่า เมื่อถั่วลิสงได้รับสภาพแห้งแล้งระหว่าง 95-125 วันหลังปลูก จะพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในเมล็ดสูง เมื่อเปรียบเทียบกับการให้น้ำอย่างเพียงพอ และพบว่าถั่วลิสงทั้ง 7 สายพันธุ์ที่ได้รับสภาพแห้งแล้ง แต่ละพันธุ์จะมีการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ที่แตกต่างกัน โดยที่พันธุ์ Ah 7223 , J11 และ UF 7513 เป็นพันธุ์ที่มีการติดเชื้อราและสร้างสารพิษในระดับที่ต่ำ และให้ผลที่สอดคล้องกับงานทดลองของ Azaizeh *et al.* (1989) พบว่าเมื่อถั่วลิสงได้รับสภาพขาดน้ำตั้งแต่อายุ 100 วันไปจนกระทั่งถึงวันเก็บเกี่ยว จะพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในเปลือกและเมล็ดอยู่สูงถึง 98 % และ 68% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับถั่วลิสงที่ได้รับน้ำอย่างเพียงพอ

นอกจากนี้ Puntase *et al.* (2002) ได้ศึกษาลักษณะของถั่วลิสงที่ตอบสนองต่อความแห้งแล้งและการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* โดยให้ถั่วลิสงพันธุ์ต่างๆเมื่อได้รับสภาพความเครียดน้ำ คือได้รับน้ำ 2 ครั้ง/สัปดาห์ และ ไม่ได้รับน้ำ 2 สัปดาห์สลับกับให้น้ำ 1 สัปดาห์ พบว่าถั่วลิสงแต่ละพันธุ์จะตอบสนองต่อสภาพความเครียดน้ำต่างกันออกไป โดยที่พันธุ์ ACC329 จะทนทานต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี ส่วนพันธุ์ ACC511 จะมีการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* น้อยที่สุด และพบว่าถั่วลิสงทุกๆพันธุ์ เชื้อรา *A. flavus* จะสามารถเข้าทำลายที่ผิวนอกของฝักสูง แต่การเข้าทำลายในเมล็ดต่ำ

5.2 สภาพน้ำท่วมขัง

สภาวะที่ดินมีน้ำท่วมขัง (flooding or water-logging) หรือมีน้ำมากเกินไป (excess water) อาจเกิดขึ้นจากการระบายน้ำที่ไม่ดีของพื้นที่ การเกิดฝนตกหรือการชลประทานมากไป และจะเกิดขึ้นได้เมื่อสภาพของน้ำในดินที่มีอยู่ในระดับชั้นของรากพืชมากกว่าระดับของ field capacity และในบางครั้งน้ำอาจจะยังขังอยู่ในแปลงเป็นเวลา 2-3 วัน หรืออาจจะมีการซึมหรือไหลผ่านออกไป แต่ก็ยังคงมีความชื้นหลงเหลืออยู่ในปริมาณที่ยังมากกว่าระดับของ field capacity ส่งผลทำให้พืชเกิดความเครียดขึ้นเนื่องจากดินขาดออกซิเจน และมีระดับของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่สูง โดยปกติในสภาพดินที่มีอากาศถ่ายเทจะมีก๊าซออกซิเจน 20.60% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0.25% และก๊าซไนโตรเจน 79% และพืชจะสามารถดำรงชีพอยู่ได้ในสภาพที่ดินมีปริมาณออกซิเจนอยู่เพียง 0.5% แต่เมื่อเกิดสภาวะน้ำท่วมขังส่งผลให้ดินขาดออกซิเจน เนื่องจากน้ำจะเข้าไปเติมเต็มในช่องว่างของอากาศในดินทำให้ไปกีดกั้นการซึมผ่นของก๊าซออกซิเจนจากบรรยากาศลงสู่ดิน ก๊าซ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ออกซิเจนจะซึมผ่านลงไปในดินที่มีน้ำได้ช้ามาก ก๊าซออกซิเจนสามารถซึมผ่านเข้าไปในชั้นดินได้เพียง 2-3 เซนติเมตรจากผิวดินเท่านั้น ส่งผลทำให้ก๊าซออกซิเจนจากบรรยากาศที่ซึมลงสู่ดินเพื่อทดแทนก๊าซออกซิเจนที่ถูกใช้ไปโดยรากพืชและจุลินทรีย์ในดินได้ยาก (Lincoln, 1991) และในทันทีที่เกิดภาวะน้ำท่วมขังการขาดก๊าซออกซิเจนจะเกิดขึ้นภายใน 2-3 ชั่วโมง และจะเกิดอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูงและระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้น (Nilsen and Orcutt, 1996)

