

การตรวจสอบเชื้อราที่พบในหญ้าอาหารสัตว์แห้ง และการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อรา

ชนันญา ดอกสี¹, พิสุทธิ์ เขียวมณี¹ และ ชัยณรงค์ รัตนกริฑากุล^{1*}

¹ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

*chainarong.r@ku.th

บทคัดย่อ

หญ้าอาหารสัตว์เป็นแหล่งอาหารที่มีความสำคัญต่อสัตว์เคี้ยวเอื้อง เนื่องจากสัตว์มีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย cellulose ให้กลายเป็นกรดไขมันซึ่งเป็นแหล่งพลังงาน ในขณะที่อาหารขึ้นเป็นการใช้เพื่อเสริมสารอาหาร คุณภาพของหญ้าอาหารสัตว์จึงส่งผลต่อสารอาหารที่สัตว์ได้รับ และการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อรา งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างหญ้าแห้งอัดฟ่อน ชนิด mauritius 2 ตัวอย่าง และ pangola 1 ตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อราด้วยการเจือจางและเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 4 ชนิด ผลพบว่า อาหาร czapek-dox และ rose bengal agar สามารถใช้ตรวจนับปริมาณเชื้อราได้ดีกว่าอาหาร czapek-dox ที่ผสม dicloran และ czapek-dox ที่ผสม malachite green โดยหญ้าแห้งอัดฟ่อนทุกชนิดพบเชื้อรา *Fusarium* spp. $3.0 - 6.0 \times 10^4$ CFU/g หญ้าแห้ง และ *Penicillium* spp. $1.1 - 5.9 \times 10^4$ CFU/g หญ้าแห้ง ยกเว้นตัวอย่างหญ้าแห้งอัดฟ่อนจาก pangola ที่พบ *Penicillium* spp. จำนวนน้อย $0.2 - 0.6 \times 10^4$ CFU/g หญ้าแห้ง ผลการตรวจปริมาณสารพิษจากเชื้อราในตัวอย่างหญ้าฟ่อนแห้งโดยวิธี ELISA พบการปนเปื้อนของสารพิษ deoxynivalenol, T-2/HT-2 toxin และ fumonisin ไม่เกินค่าที่กำหนดตามมาตรฐานยุโรป แต่พบสารพิษ zearalenone ในหญ้าฟ่อนแห้งจาก pangola ในปริมาณ 517 ppb (ค่าที่กำหนดไว้ไม่เกิน 500 ppb) ทั้งนี้สารพิษที่พบมีรายงานเชื้อรา *Fusarium* spp. มากที่สุดจากข้อมูลเบื้องต้นทำให้ทราบถึงโอกาสการพบสารพิษจากเชื้อราที่จะมีการสะสมในหญ้าฟ่อนแห้งที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ และเกษตรกรควรคำนึงถึงวิธีเก็บรักษา หรือวิธีการควบคุมสารพิษในกรณีที่มีการเก็บรักษาหญ้าฟ่อนแห้งที่ใช้เป็นอาหารสัตว์

คำสำคัญ: หญ้าอาหารสัตว์ สารพิษจากเชื้อรา *Fusarium* sp. zearalenone

Detection of Fungal Occurrence and Mycotoxin Contamination in Grasses Hay

Chanunya Doksri¹, Pisut Keawmanee¹ and Chainarong Rattanakreetakul^{1*}

¹Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen,
Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

*chainarong.r@ku.th

Abstract

Forage grasses are a vital nutritional source for ruminants. Roughage is the primary energy source for ruminants. However, stored forage is frequently susceptible to fungal contamination. Such contamination usually occurs in two main ways: either through direct fungal growth on the forage or via the transfer of mycotoxins from contaminated feed consumed by ruminants. This study investigated fungal contamination and mycotoxin levels in three grass hay samples: two from mauritius grass and one pangola grass. Fungal isolation was performed using the dilution plate method on four different types of culture media. The results indicated that czapek-dox agar and rose bengal agar were more effective for fungal enumeration compared to czapek-dox agar supplemented with dicloran or malachite green. *Fusarium* spp. was detected in all forage grass hay at concentrations ranging from $3.0 - 6.0 \times 10^4$ CFU/g, while *Penicillium* spp. was found at $1.1 - 5.9 \times 10^4$ CFU/g, except the pangola grass hay sample showing the lowest *Penicillium* spp. count $0.2 - 0.6 \times 10^4$ CFU/g. Mycotoxin analysis using the ELISA method revealed that concentrations of deoxynivalenol, T-2/HT-2 toxins, and fumonisin were within the European Union regulatory limits. However, the zearalenone level in the pangola grass hay sample was found to be 517 ppb., exceeding the 500 ppb. safety threshold. These toxins are predominantly reported to originate from *Fusarium* spp. This study highlights the potential for mycotoxin accumulation in forage and emphasizes the importance for farmers to implement proper storage practices and mycotoxin control measures to ensure animal safety.

Keywords: forage, ruminants, *Fusarium* spp., zearalenone

1. บทนำ

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้องมีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง ทำให้ความต้องการหญ้าอาหารสัตว์มีมากขึ้น แต่ปัญหาหลักของผู้เลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้องคือขาดแคลนหญ้าสดในฤดูแล้ง การแก้ปัญหาด้วยการเก็บรักษาในรูปของหญ้าแห้งอัดฟ่อนเพื่อจะได้ไม่ขาดแคลนอาหารสัตว์ตลอดทั้งปี [1] หญ้ามอริเชียส (Mauritius grass; *Pennisetum clandestinum*) และ หญ้าแพงโกลา (Pangola grass; *Digitaria eriantha* Steud.) จัดเป็นพืชอาหารสัตว์ที่ได้รับความนิยมสูงในประเทศไทย โดยหญ้า mauritius โดดเด่นในด้านความทนทานต่อสภาพแวดล้อม [2] ในขณะที่หญ้า pangola เป็นหญ้าที่มีคุณภาพทางโภชนาการสูงเป็นที่ต้องการของตลาด [3] ในกระบวนการเก็บหญ้าแห้งอัดฟ่อนสภาพภูมิอากาศและความชื้น

เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อรา ซึ่งส่งผลเสียต่อคุณภาพของอาหารสัตว์ [4] โดยเฉพาะเชื้อรากลุ่ม *Fusarium* spp. และ *Penicillium* spp. ที่มักปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารสัตว์และสามารถสร้างสารพิษจากเชื้อราซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพของสัตว์และตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์เคี้ยวเอื้องอาทิ นม ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพของผู้บริโภคได้ [5]

การตรวจสอบสารพิษเป็นกระบวนการสำคัญในการควบคุมคุณภาพหญ้าแห้งเพื่อความปลอดภัยของระบบการผลิตปศุสัตว์ วิธีการตรวจสอบสารพิษโดย ELISA เป็นวิธีการที่ยอมรับ ซึ่งสามารถระบุชนิดสารพิษได้เฉพาะเจาะจงและแม่นยำ [6] การพบเชื้อราอาจไม่เพียงพอต่อการระบุความปลอดภัยของหญ้าอาหารสัตว์ เนื่องจากเชื้อราบางชนิดอาจมีการสร้างสารพิษ จึงจำเป็นต้องมีการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราด้วย อย่างไรก็ตาม การแยกและการตรวจสอบเชื้อราบนอาหารยังเป็นวิธีที่สะดวก แต่กระบวนการดังกล่าวยังมีความจำเป็นที่ต้องอาศัยข้อมูลในการติดตามชนิดของเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อ ก่อนที่จะระบุความเสี่ยงในการเกิดโรคหรือการพบเชื้อในผลผลิตหญ้าแห้ง

การวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการตรวจหาโอกาสของเชื้อราที่ปนเปื้อนในหญ้าอาหารสัตว์แห้งเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับเตรียมการวางแผนการป้องกันและการควบคุมเชื้อราได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ เพื่อให้ได้อาหารสัตว์ที่มีคุณภาพและมีวิธีที่เหมาะสมต่อการติดตามของคุณภาพอาหารของสัตว์เลี้ยงข้ามฤดูไม่ให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพของสัตว์เลี้ยง

2. วิธีการทดลอง

2.1 ศักยภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะเพื่อการตรวจสอบปริมาณเชื้อราในหญ้าแห้งอัดฟ่อน

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างหญ้าแห้งอัดฟ่อน (mauritus 2 ตัวอย่าง และ pangola 1 ตัวอย่างจากโรงเก็บหญ้าที่ผ่านการตากแห้งจากโรงเก็บหญ้าแห้งอัดฟ่อน) ที่ผ่านการเก็บเกี่ยวและตากแห้งในช่วงเดือน มกราคม พ.ศ. 2569 ทำการเก็บตัวอย่างในเดือน มีนาคม พ.ศ. 2569 นำหญ้าแห้งมาหั่นและบดด้วยเครื่องบดให้มีขนาด 0-2 มิลลิเมตร ก่อนทำการแยกเชื้อราด้วยการเจือจางโดยการนำหญ้าอาหารสัตว์ที่บด 10 กรัม แล้วมาผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 90 ml จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่อง rotary shaker เป็นเวลา 3 ชั่วโมงก่อนนำมาเจือจางที่ 10^{-3} และ 10^{-5} และเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ czapek-dox agar, rose bengal agar, czapek-dox agar + dicloran (500 ppm.) [7] และ czapek-dox agar + malachite green (1250 ppm.) [8] และทำการบ่มเป็นเวลา 7 วัน ในสภาพอุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนด ทำการนับปริมาณเชื้อรา

2.2 การตรวจสอบปริมาณสารพิษที่เกิดจากเชื้อราในหญ้าฟ่อนแห้ง

ทำการตรวจสอบสารพิษ โดยใช้วิธี ELISA จากชุดตรวจของ Romer Labs Diagnostic GmbH อาศัยหลักการ immunoassay ในการตรวจจับสารพิษโดยใช้แอนติบอดีจำเพาะต่อสารพิษแต่ละชนิด นำตัวอย่างหญ้าแห้งอัดฟ่อนที่บดแล้ว ปริมาณ 20 กรัม ใส่ลงในภาชนะที่ใช้สำหรับสกัด โดยใช้ตัวทำละลายตามคำแนะนำของบริษัท ทำการเขย่าเป็นเวลา 3 นาที เพื่อสกัดสารพิษจากเชื้อราออกจากตัวอย่างเข้าสู่สารละลาย ทำการกรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกกากตัวอย่างออก เก็บส่วนใสของสารละลายไว้สำหรับทำการวิเคราะห์ ในกรณีที่ความเข้มข้นของสารสกัดสูงเกินช่วงการวัดของชุดตรวจ จะทำการเจือจางด้วยสารละลาย buffer ตามคำแนะนำของผู้ผลิตชุดตรวจ [9]

การตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราในหญ้าแห้งอัดฟ่อนด้วยชุดตรวจ AgraQuant® เริ่มด้วยการเติมสารมาตรฐานหรือสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมของไมโครเพลตที่เคลือบแอนติบอดีจำเพาะต่อสารพิษ จากนั้นเติม enzyme conjugate ลงในแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วย washing buffer จำนวน 3 ครั้ง เพื่อกำจัดสารที่ไม่เกิดปฏิกิริยา เติม substrate ลงในแต่ละหลุมและปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที จะเกิดสีในหลุมทดสอบ จากนั้นเติม stop solution เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader ผลการวิเคราะห์ นำมาสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อใช้สำหรับคำนวณหาปริมาณสารพิษในตัวอย่าง โดยรายงานผลเป็นหน่วย part per billion (ppb.) หรือ part per million (ppm.)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 ผลการตรวจสอบปริมาณเชื้อราในหญ้าแห้งอัดฟ่อน

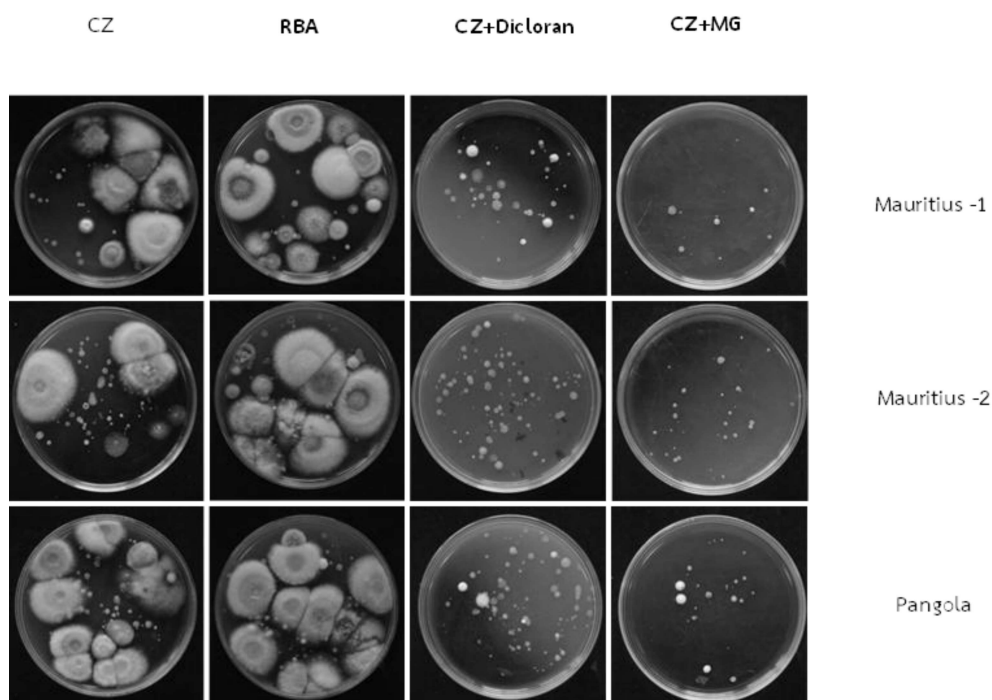
การตรวจสอบเชื้อราปนเปื้อนในหญ้าอาหารสัตว์ครั้งนี้ ได้ทำการตรวจสอบกับตัวอย่างหญ้าแห้งอัดฟ่อน โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อในการติดตามเชื้อรา *Fusarium* spp. ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป คือ czapek-dox agar และ rose bengal agar medium และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการผสมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ได้แก่ dichloran และ malachite green โดยสาร dichloran มีคุณสมบัติในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อราหลายชนิด และถูกนำมาใช้ทดแทน PCNB (Pentachloronitrobenzene) ขณะที่ malachite green สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิดและใช้เป็นสารคัดเลือกรากเชื้อราได้ดี ผลการแยกเชื้อราจากตัวอย่างหญ้าแห้งอัดฟ่อนแสดงดังภาพที่ 1 พบโคโลนีเชื้อราลักษณะฟูคล้ายปุยฝ้ายอัดแน่นปานกลาง มีสีขาวอมส้มหรือสีชมพู บนอาหาร czapek-dox agar และ rose bengal agar medium ซึ่งมีลักษณะสอดคล้องกับเชื้อรา *Fusarium* spp. นอกจากนี้ยังตรวจพบเชื้อรา *Penicillium* spp. และเชื้อราในกลุ่มที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ (Unknown) ในหลายตัวอย่าง ขณะที่อาหาร czapek-dox agar ผสม dichloran และ czapek-dox agar ผสม malachite green พบการเจริญของโคโลนีเชื้อราลดลงอย่างชัดเจน (ภาพที่ 1 และตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของสารทั้งสองชนิดที่สามารถจำกัดการแพร่กระจายของเส้นใยเชื้อราและยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เจริญรวดเร็วได้ [10,11] ทั้งนี้อาหารผสม dichloran หรือ malachite green เป็นอาหารที่ใช้ตรวจสอบ *Fusarium* spp. ในดินหรือใช้เพื่อการจำแนกเชื้อรา แต่เมื่อได้มาทดสอบการแยกเชื้อราจากตัวอย่างหญ้าแห้งอัดฟ่อนจะพบลักษณะโคโลนีที่ถูกจำกัดและโคโลนีไม่ขยาย ซึ่งอาจเป็นผลจากความเข้มข้นของสารที่สูงเกินไปกับตัวอย่างหญ้าแห้งอัดฟ่อน อย่างไรก็ตามการใช้ czapek-dox agar หรือ rose bengal agar medium สามารถจำแนกได้จากตัวอย่างได้ดี

เชื้อราที่ตรวจพบส่วนใหญ่เป็นเชื้อราในสกุล *Fusarium* sp. และ *Penicillium* sp. ขณะที่ไม่พบเชื้อราในสกุล *Aspergillus* sp. นอกจากนี้ยังพบเชื้อราในกลุ่มที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ (Unknown) ในทุกตัวอย่างหญ้าแห้งอัดฟ่อนที่ทำการศึกษา โดยหญ้า mauritius-1 เป็นตัวอย่างที่พบปริมาณเชื้อรารวมสูงที่สุด โดยเฉพาะเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ rose bengal agar ซึ่งพบเชื้อรารวมเท่ากับ 15.6×10^4 CFU/g และพบ *Fusarium* sp. สูงที่สุดที่ 6.1×10^4 CFU/g รองลงมาคือ *Penicillium* sp. เท่ากับ 5.9×10^4 CFU/g แสดงให้เห็นว่า rose bengal agar มีประสิทธิภาพในการแยกเชื้อราจากตัวอย่างหญ้าแห้งอัดฟ่อนได้ดี เนื่องจากมีสารสีที่มีคุณสมบัติช่วยยับยั้งการแพร่กระจายของโคโลนีเชื้อรา ทำให้สามารถนับจำนวนเชื้อราได้ชัดเจนมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ระบุว่า rose bengal agar เหมาะสำหรับการตรวจนับเชื้อราในตัวอย่างอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร [4] เมื่อเปรียบเทียบกับ czapek-dox agar พบว่ามีปริมาณเชื้อรารวมรองลงมา โดยตรวจพบเชื้อราในกลุ่ม Unknown สูงที่สุดที่ 4.5×10^4 CFU/g รวมทั้งพบ *Fusarium* sp. และ *Penicillium* sp. ในปริมาณใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เนื่องจาก czapek-dox agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราหลายชนิด จึงทำให้พบเชื้อราหลากหลายกลุ่มเจริญมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การจำแนกเชื้อราโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจมีข้อจำกัด ทำให้เชื้อราบางชนิดไม่สามารถจำแนกได้ชัดเจนและถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Unknown ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม dichloran และ malachite Green พบปริมาณเชื้อรารวมต่ำกว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปอย่างชัดเจน โดยเฉพาะ czapek-dox agar ผสม dichloran ที่พบเชื้อรารวมเพียง 3.8×10^4 CFU/g ในตัวอย่างจากหญ้า mauritius-1 และต่ำกว่า 1.5×10^4 CFU/g ในตัวอย่างอื่น ๆ สอดคล้องกับคุณสมบัติของ dichloran ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เจริญรวดเร็วและจำกัดการกระจายตัวของโคโลนีเชื้อรา ทำให้จำนวนโคโลนีรวมที่ตรวจพบลดลง ส่วน malachite green มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด จึงอาจส่งผลให้เชื้อราบางชนิดไม่สามารถเจริญได้ดิบอาหารดังกล่าว

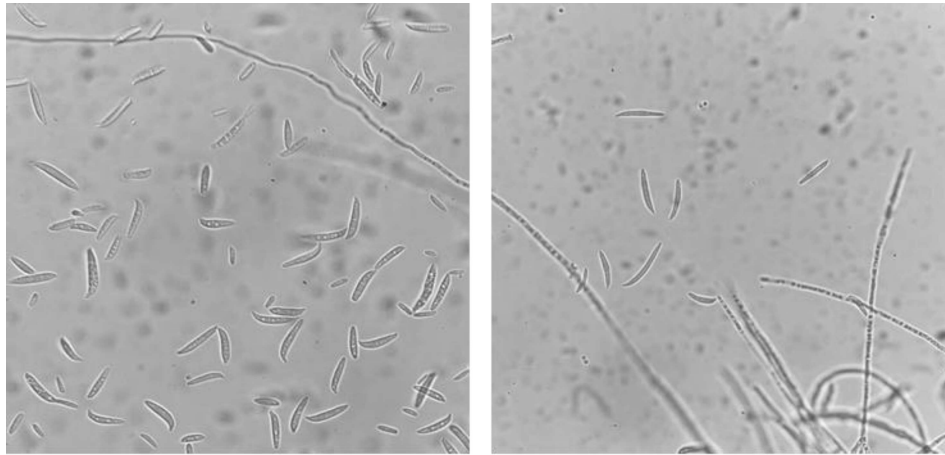
สำหรับตัวอย่างหญ้าแห้งอัดฟ่อน mauritius-2 พบปริมาณเชื้อรารวมต่ำกว่าหญ้า mauritius-1 เล็กน้อย โดย rose bengal agar และ czapek-dox agar พบเชื้อรารวมเท่ากันที่ 9.7×10^4 CFU/g แต่ rose bengal agar ตรวจพบ *Fusarium* sp. สูงกว่า นอกจากนี้ ความแตกต่างของชนิดหญ้าอาจเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจพบเชื้อรา และการสะสมสารพิษจากเชื้อรา ซึ่งหญ้า pangola เป็นหญ้าที่มีปริมาณโปรตีนมากกว่าหญ้า mauritius เล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบว่า

สะสมของสารพิษอาจเกิดจากความแตกต่างของสภาพแวดล้อมในการเก็บรักษา เช่น ความชื้น อุณหภูมิ และการระบายอากาศ และมีลักษณะใบละเอียดยิ่งขึ้นถึงความชื้นสะสมได้ง่าย หากการตากหรือการเก็บรักษาไม่เหมาะสม อาจเอื้อต่อการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษจากเชื้อราได้ [12]

ในขณะที่เหี่ยว *mauritius* มีลำต้นหยากกว่าและมีเส้นใยสูงกว่า จึงอาจมีการระบายอากาศในกองเหี่ยวได้ดีกว่าในบางสภาวะ อย่างไรก็ตาม ปัจจัยด้านความชื้น อุณหภูมิ และการระบายอากาศในการเก็บรักษายังคงเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* spp. และการสร้างสารพิษจากเชื้อรา [4] สำหรับตัวอย่างเหี่ยวแห้งอัดฟ่อน pangola พบปริมาณเชื้อรารวมต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับอีกสองชนิด อาจสะท้อนถึงชนิดของเหี่ยวแห้งอาจเป็นปัจจัยต่อการตรวจพบเชื้อรา อย่างไรก็ตามยังคงพบเชื้อราในสกุล *Fusarium* sp. และเชื้อรากลุ่ม Unknown อยู่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแม้จะมีปริมาณเชื้อราต่ำแต่ยังคงมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อราที่อาจสร้างสารพิษได้ การพบเชื้อราในสกุล *Fusarium* sp. ในทุกตัวอย่างมีความสำคัญ เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้สามารถสร้างสารพิษหลายชนิด เช่น ไดออกซีนิวาไลน์, ซีราลีโนน และฟูโมนิซิน ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ เช่น การลดประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ และการกดภูมิคุ้มกัน Placinta et al. [13] รายงานว่า *Fusarium* spp. เป็นเชื้อราที่พบได้บ่อยในอาหารสัตว์และสามารถสร้างสารพิษหลายชนิดร่วมกันในตัวอย่างเดียว ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการตรวจแยกเชื้อราแตกต่างกัน โดย rose bengal agar มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจนับเชื้อรารวม ขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม dicloran และ malachite green มีคุณสมบัติในการคัดเลือกเชื้อราบางชนิด นอกจากนี้สภาพการเก็บรักษาเหี่ยวแห้งอัดฟ่อนยังเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการปนเปื้อนเชื้อราและความเสี่ยงต่อการเกิดสารพิษจากเชื้อราในอาหารสัตว์ จึงควรมีการควบคุมความชื้นและระบบการเก็บรักษาอย่างเหมาะสม เพื่อลดความเสี่ยงต่อสุขภาพสัตว์และผลกระทบทางเศรษฐกิจในระบบการผลิตปศุสัตว์ต่อไป



ภาพที่ 1 ปริมาณเชื้อราที่พบในเหี่ยวแห้งอัดฟ่อนภายหลังการเจือจางที่ 10^{-3} บนอาหารทดสอบชนิดต่าง ๆ ที่อายุ 5 วัน
 CZ = czapek-dox agar, RBA = rose bengal agar, CZ+Dicloran = czapek-dox agar + dicloran (500 ppm.),
 CZ+MG = czapek-dox agar + malachite green (1250 ppm.)



ภาพที่ 2 ภาพลักษณะโคนิเดียของเชื้อรา *Fusarium* spp.

ตารางที่ 1 ปริมาณเชื้อราชนิดต่างๆ ที่พบในตัวอย่างหญ้าแห้งอัดฟ่อน ($\times 10^4$ CFU/g ตัวอย่าง) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ

ตัวอย่างหญ้าแห้ง	อาหาร	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	Unknow
Mauritius -1	cz	3.1	3.6	4.5
	rose bengal agar	6.1	5.9	3.6
	cz+ dicloran	3.4	0.0	0.4
	cz+ malachite green	0.0	1.1	0.9
Mauritius -2	cz	3.4	2.4	3.8
	rose bengal agar	4.7	1.1	3.8
	cz+ dicloran	0.6	0.0	0.2
	cz+ malachite green	0.0	0.9	0.4
Pangola	cz	3.1	0.2	2.9
	rose bengal agar	2.7	0.6	0.9
	cz+ dicloran	0.0	0.0	1.1
	cz+ malachite green	0.0	0.4	1.1

3.2 ผลการตรวจสอบปริมาณสารพิษที่สะสมในหญ้าแห้งอัดฟ่อน

จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากเชื้อราในหญ้าแห้งอัดฟ่อน 3 ชนิด ผลดังแสดงในตารางที่ 2 พบการปนเปื้อนของสารพิษคือออกซินิवालีนอล, ที-2 ทอกซิน และซีราลีโนนในทุกตัวอย่าง ขณะที่ไม่พบการปนเปื้อนของฟูโมนิซิน โดยมีค่าต่ำกว่าขีดจำกัดการตรวจวัด ($<LOD$ 0.20 ppm.) อาหารหยาบจากที่เก็บหญ้าแห้งอัดฟ่อน pangola เป็นตัวอย่างที่พบปริมาณสารพิษสูงที่สุดในทุกชนิดที่ตรวจพบ โดยมีค่าคือออกซินิवालีนอล เท่ากับ 0.67 ppm ที-2 ทอกซินเท่ากับ 140.5 ppb. และ ซีราลีโนน เท่ากับ 517.535 ppb. รองลงมาคืออาหารหยาบจากที่เก็บหญ้าแห้งอัดฟ่อน mauritius -1 ซึ่งพบคือออกซินิवालีนอล เท่ากับ 0.465 ppm. ที-2 ทอกซินเท่ากับ 114 ppb. และซีราลีโนนเท่ากับ 363.2 ppb. ส่วนอาหารหยาบจากที่เก็บหญ้าแห้งอัดฟ่อน mauritius -2 พบการปนเปื้อนต่ำที่สุด โดยมีคือออกซินิवालีนอลเท่ากับ 0.36 ppm.

ที-2 ทอกซินเท่ากับ 82 ppb. และซีราลีโนนเท่ากับ 296.32 ppb. เมื่อเปรียบเทียบกับมาตรฐานอาหารสัตว์ของสหภาพยุโรป พบว่าปริมาณคือออกซินิवालีนอล และ ที-2 ทอกซินในทุกตัวอย่างยังอยู่ต่ำกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนด อย่างไรก็ตาม

ตาม ซีราลีโนนในตัวอย่างจากที่เก็บหญ้าแห้งอัดฟ่อน pangola มีค่าเกินมาตรฐานสำหรับโค แกะ และแพะที่กำหนดไว้ไม่เกิน 500 ppb. จาก [13] เล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าหญ้าแห้งอัดฟ่อนดังกล่าวอาจมีความเสี่ยงต่อการส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ โดยเฉพาะ ซีราลีโนน ซึ่งเป็นสารพิษที่มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน สามารถก่อให้เกิดความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ในสัตว์ได้ ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการตรวจพบเชื้อราในสกุล *Fusarium* sp. จากการศึกษาในตารางก่อนหน้า เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้เป็นแหล่งสำคัญในการสร้างสารพิษกลุ่มไตรโคทีซีน ได้แก่ ไดออกซินิวาลีนอล และ ที-2 ทอกซิน รวมทั้ง ซีราลีโนน โดย Placinta et al.[14] รายงานว่า *Fusarium* spp. เป็นเชื้อราที่พบได้บ่อยในพืชอาหารสัตว์และสามารถสร้างสารพิษหลายชนิดร่วมกันในตัวอย่างเดียว จากการศึกษาครั้งนี้ที่ตรวจพบสารพิษมากกว่า 1 ชนิดในทุกตัวอย่างหญ้า แม้ว่าจะไม่ได้มีปริมาณเชื้อราวมสูงที่สุดจากการตรวจนับเชื้อรา แต่กลับพบปริมาณสารพิษสูงที่สุด แสดงให้เห็นว่าปริมาณเชื้อราไม่ได้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับสารพิษเสมอไป ทั้งนี้การสร้างสารพิษจากเชื้อราขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความชื้น อุณหภูมิ ระยะเวลาในการเก็บรักษา ซึ่งอาจกระตุ้นให้เชื้อราสร้างสารพิษได้มากขึ้นแม้มีจำนวนโคโลนีไม่สูงมาก โดย Magan et al. [15] อธิบายว่าปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมมีผลสำคัญต่อการสร้างสารพิษของเชื้อราในวัตถุดิบอาหารสัตว์

การที่ไม่พบฟูโมนิซินในทุกตัวอย่าง (<LOD 0.20 ppm.) อาจเกิดจากเชื้อรา *Fusarium* ที่พบไม่ใช่สายพันธุ์ที่สร้างฟูโมนิซิน หรือสภาพแวดล้อมของหญ้าแห้งอัดฟ่อนไม่เหมาะสมต่อการสร้างสารพิษชนิดนี้ เนื่องจากฟูโมนิซินมักพบในข้าวโพดและธัญพืชมากกว่าหญ้าอาหารสัตว์ อีกทั้งการสร้างสารพิษชนิดนี้ต้องอาศัยสภาพอุณหภูมิและความชื้นเฉพาะเมื่อพิจารณาเกณฑ์ความปลอดภัยสำหรับม้าตามรายงานของ Mobashar. [16] พบว่าปริมาณสารพิษในทุกตัวอย่างยังอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ แต่หากเปรียบเทียบกับเกณฑ์ Maximum mycotoxin exposure limits for equine feed (ระดับการได้รับสารพิษจากเชื้อราสูงสุดที่ยอมรับได้ในอาหารสำหรับม้า) ของ Dr. Kyle Newman พบว่าหลายตัวอย่างมีค่า ไดออกซินิวาลีนอล, ที-2 ทอกซิน และซีราลีโนนสูงกว่าระดับที่แนะนำ โดยเฉพาะ ที-2 ทอกซิน และซีราลีโนน ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกัน ระบบทางเดินอาหาร และระบบสืบพันธุ์ของม้าได้ เนื่องจากม้าเป็นสัตว์ที่มีความไวต่อสารพิษจากเชื้อราค่อนข้างสูง [17] ดังนั้นผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าหญ้าแห้งอัดฟ่อนที่ใช้เป็นอาหารสัตว์มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อรา แม้ว่าปริมาณส่วนใหญ่จะยังไม่เกินมาตรฐานสากล แต่การพบสารพิษหลายชนิดร่วมกันอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อสุขภาพสัตว์ได้ จึงควรให้ความสำคัญกับกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาหญ้าแห้งอัดฟ่อน โดยเฉพาะการควบคุมความชื้นและการระบายอากาศภายในโรงเก็บ รวมถึงควรมีการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราอย่างสม่ำเสมอ เพื่อลดผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์และประสิทธิภาพการผลิตในระบบปศุสัตว์ต่อไป

4. สรุปผล

จากการศึกษาการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในตัวอย่างหญ้าแห้งอัดฟ่อน พบว่าเชื้อราที่ตรวจพบส่วนใหญ่เป็นเชื้อราในสกุล *Fusarium* sp. และ *Penicillium* sp. โดยไม่พบ *Aspergillus* sp. ในทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษา ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อ rose bengal agar สามารถตรวจพบปริมาณเชื้อราวมได้สูงที่สุด โดยเฉพาะในตัวอย่างหญ้าแห้งอัดฟ่อน mauritius-1 ซึ่งพบเชื้อราวมสูงที่สุด แสดงให้เห็นว่า rose bengal agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดมีประสิทธิภาพในการตรวจนับและแยกเชื้อราได้ดี ขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม dicloran และ malachite- green พบปริมาณเชื้อราน้อยกว่า เนื่องจากมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิด ผลการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา พบการปนเปื้อนของไดออกซินิวาลีนอล, ที-2 ทอกซิน และซีราลีโนนในทุกตัวอย่าง ขณะที่ไม่พบฟูโมนิซิน สำหรับตัวอย่างหญ้าแห้งอัดฟ่อน pangola พบปริมาณสารพิษสูงที่สุด แม้ว่าจะไม่ได้มีปริมาณเชื้อราวมสูงที่สุดก็ตาม แสดงให้เห็นว่าปริมาณเชื้อราไม่ได้สัมพันธ์โดยตรงกับระดับสารพิษเสมอไป เนื่องจากการสร้างสารพิษขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความชื้น อุณหภูมิ และสภาพแวดล้อมในการเก็บรักษา เมื่อเปรียบเทียบกับมาตรฐานอาหารสัตว์ พบว่าปริมาณสารพิษส่วนใหญ่ยังอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของสหภาพยุโรปอย่างไรก็ตาม ซีราลีโนนในตัวอย่างหญ้าแห้งอัดฟ่อน pangola มีค่าสูงเกินเกณฑ์สำหรับโค แกะ และแพะเล็กน้อย และเมื่อพิจารณา



ตามเกณฑ์ความปลอดภัยสำหรับม้า พบว่าทั้ง 3 ตัวอย่างมีค่ามากกว่าระดับที่แนะนำ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ โดยเฉพาะระบบสืบพันธุ์ ระบบภูมิคุ้มกัน และประสิทธิภาพการเจริญเติบโต

ตารางที่ 2 ปริมาณสารพิษจากเชื้อราที่ตรวจพบในหญ้าแห้งอัดฟ่อน

ลำดับ	แหล่งที่มา	ดีออกซินิวาลีนอล (0.25-5.0 ppm)	ที-2 ทอกซิน (24-500 ppb)	ซีราลีโนน (25-1000 ppb)	ฟูโมนิซิน (0.25-5.0 ppm)
1	Mauritius -1	0.465	114	363.2	<LOD (0.20 ppm.)
2	Mauritius -2	0.36	82	296.32	<LOD (0.20 ppm.)
3	Pangola	0.67	140.5	517.535	<LOD (0.20 ppm.)
มาตรฐานอาหารสัตว์ยุโรป (European Commission, 2006.)		5 ppm. (ยกเว้น หนู วัว แพะ)	250 ppb. (ทุกชนิด)	500 ppb. (โค แกะ แพะ)	5 ppm. (ม้า)
Tolerance levels of mycotoxins in horse feed according to different studies (Mobashar, 2023).		2 ppm.	1000 ppb.	1000 ppb.	5 ppm.
Maximum mycotoxin exposure limits for equine mycotoxins according to Dr. Kyle Newman.		0.4 ppm.	50 ppb.	100 ppb.	2 ppm.

5. เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] Food Animal Division. (2022). *Production and preservation of hay for ruminants*. Bureau of Animal Nutrition Development, Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and Cooperatives. (In Thai)
- [2] Tadsri, S. (2004). *Tropical forage crops* (534 pp.). Kasetsart University Press. ISBN 974-537-437-7. (In Thai)
- [3] Somwong, U. (2007). *Pangola grass and its utilization in ruminants*. Bureau of Animal Nutrition Development, Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and Cooperatives. (In Thai)
- [4] Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (3rd ed.). <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- [5] Department of Plant Pathology Faculty Members. (2009). *Plant diseases and mycotoxins*. Faculty of Agriculture, Kasetsart University. (In Thai)
- [6] Promma, S. (2017). *Feed technology*. Faculty of Agricultural Technology, Chiang Mai Rajabhat University.
- [7] Abildgren, M. P., Lund, F., Thrane, U., & Elmholt, S. (1987). Czapek-Dox agar containing iprodione and dicloran as a selective medium for the isolation of *Fusarium* species. *Letters in Applied Microbiology*, 5(4), 83–86. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1987.tb01620.x>



- [8] Castellá, G., Bragulat, M. R., Rubiales, M. V., & Cabañes, F. J. (1997). Malachite green agar, a new selective medium for *Fusarium* spp. *Mycopathologia*, 137(3), 173–178. <https://doi.org/10.1023/A:1006886529511>
- [9] Romer Labs. (2024). *Mycotoxin testing: Diagnostic solutions for mycotoxin detection*. Retrieved from <https://www.romerlabs.com>
- [10] Andrews, S., & Pitt, J. I. (1986). Selective medium for isolation of *Fusarium* species and dematiaceous hyphomycetes from cereals. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(6), 1235–1238. <https://doi.org/10.1128/aem.51.6.1235-1238.1986>
- [11] Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9780470278376>
- [12] Tikam, K., Phatsara, C., Mikled, C., Vearasilp, T., Phunphiphat, W., Chobtang, J., Cherdthong, A., & Südekum, K.-H. (2013). Pangola grass as forage for ruminant animals: A review. *SpringerPlus*, 2, 604. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-604>
- [13] European Commission. (2006). *Commission Recommendation 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 toxin and fumonisins in products intended for animal feeding. Official Journal of the European Union*, L229, 7–9.
- [14] Placinta, C. M., D’Mello, J. P. F., & Macdonald, A. M. C. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78(1–2), 21–37.
- [15] Magan, N., Medina, A., & Aldred, D. (2011). Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathology*, 60(1), 150–163.
- [16] Mobashar, M. (2023). Mycotoxins incidence in animal feeds, their prevention and control measures. In R. Z. Abbas, N. M. Saeed, M. Younus, L. Aguilar-Marcelino, & A. Khan (Eds.), *One Health Triad* (Vol. 2, pp. 242–250).
- [17] Newman, K. (2003). *Review of mycotoxins as a possible cause of mare reproductive loss syndrome (MRLS)*. In *Proceedings of the First Workshop on Mare Reproductive Loss Syndrome*. University of Kentucky.