จุลินทรีย์ในดินมีทั้งพวกที่ต้องการออกซิเจนและไม่ต้องการออกซิเจนในการหายใจ และมีจำนวนความแตกต่างกันมากในแต่ละชั้นหน้าตัดดิน เมื่อเกิดสภาวะน้ำท่วมขัง หรือสภาพแวดล้อมอยู่ในสภาพก๊าซออกซิเจนลดน้อยลงมีการเพิ่มขึ้นของการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนของจุลินทรีย์ในดิน โดยเฉพาะแบคทีเรียจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมแบคทีเรียที่มีลักษณะเฉพาะ การเกิดน้ำท่วมขังเป็นระยะเวลาสั้นๆ แบคทีเรียที่ใช้ก๊าซออกซิเจนในการดำรงชีวิตจะใช้ก๊าซออกซิเจนในสารละลายในดิน ส่งผลทำให้ก๊าซออกซิเจนในสารละลายในดินที่ถูกน้ำท่วมขังลดน้อยลงก่อให้เกิดสภาพการขาดก๊าซออกซิเจน หลังจากที่เกิดสภาพขาดออกซิเจนแบคทีเรียที่ใช้ก๊าซออกซิเจน จะไม่สามารถทำงานได้ ส่วนแบคทีเรียที่ไม่ใช้ก๊าซอออกซิเจนในการดำรงชีวิตจะเริ่มทำงาน โดยใช้โมเลกุลชนิดอื่นแทนก๊าซออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในการได้มาซึ่งพลังงาน

พืชเมื่อได้รับสภาพน้ำท่วมขัง จะมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงในทางสรีรวิทยา ซึ่งจะมีผลต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* และการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน โดยจะทำให้การเจริญเติบโตในส่วนต่างๆของถั่วลิสง เช่น ความสูง ฝัก น้ำหนักเมล็ด ลดลงอย่างรวดเร็วนับตั้งแต่ 2 วันแรกที่ได้รับสภาพน้ำท่วมขัง ถึงแม้น้ำจะลดลงไปแต่ก็ไม่ทำให้การเจริญของต้นถั่วกลับมาเหมือนเดิม (ไพศาลและนิมิต, 2532) จากการศึกษาดังกล่าว ลักษณะอ่อนแอของพืชที่ได้รับน้ำท่วมขังจะเป็นช่องทางของการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ได้ดี จากการศึกษาของ Garcia *et al.* (1996) รายงานว่า ในช่วงฤดูฝนจะมีการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* และมีการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาท็อกซินในข้าวโพดก่อนการเก็บเกี่ยวในปริมาณที่ต่ำกว่าในฤดูแล้ง ถึงแม้ในฤดูฝนในบางพื้นที่ของการปลูกข้าว ข้าวสาลี และอ้อย จะพบปริมาณของเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดินมากกว่าในฤดูแล้งก็ตาม เช่น เชื้อ *Aspergillus, Curvulari, Fusarium* และ *Penicillium* ซึ่งมีปริมาณมากกว่าเชื้อ *Rhizopus*, *Trichoderma* และ *Verticillium* (Hossain *et al.*, 1991) นอกจากนี้ Shearer *et al.* (1992) รายงานว่าในพื้นที่เขตหนาวของรัฐไอโอว่า ระหว่างเดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน อากาศที่หนาวเย็นสามารถควบคุมการพัฒนาของ sclerotium ของเชื้อรา *A. flavus* ที่หลงเหลืออยู่ในแปลงได้ เชื้อรา *A. flavus* เป็นเชื้อราที่ต้องการออกซิเจนในการหายใจและลักษณะการแพร่กระจายของเชื้อรา *A. flavus* ในดินจะอยู่หนาแน่นมากจากบริเวณผิวหน้าดินจนถึงระยะความลึกที่ 5 เซนติเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และจะมีความหนาแน่นลดลงเมื่อชั้นดินลึกลงไป (Lee and Chung, 1997) และการจัดสภาพแวดล้อมที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาพแวดล้อมเพิ่มขึ้นจากเดิม 20% เชื้อรายังคงเจริญได้ดี แต่ความสามารถในการสร้างอะฟลาท๊อกซินลดลง 75% ขณะเดียวกันการลดปริมาณออกซิเจน ในสภาพแวดล้อมให้เหลือเพียง 1% พบว่าเชื้อรายังคงเจริญได้ แต่ความสามารถในการสร้างสปอร์และสารพิษลดลง (Menasherov *et al.*, 1992) ดังนั้นเมื่อถั่วลิสงได้รับสภาพน้ำท่วมขังหรือมีก๊าซออกซิเจนในดินลดต่ำลง อาจมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราในดินได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved