รายงานโครงการวิจัย

การลดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์

Reduction of Fungal and Mycotoxins Contamination in Agricultural Produces and Products

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

ศุภรา อัคคะสาระกุล

Suppara Aukkasarakul

กรมวิชาการเกษตร

ปี พ.ศ. 2563

รายงานโครงการวิจัย

การลดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์

Reduction of Fungal and Mycotoxins Contamination in Agricultural Produces and Products

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

ศุภรา อัคคะสาระกุล

Suppara Aukkasarakul

กรมวิชาการเกษตร

ปี พ.ศ. 2563

คำปรารภ

การปนเปื้อนเชื้อราในผลิตผลเกษตรนอกจากจะทำให้ผลิตผลเกษตรเน่าเสีย เสื่อมคุณภาพและเกิดความเสียหายแล้ว เชื้อราบางชนิดยังสามารถสร้างสารพิษในผลิตผลเกษตรที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ซึ่งกลุ่มเชื้อราที่สามารถสร้างสารพิษดังกล่าวมักพบการปนเปื้อนในผลิตผลเกษตรตั้งแต่ในแปลงช่วงการเก็บเกี่ยวไปจนถึงขั้นตอนการเก็บรักษา โดยเชื้อรากลุ่มสำคัญที่พบปนเปื้อนมากทั้งในแปลงปลูกและโรงเก็บ คือ เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* เนื่องจากเป็นเชื้อราที่สามารถเจริญและสร้างสารพิษ เช่น สารแอฟลาทอกซิน และ สารโอคราทอกซิน ได้ดีในสภาพอากาศร้อนชื้น ซึ่งสารพิษดังกล่าวจัดเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ ทั้งกลุ่มที่ 1 (สารที่ยืนยันแล้วว่าก่อมะเร็งในมนุษย์) กลุ่ม 2A (น่าจะเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์) และกลุ่ม 2B (อาจจะก่อมะเร็งในมนุษย์) การจัดการเพื่อลดการปนเปื้อนทั้งเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรดังกล่าว จะต้องดูแลควบคุมตั้งแต่ในแปลงปลูกระยะก่อนการเก็บเกี่ยวไปจนถึงขั้นตอนการเก็บรักษา ดังนั้นโครงการศึกษาวิจัยนี้จึงครอบคลุมตั้งแต่ขั้นตอนการลดการปนเปื้อนเชื้อราที่สร้างสารพิษตั้งแต่ในแปลงปลูก (เช่น ถั่วลิสง) การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ (เช่น แบคทีเรียที่ใช้ในการหมักอาหาร) และสารสกัดจากพืชที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษในพริกและพริกแห้ง การพัฒนาชีวภัณฑ์และบรรจุภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบจากเชื้อจุลินทรีย์และสารสกัดจากพืชที่สามารถป้องกันการเกิดสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรได้อย่างปลอดภัย รวมทั้งการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราแบบรวดเร็วสำหรับตรวจประเมินการปนเปื้อนสารพิษในผลิตผลเกษตรเบื้องต้น การศึกษาวิจัยทั้งหมดที่กล่าวมานี้เพื่อมุ่งหวังให้เกิดการควบคุมและป้องกันการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรอย่างครอบคลุม โดยเน้นวิธีการที่ปลอดภัยต่อผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์เพื่อยกระดับคุณภาพผลิตผลเกษตรให้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

กรมวิชาการเกษตร

นางสาวศุภรา อัคคะสาระกุล
หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
ผู้วิจัย	1
บทนำ	2
บทคัดย่อ	4
1. กิจกรรม วิธีการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษ ในพื้นที่เพาะปลูกถั่วลิสง	10
2. กิจกรรม การใช้ประโยชน์จากเชื้อราและแบคทีเรียในการยับยั้ง การเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษ	28
3. กิจกรรม การใช้ประโยชน์จากสารสกัดพืชในการยับยั้งการเจริญ ของเชื้อราและการสร้างสารพิษ	45
4. กิจกรรม พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา	67
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	88
บรรณานุกรม	92

กรมวิชาการเกษตร

โครงการการลดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์

Reduction of fungal and mycotoxins contamination in agricultural produces and products

ผู้วิจัย

ศุภรา อัคคะสาระกุล

Suppara Aukkasarakul

เนตรา สมบูรณ์แก้ว

Nettra Somboonkaew

ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์

Chawalert Trikarunasawat

อัจฉราพร ศรีจุดานุ

Atcharaporn Srijudanu

สุพี วนศิรากุล

Su-phi Wanasirakul

ศรุตา สิทธิไชยากุล

Saruta Sittichaiyakul

รัตตา สุทธยาคม

Ratta Suttayakom

กนกศักดิ์ ลอยเลิศ

Kanoksak Loylert

มัทนา วานิชย์

Mattana Wantich

วีรภรณ์ เดชนำบัญชาชัย

Weeraporn Dejnumbunchachai

วัชรี วิทยวรรณกุล

Wacharee Wittayawannakul

รัมม์พัน โกศลานันท์

Rumpun Kosaranund

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

สารพิษจากเชื้อรา (mycotoxins) เป็น toxic secondary metabolites ที่สร้างขึ้นโดยเชื้อราบางชนิดที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษ ประกอบกับอาหารที่ใช้ในการเจริญของเชื้อราอุณหภูมิ รวมทั้งสภาพแวดล้อมเหมาะสม ซึ่งสารพิษจากเชื้อราที่สำคัญที่พบเป็นปัญหาในผลิตผลเกษตรมีหลายชนิด เช่น แอฟลาทอกซิน และ โอคราทอกซิน เป็นต้น สารพิษจากเชื้อราสามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อทั้งคนและสัตว์ ทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง เมื่อมีการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษเข้าไป นอกจากนี้การปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรยังถูกนำมาใช้เป็นเครื่องต่อรองราคาในการซื้อขายผลิตผลเกษตรทั้งในระดับประเทศและระหว่างประเทศ ทำให้แต่ละประเทศกำหนดค่าการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในอาหารชนิดต่าง ๆ ไม่เท่ากัน ซึ่งนับเป็นมาตรการหนึ่งที่นำมาใช้ในการกีดกันทางการค้า ดังนั้นการศึกษาวิธีการในการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจึงมีบทบาทสำคัญในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว ทั้งยังทำให้ผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ถั่วลิสงเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย แต่เนื่องจากเป็นพืชที่มีการเจริญของฝักในดินทำให้พบการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชและการปนเปื้อนเชื้อราที่อยู่ในดินสูง มีโอกาสที่จะก่อให้เกิดการสูญเสียผลผลิตและพบการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราได้ง่าย อีกทั้งในขั้นตอนการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวที่ไม่เหมาะสมอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อรา เช่น สารแอฟลาทอกซิน ดังนั้นควรมีการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวที่ดี ตั้งแต่ขั้นตอนการตากเพื่อลดความชื้นรวมถึงขั้นตอนการกะเทาะเมล็ดเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อราและการสร้างสารพิษ เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพและปลอดภัยต่อผู้บริโภค ปัญหาที่พบในถั่วลิสงอีกประการ คือ การเข้าทำลายฝักโดยเสี้ยนดิน (Subterranean ant หรือ Red ant) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dorylus orientalis* Westwood (Hymenoptera: Formicidae) เป็นแมลงศัตรูสำคัญชนิดหนึ่งที่คอยกัดกินเจาะถั่วลิสง ทำให้ฝักถั่วไม่มีเมล็ด ชอบอาศัยอยู่ในดิน ลักษณะคล้ายปลวก สามารถเข้าทำลายพืชชนิดพืชหัวใต้ดิน เช่น มันฝรั่ง, กะหล่ำหัว, กะหล่ำดอก และถั่วลิสง การป้องกันกำจัดโดยการเขตกรรมเป็นวิธีที่ดีที่สุด การทำความสะอาดแปลงเป็นการลดการเข้าทำลายผลผลิตจากเสี้ยนดินได้ นอกจากนี้การใช้สารเคมีในการรมแปลง เป็นอีกวิธีหนึ่งในการควบคุมเสี้ยนดิน เช่น การใช้ aluminum phosphide หรือ phorate รวมถึงการใช้สารเคมีในการฉีดพ่น เช่น chlorpyriphos หรือ fenvalevate (Chandel, 2013)

การควบคุมหลังการเก็บเกี่ยว และขั้นตอนการลดปริมาณสารพิษจึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการลดความเสี่ยงของผู้บริโภคต่อการได้รับสารพิษ หลักการขั้นต้นที่ใช้ในการประเมินการเลือกใช้วิธีลดปริมาณสารพิษจะต้องพิจารณาว่าวิธีการนั้นสามารถทำลาย ลดความเป็นพิษ หรือกำจัดสารพิษให้หมดไปได้หรือไม่ โดยที่วิธีการนั้นต้องไม่ทิ้งสิ่งที่เป็นพิษอื่นไว้ในอาหารคนและอาหารสัตว์และคงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารนั้นไว้ดังเดิมหรือในระดับที่ยอมรับได้ วิธีการนั้นต้องไม่เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงเทคโนโลยีของผลิตภัณฑ์ และวิธีการนั้นต้องทำลายสปอร์ของเชื้อราได้ ด้วยหลักการที่กล่าวมานั้น เพื่อลดการใช้สารเคมีซึ่งอาจเป็นอันตราย จึงหันมานิยมชีววิธี เช่น การใช้จุลินทรีย์จำพวก เชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ ในการทำลายสารพิษจากเชื้อรา เช่น สาร Aflastatin A ซึ่งสร้างโดย *Streptomyces* sp. สามารถยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินโดย *Aspergillus parasiticus* ได้ และแบคทีเรีย *Flavobacterium aurantiacum* ก็สามารถทำลายสารแอฟลาทอกซินได้ถึง 74 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มสารพิษไว้กับเซลล์ของแบคทีเรียนาน 68 ชั่วโมง

กรมวิชาการเกษตร

Bacillus subtilis เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราและแบคทีเรียได้หลายชนิด รวมทั้งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และสารแอฟลาทอกซินได้อีกด้วย เชื้อ *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียที่สามารถปรับตัวให้อยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้เป็นอย่างดี แต่ความสามารถในการผลิตเอนไซม์หรือสารที่มีฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อราจะเปลี่ยนแปลงไปด้วย การศึกษาสภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* จะทำให้สามารถนำแบคทีเรีย *B. subtilis* มาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงที่สุด นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติค (Lactic Acid Bacteria : LAB) เป็นแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด LAB สร้างกรดแลคติคโดยกระบวนการหมัก พบได้ในอาหารหมักหลายชนิด เช่น แหนม ผักผลไม้ดอง รวมทั้งในนมเปรี้ยวและโยเกิร์ต การนำจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารมาควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตร ย่อมมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากกว่าวิธีการทางเคมี

การใช้สารสกัดจากพืช เช่น สารสกัด กระชายดำ ไพล ปุดสิงห์ ข่า พริกไทย และกระเทียม เป็นวิธีการควบคุมเชื้อราและแบคทีเรียที่ปลอดภัย เป็นทางเลือกที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพืชที่ผ่านมามุ่งเน้นผลของสารออกฤทธิ์ในการรักษาหรือบรรเทาอาการเจ็บป่วยในสัตว์และมนุษย์ แต่ยังไม่มีผลการศึกษาสารสำคัญในพืชเหล่านี้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *A. flavus* รวมถึงการทำลายสารโอคราทอกซินและแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร หากสามารถเข้าใจวิธีการทำงานของสารสำคัญจากสารสกัดพืช จะสามารถนำสารสำคัญเหล่านี้ไปพัฒนาเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ในการควบคุมเชื้อราและลดการปนเปื้อนโอคราทอกซิน ที่สามารถใช้ได้สะดวก รวดเร็วและปลอดภัยต่อผู้บริโภค ในปี 2555 อมราและคณะ รายงานการใช้น้ำคั้นกระเทียมควบคุมเชื้อรา *A. flavus* ในพริกแห้ง โดยนำพริกสดเม็ดใหญ่ชุบในน้ำคั้นกระเทียมความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนนำไปอบแห้ง และเก็บรักษานาน 4 เดือน พบว่า พริกแห้งที่ชุบน้ำคั้นกระเทียมมีการปนเปื้อนของเชื้อราและสารแอฟลาทอกซินน้อย กว่าพริกกลุ่มที่ไม่ชุบน้ำกระเทียม

การพัฒนาอนุภาคนาโน (nanoparticles) ของสารสกัดพืชอาจเป็นวิธีการนำสารสกัดพืชสมุนไพรไปใช้ควบคุมเชื้อราและสารพิษในผลิตผลเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำไปต่อยอดเพื่อพัฒนาวัสดุบรรจุภัณฑ์สำหรับผลิตผลเกษตร โดยเฉพาะกลุ่มที่มีมูลค่าสูง เช่น สมุนไพรแห้งสำหรับสุคนธบำบัด และผลไม้อบแห้ง เป็นต้น บรรจุภัณฑ์มีบทบาทอย่างมากในการควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตผลเกษตรตลอดโซ่อุปทาน แต่การใช้บรรจุภัณฑ์อย่างไม่เหมาะสม ได้ถูกยกขึ้นเป็นปัญหาในการเพิ่มปริมาณขยะ ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม วัสดุบรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ (degradable packaging material) จึงถูกพัฒนาและได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น หากเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราและสารพิษให้กับวัสดุบรรจุภัณฑ์ได้ เช่น การเติมสารสกัดพืชที่สามารถลดปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษ จะลดปัญหาการเน่าเสียในผลิตผลเกษตร เพิ่มอายุการวางจำหน่าย และมีความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค

นอกจากการศึกษาวิธีการควบคุมเชื้อราและสารพิษในผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์แล้ว การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราแบบรวดเร็วถือเป็นมาตรการหนึ่งที่แก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษในผลิตผลเกษตร โดยการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารพิษในผลิตผลเกษตรก่อนการส่งออกหรือนำเข้า เพื่อเป็นการเพิ่มคุณภาพสินค้าเกษตรให้มีความปลอดภัยต่อผู้ซื้อและผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น และเนื่องจากปัจจุบันโอคราทอกซิน เอ เป็นสารพิษที่มีปัญหาตรวจพบการปนเปื้อนมากขึ้นทั้งในพริก เครื่องเทศ ธัญพืช กาแฟ และไวน์ เป็นต้น ดังนั้นจึงควรมีการ

กรมวิชาการเกษตร

พัฒนาวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยวิธีรวดเร็ว เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์โดยไม่ต้องนำเข้าชุดทดสอบจากต่างประเทศ รวมทั้งสามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ

การตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ชีววิธี วิธีทางเคมี และวิธีทางอิมมูนวิทยา ซึ่งแต่ละวิธีมีความแตกต่างกันในด้านความยากง่ายของวิธีการ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการ และระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ เป็นต้น ดังนั้นในการเลือกวิธีการวิเคราะห์จึงขึ้นอยู่กับความพร้อมของห้องปฏิบัติการ ความสามารถของผู้ตรวจวิเคราะห์ และวัตถุประสงค์ของการตรวจวิเคราะห์เป็นหลัก ปัจจุบันประเทศผู้นำเข้ามีการกำหนดมาตรฐานสินค้าและผลิตภัณฑ์สำหรับผู้ส่งออก ซึ่งสารพิษจากเชื้อราจัดเป็นข้อกำหนดหนึ่งที่ต้องมีการทดสอบให้เป็นไปตามหลักเกณฑ์มาตรฐานการส่งออก รวมทั้งควรมีการตรวจวิเคราะห์ผลิตผลเกษตรก่อนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ โดยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตผลเกษตร โดยการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนในผลิตผลเกษตรเบื้องต้นด้วยวิธีที่รวดเร็วและไม่ยุ่งยาก อีกทั้งยังช่วยลดค่าใช้จ่ายการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศอีกด้วย นอกจากนี้เทคนิค Immunochromatographic ที่เรียกว่า Lateral Flow Immunoassay Strip Test เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้ตรวจสอบสารพิษในผลิตเกษตร โดยใช้เวลาในการตรวจสอบรวดเร็วสะดวกต่อการนำไปใช้ ผลการวิเคราะห์จะบอกได้ในเชิงคุณภาพ หากกรมวิชาการสามารถพัฒนาชุดทดสอบ Lateral Flow Strip ชนิดนี้สำเร็จ จะสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตผลเกษตรทั้งผลิตผลที่มีการนำเข้าและส่งออก โดยไม่ต้องนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการคัดกรองผลิตผลเกษตรในเบื้องต้นได้ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงศึกษาและพัฒนาวิธีการและเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมและตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์ เพื่อลดการสูญเสียหลังการเก็บเกี่ยวและยืดอายุเก็บรักษาผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลผลิตและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรไม่เพียงแต่เกี่ยวข้องกับความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภคเท่านั้น แต่ยังส่งผลกระทบต่อมาตรการทางการค้าระหว่างประเทศด้วย เพื่อควบคุมการเกิดปัญหาดังกล่าวจึงเป็นที่มาของโครงการวิจัยการลดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์ ที่ดำเนินการวิจัยโดยกรมวิชาการเกษตร ในช่วงปีงบประมาณ พ.ศ. 2559-2563 ดังนี้

การศึกษาถึงวิธีการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษในพื้นที่เพาะปลูกถั่วลิสง เพื่อหาแนวทางในการป้องกันการปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus* และสารแอฟลาทอกซินในถั่วลิสงตั้งแต่ในแปลงปลูกจนถึงขั้นตอนการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว โดยการใช้สปอร์แขวนลอยเชื้อราปฏิปักษ์ สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ *Aspergillus flavus* 561 พ่นในแปลงปลูกถั่วลิสง หลังการปลูก 15 และ 30 วัน สามารถยับยั้งการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินได้ดี นอกจากนี้ผลจากการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณมดเสี้ยนดิน *Dorylus orientalis* ในแปลงถั่วลิสงต่อปริมาณสารพิษในถั่วลิสง พบว่าปริมาณเสี้ยนดินมากทำให้มีการะสมสารแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* มาก ดังนั้นควรกำจัดเสี้ยนดินออกจากแปลงปลูกถั่วลิสง นอกจากนี้ยัง

พบว่าการตากถั่วลิสงแบบมีแผ่นรองไม่ให้สัมผัสพื้นดิน หรือตากบนลานปูน หรือการมัดต้นถั่วลิสงเข้าด้วยกันโดยให้ส่วนฝักอยู่ด้านบนและตากเป็นเวลา 1 วัน ปลิดฝัก ก่อนจะตากต่อบนลานปูน ล้วนเป็นวิธีที่ใช้ได้ดีในการตากถั่วลิสง โดยพบความชื้นในเมล็ดต่ำกว่า 9% มีการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* และสารแอฟลาทอกซินไม่แตกต่างกัน ซึ่งต่ำกว่าข้อกำหนดปริมาณสารแอฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสง (20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม)

สำหรับการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อราและแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษ มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประโยชน์สามารถนำมาใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* และการสร้างสารแอฟลาทอกซิน พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* C57 คือ ที่อายุ 24 ชั่วโมง เจริญที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 ได้ดีที่สุดเฉลี่ย 55.5% เท่ากัน และนำ แบคทีเรีย *B. subtilis* C57 มาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ ในการควบคุมเชื้อรา และสารพิษจากเชื้อรา พบว่า การใช้ชีวภัณฑ์แก่ถั่วลิสงโดยใช้ 10 กรัม ใส่ในดินพร้อมปลูกหรือใช้ 10 กรัม ก่อนปลูก 3 วันมีแนวโน้มที่สามารถลดประชากร *A. flavus* และลดปริมาณการปนเปื้อนสารพิษแอฟลาทอกซินในผลผลิตถั่วลิสงได้ดี ซึ่งชีวภัณฑ์สามารถเก็บรักษาในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 2 เดือน นอกจากนี้ในการทดลองที่ 3 ได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* จากตัวอย่างอาหารประเภทหมักดอง พบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* โดย *L. pentosus* LS1704 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ในอาหาร PDA ได้สูงสุด 18.54% และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราในอาหาร PDA+MRS ได้ 100% ส่วนการทดสอบการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี 1 พบว่า เซลล์แบคทีเรียสามารถยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี1 ได้ 9.77-19.52% และการใช้สารละลายปราศจากเซลล์สามารถยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี1 ได้ 5.46-9.62%

นอกจากนี้ผลการวิจัยยังพบว่าสารสกัดพืช เช่น ข่า กระชายดำ ไพล สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษจากเชื้อรา *Aspergillus* (สารแอฟลาทอกซิน) ในผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์ โดยพัฒนานำสารสกัดพืชวงศ์ขิงร่วมกับสารซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) ให้ได้อนุภาคนาโนของสารสกัดพืชวงศ์ขิงเพื่อควบคุมเชื้อราและสารพิษ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย $AgNO_3$ เข้มข้น 4.0 mM ต่อสารสกัดพืช ได้แก่ ไพล ขมิ้นอ้อย และขมิ้นชัน ความเข้มข้น 40,000 ppm ในอัตราส่วน 6:4 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 95°C นาน 20-30 นาที สามารถควบคุมการเจริญและลดการสร้างสารพิษของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* ได้ในอาหาร PDA จากนั้นนำกากพืชสมุนไพรที่เหลือจากการสกัดสาร มาพัฒนาเป็นกระดาษร่วมกับการใช้สารสกัดหยาบสมุนไพรเพื่อควบคุมการปนเปื้อนเชื้อราในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวและผลิตภัณฑ์ พบว่า กระดาษเยื่อตะไคร้ฟอกขาวเหมาะสมที่สุดสำหรับการพัฒนากระดาษในการศึกษานี้ นำมาเคลือบด้วยสารสกัดข่าเข้มข้น 200 ppm 60-70 เปอร์เซ็นต์ควบคุมการปนเปื้อนของ *A. flavus* และ *A. niger* ได้ทั้งในอาหาร PDA พริกสด และพริกแห้ง กระดาษเคลือบสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราทั้งในอาหาร PDA พริกสด และพริกแห้ง หลังจากห่อหุ้มด้วยกระดาษเคลือบสารดังกล่าวนาน 4 สัปดาห์ สามารถชะลอการเปลี่ยนสีของพริกแห้ง และลดปริมาณสารอะฟลาทอกซิน บี1 ได้ นอกจากนั้น

กรมวิชาการเกษตร

เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำคั้นกระเทียมสดต่อคุณภาพการเก็บรักษาพริกแห้งในบรรจุภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ พบว่า พริกแห้งคลุกด้วยน้ำคั้นกระเทียมสด ความเข้มข้น 50 และ 100% บรรจุในถุงพลาสติก PP ถุงซิปพลาสติกใส PE และถุงซิปเมทัลไลท์ เก็บที่อุณหภูมิห้อง พบว่า การคลุกพริกแห้งด้วยน้ำคั้นกระเทียมสด และชนิดของถุง ไม่มีผลต่อปริมาณสารอะฟลาทอกซิน แต่พริกแห้งที่บรรจุในถุงซิปเมทัลไลท์ มีค่าความชื้นเพิ่มขึ้นต่ำที่สุด เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 4 เดือน

ในส่วนการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรามีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตผลเกษตรด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา เริ่มจากการผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ (ochratoxin A; OTA) แบบ polyclonal antibody ในกระต่ายทดลอง 4 ตัว เป็นเวลา 15 สัปดาห์ ได้แอนติซีรั่มบริสุทธิ์ต่อสาร OTA (IgG-OTA) 320 มิลลิลิตร และการเตรียมเอนไซม์คอนจูเกต โดยการเชื่อมต่อ OTA กับเอนไซม์ Horseradish Peroxidase ด้วยการใช้ Dimethylformamide (DMF) ได้คอนจูเกตที่มีความเข้มข้นสูง และต่อมาได้นำสารตั้งต้นที่ได้จากการศึกษาช่วงแรกมาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบแบบ Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ic-ELISA) พบว่า เคลือบด้วยสาร Ochratoxin A-Bovine Serum Albumin (OTA-BSA) เข้มข้น 5, 6 และ 7 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (µg/ml) ทดสอบร่วมกับ IgG-OTA ที่ความเข้มข้น 0.25 µg/ml ส่วนวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ Direct Competitive ELISA เคลือบหลุมทดสอบด้วย IgG-OTA ความเข้มข้น 4, 5 และ 6 µg/ml ร่วมกับเอนไซม์คอนจูเกต ความเข้มข้น 1:400 ในการเคลือบหลุมทดสอบให้บ่มหลุมทดสอบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน (ประมาณ 14-15 ชั่วโมง) และ ตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการเตรียมสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน มี 3 สูตร คือ Phosphate Buffer Saline +10% Methanol, Phosphate Buffer Saline-Tween 20-Bovine Serum Albumin+7% Methanol และ Phosphate Buffer+1% gelatin นอกจากนี้ได้พัฒนาชุดตรวจสอบโอคราทอกซิน เอ โดยวิธี Lateral Flow Immunoassay พบว่า การใช้ IgG-OTA ความเข้มข้น 100 µg/ml มีความเหมาะสมในการติดฉลากกับอนุภาคทอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.6 และในตำแหน่ง test line และ control line พบว่า การใช้ OTA-BSA ความเข้มข้น 0.8 mg/ml และ goat anti-rabbit IgG ความเข้มข้น 0.8 mg/ml ทำให้เกิดสีม่วงแดงของอนุภาคทองได้ดีที่สุด แต่ยังต้องปรับหาวิธีการเพื่อให้การตรวจสอบมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

High contaminations of fungus and mycotoxins in agricultural produces and products do not only involve to consumer health but also affect to international measures and trades. To control the said problems, this research project: Reduction of fungi and mycotoxins contamination in agricultural produced and products was conducted between 2016 and 2020 at Department of Agriculture, Thailand. The project was divided into 4 activities in the following detail:

The first step of project involved to methods for controlling the contamination of fungi and mycotoxins in peanut growing area. The objective of research was to determine the appropriate technique to prevent the contamination of *Aspergillus* spp. fungi and aflatoxins in peanut supply chain including at growing area. In the first experiment, capability of antagonist fungi was studied. Spore suspension of *Aspergillus flavus* 561 (a non-toxigenic strains of *A. flavus*), as an antagonist of aflatoxin-producing *A. flavus*, was sprayed to peanut plants in growing area after 15 and 30 days of planting. After harvesting, aflatoxin contamination in peanut sprayed with *A. flavus* 561 was significantly lower than in non-treated peanut. Next experiment focus was to determine the relation between numbers of *Dorylus orientalis* and level of aflatoxin concentration in peanut. We found that aflatoxins in peanut increase with elevated number of *Dorylus orientalis*. Thus, *Dorylus orientalis* must be eliminated from growing area. The last experiment was to find out the proper drying process for peanut. Three drying techniques were compared *viz*. (1) collated the harvested plant on plastic sheets at growing area ground, (2) collated the harvested plant on cement yard, and (3) stacked the harvested plant (pods on top) on growing area ground. The moisture contents, *A. flavus* contamination and aflatoxin concentration in peanut grain from three drying techniques were not significantly different. The moisture content was less than 9% whilst aflatoxin level was lower 20 µg/g.

Next one is the research in utilization of fungi and bacteria to inhibit the growth of fungi and mycotoxins production were studied. The aim of the first experiment was to determine the appropriate cultivating condition for selected bacteria which was able to control *Aspergillus* fungi and aflatoxins production. *Bacillus subtilis* C57 was selected to use in this experiment. The optimum temperature and time for cultivating the said bacteria was 30-35°C for 24 hour. The obtained bacteria reduced aflatoxin B1 production by 55.5% comparing to control group. The C57 bacteria was applied to bio-formulation to control fungi and toxins in peanut during growing. We found that 10 g of bio-formulation applied to soil before planting peanut 3 days or at the planting day could slow down the contamination of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin B1. The mentioned bio-formulation could be stored in alumimium foil bag at 4°C for 2 months. In experiment 3, lactic acid bacteria were corrected from various fermented food to determine the capability of *A. flavus* inhibition. *Lactoballius pentosus* LS1704 was found as an effective bacteria to inhibit *A. flavus* A39 in PDA and PDA+MRS medium with 18.54 and 100% of inhibition, respectively. The LS1704 bacteria could reduce the aflatoxin B1

กรมวิทยาศาสตร์

production by 9.77-19.52%, whilst the extract solution from bacteria cultivation (cell free supernatant) could decrease production of aflatoxin B1 for 5.46-9.62%.

The utilization of plant extract to inhibit fungal growth and mycotoxins production is the third area of this project. The aim of these researches was to determine the effective plant extracts to control growth of fungi and mycotoxins which could be applied in agricultural produces and products. The first experiment objective was to develop the silver nano-particles from assorted plant extracts which be able to control fungi and mycotoxin. We found that the proportion of 4.0 mM silver nitrate ($AgNO_3$) : 40,000 ppm of plant extracts *viz*. *Zingiber montanum*, *Curcuma zedoaria* and *Curcuma longa* were 6:4. The optimum incubating condition for producing the nano particle was 95°C for 20-30 minute. The obtained nano particles effectively controlled growth of *A. flavus* and *A. niger* in the PDA medium. The residues of extracted plants from experiment 1 were then used in the next experiment. Plant residues were developed to be paper for wrapping agricultural produces and products aiming to minimize contamination of fungi and mycotoxins. Pulp of lemongrass residue was the most suitable for paper development in this study. The lemongrass paper was coated with 60-70% of 200 ppm *Alpinia galanga* crude extract to control *A. flavus* and *A. niger* contamination in PDA medium, fresh chili, and dry chili. The coated paper could control growth of both fungi in PDA, fresh chili and dry chili. Deterioration of dry chili color and concentration of aflatoxin B1 in dry chili were low after 4 weeks wrapped with the mentioned paper. The last experiment of this activity focused in the effect of *Allium sativum* extract on quality of dry chili kept in different packaging materials. The results showed that *Allium sativum* extract concentrations (50 and 100%) and types of packaging *viz*. sealed PP plastic zipper bag, PE plastic zipper bag, and metalite zipper bag did not significantly affect to quality of dry chili after 4 months storage. However, the moisture content of dry chili kept in metalite bag was less than other treatments.

Development of mycotoxins analytical methods was the last activity of this research project. Ochratoxin A (OTA) test kit was developed to monitor the contamination of OTA in agricultural products by immunological method. In the first experiment, production of antiserum against OTA for utilization in developing rapid method for OTA detection was done. Polyclonal antibody against OTA were produced in 4 New Zealand White rabbits for 15 weeks. The purify antiserum (IgG-OTA) 320 ml of was obtained. In addition, the conjugation methods of OTA with Horseradish Peroxidase (HRP) were tested.

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

OTA-HRP conjugate using Dimethylformamide (DMF) gave the high concentration. In experiment 2, the obtained substrate was determined the optimum concentration for coated wells. For the Indirect Competitive ELISA, the optimum concentration of OTA-BSA were 5, 6 and 7 µg/ml with IgG-OTA at the concentration of 0.25 µg/ml. Whilst, the Direct Competitive ELISA was coated with IgG-OTA at the concentration of 4, 5 and 6 µg/ml with the concentration of enzyme conjugate 1:400. In addition, an appropriate time for coated well was incubated at 4°C overnight (approx. 14-15 hour). For preparation of OTA standard solution, 3 formulations of Phosphate Buffer saline + 10% methanol, phosphate buffer saline-tween 20-bovine serum albumin + 7% methanol and phosphate buffer + 1% gelatin were effective for dilution. In addition, the Lateral Flow Immunoassay ochratoxin A assay was developed. It was found that OTA-antibodies (OTA-IgG) at 100 µg/ml were suitable for conjugated with colloidal gold diameter of 40 nanometer, the pH of the solution was adjusted to 8.6. The suitable concentration of OTA-BSA and goat anti-rabbit IgG for test line and control line were 0.8 mg/ml. However, the color that appears in the test line is light color compared to control line. Thus, there would be a need to improve suitable method to get more effective test kit.

กรมวิชาการเกษตร

1. กิจกรรมวิธีการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษในพื้นที่เพาะปลูกถั่วลิสง

1. Method for Controlling the Contamination of Fungi and Mycotoxins in Peanut Growing Area

ชื่อผู้วิจัย

นางสาวอัจฉราพร ศรีจุดานุ

นางสาววัชรี วิทยวรรณกุล

นางสาวมัทนา วานิชย์

นางสาวศรุตา สิทธิไชยากุล

นางสาวศุภรา อัคคะสาระกุล

นางสาวเนตรา สมบูรณ์แก้ว

นางสาวสุพี วนศิรากุล

คำสำคัญ

แอฟลาทอกซิน บี1, เชื้อราที่สร้างสารพิษ, แอสเปอร์จิลัสสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ, เสี้ยนดิน, วิธีการตาก, การเก็บรักษา

aflatoxin B1, toxigenic fungi, non-toxigenic *Aspergillus* strain, *Dorylus orientalis* Westwood, drying method, storage

บทคัดย่อ

กิจกรรมวิธีการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษในพื้นที่เพาะปลูกถั่วลิสงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาแนวทางในการป้องกันการปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus* และสารแอฟลาทอกซินในถั่วลิสงตั้งแต่ในแปลงปลูกจนถึงขั้นตอนการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว มีรายละเอียดดังนี้

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. flavus* 561 *A. tamarii* 538 และ *A. nomius* 401 เพื่อควบคุมเชื้อรา *A. flavus* A39 สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษและลดปริมาณแอฟลาทอกซินในถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ในระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว จากการทดลองในโรงเรือนเพื่อหารูปแบบที่มีประสิทธิภาพและนำมาพัฒนาเป็นรูปแบบการนำไปใช้ในสภาพแปลงให้เหมาะสม พบว่า กรรมวิธีที่ดีที่สุด คือ รดด้วยสารกรอง และ รดด้วยสารกรองร่วมกับการพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. flavus* 561 และ *A. tamarii* 538 ทุก 15 วัน 3 ครั้ง พบปริมาณสารอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงลดลง 33.96% และ 20.47% เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ดินผสมเชื้อรา A39) สำหรับการทดสอบในสภาพแปลงทดลอง พบว่า การใช้สปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. flavus* 561 พ่นหลังการปลูกถั่วลิสง 15 และ 30 วัน สามารถยับยั้งการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินได้ดีที่สุดถึง 65.28-100% นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณเสี้ยนดิน *Dorylus orientalis* Westwood (Hymenoptera: Formicidae) ต่อการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสง โดยการหยดสปอร์แขวนลอยลงบริเวณโคนต้นถั่วลิสง

กรมวิชาการเกษตร

จำนวน 20 ต้น พบว่า ได้ผลผลิตรวมทั้งแปลง เท่ากับ 41.2 กิโลกรัม (น้ำหนักแห้ง) คัดแยกเป็น ถั่วลิสงเมล็ดดี เท่ากับ 35.0 กิโลกรัม และถั่วลิสงเมล็ดเสียที่เกิดจากการทำลายของมดเสี้ยนดิน เท่ากับ 6.2 กิโลกรัม (น้ำหนักแห้ง) และตรวจสอบปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินด้วยวิธี ELISA ของผลผลิตถั่วลิสงในเมล็ดเสีย เท่ากับ 17.4-19.6 พีพีบี และจากการตรวจสอบความสามารถในการสร้างสารพิษของเชื้อรา *A. flavus* พบว่า สามารถสร้างปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินได้สูงตั้งแต่ 0.0-13,800.0 พีพีบี เมื่อวางกับดักในแปลงถั่วลิสง จะพบมดเสี้ยนดิน และมดชนิดอื่นๆ ทั้งหมด 11 ชนิด เป็นมดเสี้ยนดินจำนวนมากที่สุดเท่ากับ 3,874 ตัว ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรของปริมาณมดและปริมาณอะฟลาทอกซิน ของเชื้อรา *A. flavus* พบว่าปริมาณมดเสี้ยนดินถั่ว และมดอื่น ๆ ที่พบในแปลงถั่วลิสง มีแนวโน้มว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ของเชื้อรา *A. flavus* ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ได้มีค่าแสดงความสัมพันธ์ที่น้อย และไม่ชัดเจน สุดท้ายของการศึกษาในกิจกรรมกแรก ได้แก่ การควบคุมการปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus flavus* และสารแอฟลาทอกซิน บี1 โดยวิธีการตากและระยะเวลาการเก็บรักษาก่อนการกะเทาะเปลือกถั่วลิสง โดยทดสอบวิธีการตากเพื่อลดความชื้นในเมล็ด 3 วิธี คือ 1) ปลิดฝักถั่วลิสงทันที คัดเมล็ดดี และตากบนแผ่นรองไม่ให้ถั่วลิสงสัมผัสพื้นดิน 7 วัน 2) การมัดลำต้นถั่วลิสงเข้าด้วยกันให้ส่วนฝักอยู่ด้านบน ตาก 1 วัน ปลิดฝัก คัดเมล็ดดี และตากบนลานปูนต่ออีก 6 วัน 3) ปลิดฝักถั่วลิสง และตากบนลานปูน 7 วัน พบว่า ถั่วลิสงที่ได้มีความชื้นเมล็ดต่ำกว่า 9 เปอร์เซ็นต์ มีการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* และสาร AFB1 ไม่แตกต่างกัน และมีการปนเปื้อนสาร AFB1 ต่ำกว่าข้อกำหนดปริมาณแอฟลาทอกซิน (20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม) เมื่อนำถั่วลิสงจากการตากทั้ง 3 วิธี มาทดสอบเก็บรักษาที่อุณหภูมิโดยรอบ เป็นระยะเวลา 6 เดือน และ สุ่มตัวอย่างมาทดสอบทุก 2 เดือน พบว่า วิธีการตากร่วมกับระยะเวลาการเก็บรักษาไม่มีผลต่อการปนเปื้อนสาร AFB1 ปริมาณโปรตีน และไขมัน โดยทุกกรรมวิธีที่ทำการทดสอบพบการปนเปื้อนสาร AFB1 ไม่เกินข้อกำหนดถั่วลิสงเมล็ดแห้ง ซึ่งหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน การตากวิธีที่ 2 ถั่วลิสงมีการปนเปื้อนสาร AFB1 น้อยสุด เฉลี่ย 3.2 ไมโครกรัม/กิโลกรัม รองลงมาคือ วิธีที่ 1 และ 3 พบปนเปื้อน 4.8 และ 5.3 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ และในเดือนที่ 6 ของการเก็บรักษา ถั่วลิสงมีโปรตีนเฉลี่ย 25.4 เปอร์เซ็นต์ และไขมันเฉลี่ย 41.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งลดลง จากผลการศึกษาทำให้ได้วิธีการจัดการถั่วลิสงตั้งแต่การปลูก การดูแลระหว่างปลูก และการตากแห้งถั่วลิสงที่เหมาะสม ที่สามารถป้องกันและลดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษที่เชื้อราสร้างขึ้น ทำให้ถั่วลิสงมีความปลอดภัยในการบริโภค

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

The activity of method for controlling the contamination of fungi and mycotoxins in peanut growing area was intended to obtain the guideline of prevention *Aspergillus* and aflatoxin contamination in peanuts from the growing area to the postharvest process management. The results were explained as follows:

The efficacy of three non-toxigenic *Aspergillus* strains *viz*., *A. flavus* 561, *A. tamarii* 538 and *A. nomius* 401 were tested for controlling toxigenic *A. flavus* A39 and reducing aflatoxin in pre-and post-harvest peanut cultivar Tainan9. The experiment in greenhouse

condition was tested to find the appropriate formulate and develop for using in the field condition. The optimal treatment was applied with watering the culture filtrate and watering the culture filtrate together with spray of conidia *A. flavus* and *A. tamarii* 538 every 15 days for 3 times. The concentration of aflatoxin in treated peanut was reduced at the level of 33.96 and 20.47% when compared with the control treatment (soil mixed with *A. flavus* A39). In field conditions, the optimal application was sprayed with the spore suspension of *A. flavus* 561 at 15 and 30 days after planting peanuts. This treatment can inhibit aflatoxin production at 65.28-100%.

Besides, the study of relationship of *Dorylus orientalis* Westwood (Hymenoptera: Formicidae) with aflatoxin contamination in groundnut was conducted at groundnut field in Amphoe Nam Yuen, Ubonratchathani province. The experiment was determined by dropping the spore suspension of *Aspergillus flavus* in 20 of groundnut plants. The results revealed that total yield of groundnut kernel was 41.2 kg, infected kernel by *D. orientalis* and uninfected kernel was 6.2 and 35.0 kg of dried weight, respectively. The contamination of aflatoxin in groundnut kernel were determined using by ELISA. The infected groundnut kernel had aflatoxin at the level of 17.4-19.6 ppb. Besides this, the potential of aflatoxin production by spore suspension of *A. flavus* was tested, so it was able to produce a high content of aflatoxin from 0.0-13,800.0 ppm. Sampling traps were placed in groundnut field. The results showed that 11 species farming ants and the highest population of *D. orientalis* (3,874) were found in groundnut field. However, the relationship between the occurrence of *D. orientalis* including farming ants and fungi was not clear in this study.

The last one, controlling the contamination of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 by drying method and storage time before shelling process was tested by three drying treatments *viz.* 1) Pods (immediately striped from the peg on harvesting day) were sorted for quality before being dried on clean pallet for 7 days, 2) Bundles of peanut stem was turned up (pods on top) and dried at field for 1 day. Then, pods were removed from the peg and dried on cement ground for 6 days, and 3) Pods (without peg) were dried on cement ground for 7 days. The moisture contents were below 9%, whilst contamination of *A. flavus* and AFB1 from the all three methods were not significantly different. AFB1 contents were less than maximum level of aflatoxin (20 microgram/kilogram). After that, dry peanuts were stored at ambient temperature for 6 months and determined for AFB1 contamination, and contents of protein and lipid 2 months interval. There was no significantly different in amount of AFB1, protein and lipid between peanut from three

ศูนย์วิทยทรัพยากร

drying methods. All testing treatments found that the AFB1 contamination did not exceed the requirements for peanut kernels. In addition, after storage for 6 months the peanuts from drying method no.2 were detected AFB1 with the least level 3.2 µg/kg, followed by method no.1 and no.3 with the levels 4.8 and 5.3 µg/kg, respectively. Moreover, 6 months of the storage, the protein were found at the levels of 25.4 percent and fat contents 41.5 percent, which were decreased. The results indicate that appropriate methods for peanut production could minimize contamination of Aspergillus fungi and aflatoxin which could increase the food safety for consumer.

บทนำ

ถั่วลิสงเป็นพืชที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารของประเทศไทย สามารถปลูกได้ในทุกภาคของประเทศ การปลูกถั่วลิสงในประเทศไทยมี 2 ระบบ คือ การปลูกในฤดูฝน และฤดูแล้ง ประเทศไทยมีความต้องการผลผลิตถั่วลิสงจำนวนมาก แต่เนื่องจากเป็นพืชที่มีการเจริญของฝักในดินทำให้พบการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชและการปนเปื้อนเชื้อราที่อยู่ในดินสูง มีโอกาสที่จะก่อให้เกิดการสูญเสียผลผลิตและพบการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราได้ง่าย อีกทั้งการจัดการตั้งแต่ในแปลงปลูกจนถึงระยะการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อรา เช่น สารแอฟลาทอกซิน ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคเนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็งได้ ดังนั้นจึงต้องมีการจัดการที่ดีเพื่อควบคุมและป้องกันการปนเปื้อนเชื้อราตั้งแต่ในแปลงปลูกจนถึงระยะการเก็บรักษาเพื่อลดโอกาสการเกิดการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อรา

ในแปลงปลูกการนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แข่งขันการใช้ทรัพยากรตามธรรมชาติ (competitive exclusion) ในสกุล *Aspergillus* จีนัส Hyphomycetes มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อราสกุลเดียวกันที่สร้างสารพิษ เป็นการสร้างระบบภูมิคุ้มกันให้ถั่วลิสงและธัญพืชต่างๆ ซึ่งเชื้อเหล่านี้จะเข้ายึดครองพื้นผิวของเมล็ด ทำให้เชื้อราที่สร้างสารพิษในเมล็ดธัญพืชไม่สามารถเข้ายึดเกาะได้ นอกจากนี้เชื้อ competitive exclusion จะสร้างเอนไซม์โปรบกวนการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซิน และเชื้อที่สร้างสารพิษถูกขับออกจากพืช บางชนิดยังสามารถสร้างกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid) ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อที่สร้างสารพิษด้วย ดังนั้น การเพิ่มให้มีเชื้อประจำถิ่นเร็วขึ้น จะช่วยป้องกันสารพิษที่เกิดตามธรรมชาติอย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เพิ่มความปลอดภัยต่อผู้บริโภค นอกจากจุลินทรีย์แล้ว ยังต้องมีการศึกษาผลกระทบของแมลงศัตรูถั่วลิสง โดยเฉพาะมดเสี้ยนดินถั่ว (*Dorylus orientalis*) ซึ่งจะเข้าทำลายถั่วลิสงในระยะสร้างฝักอ่อน ทำให้ฝักถั่วลิสงเป็นรู และจะกัดกินเมล็ดจนทำให้ฝักถั่วลิสงไม่มีเมล็ดได้ นอกจากนี้ผลผลิตถั่วลิสงยังเกิดความเสียหายจากการเข้าทำลายของมดเสี้ยนดินแล้ว ปัญหาสำคัญอีกประการหนึ่งที่พบในถั่วลิสงคือ การปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* ซึ่งเชื้อราจะเข้าไปเจริญในฝักถั่วลิสงได้ง่ายจากร่องรอยการเข้าทำลายของมดเสี้ยนดิน และยังก่อให้เกิดการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เนื่องจากเป็นสารพิษที่จัดอยู่ในกลุ่มสารก่อมะเร็ง

ความชื้นเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดเชื้อราขึ้นในถั่วลิสง การลดความชื้นหรือการตากจึงเป็นขั้นตอนที่จำเป็น วิธีการตากที่เหมาะสมเพื่อลดโอกาสการเจริญของเชื้อราจึงมีความสำคัญ ดังนั้นจึงศึกษาเพื่อ

ควบคุมการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในแต่ละขั้นตอนหลากหลายวิธีการ สำหรับใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการปนเปื้อนทั้งเชื้อราและสารพิษในถั่วลิสง ทำให้ได้ผลผลิตที่ดีมีคุณภาพ และปลอดภัยต่อผู้บริโภค

การทบทวนวรรณกรรม

ประเทศแอฟริกาใต้ สหรัฐอเมริกา (Cotty, 2006) รวมทั้งอินโดนีเซีย (Dharmaputra, 2003) ประสบปัญหาการปนเปื้อนสารพิษแอฟลาทอกซิน จึงมีการวิจัยนำเชื้อราสกุล *Aspergillus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารแอฟลาทอกซิน มาลดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษในผลิตผลเกษตรตั้งแต่ในแปลงเพาะปลูก พืชไร่ เชื้อรากลุ่มนี้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการค้นพบและได้แสดงศักยภาพในการควบคุมดีที่สุด มีกลไกรบกวนการสร้างเอนไซม์ ที่จำเป็นต่อกระบวนการสร้างสารพิษ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ และเอนไซม์ ยับยั้งหรือทำลายเส้นใยของเชื้อราชนิดเดียวกันแต่เป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ กลไกการควบคุมนี้เป็นลักษณะแข่งขันแย่งพื้นที่การเจริญเติบโต (competitive exclusion) ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อราเป้าหมายสูง ตลอดจนมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เชื้อรา *Aspergillus* ที่ไม่สร้างสารพิษที่มีการผลิตเป็นชีวภัณฑ์เชิงพาณิชย์ในสหรัฐอเมริกา ปัจจุบันได้ผ่านการทดสอบจากองค์กรพิทักษ์สิ่งแวดล้อม (U.S. Environmental Protection Agency; EPA) อนุญาตให้ใช้เชื้อดังกล่าวในกระบวนการผลิตพืช ได้แก่ ข้าวโพด ถั่วลิสง มะเดื่อฝรั่ง ฝ้าย และพิสทาชิโอ (Dorner, 2004) เป็นที่ยอมรับและนำไปใช้ในประเทศที่พัฒนาแล้ว โดย Wicklow *et al.* (1988) และ Dorner *et al.* (1999) พบว่าเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ไม่สร้างสารพิษแอฟลาทอกซิน สามารถควบคุมการเข้าทำลายเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษในข้าวโพดระยะก่อนเก็บเกี่ยวได้ดี สอดคล้องกับ Kilman (1993) และ Cotty (2006) พบวา *A. flavus* สายพันธุ์ไม่สร้างสารพิษ สามารถรบกวนกระบวนการเข้าทำลายและการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ

จากการศึกษาของ Nesci *et al*. (2011) ระบุว่า แมลงศัตรูในโรงเก็บหลายชนิด อาจมีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวพาหะทำให้เกิดการแพร่กระจายของสปอร์เชื้อรา Bhusal and Khanal (2018) ได้รายงานว่าจากการสุ่มเก็บตัวอย่างของผลผลิตข้าวโพดหลังการเก็บเกี่ยว พบว่า มีปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* 97.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะเดียวกันพบว่ามีปริมาณการปนเปื้อนของแมลงศัตรูพืช (ด้วงงวงข้าวโพด) ถึง 96.7 เปอร์เซ็นต์ เช่นกัน ส่วน Wright (1991) ได้กล่าวว่า การเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชกับเชื้อรา *A. flavus* ในผลิตผลเกษตรจะมีความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนความหนาแน่นของแมลง (จำนวนแมลงทั้งที่มีชีวิตและตาย) และชนิดของแมลง secondary อื่น ๆ ที่อาจจะเป็นพาหะให้เกิดการสร้างสารพิษจากเชื้อรา ปัญหาของการปนเปื้อนของแมลงศัตรูพืช และการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อรา มีผลกระทบทำให้เกิดความเสียหายในด้านปริมาณ คุณภาพ และทำให้ราคาผลผลิตตกต่ำ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (2559) พบว่า ปัญหาเหล่านี้ส่งผลให้พื้นที่การผลิตถั่วลิสงในพื้นที่การผลิตของภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือลดลง งานวิจัยในทางด้านนี้ยังไม่มีข้อมูลที่มากนัก จึงเป็นที่มาของการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อรากับมดเสี้ยนดิน ซึ่งอาจเป็นสาเหตุนำพาให้เกิดการกระจายตัวของเชื้อรา *A. flavus* ที่อาจจะมีความเกี่ยวข้องกับการปรากฏตัวของมดเสี้ยนดิน

กรมวิชาการเกษตร

การป้องกันและควบคุมสารพิษจากเชื้อรานั้น เชื้อราจะเริ่มเข้าทำลายได้ตั้งแต่ก่อนการเก็บเกี่ยว ช่วงการเก็บเกี่ยว การจัดการหลังการเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษา โดยในขั้นตอนการเก็บรักษามักพบการปนเปื้อนรากลุ่ม storage fungi ซึ่งโดยทั่วไปเป็นราในกลุ่ม *Aspergillus Penicillium* เช่น *A. flavus* และ *A. parasiticus* เป็นต้น (Suttajit, 1990) ดังนั้นการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวในขั้นตอนการตากถั่วลิสงฝักแห้งบนตะแกรงตาข่าย แคร่ หรือผ้าใบ อย่าให้ฝักสัมผัสพื้นดิน ควรพลิกกลับกองถั่ววันละ 2-3 ครั้ง เพื่อให้ฝักแห้งสม่ำเสมอทั่งทั้งกอง ในช่วงที่แดดจัดใช้เวลาตากประมาณ 3-5 วัน ทำให้ความชื้นลดลงต่ำกว่า 9 เปอร์เซ็นต์ (สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน, 2563) การตากถั่วลิสงมี 2 ลักษณะคือ การตากก่อนปลิดฝัก และการตากหลังปลิดฝัก โดยการตากก่อนการปลิดฝักควรตากให้ส่วนฝักอยู่ด้านบนหรือวางลงบนพื้นโดยไม่ให้ซ้อนทับกันหลายชั้น และควรมีวัสดุรองรับฝักไม่ให้สัมผัสดิน ให้ตาก 1-2 วันก่อนปลิดฝักและตากต่อจนมีความชื้น ของเมล็ดไม่เกิน 12 เปอร์เซ็นต์ภายใน 2 วัน และไม่เกิน 9 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 5 วัน ในส่วนการตากหลังปลิดฝักให้ตากถั่วลิสงทั้งเปลือกบนวัสดุรองรับ เช่น ผ้าใบ ตะข่ายไนลอนชนิดตาถี่ หรือแคร่ไม้ไผ่ เพื่อลดการสัมผัสกับดิน ให้ตากจนมีความชื้นของเมล็ดไม่เกิน 12 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 4 วัน และไม่เกิน 9 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 7 วัน (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2553)

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Aspergillus flavus*, *A. tamarii* และ *A. nomius* ในการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2558 - กันยายน 2561

สถานที่ทำการทดลอง กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

1.1 เตรียมสปอร์แขวนลอยและสารกรองจากเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *A. tamarii* และ *A. nomius* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *A. flavus* *A. tamarii* และ *A. nomius* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ ที่ผ่านการคัดเลือกจากผลงานวิจัยปี พ.ศ. 2554-56 และให้ผลดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (A39) และยับยั้งการสร้างแอฟลาทอกซิน โดยการเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) เป็นเวลา 7 วัน เตรียมเป็นสปอร์แขวนลอย 1.0×10^6 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร และนำเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ไปเตรียมสารกรอง (culture filtrate) โดยย้ายรามาเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek's Dox Broth (CzB) และอาหารเหลว Malt extract broth (MEB) ในขวดลูกชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำเขาเครื่องเขยา ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน กรองเสนใย ดวยกระดาษกรองเบอร์ 1 และกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน จนได้สารกรองเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

1.2 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus*, *A. tamarii* และ *A. nomius* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษในการควบคุมเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษและปริมาณสารแอฟลาทอกซินในสภาพโรงเรือน

นำสปอร์แขวนลอยและสารกรองที่ได้จากการทดลองปีที่ 1 มาทดสอบการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (A39) และควบคุมปริมาณสารแอฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างในสภาพโรงเรือน โดยมีวิธีการ ดังนี้

เตรียมดินปลูกถั่วลิสงที่มีเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (A39) โดยนำสปอร์แขวนลอยเชื้อราที่มีความเข้มข้นประมาณ 1.0 X 10^6 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ผสมกับดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วในปริมาตร 100 มิลลิลิตร/ดิน 2.5 กิโลกรัม (อัตรา 1 : 25 โดยปริมาตร/น้ำหนัก) ผสมโดยคลุกเชื้อรากับวัสดุเพาะประกอบด้วยดินและพีทมอส (อัตรา 2 : 1) ให้เข้ากัน นำดินที่ใส่เชื้อแล้วใส่กระถางจำนวน 15 กิโลกรัม/กระถาง ก่อนปลูกถั่วลิสง เมื่อถั่วลิสงอายุ 15 วัน ทำการพ่นและรดตามกรรมวิธี วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 10 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ เชื้อรา 3 สายพันธุ์ ดังนี้

A. flavus → กรรมวิธีที่ 1 รดด้วยสปอร์แขวนลอย ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 2 พ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 3 รดและพ่นสปอร์แขวนลอย ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 4 รดด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 6 รดและพ่นด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 7 รดสปอร์และพ่นสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 8 รดสารกรองและพ่นสปอร์ ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 9 ชุดควบคุม ดินผสมเชื้อรา A39
กรรมวิธีที่ 10 ชุดควบคุม น้ำเปล่า
A. tamarii → กรรมวิธีที่ 1 รดด้วยสปอร์แขวนลอย ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 2 พ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 3 รดและพ่นสปอร์แขวนลอย ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 4 รดด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 6 รดและพ่นด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 7 รดสปอร์และพ่นสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 8 รดสารกรองและพ่นสปอร์ ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 9 ชุดควบคุม ดินผสมเชื้อรา A39
กรรมวิธีที่ 10 ชุดควบคุม น้ำเปล่า
A. nomius → กรรมวิธีที่ 1 รดด้วยสปอร์แขวนลอย ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 2 พ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา ทุก 15 วัน 3 ครั้ง

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 3 รดและพ่นสปอร์แขวนลอย ทุก 15 วัน 3 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 4 รดด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 6 รดและพ่นด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 7 รดสปอร์และพ่นสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 8 รดสารกรองและพ่นสปอร์ ทุก 15 วัน 3 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 9 ชุดควบคุม ดินผสมเชื้อรา A39

กรรมวิธีที่ 10 ชุดควบคุม น้ำเปล่า

การบันทึกผล : อัตราเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา *A. flavus* ในเมล็ดถั่วลิสงเมื่อถึงอายุเก็บเกี่ยว 90-120 วัน โดยถอนต้นออกจากถุง ปลิดฝักถั่วลิสง และผึ่งให้แห้งจนความชื้นเหลือ 9% จากนั้นชั่งน้ำหนักแล้วนำไปกะเทาะ สุ่มนำเมล็ดจำนวน 100 เมล็ด มาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยคลอร็อกซ์ (เข้มข้น 10%) นาน 5 นาที นำเมล็ดมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DG18 Agar + streptomycin เป็นเวลา 7 วัน นับจำนวนเมล็ดที่มีการติดเชื้อรา และวัดการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสง สุ่มเมล็ด 100 กรัม ของแต่ละกรรมวิธีมาบดให้ละเอียด หลังจากนั้นนำมาชั่ง 20 กรัมเพื่อวัดปริมาณสารแอฟลาทอกซินด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

1.3 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus*, *A. tamarii* และ *A. nomius* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษในการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษและปริมาณสารแอฟลาทอกซินในสภาพแปลงทดลอง

1. เตรียมเชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus* 561 และ *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (39) เลี้ยงและขยายเชื้อราด้วยอาหาร PDA

2. ปลูกเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (39) โดยพ่นเชื้อระหว่างแถวให้เข้ากับหน้าดินในอัตรา $1.0X10^5$ หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ลิตร/ไร่ พร้อมกับปลูกถั่วลิสง

3. การปฏิบัติในแปลงทดลอง โดยปลูกถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ใช้ระยะปลูก 20x50 เซนติเมตร หลุมละ 2 ต้น จำนวน 30 หลุม/กรรมวิธี โดยทุกกรรมวิธี จะปลูกคั่นด้วย border row ในระหว่างทุกๆ 5 แถวของถั่วลิสง เพื่อเป็นแนวป้องกัน การปนเปื้อนจากกรรมวิธีอื่น ก่อนปลูกพ่นสารกำจัดวัชพืชเมโทลาคลอร์ อัตรา 500 มิลลิลิตรต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีเกรด 12-24-12 อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ โดยโรยข้างแถวและพรวนดินกลบพูนโคน (อายุ 20 วัน) กำจัดวัชพืชครั้งที่ 2 พร้อมใส่ยิปซั่มอัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ (อายุ 40 วัน) ให้น้ำต้นถั่วลิสงตามกรรมวิธีต่างๆ

วางแผนการทดลองแบบ RCB ประกอบด้วย 6 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ตามกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นเชื้อรา *A. flavus* 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 15 วัน + ปลูกเชื้อรา A39

กรรมวิธีที่ 2 พ่นเชื้อรา *A. flavus* 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 30 วัน + ปลูกเชื้อรา A39

กรรมวิธีที่ 3 พ่นเชื้อรา *A. flavus* 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 45 วัน + ปลูกเชื้อรา A39

กรรมวิธีที่ 4 พ่นเชื้อรา *A. flavus* 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 15, 30, 45 วัน + ปลูกเชื้อรา A39

กรรมวิธีที่ 5 ไม่พ่นเชื้อรา *A. flavus* 561 + ปลูกเชื้อรา A39 (ชุดควบคุม)

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 6 ไม่พ่นเชื้อรา *A. flavus* 561 + ไม่ปลูกเชื้อรา A39 (ชุดควบคุม)

<u>การบันทึกข้อมูล</u>: วันปลูก วันงอก วันเก็บเกี่ยว ตรวจหาปริมาณเชื้อราโดยวิธี Soil dilution plate method ก่อนและหลังจากปลูกเชื้อโดยนำตัวอย่างดินมา spread บนอาหาร DG18 ผสม streptomycin วัดอัตราเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา *A. flavus* ในเมล็ด และอัตราเปอร์เซ็นต์การลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินด้วยวิธี ELISA เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อรา *A. flavus* ในวัสดุเพาะที่ระยะเวลา 0 15 30 และ 45 วัน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินจากแต่ละกรรมวิธี มาตรวจนับปริมาณเชื้อราโดยวิธี Soil plate method บนอาหาร DG18 Agar ที่ผสม streptomycin และทำการวัดเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา *A. flavus* ในเมล็ดถั่วลิสง เมื่อถึงอายุเก็บเกี่ยว 90-120 วัน โดยถอนต้นออกจากกระถาง ปลิดฝักถั่วลิสงและผึ่งให้แห้งจนความชื้นเหลือ 9 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปกะเทาะ สุ่มนำเมล็ดจำนวน 100 เมล็ด มาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยคลอร็อกซ์ (เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) นาน 5 นาที นำเมล็ดมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DG18 Agar เป็นเวลา 7 วัน นับจำนวนเมล็ดที่มีการติดเชื้อรา และวัดการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสง สุ่มเมล็ด 100 กรัม ของแต่ละกรรมวิธีมาบดให้ละเอียด หลังจากนั้นนำมาชั่ง 20 กรัม เพื่อวัดปริมาณสารแอฟลาทอกซินด้วยวิธี ELISA

2. ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณเสี้ยนดิน *Dorylus orientalis* Westwood (Hymenoptera: Formicidae) ต่อการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสง

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2560 - กันยายน 2562

สถานที่ทำการทดลอง กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

แปลงปลูกถั่วลิสงใน จ.ขอนแก่น และ จ.อุบลราชธานี

2.1 สำรวจพื้นที่ปลูกถั่วลิสงที่มีการระบาดของมดเสี้ยนดิน

ทำการสำรวจพื้นที่ปลูกถั่วลิสงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 3 แปลง ในเขต จ. ขอนแก่น 2 แปลง และ จ. อุบลราชธานี 1 แปลง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างผลผลิตถั่วลิสง จำนวน 20 ต้นต่อแปลง และนำตัวอย่างถั่วลิสงที่ได้มาตรวจสอบร่องรอยการเข้าทำลายของมดเสี้ยนดินด้วยสายตา หลังจากนั้น ผึ่งถั่วลิสงในร่มประมาณ 1 สัปดาห์ เมื่อถั่วลิสงแห้งแล้ว นำไปตรวจปริมาณการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินในห้องปฏิบัติการ ด้วยชุดทดสอบ DOA-Aflatoxin B_1-ELISA Test kit

2.2 การเก็บตัวอย่างมดเสี้ยนดินและการตรวจสอบเชื้อราในดิน

2.2.1 การเก็บตัวอย่างมดเสี้ยนดิน

ทำการวางกับดัก ในแปลงปลูกถั่วลิสงทั้ง 3 แปลง (ในข้อ 1) โดยใช้มะพร้าวแห้งผ่าครึ่งซีก ขุดหลุมในดินให้มีขนาดของหลุมลึกเท่ากับขนาดของมะพร้าว คว่ำมะพร้าวลงในหลุม และใช้ดินกลบปิดปากหลุม วางกับดักเช่นนี้จำนวน 20 จุดต่อแปลง ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 2 สัปดาห์ จึงขุดมะพร้าวแห้งออกจากหลุม ตรวจนับจำนวนประชากรมดเสี้ยนดินในกับดัก และส่งตัวอย่างมดเสี้ยนดินที่เก็บได้ไปจำแนกชนิดที่พิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยา องค์การพิพิธภัณฑ์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ

2.2.2 การตรวจสอบเชื้อราในดินจากแปลงถั่วลิสง

กรมวิชาการเกษตร

เก็บตัวอย่างดินจำนวน 10 จุดต่อแปลง ให้ได้ตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม เพื่อนำมาตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราในดินในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวอย่างดิน จำนวน 1 กรัมใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นทิ้งไว้ให้ตกตะกอน ประมาณ 10-15 นาที จึงนำสารละลายดินไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ด้วยวิธีการ serial dilution ที่ระดับการเจือจาง 10^{-1}-10^{-4} หลังจากนั้น ดูดสารแขวนลอยที่ได้จากแต่ละความเข้มข้น 1 มิลลิลิตร นำไปหยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DG 18 และใช้แท่งแก้วเกลี่ยสารให้ทั่ว (spread plate) จำนวน 3 ซ้ำต่อความเข้มข้น ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่พบ และเก็บข้อมูลของเชื้อที่ระยะเวลา 3 5 และ 7 วัน

โดยคำนวณจาก

$$\text{CFU/g} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อจานอาหาร}}{\text{ระดับความเจือจาง x ปริมาตรอาหารที่ดูดมา}}$$

2.3. การศึกษาความสัมพันธ์ของมดเสี้ยนดินกับการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสง

2.3.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Aspergillus flavus*

นำเชื้อรา *A. flavus* ที่คัดแยกได้จากถั่วลิสงมาแยกเลี้ยงให้บริสุทธิ์บนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7-10วัน แล้วนำเชื้อราบริสุทธิ์ที่ได้เจือจางด้วยน้ำกลั่นผสม tween 20 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสปอร์แขวนลอยมาวัดให้มีความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในแปลงทดสอบต่อไป โดยได้แบ่งสปอร์แขวนลอยส่วนหนึ่งไปตรวจสอบเพื่อหาปริมาณสารอะฟลาทอกซิน

2.3.2 การทดสอบในสภาพแปลง

2.3.2.1 ทำการปลูกถั่วลิสงใหม่ ในบริเวณที่พบการกระจายตัวของมดเสี้ยนดิน ในแปลง อ. น้ำยืน จ. อุบลราชธานี ระยะปลูก 50x20 ซม. เป็นพื้นที่ 300 ตร.ม. การดูแลและบำรุงต้นให้ปฏิบัติตามวิธีการของเกษตรกร และไม่มีการใช้สารเคมี เมื่อถั่วลิสงอยู่ในระยะติดฝัก (อายุ 48-65 วัน) กำหนดสุ่มแปลงย่อย ขนาด 1x1 เมตร จำนวน 20 แปลงย่อยซึ่งครอบคลุมต้นถั่วจำนวน 20 ต้น จากนั้นหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *A. flavus* บนดินบริเวณโคนต้นถั่ว จำนวน 10 มิลลิลิตรต่อต้น

2.3.2.2 การวางกับดักในแปลงถั่วลิสงที่ปลูกใหม่ โดยวางกับดักเหยื่อ ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1 ทำการวางกับดักและฝังลงในดิน จำนวน 20 จุดต่อแปลง ปล่อยกับดักทิ้งไว้เป็นเวลา 1 เดือน จึงนำมานับจำนวนประชากรมดเสี้ยนดินจากการวางกับดัก จากนั้นส่งตัวอย่างมดเสี้ยนดินที่เก็บได้ไปจำแนกชนิดที่พิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยา องค์การพิพิธภัณฑ์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ

เมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยวผลผลิต แปลงถั่วที่หยดสปอร์ของเชื้อรา ถอนต้นถั่วจากแปลง ปลิดฝักถั่วลิสง และผึ่งในร่มให้แห้งทุกเมล็ด โดยนำมาตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อรา ด้วยวิธี direct plate count นำเมล็ดถั่วมาแช่ลงในคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาทีในห้องปฏิบัติการ แล้วผึ่งให้แห้ง และนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ 5 เมล็ดต่อจาน จำนวน 60 จาน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5-7 วัน แล้วนำมาตรวจนับเมล็ดถั่วที่มีการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus*

ส่วนผลผลิตที่เก็บจากต้นถั่วลิสงที่ไม่ได้หยดสปอร์แขวนลอย ให้คัดแยกโดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ถั่วลิสงเมล็ดดี และถั่วลิสงเมล็ดเสีย (ถั่วลิสงเมล็ดเสีย/ฝักเสีย คือ เมล็ดที่เกิดจากการทำลายของมดเสี้ยนดิน)

กรมวิชาการเกษตร

ผึ่งในร่มให้แห้งทุกเมล็ด โดยนำมาตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อราด้วยวิธีการ direct plate count และวิธี dilution plate method

- การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราด้วยวิธีการ direct plate count โดยนำเมล็ดถั่วมาแช่ลงในคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาทีในห้องปฏิบัติการ แล้วผึ่งให้แห้ง และนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ 5 เมล็ดต่อจาน เมล็ดดี จำนวน 30 จาน และเมล็ดเสีย จำนวน 30 จาน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5-7 วัน นำมาตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อรา ด้วยการนับ direct plate count ทำเช่นเดียวกับเมล็ดถั่วลิสงที่เก็บมาจากต้นที่หยดสปอร์แขวนลอย

- การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราด้วยวิธี dilution plate method โดยการใช้ถั่วลิสงบด ซึ่งได้มีการคัดแยกแล้วเป็น 2 กลุ่มคือถั่วลิสงบดของเมล็ดดี และถั่วลิสงบดของเมล็ดเสีย จากนั้นทำเช่นเดียวกับข้อ 2.2 ด้วยวิธีการ serial dilution ที่ระดับการเจือจาง 10^{-1} – 10^{-4} หลังจากนั้นดูดสารแขวนลอยที่ได้จากแต่ละความเข้มข้น 1 มิลลิลิตร นำไปหยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และใช้แท่งแก้วเกลี่ยสารให้ทั่ว จำนวน 3 ซ้ำต่อความเข้มข้น ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วันจึงตรวจสอบโดยการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่พบ

โดยคำนวณจาก

$$\text{CFU/g} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อจานอาหาร}}{\text{ระดับความเจือจาง x ปริมาตรอาหารที่ดูดมา}}$$

จากนั้นแบ่งเมล็ดถั่วลิสงเมล็ดดีและเมล็ดเสียบางส่วนนำมาตรวจหาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่อยู่ในเมล็ดถั่วลิสงด้วยวิธี ELISA ในห้องปฏิบัติการ และวัดความสามารถในการสร้างสารพิษของเชื้อราด้วยวิธี ELISA ในห้องปฏิบัติการ

- การตรวจหาปริมาณสารอะฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสง โดยแบ่งเป็นกลุ่มถั่วลิสงเมล็ดดีและเมล็ดเสียแล้ว จำนวน 3 ตัวอย่าง อย่างละ 5 ซ้ำต่อตัวอย่าง ด้วยวิธี ELISA

- การวัดความสามารถในการสร้างสารพิษของเชื้อราด้วยวิธี ELISA โดยการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์บนอาหาร เลี้ยงเชื้อ yes medium โดยเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร วางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน เพื่อให้เชื้อราสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน จากนั้นดูดสปอร์แขวนลอยไปตรวจหาปริมาณสารอะฟลาทอกซินด้วยวิธี ELISA จำนวน 10 ตัวอย่าง อย่างละ 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณมดเสี้ยนดินต่อการสร้างสารอะฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสง

3. การควบคุมการปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus flavus* และสารแอฟลาทอกซิน บี1 โดยวิธีการตากและระยะเวลาการเก็บรักษาก่อนการกะเทาะเปลือกถั่วลิสง

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

แปลงปลูกถั่วลิสงใน จ.ขอนแก่น

3.1 สำรวจแปลงปลูกถั่วลิสงและขั้นตอนการดำเนินงานหลังการเก็บเกี่ยวของเกษตรกร คัดเลือกพื้นที่ปลูกที่เหมาะสมจำนวน 1 แหล่งปลูก เพื่อใช้ในการทดสอบกรรมวิธีการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยว

กรมวิชาการเกษตร

3.2 เปรียบเทียบวิธีการตากเพื่อลดความชื้นหลังการเก็บเกี่ยว วางแผนการทดลองแบบ RCB มีแถวแปลงปลูกเป็นบล็อค จำนวน 4 ซ้ำ โดยมีกรรมวิธีต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ปลิดฝักถั่วลิสงทันทีโดยใช้เครื่องปลิด คัดเมล็ดดีด้วยมือ และตากบนตาข่ายมุ้งไนลอนที่วางบนแผ่นรองไม่ให้ถั่วลิสงสัมผัสพื้นดิน พลิกกลับกองวันละ 2 ครั้ง ตาก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 2 การตากทั้งต้นโดยการมัดลำต้นเข้าด้วยกันให้ส่วนฝักอยู่ด้านบน ตาก 1 วัน ปลิดฝัก คัดเมล็ดดี และตากบนลานปูนต่ออีก 6 วัน

กรรมวิธีที่ 3 ปลิดฝักถั่วลิสงด้วยมือ และตากบนตาข่ายมุ้งไนลอนบนลานปูน 7 วัน

- วัดเปอร์เซ็นต์ความชื้นในเมล็ดในทุกกรรมวิธีด้วยเครื่องวัดความชื้นเมล็ด หลังจากที่ผ่านขั้นตอนการตากลดความชื้นแล้ว

- ตรวจการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* โดยการนำถั่วลิสงในทุกกรรมวิธีมากะเทาะเปลือก และสุ่มตัวอย่างแต่ละกรรมวิธี ๆ ละ 3 ซ้ำ วางเมล็ดถั่วลิสงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อรา DG 18 เพลทละ 5 เมล็ด บ่มทิ้งไว้ 5-7 วัน และบันทึกข้อมูลการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* และเชื้อราที่สร้างสารพิษชนิดอื่น ๆ

- ตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี 1 ในทุกกรรมวิธี โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดในแต่ละกรรมวิธีมาวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี 1 ด้วยวิธี ELISA

3.3 ทดสอบระยะเวลาการเก็บรักษาก่อนการกะเทาะเปลือก วางแผนการทดลองแบบ Split plot จำนวน 4 ซ้ำ โดยมีปัจจัย 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัยหลัก คือ กรรมวิธีการตากเพื่อลดความชื้น 3 กรรมวิธี จากวิธีการข้อที่ 2

ปัจจัยรอง คือ ระยะเวลาการเก็บรักษาถั่วลิสงก่อนการกะเทาะเปลือก 4 ระยะ คือ 0, 2, 4 และ 6 เดือน

นำถั่วลิสงทั้งฝักที่ผ่านขั้นตอนการตากในแต่ละกรรมวิธีบรรจุในกระสอบพลาสติก กระสอบละ 5 กิโลกรัม เก็บรักษาบนชั้นวางในโรงเก็บของเกษตรกร เป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 เดือน หลังจากนั้นทุก 2 เดือน สุ่มตัวอย่างถั่วลิสงแต่ละกรรมวิธีมากะเทาะเปลือก และตรวจสอบคุณภาพเมล็ดในทุกกรรมวิธีดังนี้

- วัดเปอร์เซ็นต์ความชื้นในเมล็ดในทุกกรรมวิธีด้วยเครื่องวัดความชื้นเมล็ด หลังจากตากลดความชื้นแล้ว

- ตรวจการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* โดยการนำถั่วลิสงในทุกกรรมวิธีมากะเทาะเปลือก และสุ่มตัวอย่าง กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ วางเมล็ดถั่วลิสงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อรา DG 18 เพลทละ 5 เมล็ด บ่มทิ้งไว้ 5-7 วัน และบันทึกข้อมูลการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* และเชื้อราที่สร้างสารพิษชนิดอื่น ๆ

- ตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี 1 ในทุกกรรมวิธี ด้วยวิธี ELISA

- นำเมล็ดถั่วลิสงแต่ละกรรมวิธีมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Protein) ด้วยเครื่องวิเคราะห์โปรตีน Nitrogen Combustion และวิเคราะห์ไขมัน (Crude Fat)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Aspergillus flavus*, *A. tamarii* และ *A. nomius* ในการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ

ผลการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการผลิตสปอร์ของเชื้อราปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *A. flavus* (400 และ 561) *A. tamarii* (538 และ 588) และ *A. nomius* (401) และ

กรมวิชาการเกษตร

สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ *A. flavus* A39 พบว่า ทุกสายพันธุ์มีการเจริญเติบโตดี บนอาหาร PDA และ DG18 ซึ่งสามารถเจริญเติบโตเต็มที่บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ในจานเพาะเชื้อขนาด 9.0 cm ภายในวันที่ 7 ของการบ่มเชื้อภายใต้อุณหภูมิ 31-33°C และแสงธรรมชาติ ผลการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตบนอาหารทั้ง 2 ชนิด ในแต่ละช่วงเวลา พบว่าเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์ แสดงอัตราการเจริญที่แตกต่างกัน คือ บนอาหาร PDA จะมีการเจริญเติบโตของเส้นใยได้ดีกว่าบนอาหาร DG18 และผลการวัดปริมาณสปอร์แขวนลอยของเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA และ DG18 พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* spp. ทุกสายพันธุ์ แสดงอัตราการผลิตสปอร์บนอาหาร PDA มากกว่า DG18 จึงเลือก PDA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตสปอร์

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองของเชื้อราปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษที่เลี้ยงในอาหารเหลว CZB และ MEB พบว่า ทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* A39 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MEB ได้ และพบว่าเชื้อรา *A. nomius* 401 มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญดีที่สุด คือ 39.71 รองลงมา คือ เชื้อรา *A. tamarii* 588 *A. flavus* 561 *A. tamarii* 538 และ *A. flavus* 400 ตามลำดับ จึงเลือก MEB เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตสารกรอง และทดสอบการตรวจนับปริมาณเชื้อราในวัสดุเพาะ หลังการจัดการด้วยกรรมวิธีการใช้สปอร์ และสารกรองจากเชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus* 561 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ พบว่าในสัปดาห์ที่ 1 ตรวจพบปริมาณเชื้อรา *A. flavus* ทั้งสองชนิด คือ *A. flavus* 561 และ A39 ในกระถางปริมาณ 5.3-32.0 x 10^2 cfu/g soil ตรวจพบปริมาณ A39 สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษปริมาณ 10.7-100.0 x 10^2 cfu/g soil จากการทดสอบใช้รูปแบบต่างๆ เชื้อรา 561 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ พบว่าปริมาณเชื้อรา 561 ค่อยๆ เพิ่มขึ้นจากเชื้อเริ่มต้นในสัปดาห์ที่ 3 และพบเชื้อราตลอดฤดูปลูกทุกครั้งที่ตรวจนับพบว่ากรรมวิธีรดด้วยสปอร์แขวนลอย (T1) และพ่นด้วยสปอร์แขวนลอย (T2) สามารถตรวจพบปริมาณเชื้อรา *A. flavus* มากที่สุด

การตรวจความสามารถของเชื้อราปฏิปักษ์ในการครอบครองผิวเมล็ดถั่วลิสงหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต เมื่อครบ 90 วัน พบว่า กรรมวิธีพ่นด้วยสปอร์แขวนลอย (T2) เชื้อราปฏิปักษ์ 561 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษมีการเจริญครอบครองผิวเมล็ดถั่วลิสงได้ดีที่สุด โดยเชื้อราสามารถเจริญครอบครองผิวเมล็ดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการใช้สารกรองจากเชื้อราปฏิปักษ์ พบว่า กรรมวิธีพ่นด้วยสารกรอง (T5) มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษดีกว่ากรรมวิธีรดด้วยสารกรอง (T4) ซึ่งไม่พบเชื้อรา *A. flavus* ใด ๆ หลังจากนั้นทำการเก็บผลผลิตถั่วลิสง พบว่า ทุกกรรมวิธีมีน้ำหนักฝักสดและน้ำหนักเมล็ดเฉลี่ยใกล้เคียงกัน ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยกรรมวิธีที่มีผลผลิตสูงสุด คือ กรรมวิธีพ่นด้วยสปอร์แขวนลอย (T2) มีน้ำหนักฝักสดเฉลี่ย 35.11 กรัม และน้ำหนักเมล็ดเฉลี่ย 7.88 กรัม เมื่อตรวจค่า Aflatoxin B_1 ทุกกรรมวิธีนั้นไม่ได้แสดงความแตกต่างใดๆ ทางสถิติ ($P \leq 0.01$)โดยที่กรรมวิธีรดด้วยสารกรองและพ่นสปอร์ (T8) และกรรมวิธีพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา (T2) พบปริมาณสารพิษลดลงจากกรรมวิธีควบคุม 1 (ดินผสมเชื้อรา A39) 25.99 และ 17.69% ตามลำดับ และกรรมวิธีควบคุม 2 (น้ำเปล่า) 36.73 และ 29.63% ตามลำดั

นำเชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus* 561 มาทดสอบพ่นในแปลง จำนวน 2 แปลง ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<u>แปลง 1</u> ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อราในวัสดุเพาะทั้งหมด 4 ครั้ง ในครั้งที่ 1 ก่อนปลูกเชื้อตรวจไม่พบเชื้อรา *Aspergillus* sp. ใด ๆ การตรวจนับในครั้งที่ 2 (15 วัน) พบเชื้อรา A39 ทุกกรรมวิธีปริมาณ 1.7-15.2 x 10^2 cfu/g soil และปริมาณเชื้อรา A39 จะลดลงจากเชื้อเริ่มต้นในครั้งที่ 1 การตรวจนับในครั้งที่ 3 และ 4 (30 และ 45 วัน) กรรมวิธีที่ 1 และ 4 ตรวจพบปริมาณเชื้อรา *A. flavus* 561 มากที่สุด

<u>แปลง 2</u> ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อราในวัสดุเพาะทั้งหมด 4 ครั้ง ในครั้งที่ 1 ก่อนปลูกเชื้อตรวจไม่พบเชื้อรา *Aspergillus* sp. ใด ๆ การตรวจนับในครั้งที่ 2 (15 วัน) พบเชื้อรา A39 ทุกกรรมวิธีปริมาณ 0.2-8.1 x 10^2 cfu/g soil และปริมาณเชื้อรา A39 จะลดลงจากเชื้อเริ่มต้นในครั้งที่ 1 การตรวจนับในครั้งที่ 3 และ 4 (30 และ 45 วัน) กรรมวิธีที่ 1 และ 4 ตรวจพบปริมาณเชื้อรา *A. flavus* 561 มากที่สุด

การตรวจความสามารถของเชื้อราปฏิปักษ์ในการครอบครองผิวเมล็ดถั่วลิสงหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต เมื่อครบ 90 วัน ไม่พบเชื้อรา 561 และเชื้อราที่สร้างสารพิษ A39 สอดคล้องกับค่า Aflatoxin B_1 กรรมวิธีที่ดีที่สุด คือ พ่นเชื้อรา *A. flavus* 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 15 วัน (T1), 30 วัน (T2) และพ่นทุก 15, 30, 45 วัน (T4) แปลงที่ 1 ไม่พบปริมาณสารพิษ และแปลงที่ 2 พบปริมาณสารพิษลดลงที่ระดับ 0.33-0.67 พีพีบี เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ดินผสมเชื้อรา A39) และไม่พ่นเชื้อรา

2. ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณเสี้ยนดิน *Dorylus orientalis* Westwood (Hymenoptera: Formicidae) ต่อการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสง

จากการสำรวจมดเสี้ยนดินในแปลงปลูกถั่วลิสงในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 แห่ง ดังนี้ 1) แปลงทดสอบเมล็ดพันธุ์ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น 2) แปลงขยายเมล็ดพันธุ์ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น และ 3) แปลงเกษตรกร อ.น้ำยืน จ. อุบลราชธานี พบร่องรอยการเข้าทำลายของมดเสี้ยนดินในทั้ง 3 แปลง แต่พบตัวมดเสี้ยนดินในแปลงเกษตรกรที่ จ. อุบลราชธานี เพียงแห่งเดียว และเมื่อทำการตรวจหาปริมาณสารอะฟลาทอกซินในผลผลิตถั่วลิสงที่เก็บมาจาก 3 แปลง พบสารอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงจากแปลงทดสอบเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงของศวร.ขอนแก่น ซึ่งมีปริมาณสารอะฟลาทอกซินเท่ากับ 4.90 พีพีบี โดยไม่พบสารอะฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสงจากแปลงขยายเมล็ดพันธุ์ และแปลงเกษตรกร เมื่อนำมดเสี้ยนดินที่ได้จากการวางกับดักในแปลงเกษตรกร จ. อุบลราชธานี มาจำแนกชนิด พบว่า เป็นมดเสี้ยนดินถั่ว (*Dorylus orientalis* Westwood) มดเสี้ยนดินชนิดนี้สามารถพบได้ในพื้นที่ป่าเปิดใหม่ พื้นที่เปิดโล่ง หรือป่าทดแทน ส่วนแปลงในพื้นที่ จ.ขอนแก่น ไม่พบการปรากฏตัวของมดเสี้ยนดิน เนื่องจากมดเสี้ยนดินไม่สามารถเพาะเลี้ยงหรือขยายพันธุ์ได้ในห้องปฏิบัติการ จึงทำการทดสอบในสภาพแปลงเท่านั้น

ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* ซึ่งได้ดำเนินการกับเมล็ดถั่วลิสงในแปลงทดสอบเมล็ดพันธุ์ และแปลงขยายเมล็ดพันธุ์ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น พบว่า ในแปลงขยายเมล็ดพันธุ์ปริมาณโคโลนีของ *A. flavus* ในดิน เท่ากับ 0.67x10^3 cfu/g แต่ไม่พบสารอะฟลาทอกซินเลย อธิบายได้ว่าแม้ว่าจะพบเชื้อรา *A. flavus* ในดินก็ตาม แต่เชื้อรานั้นอาจจะยังไม่ทันได้สร้างสารอะฟลาทอกซิน แต่ในส่วนของแปลงทดสอบเมล็ดพันธุ์ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ไม่พบโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* ในดิน แต่พบสารพิษอะฟลาทอกซินจากเมล็ดถั่ว อธิบายได้ว่า ในเมล็ดถั่วลิสงนั้นอาจเกิดการสร้างพิษของเชื้อราแล้ว

กรมวิชาการเกษตร

แต่การไม่พบสปอร์ของเชื้อราอาจเกิดการฟุ้งกระจาย หรือหลุดลอยของสปอร์ทำให้ไม่ได้มีสปอร์ของเชื้อราอยู่ในบริเวณนั้นๆ

เมื่อได้ทำการปลูกถั่วลิสงใหม่ในแปลงเกษตรกร อ.น้ำยืน จ. อุบลราชธานี แล้วได้ผลผลิตถั่วลิสงทั้งหมด 41.2 กิโลกรัม (น้ำหนักแห้ง) แบ่งเป็น ถั่วลิสงเมล็ดดี 35 กิโลกรัม และถั่วลิสงเมล็ดเสียที่เกิดจากการทำลายของมดเสี้ยนดินหรือลีบ 6.2 กิโลกรัม (น้ำหนักแห้ง) จากการวางกับดักเก็บตัวอย่างแมลง และส่งไปจำแนกชนิด พบว่า มีมดเสี้ยนดินและมดชนิดอื่น ๆ รวม 11 ชนิด โดยพบมดเสี้ยนดินเป็นจำนวนมากที่สุด เท่ากับ 3,874 ตัว และนำเมล็ดถั่วลิสงในแปลงมาทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* พบว่า เมล็ดถั่วลิสงในต้นที่หยดสปอร์แขวนลอย มีการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* 3.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในเมล็ดถั่วลิสงจากต้นที่ไม่ได้หยดสปอร์แขวนลอย เมื่อได้ตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อรา พบว่า ในผลผลิตถั่วลิสงเมล็ดเสียมีการปนเปื้อนของเชื้อรา เท่ากับ 5.0 เปอร์เซ็นต์ แต่ในถั่วลิสงเมล็ดดีจะไม่พบการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus*

ในการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อรา พบว่า ถั่วลิสงเมล็ดดี มีจำนวนโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* 0.03×10^3 และในถั่วลิสงเมล็ดเสีย พบว่า มีจำนวนโคโลนี 0.67×10^3 cfu/ml จากนั้นตรวจสอบหาการปนเปื้อนของปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสง พบว่า มีปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่พบในถั่วลิสงเมล็ดดี อยู่ในช่วง 2.7-3.2 พีพีบี และถั่วลิสงเมล็ดเสีย จะมีปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินเท่ากับ 17.4-19.6 พีพีบี นอกจากนี้ได้วัดความสามารถในการสร้างสารพิษเชื้อราในสปอร์แขวนลอย พบว่า สปอร์แขวนลอยของเชื้อราที่พบในผลผลิตถั่วลิสงเมล็ดเสีย สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้สูงถึง 0.0-13,800.0 พีพีบี ทั้งนี้ ในผลผลิตถั่วลิสงที่ไม่ได้หยดสปอร์แขวนลอย แต่ตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อราเกิดจากการฟุ้งกระจายของสปอร์ไปสู่ต้นถั่วลิสงที่ไม่ได้หยดสปอร์แขวนลอยได้

ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของปริมาณมดและเชื้อรา *A. flavus* ในการสร้างสารอะฟลาทอกซิน พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบ Pearson Product Moment Correlation Coefficient ระหว่างตัวแปรของปริมาณมดและเชื้อรา *A. flavus* มีค่า r เท่ากับ 0.456 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณมดเสี้ยนดินและมดชนิดอื่น ๆ ที่พบในแปลงถั่วลิสงมีแนวโน้มว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p < 0.05$) นอกจากนี้ จากการสังเกตในเบื้องต้น พบว่า เมล็ดถั่วลิสงที่ถูกมดเสี้ยนดินเข้าทำลายทำให้เกิดบาดแผล ก็จะพบเชื้อรา *A. flavus* ด้วยเช่นกัน ซึ่งความเสียหายของผลผลิตถั่วลิสงที่เกิดจากมดเสี้ยนดิน เป็นเพียงปัจจัยหนึ่งเท่านั้น เพราะยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างพิษอะฟลาทอกซิน ได้แก่ ความชื้นสัมพัทธ์ หรือความชื้นในเมล็ด อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการทดลองนี้ได้สิ้นสุดและยุติการทดลองก่อนระยะเวลาการทำวิจัยจะสิ้นสุดลง จึงเป็นข้อมูลในเบื้องต้นเท่านั้น การสำรวจและการอพยพเคลื่อนย้ายรังของมดเสี้ยนดิน ซึ่งเป็นแมลงสังคมที่อาศัยอยู่ในดินและไม่มีการสร้างรังที่ถาวร รวมทั้งปัจจัยสภาพแวดล้อมที่จะส่งผลกระทบต่อมดเสี้ยนดิน โดยพบว่าขณะทำการทดลองในปี 2561 และ 2562 จะมีปริมาณน้ำฝน อุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ที่แตกต่างกัน ในปี 2562 เดือนเมษายน มีอุณหภูมิสูงสุด คือ 38.6 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหาอาหารและดำรงชีวิตของมดอยู่ในช่วงระหว่าง 21-36 องศาเซลเซียส หรืออาจจะสามารถทนทานต่ออุณหภูมิได้สูงขึ้นถึง 41 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม สำหรับการทดลองในสภาพธรรมชาตินี้ อุณหภูมิเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปัจจัยที่ไม่สามารถควบคุมได้ ดังนั้น แนวทางการในศึกษาต่อไปจึงควรมุ่งเน้นหาวิธีการป้องกันและการกำจัดมดเสี้ยนดินเพื่อลดการเกิดบาดแผลทั้งในฝักและเมล็ดถั่วลิสง

3. การควบคุมการปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus flavus* และสารแอฟลาทอกซิน บี1 โดยวิธีการตากและระยะเวลาการเก็บรักษาก่อนการกะเทาะเปลือกถั่วลิสง

นำถั่วลิสงมาทดสอบกรรมวิธีการตากแบบต่าง ๆ โดยกรรมวิธีที่ 1 (ถอนต้นถั่วลิสงและปลิดฝักโดยใช้เครื่องปลิด และตากบนตาข่ายมุ้งไนลอนที่วางบนแผ่นรองไม่ให้ถั่วลิสงสัมผัสพื้นดิน พลิกกลับกองวันละ 2 ครั้ง ตาก 7 วัน) กรรมวิธีที่ 2 (การตากทั้งต้นโดยการมัดลำต้นเข้าด้วยกันให้ส่วนฝักอยู่ด้านบน ตาก 1 วัน ปลิดฝักและตากบนลานปูนต่ออีก 6 วัน) และกรรมวิธีที่ 3 (ปลิดฝักถั่วลิสงด้วยมือ และตากบนตาข่ายมุ้งไนลอนบนลานปูน 7 วัน) ผลการวัดความชื้นในเมล็ดหลังการเก็บเกี่ยวพบว่า ถั่วลิสงมีความชื้นในเมล็ดสูงกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากผ่านการตากแห้งตามกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน ความชื้นในเมล็ดลดลง โดยกรรมวิธีที่ 2 มีความชื้นในเมล็ดต่ำสุดเฉลี่ย 6.3% รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 3 และ กรรมวิธีที่ 1 มีความชื้นในเมล็ดเฉลี่ย 6.6 และ 6.9% ตามลำดับ ในส่วนของผลการปนเปื้อนเชื้อราในถั่วลิสงหลังการตากพบว่า ตัวอย่างถั่วลิสงจากกรรมวิธีที่ 1 และ 3 มีการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* เฉลี่ย 6.7% ส่วนกรรมวิธีที่ 2 ตัวอย่างที่สุ่มมาตรวจไม่พบการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* แต่พบการปนเปื้อนเชื้อรา *Fusarium* sp. และ *Penicillium* sp. เฉลี่ย 1.3% นอกจากนี้ตัวอย่างถั่วลิสงทั้ง 3 กรรมวิธีพบการปนเปื้อนเชื้อรา *A. niger* มากที่สุด โดยกรรมวิธีที่ 3 พบการปนเปื้อนเฉลี่ย 90.7% รองลงมาคือ ถั่วลิสงจากกรรมวิธีที่ 1 และ 2 พบการปนเปื้อน 81.3 และ 74.7% ตามลำดับ

จากการทดสอบกรรมวิธีการตาก พบว่า ทั้ง 3 กรรมวิธีมีการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินไม่แตกต่างกัน โดยกรรมวิธีที่ 2 พบการปนเปื้อนสาร AFB1 น้อยสุด เฉลี่ย 3.2 ไมโครกรัม/กิโลกรัม รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 1 และกรรมวิธีที่ 3 โดยพบการปนเปื้อน เฉลี่ย 4.7 และ 4.8 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ เนื่องจากในกระบวนการตากแห้งทั้ง 3 วิธี เมล็ดไม่มีการสัมผัสพื้นดินโดยตรง ทำให้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* น้อย มีความชื้นในเมล็ดต่ำกว่า 9% และพบการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 ต่ำกว่าเกณฑ์ที่มาตรฐานกำหนด

การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* ในเมล็ดถั่วลิสงในระยะเวลาการเก็บรักษา พบว่า ก่อนการเก็บรักษา (เดือน 0) ทั้ง 3 กรรมวิธี พบการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* เฉลี่ย 1.7-5.0% หลังการเก็บรักษา 2 เดือน กรรมวิธีที่ 3 พบการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* 1.7 และ 6.7% ตามลำดับ แต่กรรมวิธีที่ 1 และ 2 ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อรากลุ่มที่สร้างสารพิษ เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน ถั่วลิสงทั้ง 3 กรรมวิธีไม่พบการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* แต่พบการปนเปื้อนเชื้อรา *A. niger* 6.7-16.7% หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน มีเพียงกรรมวิธีที่ 3 พบการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* 1.7% นอกจากนี้ในเดือนที่ 6 ของการเก็บรักษายังพบการปนเปื้อนเชื้อรา *Eurotium* sp. 3.3-21.7% ซึ่งเป็นระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* ที่มักพบในกลุ่มอาหารแห้งชนิดต่าง ๆ ซึ่งการพบเชื้อรา *A. niger* สูงกว่าเชื้อราชนิดอื่น ๆ เนื่องจากเป็นเชื้อราที่เจริญได้ดีทั้งในสภาพอากาศค่อนข้างเย็นและร้อนชื้น อีกทั้งเป็นเชื้อราที่พบปนเปื้อนได้ทั้งในดินและผลิตผลเกษตรหลายชนิด

กรมวิชาการเกษตร

ทดสอบวิธีการตากและระยะเวลาในการเก็บรักษา พบว่า กรรมวิธีการตากร่วมกับระยะเวลาการเก็บรักษาไม่มีผลต่อการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 ปริมาณโปรตีน และไขมัน โดยทุกกรรมวิธีที่ทำการทดสอบพบการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 ไม่เกิน 20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ซึ่งการตากกรรมวิธีที่ 2 ถั่วลิสงมีการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 น้อยสุด เฉลี่ย 3.2 ไมโครกรัม/กิโลกรัม รองลงมาคือ ถั่วลิสงจากกรรมวิธีที่ 1 และ 3 พบปนเปื้อน 4.8 และ 5.3 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์ความชื้นเมล็ดในแต่ละกรรมวิธีการตากไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ระยะเวลาการเก็บรักษาเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นความแตกต่างกัน ซึ่งในช่วงแรกก่อนการเก็บรักษา (เดือน 0) เมล็ดมีความชื้นต่ำเฉลี่ย 6.5% มีความชื้นสูงขึ้นในช่วงเดือนที่ 2, 4 และ 6 ซึ่งเดือน 4 ของการเก็บรักษา ทั้ง 3 กรรมวิธีการตากมีความชื้นเมล็ดเฉลี่ย 7.8% เนื่องจากเป็นช่วงเดือนสิงหาคมในพื้นที่มีฝนตกมาก สถานที่เก็บรักษาเป็นชั้นวางของเปิดโล่งไม่สามารถควบคุมสภาพอากาศได้ แต่อย่างไรก็ตามในทุกกรรมวิธีทดลองมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นเมล็ดต่ำกว่ามาตรฐานถั่วลิสงเมล็ดแห้งกำหนด (9%)

นอกจากนี้นำเมล็ดถั่วลิสงมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน และไขมัน พบว่า เมล็ดถั่วลิสงจากการตากตามกรรมวิธีที่ 1, 2 และ 3 มีปริมาณโปรตีนแตกต่างกันเล็กน้อย เฉลี่ย 25.9, 25.7 และ 25.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และปริมาณโปรตีนในแต่ละช่วงระยะเวลาการเก็บรักษามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในช่วง 0-2 เดือน ถั่วลิสงมีโปรตีนสูงเฉลี่ย 25.9-26.0 เปอร์เซ็นต์ และลดลงในช่วงการเก็บรักษา 4-6 เดือน ซึ่งในเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษาถั่วลิสงมีโปรตีนต่ำสุดเฉลี่ย 25.4 เปอร์เซ็นต์ ในการวิเคราะห์ปริมาณไขมันพบว่า ในแต่ละช่วงเวลาการเก็บรักษาปริมาณไขมันในเมล็ดมีความแตกต่างกัน โดยช่วง 0-4 เดือน ถั่วลิสงมีปริมาณไขมันเฉลี่ย 43.9-44.5 เปอร์เซ็นต์ และในเดือนที่ 6 ของการเก็บรักษาถั่วลิสงมีปริมาณไขมันลดลงต่ำสุดเฉลี่ย 41.5 เปอร์เซ็นต์

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

วิธีการควบคุมเพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus* และสารแอฟลาทอกซินในแปลงปลูกถั่วลิสง โดยใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *Aspergillus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. flavus* 561 *A. tamarii* 538 และ *A. nomius* 401 เพื่อควบคุมเชื้อรา *A. flavus* A39 สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษและลดปริมาณแอฟลาทอกซินในถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ในระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว พบว่า เชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus* 561 มีประสิทธิภาพดีที่สุดเมื่อทดสอบใช้ในแปลงปลูก โดยใช้วิธีการฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา 561 พ่นหลังการปลูกถั่วลิสง 15 และ 30 วัน สามารถยับยั้งการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินได้ดีที่สุดถึง 65.28-100% และพบว่าในกรรมวิธีพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus* 561 เพียงอย่างเดียว มีประสิทธิภาพการลดปริมาณสารพิษจากดินตามธรรมชาติได้มากกว่า 70% และในส่วนของแมลงศัตรูถั่วลิสง ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณมดเสี้ยนดินถั่ว (*Dorylus orientalis* Westwood) ต่อการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซิน ทำการทดสอบในสภาพแปลงที่ อ.น้ำยืน จ.อุบลราชธานี โดยการหยดสปอร์แขวนลอยลงบริเวณโคนต้นถั่วลิสง จำนวน 20 ต้น พบว่า ได้ผลผลิตรวมทั้งแปลง 41.2 กิโลกรัม (น้ำหนักแห้ง) คัดแยกเป็น ถั่วลิสงเมล็ดดี 35.0 กิโลกรัม และถั่วลิสงเมล็ดเสียที่เกิดจากการทำลายของมดเสี้ยนดิน 6.2 กิโลกรัม (น้ำหนักแห้ง) และตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารแอฟลาทอกซินของผลผลิตถั่วลิสงในส่วนของเมล็ดเสีย พบการปนเปื้อนสาร

กรมวิชาการเกษตร

แอฟลาทอกซิน 17.4-19.6 พีพีบี จากการวางกับดักในแปลงถั่วลิสง พบมดเสี้ยนดินจำนวนมากที่สุดเท่ากับ 3,874 ตัว ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรของปริมาณมดและปริมาณอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* เท่ากับ 0.456 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณมดเสี้ยนดินและมดชนิดอื่น ๆ ที่พบในแปลงถั่วลิสงมีแนวโน้มว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ซึ่งความเสียหายของผลผลิตถั่วลิสงที่เกิดจากมดเสี้ยนดิน เป็นเพียงปัจจัยหนึ่งเท่านั้น เพราะยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างพิษอะฟลาทอกซิน ได้แก่ ความชื้นสัมพัทธ์ หรือความชื้นในเมล็ด นอกจากนี้วิธีการควบคุมในระยะเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษาถั่วลิสงเป็นอีกหนึ่งขั้นตอนที่สำคัญ โดยทำการศึกษาวิธีการตากถั่วลิสงเพื่อผลิตถั่วลิสงเมล็ดแห้ง 3 วิธี คือ วิธีที่ 1 ปลิดฝักถั่วลิสงทันที คัดเมล็ดดีด้วยมือ ตากบนตาข่ายมุ้งไนลอนที่วางบนแผ่นรองไม่ให้ถั่วลิสงสัมผัสพื้นดิน พลิกกลับกองวันละ 2 ครั้ง ตาก 7 วัน วิธีที่ 2 ตากทั้งต้นโดยการมัดลำต้นเข้าด้วยกันให้ส่วนฝักอยู่ด้านบน ตาก 1 วัน ปลิดฝัก คัดเมล็ดดี และตากบนลานปูนต่ออีก 6 วัน วิธีที่ 3 ปลิดฝักถั่วลิสงทันที และตากบนตาข่ายมุ้งไนลอนบนลานปูน 7 วัน พบว่า การตากทั้ง 3 วิธี มีการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินไม่แตกต่างกัน และไม่เกินข้อกำหนดปริมาณแอฟลาทอกซิน (20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม) และมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นในเมล็ดต่ำกว่ามาตรฐานถั่วลิสงเมล็ดแห้งกำหนด (9%) โดยวิธีที่ 2 มีการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 น้อยสุด เฉลี่ย 3.2 ไมโครกรัม/กิโลกรัม เมื่อนำถั่วลิสงที่ได้จากการตากทั้ง 3 วิธีมาเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน มาทดสอบการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 ถั่วลิสงที่ได้จากการตากวิธีที่ 2 มีการปนเปื้อนน้อยสุด เฉลี่ย 3.2 ไมโครกรัม/กิโลกรัม หลังเก็บรักษา 4-6 เดือน ถั่วลิสงมีโปรตีนเฉลี่ยลดลง ส่วนปริมาณไขมันจะลดลงในเดือนที่ 6 ของการเก็บรักษา ดังนั้นการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* และสารแอฟลาทอกซิน บี1 โดยวิธีการตากควรลดความชื้นในเมล็ดให้ต่ำกว่า 9 เปอร์เซ็นต์ โดยตากถั่วลิสงไม่ให้สัมผัสพื้นดิน และในการเก็บรักษาก่อนการกะเทาะเปลือกถั่วลิสงควรเก็บในที่โล่งระบายอากาศได้ดีและไม่ควรเก็บนานเกินไปจะทำให้ปริมาณโปรตีนและไขมันในเมล็ดลดลง

กรมวิชาการเกษตร

2. กิจกรรมการใช้ประโยชน์จากเชื้อราและแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษ

Utilization of Fungi and Bacteria to Inhibit the Growth of Fungi and Mycotoxins Production

ชื่อผู้วิจัย

นางสาวสุพี วนศิรากุล

นายชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์

นางสาวอัจฉราพร ศรีจุดานุ

นางสาวเนตรา สมบูรณ์แก้ว

คำสำคัญ

แอฟลาทอกซิน, ชีวภัณฑ์, แบคทีเรียกรดแลคติก, สารละลายสปอร์, สารละลายแบคทีเรีย, การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

aflatoxin, biological product, lactic acid bacteria, spore suspension, cell suspension, inhibition of fungal growth

บทคัดย่อ

กิจกรรมการใช้ประโยชน์จากเชื้อราและแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการ สร้างสารพิษ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประโยชน์สามารถนำมาใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* และการสร้างสารแอฟลาทอกซิน กิจกรรมนี้ประกอบด้วยรายละเอียดดังนี้

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* C57 ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญ และการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* A39 ทำการศึกษาโดยเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* C57 ในอาหารเหลว nutrient broth ในสภาวะที่มีค่า pH ระยะเวลา และอุณหภูมิ แตกต่างกัน พบว่า *B. subtilis* C57 มีการเจริญสูงสุดที่อายุ 24 ชั่วโมง และลดลงเมื่อบ่มเป็นระยะเวลานานขึ้น พบการเจริญเฉลี่ยสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณ $1.2x10^9$ โดยแบคทีเรียเจริญได้ดีที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แบคทีเรียเจริญได้ดีที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8 เมื่อนำแบคทีเรียที่เจริญภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 ของเชื้อรา *A. flavus* A39 พบว่า แบคทีเรีย *B. subtilis* C57 ที่อายุ 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าแบคทีเรียที่อายุ 48 และ 72 ชั่วโมง การยับยั้งเฉลี่ยสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณการยับยั้ง 48.1 และ *B. subtilis* C57 อายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 ได้ดีที่สุดเฉลี่ย 55.5% เท่ากัน และแบคทีเรียที่เจริญที่ระดับความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกันมีผลต่อการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 แต่ไม่มีความสัมพันธ์กันในแต่ละอุณหภูมิ

กรมวิชาการเกษตร

สำหรับการศึกษาการพัฒนาชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมเชื้อรา และสารพิษจากเชื้อรา โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* C57 พบว่า สภาพที่เหมาะสมการผลิตเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียในปริมาณมากคือ การเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* C57 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีการเพิ่มปริมาณถึง stationary phase ในช่วง 24 ชม. สูตรชีวภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเตรียมชีวภัณฑ์ต้นแบบคือ ใช้แป้งข้าวเจ้า 2000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 20 ml และซูโครส 200 กรัม ผสมรวมกันกับเชื้อ *Bacillus subtilis* C57 ที่เลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส อายุ 24 ชม. เจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้มีค่า OD เท่ากับ 1 ที่ 600 นาโนเมตร 400 มิลลิลิตร บรรจุถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ขนาด 10 กรัม โดยมีระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะสามารถเก็บรักษาได้คือ ไม่เกิน 2 เดือนภายใต้สภาพอุณหภูมิต่ำในตู้เย็น ขณะที่การใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุม เชื้อรา *A. flavus* A39 พบว่าการให้ชีวภัณฑ์แก่ถั่วลิสงโดยให้ 10 กรัม พร้อมปลูกหรือให้ 10 กรัม ก่อนปลูก 3 วันมีแนวโน้มที่สามารถลดประชากร *A. flavus* และลดปริมาณการปนเปื้อนสารพิษแอฟลาทอกซินที่ตรวจสอบจากผลผลิตถั่วลิสง ได้ดีกว่าการให้ช่วงออกดอก และการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกในการควบคุมเชื้อรา *Aspergillus flavus* จากตัวอย่างอาหารประเภทหมักดอง พบแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* (A.39) จำนวน 36 ไอโซเลท คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา ด้วยวิธี dual culture overlay assay ได้จำนวน 10 ไอโซเลท ซึ่งมีกิจกรรมยับยั้ง 4.99-7.94% ของพื้นที่ จัดจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดตรวจสอบ API 50 CHL พบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus plantarum1* (LS603, LS901), *L. plantarum2* (LS1802), *L. pentosus* (LS704, LS1701, LS1702, LS1703, LS1704, LS1709) และ*L. salivarius* (LS604) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้สารละลายเซลล์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ในอาหาร PDA ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 12.51-18.54% โดย *L. pentosus* LS1704, LS1709, LS1701 และ *L. plantarum1* LS603 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุด 18.54, 18.15, 17.42 และ 17.05% ตามลำดับ และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ในอาหาร PDA+MRS ได้ 100% การใช้สารละลายปราศจากเซลล์พบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 0.75-7.27% ซึ่งพบการเจริญไม่แตกต่างกับชุดควบคุม ส่วนการทดสอบการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี 1 พบว่า เซลล์แบคทีเรียสามารถยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี1 ได้ 9.77-19.52% และการใช้สารละลายปราศจากเซลล์สามารถยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี1 ได้ 5.46-9.62%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract

The activity of utilization of fungi and bacteria to inhibit the growth of fungi and mycotoxins production was aimed to select the beneficial bacteria for controlling the growth of *Aspergillus* and aflatoxin production. In this activity consisted of 3 experiments as follows:

For experiment 2.1, in the study on optimal conditions of *Bacillus subtilis* for controlling *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B_1 production, was cultured *B. subtilis*

C57 in nutrient broth (NB) at the different conditions of pH, time and temperature. The highest *B. subtilis* C57 growth was found at 24 hours and 40℃ with the average growth $1.2x10^9$. *B. subtilis* C57 was grown well at pH5 with the temperature at 30, 35 and 40℃ while, at 25℃ *B. subtilis* C57 was grown well at pH8. The inhibition of the growth of *A. flavus* A39 and aflatoxin B1 production by using *B. subtilis* C57 cultured under different conditions were tested. It was found that cultured of *B. subtilis* C57 at 24 hours was more affected the inhibition of *A. flavus* A39 growth than cultured at 48 and 72 hours. The highest inhibition was found at 40, with the inhibition percentage of 48.1%. In addition, cultured of *B. subtilis* C57 at 24 hours with temperature at 30 and 35℃ could inhibit aflatoxin B1 production with the percentage of 55.5. Therefore, *B. subtilis* C57 cultured at different pH affects the inhibition of aflatoxin B1 production but, it has different inhibitory effects in each temperature.

The study of bio-formulation of *Bacillus subtilis* C57 was developed for controlling of *Aspergillus flavus* and aflatoxins contamination. The optimal conditions of mass production for cell culture were tested and showed that cultured in NB (Nutrient Blot) medium, at the temperature 35 °C would be suitable to reach the stationary phase of *B. subtilis* C57 after 24 hours of inoculation. The formula of bio-formulation consisting of rice flour 200 0gram, soybean oil 20 ml and sucrose 200 gram mixed well with 400 ml of bacterial cell culture, which diluted at OD=1.0 (wavelength 600 nm.). Then the mixture was separated in 10 gram and load in aluminum foil bag. The proper period of storage bio-formulation was 2 months under cold temperature (commercial refrigerator). In addition, using of biological products to control *A. flavus* A39 was conducted by treating with groundnut. The result showed that using 10 grams of bio-formulation into peanut pot before planting 3 days tend to reduce the population of *A. flavus* and aflatoxins contamination rather than using at flowering stage.

Whilst, the last experiment was study on Lactic Acid Bacteria (LAB) selected from fermented foods for controlling *Aspergillus flavus*. Thirty-six isolates of LAB were found to inhibit *A. flavus* (A.39). The screening of highly effective LAB for inhibition *A. flavus* were obtained by dual culture overlay assay for 10 isolates. They have an Inhibitory activity 4.99-7.94% of the area. Bacteria were classified by API 50 CHL test. They were found 4 types of *Lactobacillus plantarum1* (LS603, LS901), *L. plantarum2* (LS1802), *L. pentosus* (LS704, LS1701, LS1702, LS1703, LS1704, LS1709) and *L. salivarius* (LS604), which were classified in the *Lactobacillus* group. Moreover, used of cell suspension to control the growth of *A. flavus* (A.39) found that they were able to inhibit *A. flavus* (A.39) in PDA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

medium, inhibitory activity for 12.51-18.54%. Four isolates of LAB, LS1704, LS1709, LS1701 and LS603 were able to inhibit the growth of fungi at 18.54, 18.15, 17.42 and 17.05%, respectively. And they were able to inhibit the fungal growth at 100% in PDA+MRS medium. While cell suspension of LAB had poor aflatoxin B_1 inhibition (9.77-19.52%). The cell free supernatant (CFS) from LAB slightly reduced fungal growth and aflatoxin B_1 production. The inhibition of fungal growth and AFB_1 were at 0.75-7.27% and 5.46-9.62%, respectively.

บทนำ

การปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราโดยเฉพาะสารแอฟลาทอกซินอาจพบได้ถึงแม้จะมีการจัดการป้องกันที่ดีแล้วก็ตาม ดังนั้นการควบคุมหลังการเก็บเกี่ยว และขั้นตอนการลดปริมาณสารพิษจึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการลดความเสี่ยงของผู้บริโภคต่อการได้รับสารพิษ หลักการขั้นต้นที่ใช้ในการประเมินการเลือกใช้วิธีลดปริมาณสารพิษจะต้องพิจารณาว่าวิธีการนั้นสามารถทำลาย ลดความเป็นพิษ หรือกำจัดสารพิษให้หมดไปได้หรือไม่ โดยที่วิธีการนั้นต้องไม่ทิ้งสิ่งที่เป็นพิษอื่นไว้ในอาหารคนและอาหารสัตว์และคงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารนั้นไว้ดังเดิมหรือในระดับที่ยอมรับได้ วิธีการนั้นต้องไม่เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงเทคโนโลยีของผลิตภัณฑ์ และวิธีการนั้นต้องทำลายสปอร์ของเชื้อราได้ ด้วยหลักการที่กล่าวมานั้น เพื่อลดการใช้สารเคมีซึ่งอาจเป็นอันตราย จึงหันมานิยมชีววิธี เช่น การใช้จุลินทรีย์จำพวก เชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ ในการทำลายสารพิษจากเชื้อรา

การควบคุมเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การใช้ความร้อน การใช้แสงอุลตร้าไวโอเลต การใช้รังสี วิธีทางเคมี เช่น การใช้โซเดียม ไฮเปอร์คลอไรท์ การใช้โอโซน การใช้โซเดียมไดซัลไฟด์ แต่วิธีดังกล่าว ก็ยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ มีค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งทำให้เกิดความสูญเสียทางโภชนาการกับผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์ด้วย การใช้วิธีทางชีวภาพเป็นวิธีที่นำมาใช้ในการควบคุมเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์ เช่น การใช้แบคทีเรีย ยีสต์ หรือเชื้อรา เนื่องจากพบได้ในธรรมชาติ และปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม กลไกที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยทางชีวภาพนั้นมีรูปแบบที่หลากหลายไม่สามารถกำหนดขอบเขตที่ชัดเจนได้ มีทั้งที่เป็นผลโดยตรงในการยับยั้ง และเป็นวิธีการเฉพาะเจาะจงกับเชื้อสาเหตุโรคพืช กลไกที่มักพบโดยทั่วไป คือ การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมายโดยการสร้างสารปฏิชีวนะ เอนไซม์หรือสาร biocide ออกมาใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุ โดยจะไปจำกัดปัจจัยที่ใช้ในการดำรงชีวิตให้ใช้ได้น้อยลงหรือไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้

Bacillus subtilis เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และการสร้างสารแอฟลาทอกซิน แต่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญและการทำงานของ *B. subtilis* โดยปกติเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมหลากหลาย แต่ความสามารถในการผลิตเอนไซม์หรือสารที่มีฤทธิ์ในการควบคุมสามารถเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะแวดล้อม การศึกษาสภาวะที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและความสามารถในการยับยั้งเชื้อราและสารพิษ จะทำให้สามารถนำ *B. subtilis* มาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

นอกจากนี้การนำแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร มาควบคุมการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษในผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์ ย่อมทำให้ผู้บริโภครู้สึกถึงความปลอดภัยมากกว่าการใช้จุลินทรีย์อื่น ๆ Lactic Acid Bacteria (LAB) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก โดยกระบวนการหมักของคาร์โบไฮเดรต จัดเป็นสารเสริมชีวนะ (probiotic) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของคนหรือสัตว์ นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราและการสร้างสารพิษจากเชื้อราได้ การนำแบคทีเรียในกลุ่มนี้มาใช้ในการยับยั้งเชื้อราในผลิตผลเกษตรจะช่วยลดความเสี่ยงในการได้รับเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราลงได้ อีกทั้งยังมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคอีกด้วย ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และการสร้างสารแอฟลาทอกซิน พร้อมทั้งนำมาพัฒนาต่อยอดเป็นชีวภัณฑ์สำหรับใช้ในแปลง นอกจากนี้การศึกษาเพื่อหาแบคทีเรียกลุ่มปลอดภัยที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารที่ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* สำหรับนำมาพัฒนาใช้ประโยชน์ในการควบคุมสารพิษในผลิตผลเกษตรต่อไป

การทบทวนวรรณกรรม

การใช้วิธีทางชีวภาพเป็นวิธีที่นำมาใช้ในการควบคุมเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์ เช่น การใช้แบคทีเรีย ยีสต์ หรือเชื้อรา เนื่องจากพบได้ในธรรมชาติ และปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม กลไกที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยทางชีวภาพนั้นมีรูปแบบที่หลากหลายไม่สามารถกำหนดขอบเขตที่ชัดเจนได้ มีทั้งที่เป็นผลโดยตรงในการยับยั้ง และเป็นวิธีการเฉพาะเจาะจงกับเชื้อสาเหตุโรคพืช กลไกที่มักพบโดยทั่วไป คือ การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมายโดยการสร้างสารปฏิชีวนะ เอนไซม์ หรือสาร biocide ออกมาใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุ โดยจะไปจำกัดปัจจัยที่ใช้ในการดำรงชีวิตให้ใช้ได้น้อยลงหรือไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ (Paul and Clark, 1996)

มีการนำจุลินทรีย์ที่พบในธรรมชาติมาใช้ในการเกษตร เพื่อควบคุมความเสียหายของผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดจากการเข้าทำลายและสร้างสารพิษโดยเชื้อรา *Aspergillus* spp. มากขึ้น จุลินทรียที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราหลังการเก็บ ไดแก *Bacillus subtilis* (Baker *et al*. ,1985) *Lactobacilli* spp. (Schillinger *et al*., 1996). อมรา (2556) พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่แยกเชื้อจากตัวอย่างดินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินและยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และสามารถลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินได้ 64.95 เปอร์เซ็นต์จากชุดควบคุม

แบคทีเรีย *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) รูปร่างเป็นท่อนทรงกระบอก (rod shaped) อาจเป็นท่อนเดียวหรือต่อกันเป็นสาย สร้างโคโลนีผิวด้าน (dull) หรือผิวย่นทั้งเซลล์ (wrinkled) เป็นสีครีมหรือน้ำตาลอ่อน (Gordon,1989) เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง 5-55 องศาเซลเซียส ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี สามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูง และสภาพเป็นด่างได้อย่างดี เจริญได้ตั้งแต่ pH 5.5 ไปถึง 8.8 (สุรางค์, 2555)

Palumbo *et al*. (2006) รายงานว่า มีแบคทีเรียหลายชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและการสร้างสารพิษได้ เช่น *Bacillus*, *Lactobacilli*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* และ *Burkholderia*

กรมวิชาการเกษตร

spp. เป็นต้น ในประเทศไทยมีการศึกษาแบคทีเรียดินจากแหล่งปลูกข้าวโพด และถั่วลิสงมาคัดเลือกหาแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินด้วย พบว่ามีแบคทีเรียดินหลายไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและการสร้างสารแอฟลาทอกซินได้ Nesci *et al*. (2005) พบว่า *B. subtilis* ที่แยกได้จากดินปลูกข้าวโพดสามารถยับยั้งการสะสมของสารแอฟลาทอกซินได้ และจากการศึกษาของ อวันวี (2550) พบว่า *B. subtilis* มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. westerdijkiae* และสามารถกำจัดสารแอฟลาทอกซิน บี1 ได้ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *B. subtilis* มีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคพืชได้หลายชนิด และในขณะเดียวกันยังเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ สัตว์ และไม่มีพิษตกค้างต่อสิ่งแวดล้อม

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) เป็นแบคทีเรียที่พบมากในอาหารประเภทอาหารหมัก เช่น แหนม ผักผลไม้ดอง ผลิตภัณฑ์นม เช่น นมเปรี้ยว หรือโยเกิร์ต และยังพบได้ในร่างกายคนและสัตว์ เช่น ระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหาร ปัจจุบันผู้คนให้ความสนใจเกี่ยวกับจุลินทรีย์สุขภาพกันอย่างมาก ผลิตภัณฑ์บางอย่างผลิตโดยใช้จุลินทรีย์สุขภาพ มีการนำเอาแบคทีเรียแลคติกหลายชนิดมาใช้ เพื่อเสริมประสิทธิภาพการทำงานให้ดียิ่งขึ้น ซึ่งจัดเป็นโปรไบโอติก (probiotics) ชนิดหนึ่ง ที่ช่วยสร้างสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค (Yeung and Laquata, 2003) สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติก ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไดอะซิทิล ริวเทอรีน และแบคเทอริโอซิน (ภักดี, 2548) แบคทีเรียกลุ่มนี้ เช่น *Lactobacillus* และ*Lactococcus* ซึ่งสามารถสร้างสารปฏิชีวนะออกมาทำลายเชื้อราบางชนิด เช่น เชื้อรา *Aspergillus* spp. *Trichoderma* sp. เป็นต้น

Haskard *et al*. (2001) รายงานว่า โครงสร้างของ LAB มีความสามารถในการจับกับสารแอฟลาทอกซิน ทำให้มีการคัดแยกความหลากหลายสายพันธุ์ของ LAB จากแหล่งที่มาต่าง ๆ เช่น โยเกิร์ต ขนมปัง ธัญพืช และอาหารหมักดอง เพื่อศึกษาถึงความสามารถของ LAB ต่อการจับกับ AFB1 และทำให้สามารถลดปริมาณของสารแอฟลาทอกซิน บี1 ได้มากน้อยแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ มีการทดสอบนำ LAB 8 สายพันธุ์ มาจับกับสารแอฟลาทอกซิน บี1 พบว่า LAB ทั้ง 8 สายพันธุ์สามารถจับกับสารพิษนี้ได้ (Hernandez-Mendoza, *et al*., 2009) นอกจากนี้ยังพบว่า LAB มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus* และยับยั้งการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซิน (Khanafari A. *et al*., 2007)

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* และสารแอฟลาทอกซิน บี1

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2558 - กันยายน 2560

สถานที่ทำการทดลอง กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

1.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B. subtilis* C57 ในสภาวะแตกต่างกัน

1.1.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* C57

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* C57 ในอาหารเหลว NB (nutrient broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นสารแขวนลอยแบคทีเรียให้ได้ปริมาณ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการวัดความหนาแน่นของเซลล์ด้วยด้วยเครื่อง spectrophotometer ปรับค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ให้ได้เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

1.1.2 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ในสภาวะต่างกัน

นำเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 1.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่ความเป็นกรด-ด่าง 5 6 7 และ 8 เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส วัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีอายุ 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการวัดความหนาแน่นของเซลล์ด้วยด้วยเครื่อง spectrophotometer บันทึกผลการทดลอง

ทำการศึกษาในแต่ละอุณหภูมิโดยวางแผนการทดลองแบบ 4x3 factorial in CRD โดยมี 2 ปัจจัย คือระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4 ระดับ ได้แก่ pH 5 pH 6 pH 7 และ pH 8 และปัจจัยของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 3 ระดับ ได้แก่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยแต่ละชุดการทดลองประกอบด้วย 3 ซ้ำ รวม 12 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 pH 5 อายุแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง	กรรมวิธีที่ 7 pH 7 อายุแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 2 pH 5 อายุแบคทีเรีย 48 ชั่วโมง	กรรมวิธีที่ 8 pH 7 อายุแบคทีเรีย 48 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 3 pH 5 อายุแบคทีเรีย 72 ชั่วโมง	กรรมวิธีที่ 9 pH 7 อายุแบคทีเรีย 72 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 4 pH 6 อายุแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง	กรรมวิธีที่ 10 pH 8 อายุแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 5 pH 6 อายุแบคทีเรีย 48 ชั่วโมง	กรรมวิธีที่ 11 pH 8 อายุแบคทีเรีย 48 ชั่วโมง
กรรมวิธีที 6 pH 6 อายุแบคทีเรีย 72 ชั่วโมง	กรรมวิธีที่ 12 pH 8 อายุแบคทีเรีย 72 ชั่วโมง

1.2. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* A39

1.2.1 เตรียมสารละลายแบคทีเรีย (cell suspension)

นำเชื้อ *B. subtilis* C57 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว NB มาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อัตรา 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บส่วนตะกอนเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วและปั่นเหวี่ยงอีก 2 ครั้ง ละลายเซลล์ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และปรับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียให้ได้ค่า OD เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ($1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

1.2.2 การเตรียมสารละลายสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา *A. flavus* A39

เลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* A39 ในอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน นำสปอร์ไปละลายในน้ำกลั่นผสม tween 20 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นับสปอร์ให้มีจำนวนสปอร์ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

1.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* A39

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา โดยวิธี dual culture ในอาหาร PDA+NA หยดสารละลายสปอร์ *A. flavus* A39 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ และหยดสารละลายแบคทีเรีย 5 ไมโครลิตร ที่มีอายุ 24 48 และ 72 ชั่วโมง ห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2.5 เซนติเมตร จำนวน 4 ด้าน ระยะห่างระหว่างหยดของสารละลายแบคทีเรียประมาณ 2.5 เซนติเมตร บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา *A. flavus* A39 ในจานทดสอบและจานควบคุม

วางแผนการทดลองแบบ 4x3 factorial in CRD โดยมี 2 ปัจจัย คือ การใช้แบคทีเรียที่เจริญที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4 ระดับ ได้แก่ pH 5 pH 6 pH 7 และ pH 8 และอายุของแบคทีเรีย 3 ระดับ ได้แก่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยแต่ละชุดการทดลองประกอบด้วย 3 ซ้ำ รวม 12 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่ pH5 อายุ 24 ชม.	กรรมวิธีที่ 7 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่ pH7 อายุ 24 ชม.
กรรมวิธีที่ 2 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่ pH5 อายุ 48 ชม.	กรรมวิธีที่ 8 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่ pH7 อายุ 48 ชม.
กรรมวิธีที่ 3 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่ pH5 อายุ 72 ชม.	กรรมวิธีที่ 9 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่ pH7 อายุ 72 ชม.
กรรมวิธีที่ 4 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่ pH6 อายุ 24 ชม.	กรรมวิธีที่ 10 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่ pH8 อายุ 24 ชม.
กรรมวิธีที่ 5 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่ pH6 อายุ 48 ชม.	กรรมวิธีที่ 11 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่ pH8 อายุ 48 ชม.
กรรมวิธีที 6 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่ pH6 อายุ 72 ชม.	กรรมวิธีที่ 12 ใช้แบคทีเรียที่เจริญที่ pH8 อายุ 72 ชม.

คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา} = (C-T) / C \times 100$$

C = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในจานควบคุม

T = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในจานทดสอบ

1.3 ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* A39

ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งสารแอฟลาทอกซิน โดยบ่มเชื้อราจากข้อ 2.3 ต่อไปอีก 7 วัน รวมเป็นเวลา 14 วัน ตัดชิ้นวุ้นของเชื้อรา *A. flavus* A39 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 ชิ้น ใส่ลงหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร นำมาสกัดสารแอฟลาทอกซิน บี1 โดยดัดแปลงจากวิธีของ Teniola *et al.* (2005) เติมคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร ลงไปหลอดที่มีชิ้นวุ้นของเชื้อรา เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ดูดส่วนน้ำใสในหลอดใหม่ ผ่าน syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ระเหยแห้งโดยใช้ก๊าซไนโตรเจน จากนั้นเติม 70% เมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป นำสารสกัดที่ได้ไปตรวจสอบสารแอฟลาทอกซิน บี1 ด้วยชุดทดสอบ DOA ELISA Test Kit คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินของเชื้อรา } A.\ flavus = (C-T) / C \times 100$$

C = ปริมาณสารแอฟลาทอกซิน บี1 จากเชื้อราที่ได้จากชุดควบคุม

T = ปริมาณสารแอฟลาทอกซิน บี จากเชื้อราที่ได้จากการทดสอบ dual culture

กรมวิชาการเกษตร

2. การพัฒนาชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมเชื้อราและสารพิษจากเชื้อรา

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2559 - กันยายน 2562

สถานที่ทำการทดลอง กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

เตรียมหัวเชื้อที่จะใช้ในการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* C57 ในอาหารเหลว NB (nutrient broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นสารแขวนลอยแบคทีเรียให้ได้ปริมาณ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการวัดความหนาแน่นของเซลล์ด้วยด้วยเครื่อง spectrophotometer ปรับค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ให้ได้เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

2.1. ศึกษาการผลิตเซลแขวนลอยแบคทีเรียในปริมาณมาก

ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B. subtilis* (C57) ตามสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อได้จากรายงานของ สุพี และคณะ (2560) คือใช้อาหารเหลว NB ที่ปรับค่า pH เท่ากับ 5 ปริมาตร 1000 ml. บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยปรับความเข้มข้นให้ได้ค่า OD = 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ที่ 0 24 และ 48 ชม.

2.2. การเตรียมชีวภัณฑ์ต้นแบบ

2.2.1 การเตรียมชีวภัณฑ์สูตรทัลคัม ประกอบไปด้วย

1. แป้งทัลคัม 60 กรัม
2. แคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัม
3. คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส โซเดียม ซอล์ท (CMC) 8 กรัม
4. น้ำสกัดมันฝรั่ง 2 กรัม
5. เชื้อแบคทีเรียที่มีค่า OD เท่ากับ 1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จำนวน 20 มิลลิลิตร

2.2.2 การเตรียมสูตรดัดแปลงของ ณิชกานต์, 2554 มีขั้นตอนดังนี้

1). เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ในอาหารเหลว NB ที่ปรับค่า pH เท่ากับ 5 ปริมาตร 1000 ml. บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2). เก็บเกี่ยวเชื้อแบคทีเรียด้วย centrifuge ที่ 4°C ความเร็ว 4000 rpm นาน 10 นาที นำตะกอน pallete ของเชื้อมาเจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้มีค่า OD ที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0

3). เตรียมสูตรชีวภัณฑ์ประกอบไปด้วย แป้งข้าวเจ้า 2000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 20 ml และซูโครส 200 กรัม ผสมรวมกัน นึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน เมื่อเย็นตัวลงจึงนำมาผสมกับเชื้อ *B. subtilis* (C57) ที่เลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส อายุ 24 ชม. เจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้มีค่า OD เท่ากับ 1 ที่ 600 นาโนเมตร 400 มิลลิลิตรที่เจือจางความเข้มข้นแล้ว

4). อบอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาบดให้ละเอียด

5). บรรจุถุงอะลูมิเนียมฟอย 10 กรัม

กรมวิชาการเกษตร

2.3 การศึกษาความทนทานต่อสภาพการเก็บรักษา

เตรียมชีวภัณฑ์ *B. subtilis* (C57) บรรจุถุงอะลูมิเนียมฟอย 10 กรัม นำมาเก็บในสภาพอุณหภูมิ 2 ระดับคือ อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน แล้วนำออกมาประเมินอัตราการอยู่รอดของเชื้อ *B. subtilis* (C57) ทุก 1 เดือน โดยวิธี plate count technique วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ มีขั้นตอนดังนี้

1. ใช้ผงชีวภัณฑ์ 10 กรัม ต่อน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าโดยใช้ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที
2. ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 10-15 นาที
3. นำส่วนใสไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยวิธีการ Serial dilution ให้ได้ความเข้มข้นระดับ 10^{-1} – 10^{-5} เท่า
4. ดูดสารแขวนลอยเชื้อ 0.1 ml นำไป spread plate บนอาหาร NA ในจานเลี้ยงเชื้อจำนวน 3 เพลท (ซ้ำ) วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 36 ชั่วโมง
5. ตรวจนับจำนวนโคโลนีแล้วคำนวณตามวิธีการคำนวณโคโลนี

โดยใช้สูตร $\overline{X} \times df \times 10$

$\overline{X}$ = ค่าเฉลี่ยของโคโลนีจาก 3 ซ้ำ ของความเข้มข้นจะใช้หาค่า CFU

df = ความเข้มข้นในการ spread plate (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ....)

จากสูตร $\overline{X} \times df \times 10$

2.4 การทดลองให้ชีวภัณฑ์แก่ต้นถั่วลิสงในกระถาง

เนื่องด้วยผลการเตรียมชีวภัณฑ์ใหม่โดยใช้สูตรทัลคัม ให้ผลไม่ดีนัก จึงจะใช้สูตรดัดแปลงของ ณิชกานต์, 2554 ในการทดลองกับต้นถั่วลิสงในกระถาง โดยเตรียมสูตรชีวภัณฑ์ที่เตรียมจากเชื้อ *B. subtilis* (C57) และ activate เชื้อเพื่อให้ได้เชื้อที่ active และเตรียมการสถานที่ปลูกถั่วลิสง ใช้กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว และดินปลูกที่มีเชื้อ *A. flavus* โดยนำสปอร์แขวนลอยเชื้อรา ผสมกับดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วใน อัตรา 1: 25 v/w ตรวจหาปริมาณเชื้อราเริ่มต้นโดยวิธี Soil dilution plate method นำดินที่ใส่เชื้อ บ่มเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ก่อนปลูกถั่วลิสง วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำและให้ 1 กระถางเป็น 1 experimental unit ด้วยวิธีการให้ชีวภัณฑ์ 1 ซอง (10 กรัม) ที่ผสมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 500 มิลลิลิตรต่อกระถางโดยกำหนดวิธีการให้ 4 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธี 1 ไม่ให้ชีวภัณฑ์

กรรมวิธี 2 ให้ชีวภัณฑ์ 1 ซองก่อนปลูก 3 วัน

กรรมวิธี 3 ให้ชีวภัณฑ์ 1 ซองพร้อมปลูก

กรรมวิธี 4 ให้ชีวภัณฑ์ 1 ซองหลังปลูก 1 เดือน (หรือเมื่อดอกบาน)

กรมวิชาการเกษตร

- ขั้นตอนการบันทึกผลการทดลอง

1) เก็บตัวอย่างดินในบริเวณรากของต้นถั่วมาตรวจสอบประชากรเชื้อด้วย selective medium ของ *A. flavus* (AFPA selective medium) ตั้งแต่เริ่มจนสิ้นสุดการทดลอง โดยบันทึกผลโดยตรวจนับจำนวนโคโลนีของ *A. flavus* ทุก 15 วัน

2) ตรวจสอบการปนเปื้อน *A. flavus* ด้วย selective medium ของ *A. flavus*และสารแอฟลาทอกซินในผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวด้วยชุดตรวจสอบแอฟลาทอกซินสำเร็จรูปของกรมวิชาการเกษตร

3. ศึกษาชนิดของ Lactic Acid Bacteria (LAB) ในการควบคุมเชื้อรา *Aspergillus* sp.

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) จากผลิตภัณฑ์อาหาร

เก็บตัวอย่างอาหารประเภทหมักดอง ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกโดยเจือจางน้ำที่ได้จากตัวอย่างลงครั้งละ 10 เท่า นำตัวอย่างที่เจือจางระดับ 10^{-3}- 10^{-5} เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง De Man Rogosa and Sharpe (MRS) ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5% บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เลือกเก็บโคโลนีเดี่ยวที่มีบริเวณใสรอบๆ ลงบนอาหาร MRS

3.2 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

3.2.1 การเตรียมสารละลายสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* (A39)

เลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* (A39) ในอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน นำสปอร์ไปละลายในน้ำกลั่นผสม tween 20 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นับสปอร์ให้มีจำนวนสปอร์ประมาณ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.2.2 การเตรียมสารละลายแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วแตะเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.2.1 แบ่งอาหารเหลวที่มีเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญ ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำทิ้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จะได้สารละลายเซลล์แบคทีเรีย (cell suspension) ปรับให้มีปริมาณ $1.5x10^8$ CFU โดยปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard

3.2.2.2 แบ่งอาหารเหลวที่มีเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญ ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อัตรา 9,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำส่วนใสกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร จะได้สารละลายปราศจากเซลล์ (cell free supernatant, CFS)

3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Dual culture overlay assay ดัดแปลงวิธีการของ Magnusson and Schürer (2001)

กรมวิชาการเกษตร

หยดสารละลายเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จำนวน 2 จุด ห่างกัน 3 เซนติเมตร ลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วหยดสารละลายสปอร์เชื้อรา *A. flavus* (A39) ที่เตรียมได้ในข้อ 2.1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในอาหาร PDA เททับลงบนอาหาร MRS บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน สังเกตจากบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดรอบเชื้อแบคทีเรีย วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อแบคทีเรียและบริเวณใสรอบเชื้อ คำนวณกิจกรรมการยับยั้ง จากอัตราส่วนของพื้นที่บริเวณยับยั้งต่อพื้นที่การเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง} = \frac{\text{พื้นที่ของบริเวณยับยั้ง}}{\text{พื้นที่การเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก}}$$

โดยกำหนดให้ (-) ไม่พบบริเวณยับยั้ง, (+) กิจกรรมยับยั้ง 0.1-3.0%, (++) กิจกรรมยับยั้ง 3.1-8.0% และ (+++) กิจกรรมยับยั้งมากกว่า 8.0%

3.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* (A39)

3.2.4.1 นำสารละลายเซลล์แบคทีเรีย ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สำหรับอาหาร PDA และ 10 ไมโครลิตร สำหรับอาหาร PDA+MRS หยดลงในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ PDA+MRS ตามลงไป หมุนวนจานเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สารกระจายทั่ว เมื่ออาหารแข็งหยดสารละลายสปอร์ ของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ที่ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับจานควบคุมหรือจานเลี้ยงเชื้อที่หยดน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราในจานทดสอบและจานควบคุม คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

3.2.4.2 นำส่วนใสหรือสารละลายปราศจากเซลล์ ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หยดลงในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตามลงไปหมุนวนจานเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สารกระจายทั่ว เมื่ออาหารแข็งหยดสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ที่ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตรงกลางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เปรียบเทียบกับจานควบคุมที่เติมอาหารเหลวMRS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราในจานทดสอบและจานควบคุม คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

$$\text{เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา} = (D1-D2) / D1 \times 100$$

โดย D1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในจานควบคุม

D2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในจานทดสอบ

3.3 ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างสารพิษของแบคทีเรียกรดแลคติก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

นำเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* (A39) ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี1 ของเชื้อรา *A. flavus* (A39) โดยนำเชื้อราจากการทดลองข้อ 2.4 ที่อายุ 10 วัน ตัดชิ้นวุ้นของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 6 ชิ้น ใส่ลงหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 2 มิลลิลิตร นำมาสกัดสารอะฟลาทอกซิน บี1 ดัดแปลงจากวิธีของ Teniola *et al.* (2005) โดยเติมคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีชิ้นวุ้นของเชื้อรา เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที ดูดน้ำส่วนใสผ่าน syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ในหลอดใหม่ ระเหยแห้งโดยใช้ก๊าซไนโตรเจน จากนั้นเติมเมทานอล 70% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ไปตรวจสอบสารอะฟลาทอกซิน บี1 ด้วยชุดทดสอบ DOA ELISA Test Kit คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ดังนี้

เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* = (C-T) / C x 100

โดย C = ปริมาณสารอะฟลาทอกซิน บี1 จากเชื้อราที่ได้จากชุดควบคุม

T = ปริมาณสารอะฟลาทอกซิน บี จากเชื้อราที่ได้จากการทดสอบ Dual culture overlay assay

3.4 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

จำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL (Biomerieux, France) ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นสูง หยดสารละลายเชื้อที่เตรียมได้ใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ให้มีความขุ่นเท่ากับ 2 McFarland บันทึกจำนวนหยดของสารละลายแบคทีเรียเข้มข้นที่ใช้ (n) เติมสารละลายแบคทีเรียเข้มข้นลงในอาหาร API 50 CHL ปริมาตร 2n ใส่เชื้อที่เตรียมจากอาหาร API 50 CHL ลงในช่องทดสอบ API 50 CH บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C ระยะเวลา 48 ชม. บันทึกผล ดังนี้ (+) เมื่ออาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง, (-) เมื่ออาหารไม่เปลี่ยนสี และ (?) เมื่อให้ผลไม่ชัดเจน จำแนกชนิดด้วยโปรแกรม apiweb™

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* และสารแอฟลาทอกซิน บี1

คัดเลือกแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ C57 ที่แยกได้จากดินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* A39 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการสร้างสารพิษสูงได้ดี มาใช้ในการทดสอบ เมื่อทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B. subtilis* C57 ในอาหารเหลว NB พบว่า ระยะเวลาในการเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* C57 มีผลต่อการเจริญหรือปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย *B. subtilis* C57 ที่อายุ 24 ชั่วโมง มีการเจริญสูงสุดในทุกๆ อุณหภูมิ ปริมาณเซลล์แบคทีเรียเฉลี่ย 28.46 x 10^7, 53.15 x 10^7 , 97.53 x 10^7 และ 127.86 x 10^7 ที่อุณหภูมิ 25 30 35 และ 40 องศา

กรมวิชาการเกษตร

เซลเซียส ตามลำดับ ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับอุณหภูมิ พบว่า ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย *B. subtilis* C57 เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงขึ้น แต่การเลี้ยงแบคทีเรียที่ระยะเวลานานขึ้นทำให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* C57 มีแนวโน้มลดลงในทุกอุณหภูมิ นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับความเป็นกรด-ด่าง มีผลทำให้การเจริญของแบคทีเรีย *B. subtilis* C57 แตกต่างกัน แต่ไม่มีความสัมพันธ์กัน ซึ่งในแต่ละอุณหภูมิให้ผลที่แตกต่างกัน โดยที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ที่ระดับ ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 ทำให้ *B. subtilis* C57 มีการเจริญสูงกว่าที่ความเป็นกรด-ด่างระดับอื่น ส่วนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบ *B. subtilis* C57 เจริญได้ที่ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8

การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* A39 พบว่า แบคทีเรีย *B. subtilis* A39 ที่เจริญที่ระยะเวลาแตกต่างกัน มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* A39 โดยแบคทีเรียที่อายุ 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด มีการยับยั้งเฉลี่ย 29.45, 28.43, 40.64 และ 48.12% ที่อุณหภูมิ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในขณะที่การใช้แบคทีเรียที่อายุ 48 และ 72 ชั่วโมง ให้ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราไม่แตกต่างกัน และแบคทีเรียที่เจริญที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง แตกต่างกันไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* A39 นอกจากนี้การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับอุณหภูมิ พบว่าแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิสูงมีแนวโน้มทำให้การยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* A39 สูงขึ้น

การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 ของเชื้อรา *A. flavus* A39 พบว่า แบคทีเรีย *B. subtilis* C57 ที่เจริญที่ระยะเวลาแตกต่างกัน มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* A39 โดยแบคทีเรียที่อายุ 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินได้ดีที่สุด มีการยับยั้งเฉลี่ย 39.48, 55.58, 55.56 และ 50.86% ที่อุณหภูมิ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และพบว่าระดับความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกันมีผลต่อการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* A39 แต่ไม่มีความสัมพันธ์กัน ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับอุณหภูมิ พบว่าแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิสูงทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* A39 ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ

2. การพัฒนาชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมเชื้อราและสารพิษจากเชื้อรา

ผลการทดสอบการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* (C57) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าที่ 35 องศาเซลเซียส เชื้อมีการเพิ่มปริมาณเร็วกว่าที่อุณหภูมิห้อง และถึง stationary phase ในช่วง 24 ชม. แรก หลังจากเริ่มเลี้ยง ขณะที่เชื้อที่เลี้ยงในอุณหภูมิห้องมีการเพิ่มปริมาณที่ไม่สม่ำเสมอที่ 48 ชม. หลังจากเริ่มเลี้ยง

การเตรียมการผลิตชีวภัณฑ์ เลือกเอาสูตรชีวภัณฑ์ตามสูตร ณิชกานต์, 2554 โดยใช้แป้งข้าวเจ้า 2000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 20 ml และซูโครส 200 กรัม ผสมรวมกัน ต่อเชื้อ *Bacillus subtilis* (C57) ที่เลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส อายุ 24 ชม. เจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้มีค่า OD เท่ากับ 1 ที่ 600 นาโนเมตร 400 มิลลิลิตร เมื่อแบ่งบรรจุถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ขนาด 10 กรัม ได้ชีวภัณฑ์ทั้งหมด 200 ถุง นำไปเก็บเพื่อศึกษาความทนทานต่อสภาพการเก็บรักษา

กรมวิชาการเกษตร

ผลการตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียในชีวภัณฑ์ต้นแบบหลังการเก็บรักษาครบ 6 เดือนพบว่าที่ 1 เดือนหลังการเก็บรักษา การเก็บที่อุณหภูมิห้อง (25±3 °C) มีปริมาณเชื้อลดลงอย่างรวดเร็วจากปริมาณตั้งต้นที่ $1.36x10^6$ CFU/ml จนเหลือ $0.0925x10^6$ CFU/ml และมีปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง $0.0425x10^6$ - $0.0718x10^6$ CFU/ml จนตลอดระยะเวลาเก็บรักษา ขณะที่ชีวภัณฑ์ที่เก็บในตู้เย็นมีปริมาณเชื้อลดลงจากปริมาณตั้งต้นที่ $1.36x10^6$ CFU/ml เหลือ $0.9925x10^6$ CFU/ml ในเดือนที่ 1 หลังการเก็บรักษา และลดลงเหลือ $0.114x10^6$ CFU/ml และ $0.116x10^6$ CFU/ml ในเดือนที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งถือว่ายังคงมีปริมาณเชื้อสูงในเกณฑ์ที่นำไปใช้งานได้ อย่างไรก็ตาม หลังจากเก็บรักษาได้ 4 และ 5 เดือน ค่าของปริมาณเชื้อก็ลดลงเหลือ $0.071x10^6$ CFU/ml และ $0.070x10^6$ CFU/ml ตามลำดับ แต่ผลการตรวจสอบที่ 6 เดือนกลับพบว่าค่าที่ได้มีปริมาณเท่ากับ $0.1662x10^6$ CFU/ml ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะสามารถเก็บรักษาได้คือ ไม่เกิน 2 เดือนภายใต้สภาพอุณหภูมิต่ำ (5 °C)

ทดสอบชีวภัณฑ์ที่ได้กับต้นถั่วลิสงในกระถางโดยตรวจสอบปริมาณประชากรเชื้อรา *A. flavus* ในดินที่เก็บมาจากกระถางปลูกถั่วลิสงที่ให้ชีวภัณฑ์กรรมวิธีต่าง ๆ พบว่า กรรมวิธีที่ให้ชีวภัณฑ์มีปริมาณประชากรเชื้อรา *A. flavus* ต่ำกว่าที่ไม่ให้ชีวภัณฑ์ และกรรมวิธีที่ให้ชีวภัณฑ์ให้พร้อมปลูกและกรรมวิธีที่ให้ชีวภัณฑ์ก่อนปลูก 3 วันมีแนวโน้มที่สามารถลดประชากร *A. flavus* ได้ดีกว่ากรรมวิธีที่ให้ชีวภัณฑ์ให้ช่วงออกดอก ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการปนเปื้อนสารพิษแอฟลาทอกซินที่ตรวจสอบจากผลผลิตถั่วลิสงที่ได้จากกรรมวิธีที่ให้ชีวภัณฑ์พร้อมปลูกและกรรมวิธีที่ให้ชีวภัณฑ์ก่อนปลูก 3 วัน ก็มีปริมาณการปนเปื้อนต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่ให้ชีวภัณฑ์ หรือกรรมวิธีที่ให้ชีวภัณฑ์ในช่วงออกดอก

3. ศึกษาชนิดของ Lactic Acid Bacteria (LAB) ในการควบคุมเชื้อรา *Aspergillus* sp.

จากการเก็บตัวอย่างอาหารจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ ผักกาดดอง หน่อไม้ดอง อุ่นดอง นมเปรี้ยว โยเกิร์ต ผักเสี้ยนดอง ผักดอง กิมจิ น้ำสลัด ขิงดอง ขนมจีน และข้าวหมาก รวมทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกโคโลนีเดี่ยวที่มีบริเวณใสรอบๆ บนอาหาร MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5% ได้จำนวน 84 ไอโซเลต ซึ่งกรดแลคติคที่แบคทีเรียสร้างขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคาร์บอเนตจะได้แคลเซียมแลคเตทที่ละลายน้ำได้ โดยมีลักษณะเป็นวงใสที่ชัดเจนรอบๆ แบคทีเรีย จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* (A39) ด้วยวิธี Dual culture overlay assay ดัดแปลงวิธีการของ Magnusson and Schürer (2001) พบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อราจำนวน 36 ไอโซเลท โดยคำนวณกิจกรรมการยับยั้งจากอัตราส่วนของพื้นที่บริเวณยับยั้งต่อพื้นที่การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราจะเกิดบริเวณยับยั้งที่ชัดเจน ซึ่งแบคทีเรียอาจสร้างสารบางชนิด เช่น กรดแลคติค กรดอะซิติก ที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อราได้ หรือเกิดจากการแข่งขันกันในการใช้สารอาหารและการใช้พื้นที่ในการเจริญ ตามกลไกการยับยั้งในลักษณะการแข่งขัน (competition)

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อรา ซึ่งมีกิจกรรมยับยั้ง 3.1-8.0% ของพื้นที่ ตามระดับการยับยั้งของ Magnusson and Schürer (2001) จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ LS603 LS604 LS704 LS901 LS1701 LS1702 LS1703 LS1704 LS1709 และ LS1802 ซึ่งแยกเชื้อได้จากหน่อไม้ดอง ผักกาดดอง

กรมวิชาการเกษตร

กิมจิ และขนมจีน นำมาทดสอบอีกครั้ง พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา ได้แก่ LS1701 LS1703 และ LS1702 โดยมีกิจกรรมการยับยั้ง 7.94 6.95 และ 6.84% ของพื้นที่ ตามลำดับ ซึ่งจะปรากฏบริเวณใสอย่างชัดเจนรอบๆ เชื้อแบคทีเรีย

การใช้สารละลายเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกมาทดสอบการยับยั้งเชื้อราบนอาหาร PDA พบว่า แบคทีเรียแต่ละไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดย LS1704 LS1709 LS1701 และ LS603 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 18.54 18.15 17.42 และ 17.05 ตามลำดับ แต่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งค่อนข้างต่ำ โดยเชื้อรามีการเจริญที่ต่างกับจานควบคุมเพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เชื้อราแข่งขันการใช้สารอาหารได้ดีกว่า จึงพบการเจริญของเชื้อราใกล้เคียงกับเชื้อราในจานควบคุม ส่วนการทดสอบในอาหาร PDA+MRS ซึ่ง MRS เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ส่วนอาหาร PDA เป็นอาหารสำหรับเชื้อรา จึงได้อาหารทั้งสองชนิดมาผสมกัน พบว่า จานเลี้ยงเชื้อที่หยดแบคทีเรียกรดแลคติกลงไป ไม่พบการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ในขณะที่จานควบคุมซึ่งหยดน้ำกลั่นลงไปพบการเจริญของเชื้อรา โดยวัดการเจริญจากเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราที่อายุ 7 วัน ได้เฉลี่ย 5.45 เซนติเมตร ซึ่งแสดงว่าเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก ที่คัดเลือกมาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ได้ 100%

นำสารละลายปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งอาจมีการสร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อรามาทดสอบ พบเชื้อรามีการเจริญไม่แตกต่างกับชุดควบคุม แสดงว่าสารละลายปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกไม่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อราได้ ซึ่งเมื่อคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่น้อยมาก

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษโดยเริ่มจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และการสร้างสารแอฟลาทอกซิน พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* C57 ที่แยกได้จากดิน และเลี้ยงในอาหารเหลว NB มีอัตราการเจริญสูงสุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยแบคทีเรียเจริญได้ดีที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แบคทีเรียเจริญได้ดีที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8 เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 ของเชื้อรา *A. flavus* A39 ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 สูง พบว่า แบคทีเรียที่อายุ 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณการยับยั้ง 48.1 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 ของเชื้อรา *A. flavus* A39 พบว่า *B. subtilis* C57 อายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 ได้ดีที่สุดเฉลี่ย 55.5% เท่ากัน เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรีย *B. subtilis* C57 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษแล้วจึงนำมาพัฒนาต่อ

สำนักวิทยบริการฯ

ยอดเป็นชีวภัณฑ์ พบว่าสภาพที่เหมาะสมการผลิตเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียในปริมาณมาก คือ การเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* C57 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีการเพิ่มปริมาณถึง stationary phase ในช่วง 24 ชม. โดยสูตรชีวภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเตรียมชีวภัณฑ์ต้นแบบคือ ใช้แป้งข้าวเจ้า 2000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 20 มิลลิลิตร และซูโครส 200 กรัม ผสมรวมกันกับเชื้อ *B. subtilis* C57 ที่เลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส อายุ 24 ชม. เจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้มีค่า OD เท่ากับ 1 ที่ 600 นาโนเมตร 400 มิลลิลิตร บรรจุถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ขนาด 10 กรัม โดยมีระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะสามารถเก็บรักษาได้คือ ไม่เกิน 2 เดือนภายใต้สภาพอุณหภูมิต่ำในตู้เย็น ขณะที่การใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* A39 พบว่าการให้ชีวภัณฑ์แก่ถั่วลิสงโดยให้ 10 กรัม พร้อมปลูกหรือให้ 10 กรัม ก่อนปลูก 3 วัน มีแนวโน้มที่สามารถลดประชากร *A. flavus* และลดปริมาณการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสงได้ดีกว่าการให้ในช่วงออกดอก

นอกจากนี้การศึกษาเพื่อหาแบคทีเรียกลุ่มปลอดภัยที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารที่ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* (A39) ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus plantarum1* (LS603, LS901), *L. plantarum2* (LS1802), *L. pentosus* (LS704, LS1701, LS1702, LS1703, LS1704, LS1709) และ*L. salivarius* (LS604) ซึ่งการใช้สารละลายเซลล์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ในอาหาร PDA ได้ 12.51-18.54% โดย *L. pentosus* LS1704 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุด 18.54 เปอร์เซ็นต์ และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ในอาหาร PDA+MRS ได้ 100% การใช้สารละลายปราศจากเซลล์พบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 0.75-7.27% ส่วนการทดสอบเพื่อยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี1 พบว่า เซลล์แบคทีเรียสามารถยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี1 ได้ 9.77-19.52%

กรมวิชาการเกษตร

3. การใช้ประโยชน์จากสารสกัดพืชในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษ

3. Utilization of Plant Extract to Inhibit Fungal Growth and Mycotoxins Production

ชื่อผู้วิจัย

นางสาวเนตรา สมบูรณ์แก้ว
นางรัตตา สุทธยาคม
นางสาวศิริพร เต็งรัง
นายกนกศักดิ์ ลอยเลิศ
นายชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์
นางสาวศุภรา อัคคะสาระกุล
นางสาววีรภรณ์ เดชนำบัญชาชัย
นางสาวรัมม์พัน โกศลานันท์

คำสำคัญ

กากพืช, อนุภาคนาโน, สารสกัดพืช, บรรจุภัณฑ์, พริกแห้ง, ยืดอายุการเก็บรักษา
plant residue, nanoparticle, plant extract, packaging, dried chili, extend shelf life

บทคัดย่อ

กิจกรรมการใช้ประโยชน์จากสารสกัดพืชในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษ มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสารสกัดพืชที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus* และสารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร มีรายละเอียดดังนี้

การพัฒนาอนุภาคนาโนของสารสกัดพืชในการควบคุมเชื้อราและสารพิษ โดยทดสอบการใช้สารสกัดพืชวงศ์ขิงในปริมาณต่าง ๆ ในการลดขนาดอนุภาคของซิลเวอร์ ด้วยการทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคนาโน ได้แก่ ความเข้มข้นและสัดส่วนของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) ต่อปริมาณสารสกัดพืช และอุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคนาโน พบว่าสารละลาย $AgNO_3$ เข้มข้น 4.0 mM ปริมาตร 6 ส่วน ต่อสารสกัดพืช 4 ส่วน บ่มที่อุณหภูมิ 95°C นาน 20-30 นาที เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน สารสกัดข่าและกระชายดำไม่มีประสิทธิภาพในการลดขนาดของอนุภาคเงิน ขณะที่สารสกัดไพล ขมิ้นอ้อย และขมิ้นชัน (จากเหง้าสด) มีประสิทธิภาพในการลดขนาดของอนุภาคเงิน ทำให้อนุภาคมีขนาดเล็กลง โดยมีขนาดอนุภาคประมาณ 80-300 นาโนเมตร อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากไพล ขมิ้นอ้อย และขมิ้นชัน เข้มข้น 40,000 ppm สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อ *A. flavus* และ *A. niger* ได้ ส่งผลต่อการลดการสร้างสารพิษของเชื้อราได้

สำหรับการพัฒนากระดาษจากกากพืชสมุนไพรร่วมกับสารสกัดหยาบสมุนไพรเพื่อใช้ควบคุมการปนเปื้อนเชื้อราในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวและผลิตภัณฑ์ ได้นำกากกากเหง้าข่า กระชายดำ ไพล และตะไคร้ ผ่านกระบวนการแยกเยื่อ ฟอกขาว และขึ้นรูปกระดาษ พบว่า สารสกัดข่าเข้มข้น 200 ppm

กรมวิชาการเกษตร

สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* ได้สูงกว่าสารสกัดกระชายดำ ไพล และตะไคร้ อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อนำกากพืชมาแยกเยื่อ กากข่าและตะไคร้ให้ปริมาณเยื่อสูงถึง 24 และ 11% ตามลำดับ สามารถนำมาพัฒนาผลิตกระดาษได้ เมื่อนำเยื่อข่าและเยื่อตะไคร้ที่ฟอกขาวและไม่ฟอกขาวมาผลิตกระดาษ พบว่าสมบัติของกระดาษทั้งสองชนิดที่ฟอกขาวมีค่าความต้านแรงดึงขาด และ ค่าโมดุลัสของสภาพยืดหยุ่นสูงกว่ากระดาษที่ไม่ฟอก แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดของกากพืช พบว่า กระดาษเยื่อตะไคร้มีความแข็งแรงกว่า ทนต่อแรงดึงได้ดี มีความยืดหยุ่นสูงกว่า เมื่อนำกระดาษทั้งสองชนิดมาเคลือบสารสกัดพืช พบว่ากระดาษเยื่อข่าและกระดาษเยื่อตะไคร้ฟอกขาวและไม่ฟอกขาวที่เคลือบสารสกัดข่าเข้มข้นตั้งแต่ 60% ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่กระดาษเยื่อตะไคร้ฟอกขาวดูดซึมสารสกัดข่าได้ดีกว่า จึงนำกระดาษเยื่อตะไคร้ฟอกขาวที่เคลือบสารสกัดข่าความเข้มข้น 60 และ 70% มาห่อหุ้มพริกขี้หนูสดและแห้ง พบว่า กระดาษเคลือบสารสกัดดังกล่าว ไม่มีผลต่อการควบคุมเชื้อราและการเปลี่ยนสีในพริกขี้หนูสด ขณะที่กระดาษเคลือบสารสกัดข้างต้นห่อหุ้มพริกขี้หนู และบรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชะลอการเปลี่ยนสีของพริกแห้ง และลดปริมาณสารอะฟลาทอกซิน บี1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อรา อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของกระดาษเยื่อตะไคร้ฟอกขาวที่เคลือบสารสกัดข่าทั้งสองความเข้มข้นในการควบคุมเชื้อรา สารอะฟลาทอกซิน บี1 และการเปลี่ยนแปลงสีของพริกแห้งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ และการศึกษาสุดท้าย คือ การผลิตพริกแห้งคุณภาพเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและลดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษ โดยทำการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำคั้นกระเทียมสดต่อคุณภาพการเก็บรักษาพริกแห้ง วัตถุประสงค์ในการวิจัยนี้ เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารอะฟลาทอกซิน วางแผนการทดลองแบบ Split plot design พริกแห้งจากโรงอบพลังงานแสงอาทิตย์ มีความชื้น 12.88% ตรวจพบสารอะฟลาทอกซินเริ่มต้น 4.50 พีพีบี นำมาใช้ในการทดลองพริกแห้งคลุกด้วยน้ำคั้นกระเทียมสด ความเข้มข้น 0 50 และ 100% บรรจุในถุงพลาสติก PP ถุงซิปพลาสติกใส PE และถุงซิปเมทัลไลท์ เก็บที่อุณหภูมิห้อง พบว่า การคลุกพริกแห้งด้วยน้ำคั้นกระเทียมสด และชนิดของถุง ไม่มีผลต่อปริมาณสารอะฟลาทอกซิน แต่พริกแห้งที่บรรจุในถุงซิปเมทัลไลท์ มีค่าความชื้นเพิ่มขึ้นต่ำที่สุด 15.07% เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 4 เดือน ส่วนการทดสอบช่วงเวลาการสร้างสารอะฟลาทอกซิน ในพริกแห้งที่ใส่สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Aspergillus flavus* บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบปริมาณสารอะฟลาทอกซินสูงสุดเท่ากับ 45.89 พีพีบี

Abstract

The activity of utilization of plant extract to inhibit fungal growth and mycotoxins production was intended to select plant extracts that were effective in inhibiting *Aspergillus* and aflatoxin contamination in agricultural products. In this activity consisted of 3 experiments as follows:

Synthesized silver nanoparticles using plant extracts for controlling fungi growth and toxin production was tested by using various concentrations of Zingiberaceae extract

ลิขสิทธิ์การเกษตร

to reduce the particle size of silver. The factors affected to synthesize silver nanoparticles i.e., concentration and ratio of silver nitrate solution (AgNO3) to plant extract content, temperature and incubation time for the nanoparticles synthesis. The 60% of silver nitrate ($AgNO_3$) solution at concentration at 4.0 mM was appropriately mixed with 40% of plant extract and heated at 95°C for 20-30 minutes could form the small silver particles. However, only extracts of *Zingiber cassumunar*, *Curcuma zedoaria* and *Curcuma longa* showed efficacy to synthesize the smaller particles. Sizes of obtained particles were between 80 and 300 nanometers. At concentration of 40,000 ppm of the silver particles could control growth and toxin production of *Aspergillus flavus* and *A. niger*.

The development of paper made from herbal plant residues for controlling fungi contamination in agricultural produces and products was conducted. Residue of rhizomes of galangal, kra chai dum, plai, and lemongrass from extracting processes were individually studied as alternative raw material to pulping and paper production. Effectiveness of crude galangal extract (200 ppm) to control *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* was significantly greater than other crude extracts. Pulp yield of galangal and lemongrass residues were 24 and 11%, respectively. Paper made from bleached galangal and lemongrass pulp showed higher tensile strength and elasticity than non-bleached pulp. However, strength and elasticity of bleached lemongrass pulp paper were significantly higher than paper made from bleached galangal pulp. All paper treated with at least 60% concentration of extract significantly inhibited growth of *A. flavus* and *A. niger* compared to paper coated with either water or ethanol (control groups). Galangal extract absorbed to bleached lemongrass pulp paper higher than other paper. Afterward, fresh and dry chilli were wrapped with bleached lemongrass pulp paper coated with galangal extract at 60-70% concentration before being packed in plastic bags (for fresh chilli) and aluminium foil bags (for dry chilli) to determine the contamination of fungi, aflatoxin B1 and colour deterioration during 1 and 4 weeks storage, respectively. The papers did not affect to colour and fungus growth in wrapped fresh chilli comparing to chilli without paper wrapping. Whilst, dry chilli wrapped with paper coated with at least 60% galangal extract significantly contained lower concentration of aflatoxin B1 and caused small deterioration of colour compared to chilli wrapped with uncoated paper and without wrapping paper (foil bag alone).

In experiment 3.3, Producing quality of dried chili to extend shelf life and reduce fungi and toxin contamination was tested by using efficacy of fresh garlic juice on the storage quality of dried chili. The aim of this research was to reduce the contamination of

fungi and aflatoxin. The experimental design was split-plot. The dried chili from the solar drying house has 12.88% moisture content, initial aflatoxin was detected at 4.50 ppb and used in the experiment. Dried chilies mixed with fresh garlic juice at 0, 50, and 100% concentrations are packed in PP plastic bags, PE plastic zipper bags, and metalite zipper bags, stored at room temperature for 4 months. It was found that mixing dried chilies with fresh garlic juice and type of storage bag did not affect the aflatoxin content. However, the dried chili contained in the metalite zipper bag has a low moisture content of 15.07%. It can prevent the penetration of moisture well. The dried chili with spore suspension of *Aspergillus flavus* incubated for 48 hours showed the highest aflatoxin content of 45.89 ppb.

บทนำ

การใช้สารสกัดจากพืช เช่น สารสกัด กระชายดำ ไพล ปุดสิงห์ ข่า พริกไทย และกระเทียม เป็นวิธีการควบคุมเชื้อราและแบคทีเรียที่ปลอดภัย เป็นทางเลือกที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค อย่างไรก็ตาม การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพืชที่ผ่านมา มุ่งเน้นผลของสารออกฤทธิ์ในการรักษาหรือบรรเทาอาการเจ็บป่วยในสัตว์และมนุษย์ แต่ยังไม่มีผลการศึกษารายงานถึงชนิด ความเข้มข้น และกลไกการทำงานของสารสำคัญในพืชเหล่านี้ รวมถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *A. flavus* รวมถึงการทำลายสารโอคราทอกซินและแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร หากสามารถเข้าใจวิธีการทำงานของสารสำคัญจากสารสกัดพืช จะสามารถนำสารสำคัญเหล่านี้ไปพัฒนาเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ในการควบคุมเชื้อรา และลดการปนเปื้อนโอคราทอกซิน ที่สามารถใช้ได้สะดวก รวดเร็วและปลอดภัยต่อผู้บริโภค ทั้งในระดับครัวเรือนหรืออุตสาหกรรม การนำสารสกัดพืชประยุต์ใช้กับเทคโนโลยีบางชนิดอาจสามารถลดปัญหาดังกล่าวได้ วิธีการทางนาโนเทคโนโลยีกำลังได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของวัตถุหลายชนิดในทางการแพทย์ เภสัชศาสตร์ วิศวกรรม ชีววิทยา รวมถึงเกษตรกรรม การพัฒนาอนุภาคนาโน (nanoparticles) ของสารสกัดพืชอาจเป็นวิธีการนำสารสกัดพืชสมุนไพรไปใช้ควบคุมเชื้อราและสารพิษในผลิตผลเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำไปต่อยอดเพื่อพัฒนาวัสดุบรรจุภัณฑ์สำหรับผลิตผลเกษตร โดยเฉพาะกลุ่มที่มีมูลค่าสูง เช่น สมุนไพรแห้งสำหรับสุคนธบำบัด และผลไม้อบแห้ง เป็นต้น อย่างไรก็ตามปัญหาที่พบในการนำสารสกัดไปใช้กับผลิตผลเกษตร คือ ลักษณะของผลิตผลถูกรบกวนด้วยสีและกลิ่นของสารสกัด ยกตัวอย่างถั่วลิสงที่เคลือบด้วยสารสกัดกระชายดำ ทำให้สีของถั่วลิสงเป็นสีม่วงคล้ำของกระชายดำ หรือถั่วลิสงที่เคลือบด้วยสารสกัดปุดสิงห์ มีผิวเงางาม แต่มีกลิ่นคล้ายกับแมงดา ดังนั้นจึงควรพัฒนาวิธีการประยุกต์ใช้สารสกัดพืชเพื่อควบคุมเชื้อราและสารพิษในผลิตผลเกษตร

จากกระบวนการสกัดสารสำคัญจากส่วนต่าง ๆ ของพืชสมุนไพร เช่น เหง้าข่า ไพล กระชายดำ และต้นตะไคร้ กากพืชที่เหลือจากการสกัดสารดังกล่าวยังมีประโยชน์ นอกจากจะประกอบด้วยสารสำคัญที่เหลือจากการสกัดแล้ว ยังประกอบด้วยเส้นใยจำนวนมาก เส้นใยจากเศษวัสดุพืชถูกพัฒนาให้เป็นประโยชน์หลาย

กรมวิชาการเกษตร

ด้าน เช่น ปุ๋ย และบรรจุภัณฑ์ ซึ่งวัสดุบรรจุภัณฑ์และบรรจุภัณฑ์มีบทบาทอย่างมากในการควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตผลเกษตรตลอดโซ่อุปทาน แต่การใช้บรรจุภัณฑ์อย่างไม่เหมาะสม ได้ถูกยกขึ้นเป็นปัญหาในการเพิ่มปริมาณขยะ ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม วัสดุบรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ (degradable packaging material) จึงถูกพัฒนาและได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น การเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราและสารพิษให้กับวัสดุบรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ เช่น การเติมสารสกัดพืชที่สามารถลดปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษ จะลดปัญหาการเน่าเสียในผลิตผลเกษตร เพิ่มอายุการวางจำหน่าย และมีความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค โดยบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหารแห้งที่ดีควรมีคุณสมบัติ ดังนี้ 1. สามารถป้องกันความชื้น ควรมีค่าอัตราการดูดซึมกลับความชื้นต่ำ 2. สามารถป้องกันอากาศ โดยเฉพาะออกซิเจน จะต้องป้องกันก๊าซออกซิเจนจากสภาวะอากาศรอบๆ ผ่านเข้าไปในภาชนะบรรจุ และ 3. มีความทนทานต่อการกดหรือการกระแทกได้ดี เนื่องจากเนื้ออาหารแห้งมักแข็ง เปราะ แตกง่าย และมีส่วนแหลมคมสามารถทิ่มแทงภาชนะบรรจุได้ ดังนั้นกิจกรรมนี้จึงศึกษาประโยชน์ของสารสกัดจากพืชเพื่อนำมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* ที่สร้างสารพิษที่เป็นอันตรายในผลิตผลเกษตร พร้อมทั้งนำมาประยุกต์ใช้พัฒนาเป็นบรรจุภัณฑ์ที่ลดการปนเปื้อนเชื้อราและย่อยสลายได้ง่ายซึ่งดีต่อทั้งผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม

การทบทวนวรรณกรรม

นอกจากเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราและสารพิษแล้ว ยังมีรายงานวิจัยหลายฉบับพบว่าพืชสมุนไพร (medicinal plants) หลายชนิดมีสารสำคัญที่กำจัดเชื้อราได้ เช่น สารสกัดจากกานพลู กระเทียม ข่า ตะไคร้ กระชายดำและกะเพรา (อมรา และคณะ, 2553) โดย Abd El-Khalek (2013) รายงานว่าสารสกัดพืช เช่น สารสกัดผักชีลาว (dill) ด้วยเอธานอล 90% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. carbonarius* และ ยับยั้งการผลิตสารโอคราทอกซินเอ 83 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีผลการศึกษาโดย Yenchai *et al*. (2004) พบว่าสารสำคัญในเหง้ากระชายดำ คือ borneol, sylvestrene, 5,7- dimetho-xyflavone (5,7 DMF) และฟลาโวนอยด์ 9 ชนิด เช่น สาร 5,7,4’-trimethoxyflavone และ 3,5,7,4’–tetramethoxyflavone เป็นต้น ซึ่งมีฤทธิ์ในการขยายหลอดเลือดแดง (ในหนูทดลอง) ต้านการอักเสบ และต้านจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามการวิจัยที่ผ่านมามุ่งเน้นผลของสารออกฤทธิ์ในการรักษา หรือบรรเทาอาการเจ็บป่วยในสัตว์หรือมนุษย์ แต่ยังไม่มีผลการศึกษารายงานถึงชนิด ความเข้มข้น และกลไกการทำงานของสารสำคัญในพืชสมุนไพร รวมถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *A. niger* และ *A. carbonarius* และการทำลายสาร OTA ในผลิตผลเกษตร หากสามารถเข้าใจวิธีการทำงานของสารสำคัญจากสารสกัดพืช จะสามารถนำสารสำคัญเหล่านี้ไปพัฒนาเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ในการควบคุมเชื้อรา *A. niger* และ *A. carbonarius* และลดการปนเปื้อนสาร OTA ที่สามารถใช้ได้สะดวก รวดเร็วและเพิ่มความปลอดภัยให้แก่ผู้บริโภค

การประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนด้วยสารสกัดพืช (plant-mediated silver nanoparticles) มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เช่น การใช้ silver nanoparticles พร้อมกับสารสกัดคาโมมาย (chamomile plant) ควบคุมการเจริญของเชื้อ *E. coli* (Azizinezhad *et al*., 2014) และการพัฒนา silver nanoparticles ร่วมกับสารสกัดจากเปลือก *Syzygium cumimi* ในการควบคุมเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ

กรมวิชาการเกษตร

Bacillus licheniformis ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และพร้อมนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมยา อาหาร และเครื่องสำอาง (Prasad *et al*., 2013) นอกจากนี้ Prashanth *et al*. (2011) รายงานการพัฒนาอนุภาคนาโนเงินร่วมกับสารสกัด vasambu ในการควบคุมแบคทีเรียและเชื้อรา พบว่าสามารถควบคุมแบคทีเรีย เช่น *E. coli* ได้ดี แต่ควบคุมเชื้อรา เช่น *Fusarium oxysporum* ได้เพียงเล็กน้อย

ปัจจุบันมีการศึกษาผลข้างเคียงจาก Ag-NPs ต่อมนุษย์และสัตว์ (*in vivo*) พบว่าอนุภาคนี้สามารถเข้าสู่ร่างกายได้ทางการหายใจ ปากและผิวหนัง โดย Ji *et al*. (2007) รายงานว่าหนูที่สูดดม Ag-NPs 4 สัปดาห์ สัปดาห์ละ 5 วัน วันละ 6 ชั่วโมง มีน้ำหนักตัว ฮีโมโกบิล และสารต่างๆ ในเลือดไม่ต่างจากหนูกลุ่มที่ไม่ได้รับ Ag-NPs นอกจากนี้ Kim *et al*. (2008) ทดสอบให้ Ag-NPs กับหนู (ทางปาก) เป็นเวลา 28 วัน พบว่าปริมาณของ Ag-NPs ไม่มีผลกับน้ำหนักตัวหนู แต่ปริมาณ Ag-NPs มีผลต่อ alkaline phospahe และคลอเรสเตอรอลในเลือดหนู สำหรับการทดลองในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*)

กากพืชที่เหลือจากการสกัดยังคงประกอบด้วยสารสำคัญในปริมาณสูง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ กากพืชเหล่านี้ซึ่งมีส่วนประกอบของเซลลูโลส เพคติน และเส้นใย ซึ่งอาจนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตวัสดุบรรจุภัณฑ์ เช่น กระดาษ หรือพลาสติกฟิล์มชีวภาพ ซึ่งจะเป็นการลดขยะและไม่ก่อปัญหาสิ่งแวดล้อม นอกจากสารสำคัญที่เหลือในกากพืชสมุนไพรแล้ว การเสริมฤทธิ์ให้กับวัสดุบรรจุภัณฑ์อาจทำได้โดยการเติมสารสกัดหยาบลงในวัสดุบรรจุภัณฑ์ด้วยวิธีการเคลือบผิว ซึ่งจะช่วยให้บรรจุภัณฑ์นั้นสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษในผลิตผลเกษตรหลายชนิดได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น การใช้สารสกัดหยาบอบเชยเป็นส่วนผสมใน active packaging paper ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของวัสดุบรรจุภัณฑ์เพื่อลดการเน่าเสียของอาหารที่เกิดจากเชื้อ *Rhizopusstolonifer* sp. (Rodríguez *et al*., 2008) เป็นต้น การพัฒนาวัสดุบรรจุภัณฑ์ที่ได้จากพืชสมุนไพรท้องถิ่นของไทย เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรและยังช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษในผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์ เช่น ผักผลไม้สดเพื่อส่งออก และผลไม้อบแห้ง เป็นการเพิ่มความปลอดภัยให้แก่ผู้บริโภค

จากการศึกษาของ อัจฉรา (2543) ในสมุนไพรตากแห้ง พบมีการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. niger* มากที่สุด และสารอะฟลาทอกซินในสมุนไพร ทั้ง 50 ชนิด เช่นเดียวกับ Tassaneeyakul *et al*. (2004) พบการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์สมุนไพรอบแห้ง 5 ชนิด มีค่าอยู่ระหว่าง 1.7-14.3 มิลลิกรัมต่อกรัม ผลิตผลเกษตรทั้งแบบแห้งและแปรรูป มักพบการปนเปื้อนของเชื้อรากลุ่ม *Aspergiillus* ที่พบบ่อยได้แก่ *A. niger* และ *A. flavus* ในปี 2555 อมราและคณะ รายงานการใช้น้ำคั้นกระเทียมควบคุมเชื้อรา *A. flavus* ในพริกแห้ง โดยนำพริกสดเม็ดใหญ่ชุบในน้ำคั้นกระเทียมความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนนำไปอบแห้งและเก็บรักษานาน 4 เดือน พบว่า พริกแห้งที่ชุบน้ำคั้นกระเทียมมีการปนเปื้อนของเชื้อราและสารแอฟลาทอกซินน้อยกว่าพริกกลุ่มที่ไม่ชุบน้ำกระเทียมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าสารจากพืชสามารถควบคุมเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราได้

สารแอลลิซิน (allicin หรือ diallyl thiosulfinate) เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของกระเทียมที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพต่าง ๆ สารแอลลิซิน ในกระเทียมอยู่ในรูปของสารแอลลิอิน ซึ่งสารเป็นสารตั้งต้น เมื่อกระเทียมสด ถูกบด หรือผ่านกระบวนการแปรรูป เอนไซม์แอลลิเนสจะถูกปลดปล่อยออกมาจากภายในแวคิวโอลของเซลล์ มีกลไกในการเปลี่ยนสารแอลลิอินให้กลายเป็นสารแอลลิ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ซิน (Feldberg *et al*. 1988; Ankri and Mirelman 1999; Curtis *et al*. 2004; Yabaya *et al.* 2010) ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารแอลลิซินในกระเทียมที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิด รวมทั้งเชื้อรา *A. flavus* (Bilgrami *et al*. 1992; Sandosskumar et al. 2007) บุญญวดี และคณะ (2558) รายงานประสิทธิภาพของน้ำคั้นกระเทียม ความเข้มข้น 2.5% ขึ้นไป สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. flavus* ได้สมบูรณ์ เมื่อนำพริกป่นมาคลุกกับน้ำคั้นกระเทียม ความเข้มข้น 100 และ 75% สามารถลดปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนอยู่ในพริกป่นได้ 73.67 และ 69.71% ตามลำดับ

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. การพัฒนาอนุภาคนาโนของสารสกัดพืชในการควบคุมเชื้อราและสารพิษ

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2558 - กันยายน 2561

สถานที่ทำการทดลอง กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

1.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

1.1.1 การเตรียมตัวอย่างพืชสด

ทำความสะอาดเหง้าข่า กระชายดำ ไพล ขมิ้นอ้อย และขมิ้นชันด้วยน้ำกลั่น ผึ่งให้แห้ง หั่นตัวอย่างเป็นชิ้นบางประมาณ 0.5 ซม. หากยังไม่ใช้ตัวอย่างพืชที่ได้ไปทดสอบในทันที ให้นำตัวอย่างพืชเก็บรักษาในถุงพลาสติกแบบมีซิป ไล่อากาศออกจากถุง และเก็บในตู้แช่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

1.1.2 การเตรียมตัวอย่างพืชอบแห้ง

ทำความสะอาดเหง้ากระชายดำ ไพล ข่า ขมิ้นอ้อย และขมิ้นชันด้วยน้ำกลั่น ผึ่งให้แห้ง หั่นตัวอย่างเป็นชิ้นบางประมาณ 0.5 ซม. นำตัวอย่างพืชทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 55-60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปสกัดด้วยน้ำกลั่น หรือเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

1.2 การเตรียมสารสกัดพืช (plant extract)

1.2.1 การเตรียมสารสกัดพืชจากตัวอย่างสด

นำตัวอย่างพืช (ทีละชนิด) ปริมาณ 50 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C ต่อเนื่องเป็นเวลา 20 นาที ปล่อยให้อุณหภูมิลดลง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 และกระดาษ GF/A ตามลำดับ นำไปใช้ทดสอบในขั้นต่อไป หรือเก็บสารกรองที่ได้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการทดสอบขั้นต่อไป

1.2.2 จากตัวอย่างแห้ง

นำตัวอย่างพืช (ทีละชนิด) ปริมาณ 50 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,200 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C ต่อเนื่องเป็นเวลา 20 นาที ปล่อยให้อุณหภูมิลดลง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 และกระดาษ GF/A ตามลำดับ นำไปใช้ทดสอบในขั้นต่อไป หรือเก็บสารกรองที่ได้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการทดสอบขั้นต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

1.3 การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดพืชและซิลเวอร์ไนเตรต ($AgNO_3$) ร่วมกับอุณหภูมิและระยะเวลา ทำการทดลองหาสัดส่วนระหว่างสารสกัดพืช และ $AgNO_3$ เนื่องจากคุณสมบัติของสารสกัดพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน จึงต้องทดสอบสัดส่วนของสารสกัดพืชและ $AgNO_3$ ใน อัตราส่วนต่าง ๆ เพื่อหาอัตราส่วนของสารที่เหมาะสม (ตารางที่ 1) หลังจากเติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตลงไปในสารสกัดพืชแต่ละชนิด สารละลายถูกให้ความร้อนด้วย water bath อุณหภูมิ 75-95°C นาน 20-120 นาที (ขึ้นอยู่กับชนิดตัวอย่างพืช) จากนั้นจะนำไปทดสอบคุณสมบัติอนุภาคนาโนต่อไป

ตารางที่ 1 ปริมาตรและความเข้มข้นสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทต่อปริมาตรของสารสกัดพืช โดยใช้ทดสอบในแต่ละตัวอย่างพืช

ตัวอย่างที่	สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$)		สารสกัดพืช
	ความเข้มข้น (mM)	ปริมาตร (mL)	ปริมาตร (mL)
1	0.1	9.5	0.5
2	0.1	9.0	1.0
3	0.1	8.0	2.0
4	0.1	6.0	4.0
5	0.5	9.5	0.5
6	0.5	9.0	1.0
7	0.5	8.0	2.0
8	0.5	6.0	4.0
9	1.0	9.5	0.5
10	1.0	9.0	1.0
11	1.0	8.0	2.0
12	1.0	6.0	4.0
13	2.0	9.5	0.5
14	2.0	9.0	1.0
15	2.0	8.0	2.0
16	4.0	6.0	4.0
17	4.0	9.5	0.5
18	4.0	9.0	1.0
19	4.0	8.0	2.0
20	4.0	6.0	4.0

กรมวิทยาศาสตร์

1.4 การทดสอบคุณสมบัติของอนุภาคนาโน

หลังจากบ่มใน water bath นำสารละลายที่ได้ ไปตรวจสอบคุณสมบัติของการเป็นอนุภาคนาโน โดยทดสอบ

1.4.1 ทดสอบการดูดกลืนแสงของสารละลาย

สารละลาย $AgNO_3$ ทำปฏิกิริยากับสารสกัดพืช ทำให้เกิดสารละลายสีน้ำตาล การเกิดสารละลายสีน้ำตาลเป็นคุณสมบัติหนึ่งของการสังเคราะห์อนุภาคนาโน นำสารละลายที่ได้ปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25°C นาน 20 นาที นำสารละลายส่วนใสทิ้ง เพื่อกำจัด $AgNO_3$ ส่วนเกินที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารสกัดพืช จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปในหลอดทดลองที่ยังมีตะกอน (pellets) และเขย่าให้เข้ากัน (Priya *et al*., 2014) ถ้าสีของสารละลายมีสีเหลืองอัมพันถึงสีน้ำตาลแดง แสดงคุณสมบัติเบื้องต้นของสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน ตรวจสอบค่าดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ หากอยู่ในช่วง 400-450 nm แสดงถึงคุณสมบัติเบื้องต้นของการเกิดอนุภาคซิลเวอร์นาโน

1.4.2 การวัดขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโน

นำตัวอย่างสารละลายที่มีค่าดูดกลืนแสงที่ช่วง 400-450 nm ไปเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจสอบขนาดและรูปร่างของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ได้ โดยนำสารละลายปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm/นาที อุณหภูมิ 25 °C นาน 45 นาที จำนวน 2 ครั้ง นำส่วนตะกอนของสารละลายที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง เข้าเครื่อง sonicate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที และทำให้เป็นแผ่นแห้งบน mica-based glass slide ก่อนนำไปวัดขนาดและรูปร่างของอนุภาคด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscopy

1.5 การทดสอบประสิทธิภาพอนุภาคนาโนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

1.5.1 การเตรียมเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus niger*

เตรียมเชื้อราทั้งสองชนิดโดยวิธีการเพาะเมล็ดธัญพืชบนกระดาษชื้น (Blotter method) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30°C) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยเขี่ยเส้นใยของเชื้อราที่เจริญบนเมล็ดนำมาวางบนอาหาร PDA และบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จำแนกเชื้อราที่แยกได้แล้วคัดเลือกไอโซเลตที่เป็น *A. flavus* และ *A. niger* เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

1.5.2 ทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนในการยับยั้งเชื้อราและการสร้างสารพิษ

นำตัวอย่างตะกอนที่ได้จากการทดสอบข้อ 4.2 ผสมในอาหาร PDA โดยให้อนุภาคซิลเวอร์นาโนของสารสกัดพืชแต่ละชนิดมีความเข้มข้น 20,000 30,000 และ 40,000 ppm ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร หยด spore suspension ของเชื้อราแต่ละชนิด (ความเข้มข้น 10^6 spore/mL) ปริมาตร 1 µL บนอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3 วัน จำนวน 3 ซ้ำต่อกรรมวิธี วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ เชื้อราดังนี้

$$\text{การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (\%)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A คือ ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA

B คือ ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมอนุภาคซิลเวอร์นาโน

กรมวิทยาศาสตร์

2. การพัฒนากระดาษจากกากพืชสมุนไพรร่วมกับสารสกัดหยาบสมุนไพรเพื่อใช้ควบคุมการปนเปื้อนเชื้อราในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวและผลิตภัณฑ์

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

2.1 การเตรียมสารสกัดพืช

เตรียมสารสกัดหยาบจากพืช 4 ชนิด ไดแก กระชายดำ ขา ไพล และ ตะไคร้ สกัดดวยเอทานอล โดยนำพืชสมุนไพรแหงหั่นชิ้น แชในเอทานอล (อัตราพืชสมุนไพร 1 ส่วนต่อเอทานอล 5 ส่วน) เปนเวลา 72 ชั่วโมง กรองแยกกาก ระเหยตัวทำละลายดวยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน และทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดหยาบสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* โดยเตรียมสารแขวนลอยของสปอรความเข่มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยหาคาความเข้มข่นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อรา (Minimum Inhibitory Concentration: MIC)

2.2 การเตรียมกระดาษ การเคลือบกระดาษ และการทดสอบประสิทธิภาพกระดาษ

2.2.1 การเตรียมกระดาษ

การเตรียมกระดาษดัดแปลงจากวิธีการของ ศิริพรและคณะ (2556) โดยนำกากพืชสมุนไพร ได้แก่ กากของเหง้าข่า กระชายดำ ไพล และต้นตะไคร้ ที่ผ่านกระบวนการสกัดสารสำคัญแล้ว ต้มด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 เท่าของน้ำหนักตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 80-90°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองเยื่อแล้วล้างด้วยน้ำสะอาดจนไม่มีฟอง ต้มภายใต้สภาวะเดิมซ้ำอีกครั้ง นำไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55°C ได้เส้นใยแห้งที่ไม่ฟอกขาว สำหรับการผลิตเส้นใยฟอกขาว ผลิตโดยนำเยื่อใยพืชที่ได้ไปฟอกด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 30% เติมโซเดียมซิลิเกต และแมกนีเซียมซัลเฟต ปริมาณ 2.0 และ 0.05% โดยน้ำหนักตัวอย่าง ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้เป็นด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ต้มที่อุณหภูมิ 80-90°C เป็นเวลา 20 นาที ล้างเยื่อด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำเยื่อที่ได้ไปทำให้แห้ง และเลือกเยื่อแห้งที่ได้จากกากพืชที่ให้ผลผลิตเยื่อสูง (Total pulp yield) เพื่อไปขึ้นรูปกระดาษ 60 แกรม โดยใช้เยื่อแห้ง 1.26 กรัม แช่น้ำให้ท่วม (ประมาณ 100-150 มิลลิลิตร) นานประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นเทเยื่อที่แช่น้ำใส่เครื่องปั่นอเนกประสงค์ เติมน้ำ 1 ลิตร ปั่นนาน 3 นาที จากนั้นเทน้ำเยื่อใส่ลงเครื่องขึ้นรูปกระดาษและเครื่องอัดกระดาษ นำกระดาษมาตาก (พร้อมแผ่นอลูมิเนียมที่ใช้ระหว่างขึ้นรูปและอัดกระดาษ) เพื่อลดความชื้น เมื่อกระดาษแห้งแล้ว นำไปทดสอบสมบัติของกระดาษต่อไป

2.2.2 การทดสอบสมบัติของกระดาษ นำกระดาษจากข้อ 2.2.1 (จำนวนตัวอย่างกระดาษ 10 ซ้ำ) ทดสอบสมบัติตามมาตรฐาน ดังนี้

1).ความต้านแรงดึงขาด (Tensile Strength) ตามมาตรฐาน ASTM D 828-97 (Standard Test Method for Tensile Properties of Paper and Paperboard Using Constant-Rate-of-Elongation Apparatus)

2). การยืดตัว ณ จุดขาด (Elongation at Break) ตามมาตรฐาน ASTM D 828-97

กรมวิชาการเกษตร

3). ค่าโมดุลัสของสภาพยืดหยุ่น (Modulus of Elasticity) หรือค่าความเค้นที่ทำให้วัสดุยืดตัวตามที่กำหนด ตามมาตรฐาน ASTM D 828-97

4). ค่าการซึมผ่านของอากาศ (Air Permeability) ด้วย Gurley Type Densometer ตามมาตรฐาน TAPPI T460 om-96 (Air Resistance of Paper (Gurley Method))

5). ความหนา (Thickness) ตามมาตรฐาน TAPPI T410 om-89

6). ความชื้น (Moisture content) ตามมาตรฐาน TAPPI T411-om-89

7). น้ำหนักมาตรฐานของกระดาษ (Basis Weight) ดัดแปลงตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก.170-2550

เปรียบเทียบสมบัติกระดาษแต่ละชนิดทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (P=0.05)

2.2.3 การเคลือบกระดาษด้วยสารสกัดพืชและการทดสอบประสิทธิภาพกระดาษเคลือบใน การควบคุมเชื้อรา

คัดเลือกสารสกัดพืชที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราจากการทดลองหัวข้อที่ 1 มาทดสอบเคลือบกระดาษที่ให้เยื่อคุณภาพดี (จากการทดลองหัวข้อที่ 2.1-2.2) โดยศึกษาการเคลือบสารสกัดพืชที่ความเข้มข้นและปริมาตรแตกต่างกัน ด้วยการระบายสารสกัดพืชด้วยพู่กัน วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 11 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	กระดาษไม่เคลือบสารสกัดหยาบ จุ่มน้ำกลั่น
กรรมวิธีที่ 2	กระดาษไม่เคลือบสารสกัดหยาบ จุ่มเอทานอล เข้มข้น 100%
กรรมวิธีที่ 3	กระดาษเคลือบสารสกัดหยาบ 50% ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 4	กระดาษเคลือบสารสกัดหยาบ 50% ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 5	กระดาษเคลือบสารสกัดหยาบ 50% ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 6	กระดาษเคลือบสารสกัดหยาบ 60% ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 7	กระดาษเคลือบสารสกัดหยาบ 60% ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 8	กระดาษเคลือบสารสกัดหยาบ 60% ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 9	กระดาษเคลือบสารสกัดหยาบ 70% ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 10	กระดาษเคลือบสารสกัดหยาบ 70% ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 11	กระดาษเคลือบสารสกัดหยาบ 70% ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *A. niger* และ *A. flavus* ของกระดาษเคลือบสารสกัดหยาบพืช ทดสอบดวยวิธี disc diffusion method โดยใชแผนกระดาษที่เคลือบสารสกัดพืชขนาด 1.0 x 1.0 เซนติเมตร วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เกลี่ยสารแขวนลอยของสปอรเชื้อรา *A. niger* และ *A. flavus* ความเขมขน 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 33±1°C) เปนเวลา 3 วัน ตัวอยางควบคุม คือ กระดาษจากกากพืชที่ไม่เคลือบสารสกัดหยาบพืช แต่จุ่มน้ำกลั่นหรือเอทานอล ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ

2.3 การทดสอบกระดาษในการควบคุมเชื้อราในผลิตผลเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

นำกระดาษที่ให้ผลดีในการเคลือบสารสกัดพืช (ผลจากการทดลองข้อ 2.3) มาห่อหุ้มผลิตผลเกษตร ได้แก่ พริกขี้หนูผลสด และผลิตภัณฑ์ ได้แก่ พริกขี้หนูแห้ง วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำ ดังนี้

<u>พริกขี้หนูผลสด</u>

กรรมวิธีที่ 1 พริกไม่ห่อหุ้มกระดาษ บรรจุในถุงพลาสติก

กรรมวิธีที่ 2 พริกห่อหุ้มด้วยกระดาษไม่เคลือบสารสกัดพืช บรรจุในถุงพลาสติก

กรรมวิธีที่ 3 พริกห่อหุ้มด้วยกระดาษเคลือบสารสกัดพืชเข้มข้น 60% บรรจุในถุงพลาสติก

กรรมวิธีที่ 4 พริกห่อหุ้มด้วยกระดาษเคลือบสารสกัดพืชเข้มข้น 70% บรรจุในถุงพลาสติก

เก็บรักษาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 13±2°C วัดคุณภาพของพริก โดยตรวจวัดสี การปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus* spp. และสารแอฟลาทอกซินด้วยชุดตรวจสอบ DOA ELISA Test Kit

<u>พริกขี้หนูแห้ง</u>

กรรมวิธีที่ 1 พริกไม่ห่อหุ้มกระดาษ บรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์

กรรมวิธีที่ 2 พริกห่อหุ้มด้วยกระดาษไม่เคลือบสารสกัดพืช บรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์

กรรมวิธีที่ 3 พริกห่อหุ้มด้วยกระดาษเคลือบสารสกัดพืชเข้มข้น 60% บรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์

กรรมวิธีที่ 4 พริกห่อหุ้มด้วยกระดาษเคลือบสารสกัดพืชเข้มข้น 70% บรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์

เก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 33±1°C) วัดคุณภาพของพริกแห้ง โดยตรวจวัดสี การปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus* spp. และสารแอฟลาทอกซินด้วยชุดตรวจสอบ DOA ELISA Test Kit

3. การผลิตพริกแห้งคุณภาพเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและลดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษ

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

3.1 การเตรียมพริกแห้ง

พริกขี้หนูแดงเก็บเกี่ยวจากแปลงเกษตรกร คัดเลือกผลเน่าเสียทิ้ง ล้างน้ำทำความสะอาด เด็ดขั้ว ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ ตากในโรงอบพลังงานแสงอาทิตย์

3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำคั้นกระเทียมต่อคุณภาพการเก็บรักษาพริกแห้ง

วางแผนการทดลองแบบ Split-plot design จำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 70 กรัม

Main plot = 3x3 Factorial จัดเรียงแบบ RCB

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นน้ำคั้นกระเทียมสด 3 ระดับ คือ 0 50 และ 100%

ปัจจัยที่ 2 ถุง 3 ชนิด คือ ถุงพลาสติก PP ถุงซิปพลาสติกใส PE และ ถุงซิปเมทัลไลท์หน้าใส

Sub plot = อายุการเก็บรักษา 4 ระดับ คือ 1 2 3 และ 4 เดือน

พริกแห้งจาก ข้อ1 แบ่งตัวอย่างพริกแห้งเป็น 3 ส่วน นำมาคลุกน้ำคั้นกระเทียม ความเข้มข้น 0 50 และ 100% ใช้อัตราส่วน พริกแห้ง 1 กิโลกรัมต่อน้ำคั้นกระเทียม 150 มิลลิลิตร ผึ่งให้แห้ง บรรจุ

กรมวิชาการเกษตร

ถุงพลาสติก PP ถุงซิปพลาสติกใส PE และถุงซิปเมทัลไลท์หน้าใส โดยชั่งน้ำหนักถุงละ 70 กรัม เก็บที่อุณหภูมิห้อง

<u>บันทึกผล</u> เมื่อครบกำหนดเวลาการเก็บรักษา 1 2 3 และ 4 เดือน

1. ค่าความชื้น (moisture content) ของพริกแห้ง นำตัวอย่างพริกแห้งปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นอาหาร วัดค่าความชื้นด้วยเครื่อง G-WON HITECH Model : GMK 308 ประเทศเกาหลี

2. การปนเปื้อนของเชื้อรา ตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อราในพริกแห้ง โดยวิธี Direct Plate Count Method สุ่มตัวอย่างวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ AFPA (Aspergillus flavus and parasiticus Agar) เก็บที่อุณหภูมิ ห้อง เป็นเวลา 7 วัน

3. การปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซิน โดยชุดตรวจสอบสำเร็จรูปของกรมวิชาการเกษตร (DOA ELISA Test Kit)

3.3 ทดสอบช่วงเวลาการสร้างสารอะฟลาทอกซินในพริกแห้งที่ปลูกเชื้อรา *A. flavus*

วางแผนการทดลองแบบ Split-plot design จัดเรียงแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำ

Main plot = 3 M1 = ชุดควบคุม (พริกแห้งไม่ใส่เชื้อ)
M2 = พริกแห้ง ใส่น้ำ (2 มล.)
M3 = พริกแห้ง ใส่เชื้อ *A. flavus* (2 มล.)

Sub plot = 3 เวลา คือ ระยะเวลาที่บ่มเชื้อ 24 48 และ 72 ชั่วโมง

พริกแห้งนำมาชั่งน้ำหนักถุงละ 100 กรัม ใส่ถุงพลาสติกโพลีโพรพิลีน (PP) จำนวน 90 ถุง แบ่งเป็น 3 ส่วน ตามกรรมวิธี M1 = พริกแห้งไม่ใส่เชื้อ M2 = พริกแห้งใส่น้ำ และ M3 = พริกแห้งใส่สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา ปิดปากถุง บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตามเวลาที่กำหนด

<u>บันทึกผล</u> เมื่อครบกำหนด 24 48 และ 72 ชั่วโมง

ตรวจการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซิน โดยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป (DOA ELISA Test Kit)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การพัฒนาอนุภาคนาโนของสารสกัดพืชในการควบคุมเชื้อราและสารพิษ

ผลการสังเคราะห์อนุภาคนาโนด้วยสารสกัดจากข่าแห้ง พบว่า สารละลายระหว่าง $AgNO_3$ และสารสกัดข่าแห้งหมายเลข 4 9 และ 10 เปลี่ยนเป็นสีเหลืองถึงน้ำตาลแดง (แต่สีไม่เข้ม) โดยที่ช่วงความยาวคลื่น 400-450 nm มีค่าการดูดกลืนแสง 0.213, 0.397, 0.543 ตามลำดับ ซึ่งค่า ABS ที่ได้มีค่าต่ำ สารละลายที่ทำให้เกิดอนุภาคซิลเวอร์นาโน จะได้พีคที่ 430-450 nm พบว่าสารละลายตัวอย่างที่ 9 ให้ค่าดูดกลืนแสงที่ 445 nm สูงที่สุด แต่พีคยังค่อนข้างต่ำ จากการตรวจสอบวรรณกรรม การให้ความร้อนที่สูงขึ้นอาจจะช่วยเร่งปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดพืชและ $AgNO_3$ ผลของสารสกัดจากข่าสด สารละลายระหว่าง $AgNO_3$ และสารสกัดสด พบว่า ตัวอย่างที่ 9 และ 10 สีของสารละลายเปลี่ยนสีจากสีขาวขุ่นเป็นสีเหลืองอมน้ำตาล เมื่อหลังจากสารละลายถูกให้ความร้อนด้วย ที่อุณหภูมิ 75°C นาน 120 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25°C นาน 20 นาที เพื่อทดสอบการดูดกลืนแสงของสารละลาย

กรมวิชาการเกษตร

สารละลายระหว่าง $AgNO_3$ และสารสกัดข่าสดและข่าแห้ง มีระดับการดูดกลืนแสงในระดับต่ำ อาจเป็นผลจากสารสกัดข่ามีองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่กว่าร้อยละ 70 เป็นน้ำมันหอมระเหย รวมถึงสารกลุ่มเทอร์พีน คือ แคโรทีนอยด์ประมาณ 0.6-1.1 mg% และ แทนนิน 17.7 mg% สารประกอบเหล่านี้สามารถให้ไอออนแก่ซิลเวอร์ไอออนได้น้อย การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนจึงเกิดขึ้นได้ปริมาณน้อย การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนเกิดจากการผสมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท เข้ากับสารสกัดพืชเป็นตัวรีดิวซ์ ซึ่งสารที่จะช่วยให้เกิดปฏิกิริยาและให้ความคงตัวแก่อนุภาคนาโน ได้แก่ โปรตีน กรดอะมิโน เอนไซม์ อัลคาลอยด์ แทนนิน ฟินอล คีโตน อัลดีไฮด์ เอไมด์ กรดคาร์บอกซิลิก คาร์โบไฮเดรต ฟลาวอนอยด์ และวิตามินที่มีอยู่แล้วในสารสกัดจากพืช ซึ่งสารสกัดจากพืชประกอบด้วยกลุ่มอัลดีไฮด์ซึ่งมีหน้าที่ในการลดขนาดไอออนเงินลงให้เป็นอนุภาคขนาดนาโนเมตร ทดสอบหาสัดส่วนระหว่างสารละลาย $AgNO_3$ และสารสกัดข่าสดเพิ่มเติม โดยทดสอบบ่มที่อุณหภูมิ 95°C นาน 30 นาที พบว่าสารละลายหมายเลข 14 เปลี่ยนเป็นสีส้มแดงและมีตะกอน ขณะที่สารละลายหมายเลข 18 เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลส้ม อย่างไรก็ตามไม่มีสารละลายหมายเลขใดที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400-450 nm

การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยสารสกัดกระชายดำ พบว่า ลักษณะของสารละลายหลังจากบ่มที่ 75°C นาน 120 นาทีแล้ว พบว่าสีของสารละลายมีสีม่วงอ่อน ม่วงเข้ม และสีน้ำตาลอมม่วง ไม่ปรากฏพีคที่ 400-450 nm แสดงให้เห็นว่าสารละลายที่ได้ยังไม่มีไม่มีการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน นำสารสกัดกระชายดำสดมาทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างสารสกัดพืชและสารละลาย $AgNO_3$ (สารละลายหมายเลข 1-12) บ่มที่อุณหภูมิ 75°C นาน 120 นาที พบว่า สารละลายหมายเลข 4 และ 8 มีการเปลี่ยนสีของสารละลายเป็นสีม่วงอมน้ำตาล ซึ่งเป็นตัวอย่างมีการเปลี่ยนสีมากที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างหมายเลขอื่น ขณะที่สารละลายหมายเลข 9 10 11 และ12 เกิดตะกอนในสารละลายจำนวนมาก จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25°C นาน 20 นาที และทดสอบการดูดกลืนแสงในช่วง 400-450 nm สารละลายทั้ง 12 หมายเลขไม่ดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่นดังกล่าว

การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยสารสกัดไพลแห้ง ทดสอบอัตราส่วนระหว่างสารสกัดไพลแห้งและสารละลาย $AgNO_3$ บ่มที่อุณหภูมิ 75°C นาน 360 นาที พบว่า สารละลายหมายเลข 8 มีการเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองอัมพัน และสารละลายหมายเลข 12 เปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองอมน้ำตาลแดง หลังจากนำสารละลายทั้ง 12 หมายเลขปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25°C นาน 20 นาที และทดสอบการดูดกลืนแสงที่ 400-450 nm พบว่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm ในสารละลายหมายเลข 8

ผลของสารสกัดไพลสด ทดสอบอัตราส่วนระหว่างสารสกัดไพลสดและสารละลาย $AgNO_3$ ที่ความเข้มข้นและปริมาตรของสารละลายหมายเลข 16 และ 20 โดยปรับอุณหภูมิสำหรับบ่มให้เกิดปฏิกิริยาเป็น 95°C นาน 60 นาที จากการทดสอบพบว่า สารสกัดไพลสดเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอัมพัน เมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25°C นาน 20 นาที พบว่าสารละลายหมายเลข 16 และ 20 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 440 nm และได้กราฟที่มีพื้นที่ใต้กราฟขนาดใหญ่และค่อนข้างสมมาตร แสดงว่าอุณหภูมิบ่ม 95°C นาน 60 นาที มีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน และอนุภาคที่ได้มีขนาดเล็กและความเข้มข้นของสารละลาย $AgNO_3$ ที่เพิ่มขึ้นอาจจะช่วยเร่งปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดพืชและสารละลาย $AgNO_3$ ได้

กรมวิทยาศาสตร์

จากการทดสอบในสารสกัดไพล พบว่า พืชสดให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนได้ดีกว่าพืชอบแห้ง ดังนั้นในการทดสอบสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยสารสกัดขมิ้นอ้อย จึงนำขมิ้นอ้อยสดมาสกัด บ่มเพื่อเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95° C นาน 20 นาที พบว่าสีของสารละลายหมายเลข 1-20 มีการเปลี่ยนแปลงชัดเจน โดยเฉพาะสารละลายหมายเลข 11 12 16 และ 20 เปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองอำพันเข้ม หลังจากปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25°C นาน 20 นาที พบว่าสารละลายหมายเลข 16 และสารละลายหมายเลข 20 ให้ค่าการดูดกลืนแสง โดยหมายเลข 20 ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงที่สุด คือ 2.453 ที่ความยาวคลื่น 433 nm

การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยสารสกัดขมิ้นชัน ทดสอบอัตราส่วนระหว่างสารสกัดขมิ้นชันสดและสารละลาย $AgNO_3$ บ่มที่อุณหภูมิ 95° C นาน 25 นาที พบว่า สีของสารละลายมีการเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองอมน้ำตาล โดยเฉพาะสารละลายหมายเลข 4 8 และ 12 มีสีเหลืองเข้ม ซึ่งสัดส่วนของสารสกัดขมิ้นชัน 4 มิลลิตร กับสารละลาย $AgNO_3$ 6 มิลลิตร จึงได้เพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย $AgNO_3$ เป็น 2.0 และ4.0 mM พบว่าสารละลายหมายเลข 16 และ 20 สารสกัดขมิ้นชัน 4 มิลลิตร ร่วมกับสารละลาย $AgNO_3$ ความเข้มข้น 4.0 mM ปริมาตร 6 มิลลิตร สารสกัดทั้งสองตัวอย่างเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองอำพันเข้ม จากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25°C นาน 20 นาที และทดสอบการดูดกลืนแสง พบว่าสารละลายหมายเลข 16 มีค่าการดูดกลืนแสง 1.316 ที่ความยาวคลื่น 427.0 nm ขณะที่สารละลายหมายเลข 20 มีค่าการดูดกลืนแสง 1.457 ที่ ความยาวคลื่น 426.0 nm

การวัดขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโน โดยนำสารละลาย $AgNO_3$ ร่วมกับสารสกัดพืช ที่มีค่าดูดกลืนแสงสูงในช่วง 400-450 nm ได้แก่ สารละลายจากไพลหมายเลข 20 สารละลายจากขมิ้นอ้อยหมายเลข 20 และสารละลายขมิ้นชันหมายเลข 20 ไปตรวจวัดขนาดด้วยกล้องอิเลคตรอนกำลังขยายสูง (SEM) พบว่าอนุภาคเงินมีขนาดเล็กลง เมื่อเปรียบเทียบอนุภาคเงินในสารละลาย $AgNO_3$ เข้มข้น 4.0 mM และอนุภาคเงินจากสารละลายจากไพลหมายเลข 20 สารละลายจากขมิ้นอ้อยหมายเลข 20 และสารละลายขมิ้นชันหมายเลข 20 โดยอนุภาคเงินจากสารละลายขมิ้นอ้อยหมายเลข 20 มีลักษณะเป็นวงกลม ขนาดประมาณ 80-100 nm อนุภาคเงินจากสารละลายขมิ้นชันหมายเลข 20 มีลักษณะเป็นเหลี่ยม มีขนาดประมาณ 100-200 nm และ อนุภาคเงินจากสารละลายไพลหมายเลข 20 มีลักษณะเป็นรูปไข่ ขนาดอนุภาคประมาณ 200-300 nm ซึ่งขนาดและรูปร่างของอนุภาคนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและปริมาตรของสารละลาย $AgNO_3$ ชนิดและปริมาตรของสารสกัดพืช และอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์

ทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ได้จากสารสกัดขมิ้นอ้อย ขมิ้นชัน และไพลในการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* ใน PDA เพื่อวัดการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดขมิ้นอ้อย อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากขมิ้นชัน อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดไพล ที่ความเข้มข้น 40,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* มีการเจริญน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดขมิ้นอ้อย ขมิ้นชัน และไพล ที่ความเข้มข้นอื่น เมื่อนำเชื้อรา *A. flavus* ที่เจริญบนอาหารผสมอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดขมิ้นชันความเข้มข้น 40,000 ppm ไปส่องกล้องเสตอริโอ พบว่าก้านชูสปอร์ (conidiophore) ของ *A. flavus* มีลักษณะผิดปกติ ไม่มีสปอร์ที่ก้านชูสปอร์ อนุภาคนาโนเงินสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

เนื่องจากการรวมตัวของสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำหยุดการทำงานของกลุ่มซัลไฟดริลในผนังเซลล์เชื้อรา และไขมันเกิดการสลายภายในเซลล์

2. การพัฒนากระดาษจากกากพืชสมุนไพรร่วมกับสารสกัดหยาบสมุนไพรเพื่อใช้ควบคุมการปนเปื้อนเชื้อราในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวและผลิตภัณฑ์

ได้สารสกัดหยาบข่า กระชายดำ ไพล และตะไคร้ที่สกัดด้วยเอทานอล เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดแต่ละชนิดในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* พบว่าสารสกัดหยาบข่า 200 ppm (ความเข้มข้นต่ำสุด) สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดได้ 100% รองลงมาได้แก่ สารสกัดหยาบไพล เข้มข้น 9,000 ppm ยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* 86% และ *A. niger* 78% สารสกัดหยาบกระชายดำเข้มข้น 9,000 ppm ยับยั้ง *A. flavus* 84% และ *A. niger* 71% ขณะที่สารสกัดหยาบตะไคร้ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดได้เพียง 9% และ 0% ตามลำดับ อาจเนื่องจากสารสกัดหยาบตะไคร้ที่สกัดด้วยเอทานอลมีสารสำคัญ citronellal และ linalool ในปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ทำให้ประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อราลดลง

นำกากเหง้าข่า กากเหง้ากระชายดำ กากเหง้าไพล และกากตะไคร้ (ที่เหลือจากการสกัด) ใส่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โซดาไฟ) และให้ความร้อน เพื่อละลายลิกนิน เมื่อเส้นใยหรือเยื่อแยกออกจากกัน กำจัดโซดาไฟและล้างเส้นใยด้วยน้ำสะอาด จนเส้นใยไม่ลื่นมือ (โซดาไฟถูกชะล้างไป) หลังจากอบแห้งเส้นใยแต่ละชนิดที่ได้จะมีลักษณะเริ่มแรกเป็นสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม ผิวสัมผัสหยาบ จากนั้นนำเยื่อจากกากข่าและตะไคร้มาฟอกขาวด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 30% และเติมโซเดียมซิลิเกต (Na_2SiO_3) ปริมาณ 2% โดยน้ำหนักตัวอย่างแห้ง เพื่อช่วยคงสภาพ pH และทำให้เกิดความเสถียร H_2O_2 จึงไม่สลายตัวง่าย และเติมแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 0.05 % โดยน้ำหนักตัวอย่างแห้ง เพื่อทำให้ H_2O_2 อยู่ในรูป Inactive form ไม่ทำปฏิกิริยากับโลหะต่างๆ และเมื่อทำงานร่วมกับ Na_2SiO_3 จะช่วยลดการสลายตัวของ H_2O_2 ลักษณะเส้นใยของกากสมุนไพรที่ฟอกด้วย H_2O_2 ปริมาณ 10 เท่าของน้ำหนักตัวอย่างแห้ง มีลักษณะแตกต่างกัน เส้นใยจากกากเหง้าข่า มีขนาดสั้น หยาบ เส้นค่อนข้างใหญ่ น้ำหนักเส้นใยที่ได้ประมาณ 24.10% จากกากแห้ง 100 กรัม กากกระชายดำและกากไพลให้ผลผลิตต่ำกว่า 3% ของน้ำหนักกากแห้ง เส้นใยไพลให้สัมผัสค่อนข้างหยาบ แต่น้อยกว่าเส้นใยกระชายดำและเส้นใยข่า ขณะที่เส้นใยจากกากตะไคร้ มีเส้นใยยาว เส้นเล็ก เนื้อสัมผัสนุ่มกว่าเส้นใยชนิดอื่น การที่เส้นใยข่า กระชายดำ และไพลมีขนาดสั้น เนื่องจากการเตรียมพืชทั้งสามชนิดก่อนการสกัดสารสำคัญ เหง้าพืชจะถูกหั่นเป็นชิ้นกลมบาง เพื่อให้สามารถสกัดสารสำคัญออกมาได้มากที่สุด หากตัวอย่างแห้งก่อนการแยกเส้นใยมีความยาวหรือหั่นตามความยาวเส้นใย น่าจะทำให้ได้เส้นใยที่ยาวและได้ผลผลิตเยื่อมากขึ้น

พิจารณาคัดเลือกกากพืชที่ให้ผลผลิตเยื่อ (Total pulp yield) สูงสองอันดับแรก ได้แก่ กากข่า และกากตะไคร้ เพื่อนำไปผลิตกระดาษขั้นต่อไป โดยนำเส้นใยหรือเยื่อข่าฟอก ข่าไม่ฟอก ตะไคร้ฟอก และตะไคร้ไม่ฟอก ไปผ่านกระบวนการปั่น แล้วนำไปขึ้นรูปด้วยเครื่องขึ้นแผ่นกระดาษและเครื่องอัดกระดาษ ได้ตัวอย่างกระดาษข่าฟอก ข่าไม่ฟอก ตะไคร้ฟอก และตะไคร้ไม่ฟอก

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

ทดสอบสมบัติกระดาษเยื่อข่าไม่ฟอก (NG) ข่าฟอก (BG) ตะไคร้ไม่ฟอก (NL) และตะไคร้ฟอก (BL) ได้แก่ ค่าความต้านแรงดึงขาด การยืดตัว ณ จุดขาด ค่าโมดุลัสของสภาพยืดหยุ่น ค่าการซึมผ่านของอากาศ ความหนา น้ำหนักมาตรฐาน และค่าความชื้น ได้ผลการทดสอบดังนี้

ค่าความต้านแรงดึงขาด (Tensile strength) ของกระดาษจากกากตะไคร้มีค่าสูงกว่ากระดาษจากกากข่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบกระดาษจากเยื่อที่ฟอกและไม่ฟอกขาว (NG เปรียบเทียบกับ BG และ NL เปรียบเทียบกับ BL) การฟอกขาวไม่มีผลต่อความต้านทานต่อแรงดึงของกระดาษ ขณะที่การยืดตัว ณ จุดขาด (Elongation at break) หรือเปอร์เซ็นต์การยืดตัวของกระดาษนั้น กระดาษจากเยื่อตะไคร้มีค่าสูงกว่ากระดาษจากเยื่อข่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเยื่อที่ฟอกขาวและไม่ฟอก พบว่ากระดาษที่ฟอกขาวทั้งจากเยื่อตะไคร้และเยื่อข่า มีเปอร์เซ็นต์การยืดตัวน้อยกว่ากระดาษจากเยื่อที่ไม่ฟอกขาว สาเหตุสำคัญมาจากผลของสารเคมีและความร้อนที่ใช้ขณะฟอกขาวทำให้ความแข็งแรงและแรงยึดของเยื่อลดลง

ค่าโมดุลัสของสภาพยืดหยุ่น หรือค่าความเค้นที่ทำให้วัสดุยืดตัว (Modulus of elasticity) เป็นค่าบอกระดับความแข็งแกร่งของวัสดุ ซึ่งกระดาษเยื่อตะไคร้สามารถทนต่อแรงเค้นได้สูงกว่ากระดาษเยื่อข่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเยื่อกระดาษฟอกและไม่ฟอกขาว พบว่า ค่าความเค้นที่ทำให้วัสดุยืดตัวของกระดาษฟอกขาวทั้งสองชนิดสูงกว่ากระดาษที่ไม่ฟอกขาว

ความหนา (Thickness) และน้ำหนัก (Weight) ของกระดาษเยื่อข่าสูงกว่ากระดาษจากเยื่อตะไคร้อย่างมีนัยสำคัญ กระดาษจากเยื่อที่ฟอกขาวมีความหนา น้ำหนักน้อยกว่ากระดาษจากเยื่อที่ไม่ฟอก ทั้งนี้น้ำหนักและความหนาของเยื่อที่ไม่ฟอกอาจมาจากปริมาณลิกนินและสารอื่นๆ ที่ยังปนเปื้อนกับเยื่อ ขณะที่เยื่อที่ฟอกขาวแล้วนั้น กระบวนการฟอกขาวนอกจากจะทำให้ลิกนินมีสีอ่อนลงแล้ว ยังกำจัดลิกนินและสารอื่น ๆ ไปด้วยส่งผลให้เยื่อแยกตัวออกจากกันได้ดี และแตกออกมีเส้นแขนงเล็กๆ ยึดเกาะกันมากขึ้น

ปริมาณความชื้น (Moisture content) ในเยื่อกระดาษข่ามีระดับสูงกว่าความชื้นในเยื่อกระดาษตะไคร้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเยื่อกระดาษข่าฟอกและไม่ฟอกขาว เยื่อกระดาษที่ไม่ฟอกขาว มีปริมาณความชื้นสูงกว่า เนื่องจากใยของข่ามีความหนากว่าเยื่อตะไคร้ และมีปริมาณลิกนินและส่วนประกอบอื่นๆ ที่ไม่ใช่เยื่อใย ซึ่งเป็นส่วนที่สามารถดูดซับความชื้นไว้ สำหรับเยื่อตะไคร้ที่ฟอกและไม่ฟอกมีปริมาณความชื้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ

นอกจากนี้เยื่อกระดาษข่ามีสมบัติการยอมให้อากาศผ่าน (Air permeability) สูงกว่าเยื่อกระดาษตะไคร้ ทั้งนี้อาจเป็นผลจากโครงสร้างเยื่อใยของเยื่อข่ายังคงมีลิกนินและส่วนประกอบอื่น ๆ ปะปน ซึ่งอาจไปทำให้มีช่องว่างที่อากาศผ่านจำนวนน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเยื่อกระดาษจากตะไคร้ที่มีช่องว่างสม่ำเสมอ มีน้ำมัน หรือสารประกอบอื่นๆ ปนเปื้อนที่เยื่อน้อยกว่าข่า

ผลการทดสอบสมบัติของกระดาษ ได้แก่ สมบัติทนต่อแรงดึง มีความยืดหยุ่น ดูดซับสารสกัดได้ดี และปริมาณผลผลิตเยื่อสูง จึงนำกระดาษเยื่อข่าและกระดาษเยื่อตะไคร้ที่ฟอกขาวมาเคลือบสารสกัดพืชแต่ละชนิด ได้แก่ สารสกัดข่า สารสกัดกระชายดำ และสารสกัดไพล (จากผลการทดลองสารสกัดตะไคร้ไม่มีประสิทธิภาพควบคุมเชื้อรา) ที่ความเข้มข้นและปริมาตรของสารสกัดแตกต่างกัน ไปทดสอบควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* โดยนำกระดาษที่เคลือบสารสกัดพืชชนิดต่าง ๆ ขนาด 1.0 x 1.0 เซนติเมตร วาง

กรมวิชาการเกษตร

บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีการเกลี่ยสารแขวนลอยของสปอรเชื้อราความเขมขน 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร และบมที่อุณหภูมิหอง (ประมาณ 33±1°C) เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบกับกระดาษที่ไม่เคลือบสารสกัดพืช พบว่ากระดาษเยื่อข่าฟอกขาวเคลือบด้วยสารสกัดข่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* ได้ สารสกัดข่าต่ำสุดที่ควบคุมเชื้อราทั้งสองชนิดได้ คือ ความเข้มข้น 50% ปริมาตร 1.0-2.0 มิลลิลิตร แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่าหรือมีขนาดของส่วนใสที่เชื้อราไม่สามารถเจริญได้ (Zone of inhibition) น้อยกว่ากรรมวิธีสารสกัด 60 และ 70% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ความเข้มข้น 60% ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* และ *A. niger* โดยมีขนาดส่วนใสเฉลี่ย 9.883 และ 7.920 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้น 60 และ 70% และปริมาตรสาร 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตร พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการควบคุมเชื้อรา ดังนั้นที่ความเข้มข้น 60% และปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร จึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสม เนื่องจากใช้สารสกัดน้อยกว่ากรรมวิธีอื่น

กระดาษเยื่อตะไคร้ฟอกขาวเคลือบด้วยสารสกัดข่าที่ความเข้มข้น 50 60 และ 70% และปริมาตร 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตร สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* ได้ โดยสารสกัดเข้มข้น 50% ปริมาตร 1.0-2.0 มิลลิลิตร ยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดได้แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่ากระดาษเคลือบสารสกัดข่า 60-70% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าที่กรรมวิธี 60% ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มีขนาดส่วนใสในอาหารเลี้ยงเชื้อ *A. flavus* และ *A. niger* เฉลี่ย 10.583 และ 9.333 มิลลิเมตร (ตามลำดับ) ซึ่งถือว่าเป็นกรรมวิธีที่ใช้สารสกัดต่ำสุดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* เนื่องจากสารสกัดข่าความเข้มข้น 60-70% และปริมาตร 1.0-2.0 มิลลิลิตร ไม่มีผลทางสถิติในการเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อราทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตามกระดาษเยื่อตะไคร้เคลือบสารสกัดข่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา ทั้งสองชนิดดีกว่ากระดาษเยื่อข่าเคลือบสารสกัดข่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่าขนาดของส่วนใสในจานเลี้ยงเชื้อ *A. flavus* และ *A. niger* ที่ใช้กระดาษเยื่อตะไคร้เคลือบสารสกัดข่า (60-70%) มีค่าเฉลี่ย 11.79 และ 9.51 มิลลิเมตร ตามลำดับ ขณะที่ส่วนใสในอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ใช้กระดาษเยื่อข่ามีค่าเฉลี่ย 10.07 และ 8.40 มิลลิเมตร ตามลำดับ (P = 0.05) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในกระดาษเยื่อตะไคร้ มีโครงสร้างเยื่อใยที่ให้สารสกัดกระจายได้มากกว่า เมื่อนำไปใช้ควบคุมเชื้อรา ทำให้สารสำคัญในสารสกัดสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่า

สำหรับสารสกัดกระชายดำและสารสกัดไพลที่สามารถควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ความเข้มข้น 9,000 ppm (0.9%) แต่เมื่อนำสารสกัดกระชายดำและสารสกัดไพลความเข้มข้น 60-70% เคลือบกระดาษเยื่อข่าและกระดาษเยื่อตะไคร้ และนำไปควบคุมเชื้อราในจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด พบว่ากระดาษเคลือบสารสกัดกระชายดำและสารสกัดไพล ไม่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพ อาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีกระดาษเยื่อข่าเคลือบสารสกัดกระชายดำ 70% ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ไม่ปรากฏส่วนใสหรือส่วนที่เชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตได้ สำหรับกระดาษเคลือบสารสกัดไพล เข้มข้น 70% 2.0 มิลลิลิตร ถึงแม้ปรากฏส่วนใส แต่มีขนาดเพียง 0.5 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตามสารสกัดข่าซึมลงสู่กระดาษเยื่อตะไคร้ฟอกขาวได้ดี ผิวกระดาษที่เคลือบสารสกัดไม่แฉะ แห้งกว่ากระดาษชนิดอื่นที่เคลือบสารสกัด ดังนั้นจึงคัดเลือกกระดาษเยื่อตะไคร้ฟอกขาวเคลือบด้วยสารสกัดข่า เพื่อใช้ทดสอบควบคุมเชื้อราในผลิตผลทางการเกษตรต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

การใช้กระดาษเยื่อตะไคร้ (ฟอกขาว) เคลือบสารสกัดข่าที่ความเข้มข้น 60 และ 70% ปริมาตร 1.0-2.0 มิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการควบคุมเชื้อราในพริกขี้หนูผลสด ไม่พบเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* spp. และสีของพริกขี้หนูที่ห่อหุ้มด้วยกระดาษหลังจากเก็บรักษา 1 สัปดาห์ที่ 13°C ไม่แตกต่างจากพริกขี้หนูที่ไม่ห่อหุ้มด้วยกระดาษ และไม่พบสารอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในพริกขี้หนูสดในการทดสอบ

สำหรับพริกขี้หนูแห้งที่ห่อหุ้มกระดาษเยื่อตะไคร้ (ฟอกขาว) เคลือบสารสกัดข่าที่ความเข้มข้น 60 และ 70% ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร บรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ปิดผนึก ถุงละ 40 กรัม และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 33±1°C) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ในวันที่ 0 ของการเก็บรักษา (ก่อนใส่ถุง) ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อรา แต่พบปริมาณสารอะฟลาทอกซิน (ที่เชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* ผลิต) 7.14 ไมโครกรัม/กิโลกรัม (ppb) เมื่อเก็บรักษาครบ 4 สัปดาห์ ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อรากลุ่ม Aspergillus ขณะที่สารอะฟลาทอกซินมีปริมาณลดลงเหลือ 5.10 ppb สำหรับผลของการห่อหุ้มด้วยกระดาษเคลือบสารสกัดพืชต่อการชะลอการเปลี่ยนแปลงสีของพริกขี้หนูแห้ง พบว่าในวันที่ 0 ของการเก็บรักษาพริกขี้หนูแห้ง ค่าสีเปลือก (hue angle: h°) เฉลี่ยเท่ากับ 8.34 หลังจาก 4 สัปดาห์ พริกที่เก็บในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ที่ไม่มีกระดาษห่อหุ้ม (เส้น d) ให้ค่า h° เฉลี่ย 356.95 แสดงให้เห็นว่าพริกแห้งมีสีแดงคล้ำเพิ่มมากขึ้นจากวันที่ 0 (h° ลดลง 11.39) ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติจากสีพริกในกรรมวิธีอื่นๆ การห่อหุ้มพริกขี้หนูแห้งด้วยกระดาษเยื่อตะไคร้ที่ไม่เคลือบสารสกัด (เส้น c) เคลือบสารสกัดข่าเข้มข้น 60% (เส้น a) และเคลือบสารสกัดข่าเข้มข้น 70% (เส้น b) มีผลต่อสีพริกไม่แตกต่างทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ย h° หลังจากเก็บรักษา 4 สัปดาห์เท่ากับ 3.16 4.58 และ 5.87 ตามลำดับ สำหรับค่าเฉลี่ยความสว่าง (Lightness: L*) ของพริกแห้งในวันที่ 0 คือ 30.50 หลังจากการทดลอง 4 สัปดาห์ พบว่า L* ของพริกที่ไม่ห่อหุ้มกระดาษและที่ห่อหุ้มกระดาษที่ไม่เคลือบสารสกัดลดลงเหลือ 27.90 และ 29.68 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากพริกกรรมวิธีห่อหุ้มด้วยกระดาษเคลือบสารสกัดข่า 60% และกระดาษเคลือบสารสกัดข่า 70% ที่ให้ค่า L* ในสัปดาห์ที่ 4 เท่ากับ 30.86 และ 30.20 ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการห่อหุ้มพริกด้วยกระดาษเคลือบสารสกัดข่านอกจากช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราแล้ว ยังสามารถชะลอการเปลี่ยนแปลงสีของพริกขี้หนูแห้งได้

3. การผลิตพริกแห้งคุณภาพเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและลดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษ

พริกขี้หนูแดงเก็บเกี่ยวจากแปลงเกษตรอินทรีย์ในเขต อ.หนองหงส์ จ.บุรีรัมย์ คัดเลือกผลเน่าเสีย ทิ้ง เด็ดขั้ว ล้างน้ำทำความสะอาด ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ ตากในโรงอบพลังงานแสงอาทิตย์ (solar drying house) เป็นเวลา 5 วัน ได้พริกแห้งที่มีปริมาณการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซิน 4.50 พีพีบี ซึ่งมีค่าไม่เกิน 20 พีพีบี ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 และพริกแห้งมีค่าความชื้น 12.88% ที่ตามมาตรฐานสินคาเกษตร มกษ. 3001-2553 กำหนดให้พริกแห้งมีความชื้นไม่เกิน 13.5% เพื่อนำมาใช้ทำการทดลอง

นำพริกแห้งคลุกน้ำคั้นกระเทียมความเข้มข้น 0 50 และ 100% บรรจุถุงพลาสติก PP ถุงซิปพลาสติกใส PE และถุงซิปเมทัลไลท์หน้าใส เก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 2 3 และ 4 เดือน พบว่าปริมาณสาร อะฟลาทอกซินจากพริกแห้งที่คลุกน้ำคั้นกระเทียมรวมทุกความเข้มข้น มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน

กรมวิชาการเกษตร

ทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบตามระยะเวลาในการเก็บรักษา ดังนี้ ปริมาณอะฟลาทอกซิน 4.46 5.64 5.76 และ 4.37 พีพีบี ตามลำดับเวลา โดยที่ปริมาณอะฟลาทอกซินในเดือนที่1 และ 4 มีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเดือนที่ 2 และ3 มีความแตกต่างกันอยู่ในช่วงแคบ ๆ ไม่เกิน 1.39 พีพีบี ทั้งนี้ เนื่องจากพริกแห้งในบางตัวอย่างอาจมีการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินเริ่มต้นที่สูงกว่าอยู่ก่อนแล้ว แสดงให้เห็นว่า การคลุกน้ำคั้นกระเทียม และการเก็บรักษาพริกแห้งในถุงทั้ง 3 ชนิด ไม่มีผลต่อปริมาณอะฟลาทอกซินที่ตรวจพบในแต่ละเดือนของการเก็บรักษา

สำหรับค่าความชื้นของพริกแห้งที่เก็บในถุงแต่ละชนิด มีค่าเพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตามเวลาที่เก็บรักษา และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดของถุงในเดือนที่ 4 จะพบว่า พริกแห้งที่เก็บในถุงพลาสติก PP มีค่าความชื้นสูงที่สุด 15.38% รองลงมา คือ ถุงซิปพลาสติกใส PE 15.18% และ ถุงซิปเมทัลไลท์ 15.07% ซึ่งมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันทั้ง 4 เดือน ซึ่งเป็นผลมาจากชนิดของวัสดุที่ใช้ในการผลิตถุง มีความสามารถในการป้องกันการซึมผ่านของความชื้นและอากาศได้ดีแตกต่างกัน ดังนี้ ถุงพลาสติก PP ผลิตจากพลาสติกความหนาแน่นต่ำ 0.90-0.91 g/cm^3 แต่สำหรับถุงซิปใส PE และถุงซิปเมทัลไลท์ มาจากพลาสติกที่มีความหนาแน่นสูงกว่า 0.910 ถึง 0.925 g/cm^3 ขณะที่ถุงซิปเมทัลไลท์มีการเคลือบชั้นโลหะเพิ่มเข้าไป ทำให้ถุงซิปเมทัลไลท์สามารถป้องกันการซึมผ่านของความชื้นและอากาศได้ดีกว่าถุงซิปใส PE และถุงพลาสติก PP

ส่วนการปนเปื้อนของเชื้อราในพริกแห้งระหว่างการเก็บรักษา พบเชื้อราสำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ *A. flavus* และ *A. niger* ในทุกตัวอย่างของพริกแห้ง โดยเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้ พบได้ทั่วไปในสภาพแวดล้อมปกติ การปนเปื้อนของเชื้อราอาจจะเกิดได้ในทุกขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ที่ทำในพื้นที่เปิดโล่ง เชื้อราจะพักตัวในรูปของสปอร์บนพริกแห้งที่มีความชื้นต่ำ ทำให้สปอร์ของเชื้อรายังไม่สามารถเจริญเป็นเส้นใยได้ ต่อเมื่อนำมาตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราด้วยวิธี Direct Plate Count Method บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทั้งความชื้น ออกซิเจน และสารอาหาร เป็นปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา

Aspergillus flavus ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ มีสีเขียวหรือเขียวอมเหลือง เส้นใยละเอียด สีขาว บางสายพันธุ์พบสามารถสร้างเม็ดสเคลอโรเตียม สีน้ำตาลบริเวณขอบของโคโลนี เส้นใยเชื้อราเจริญแผ่บาง ๆ สร้างโคนิเดียลเฮด เป็นช่อ สีเขียวอมเหลือง เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมน้ำตาล และแตกออกเป็นแท่งหลวม ๆ โคนิดิโอฟอร์ผนังหนาและมีหนาม เวสซิเคิลรูปร่างค่อนข้างกลม ไฟอะลายด์เกิดโดยตรงบนเวสซิเคิล หรือบนเมตูเล โคนิเดียรูปร่างทรงกลมถึงรูปไข่ ผิวไม่เรียบ ต่อกันเป็นสายยาว

Aspergillus niger ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. niger* บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ เป็นวงซ้อนกัน สีน้ำตาลเข้มจนถึงสีดำ เส้นใยสีขาวใสมีผนังกั้นตามขวาง เจริญแผ่บนอาหารบาง ๆ ด้านใต้โคโลนีมีสีขาว หรือเหลืองอ่อน สร้างโคนิเดียลเฮด สีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม รูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดใหญ่ เมื่อแก่จะแตกเป็นหลายแฉกในแนวรัศมี โคนิดิโอฟอร์ ใส ไม่มีสี ตรง เกิดเดี่ยว ๆ ผนังเรียบ ส่วนปลายพองออกเป็นรูปวงกลม เรียกว่า เวสซิเคิล มีเมตูเลและไฟอะลายด์ โคนิเดียมีเซลล์เดียว รูปร่างกลม สีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ผนังขรุขระ มีหนาม

ลิขสิทธิ์การเกษตร

ผลจากการทดลอง แสดงให้เห็นว่า การเก็บรักษาพริกแห้งที่มีความชื้นต่ำกว่า 13.5% จะคลุกหรือไม่คลุกน้ำคั้นกระเทียมก็ตาม และบรรจุในถุง ทั้ง 3 ชนิด เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน จะไม่มีผลต่อปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่ตรวจพบ สาเหตุจากตัวอย่างพริกแห้งที่ใช้ในการทดลอง มีค่าความชื้นเริ่มต้นค่อนข้างต่ำ 12.88% ทำให้ไม่มีการสร้างสารอะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในระหว่างการเก็บรักษา

ทดสอบช่วงเวลาการสร้างสารอะฟลาทอกซินในพริกแห้งที่ปลูกเชื้อรา *A. flavus* โดยนำพริกแห้งใส่สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *A. Flavus* เปรียบเทียบกับ ชุดควบคุม (ไม่ใส่น้ำและเชื้อ) และพริกแห้งใส่น้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบ 24 48 และ 72 ชั่วโมง นำมาตรวจสารอะฟลาทอกซิน พบว่า ในเวลาเดียวกัน พริกแห้งที่ใส่เชื้อมีปริมาณอะฟลาทอกซินสูงกว่าพริกแห้งชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างช่วงเวลา จะมีเพียงพริกแห้งที่ใส่เชื้อ ที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนี้ ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณอะฟลาทอกซินสูงที่สุด 45.89 พีพีบี ที่ 72 ชั่วโมง 30.41 พีพีบี และที่ 24 ชั่วโมง 29.51 พีพีบี ค่าความแตกต่างของปริมาณอะฟลาทอกซิน ระหว่างพริกแห้งใส่เชื้อกับพริกแห้งใส่น้ำ ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีค่าความแตกต่างสูงถึง 36.50

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การศึกษาประโยชน์ของสารสกัดพืชเพื่อนำมาใช้ในการการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* ที่สามารถสร้างสารพิษได้ในผลิตผลเกษตร โดยพัฒนาให้อนุภาคนาโน (nanoparticles) ของสารสกัดพืชสมุนไพรสามารถไปใช้ควบคุมเชื้อราและสารพิษในผลิตผลเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งผลการทดสอบการใช้สารสกัดพืชวงศ์ขิงในปริมาณต่าง ๆ ในการลดขนาดอนุภาคของซิลเวอร์ ด้วยการทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคนาโน ได้แก่ ความเข้มข้นและสัดส่วนของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) ต่อปริมาณสารสกัดพืช และอุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคนาโน พบว่าสารละลาย $AgNO_3$ เข้มข้น 4.0 mM ปริมาตร 6 ส่วน ต่อสารสกัดพืช 4 ส่วน บ่มที่อุณหภูมิ 95°C นาน 20-30 นาที เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน สารสกัดข่าและกระชายดำไม่มีประสิทธิภาพในการลดขนาดของอนุภาคเงิน ขณะที่สารสกัดไพล ขมิ้นอ้อย และขมิ้นชัน (จากเหง้าสด) มีประสิทธิภาพในการลดขนาดของอนุภาคเงิน ทำให้อนุภาคมีขนาดเล็กลง โดยมีขนาดอนุภาคประมาณ 80-300 นาโนเมตร อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากไพล ขมิ้นอ้อย และขมิ้นชัน เข้มข้น 40,000 ppm สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อ *A. flavus* และ *A. niger* ได้ ส่งผลต่อการลดการผลิตสารพิษของเชื้อราได้ นอกจากนี้ได้พัฒนานำกากสมุนไพรมาผลิตเป็นกระดาษและเคลือบสารสกัดสมุนไพรเพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษ โดยกากพืชที่ผ่านกระบวนการสกัดสารสำคัญออกไปแล้ว ได้แก่ กากเหง้าข่า กระชายดำ ไพล และตะไคร้ เมื่อผ่านกระบวนการแยกเยื่อแล้วกากเหง้าข่า และตะไคร้ ให้ปริมาณเยื่อสูงถึง 24 และ 11% (ตามลำดับ) ขณะที่เยื่อกระชายดำ และไพล มีปริมาณต่ำกว่า 5% จึงนำเยื่อเหง้าข่าและตะไคร้ไปพัฒนาผลิตกระดาษ โดยนำเยื่อทั้งสองชนิดทั้งแบบฟอกขาวและไม่ฟอกขาวมาผลิตกระดาษ พบว่าสมบัติของกระดาษจากเยื่อทั้งสองชนิดที่ฟอกขาวมีค่าความต้านแรงดึงขาด และค่าโมดุลัสของสภาพยืดหยุ่น สูงกว่ากระดาษที่ไม่ฟอก แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดของกากพืช พบว่า กระดาษเยื่อตะไคร้มี

กรมวิชาการเกษตร

ความแข็งแรงกว่า ทนต่อแรงดึงได้ดี มีความยืดหยุ่นสูงกว่า เมื่อนำกระดาษทั้งสองชนิดมาเคลือบสารสกัดพืช กระดาษเยื่อข่า และกระดาษเยื่อตะไคร้ที่เคลือบสารสกัดข่าเข้มข้น 60% ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราได้โดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากกรรมวิธีกระดาษเคลือบสารสกัด 70% สารสกัดข่าสามารถซึมลงในกระดาษเยื่อตะไคร้ได้เร็วกว่าในกระดาษเยื่อข่า ทำให้กระดาษพื้นผิวไม่เฉอะแฉะ จึงนำกระดาษตะไคร้ฟอกขาวไปทดสอบเคลือบสารสกัดข่าความเข้มข้น 60 และ 70% ห่อหุ้มพริกขี้หนูผลสดและพริกขี้หนูแห้ง โดยห่อหุ้มพริกขี้หนูผลสดก่อนบรรจุในถุงพลาสติกและเก็บรักษาที่ 13°C เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และห่อหุ้มพริกขี้หนูแห้งก่อนบรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ากระดาษตะไคร้ฟอกขาวเคลือบด้วยสารสกัดข่าไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราและสีของพริกขี้หนูผลสด ขณะที่สามารถช่วยชะลอการเปลี่ยนสีของพริกแห้ง และลดปริมาณสารอะฟลาทอกซิน บี1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของกระดาษเยื่อตะไคร้ที่เคลือบสารสกัดข่าทั้งสองความเข้มข้นในการควบคุมเชื้อรา สารอะฟลาทอกซิน บี1 และการเปลี่ยนแปลงสีของพริกแห้ง ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นการนำกระดาษจากเยื่อตะไคร้เคลือบด้วยสารสกัดพืชข่า 60-70% มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* สามารถนำไปต่อยอดเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเกษตรที่ต้องการหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีในการควบคุมเชื้อรา เช่น การผลิตกระดาษรังผึ้ง (Cooling pad) โรงเลี้ยงสัตว์ เป็นต้น

การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำคั้นกระเทียมสดต่อคุณภาพการเก็บรักษาพริกแห้ง เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารอะฟลาทอกซิน โดยใช้พริกแห้งจากโรงอบพลังงานแสงอาทิตย์ มีความชื้น 12.88% ตรวจพบสารอะฟลาทอกซินเริ่มต้น 4.50 พีพีบี นำมาใช้ในการทดลองพริกแห้งคลุกด้วยน้ำคั้นกระเทียมสด ความเข้มข้น 0 50 และ 100% บรรจุในถุงพลาสติก PP ถุงซิปพลาสติกใส PE และถุงซิปเมทัลไลท์ เก็บที่อุณหภูมิห้อง พบว่า การคลุกพริกแห้งด้วยน้ำคั้นกระเทียมสด และชนิดของถุง ไม่มีผลต่อปริมาณสารอะฟลาทอกซิน แต่พริกแห้งที่บรรจุในถุงซิปเมทัลไลท์ มีค่าความชื้นเพิ่มขึ้นต่ำที่สุด 15.07% เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 4 เดือน ส่วนการทดสอบช่วงเวลาการสร้างสารอะฟลาทอกซิน ในพริกแห้งที่ใส่สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Aspergillus flavus* บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบปริมาณสารอะฟลาทอกซินสูงสุดเท่ากับ 45.89 พีพีบี การผลิตพริกแห้ง จะตองใสใจในเรื่องความสะอาด เพื่อลดการปนเปอนจากสิ่งสกปรก เชื้อจุลินทรีย์ และสารพิษจากเชื้อรา เนื่องจากความร้อนที่ใช้ประกอบอาหาร ไม่สามารถทำลายสารอะฟลาทอกซินได้ ดังนั้น จึงต้องป้องกันการปนเปื้อนของสารพิษตั้งแต่ในวัตถุดิบที่นำมาใช้ และลดความชื้นหลังการเก็บเกี่ยวอย่างรวดเร็ว เพื่อลดปริมาณวอเตอร์แอคทิวิตี้ให้ต่ำกว่าที่เชื้อราจะสามารถเจริญและสร้างสารพิษได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4. พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา

4. Development of Mycotoxins Analytical Methods

ชื่อผู้วิจัย

นางสาวศุภรา อัคคะสาระกุล

นางสาวสุพี วนศิรากุล

นางสาวเนตรา สมบูรณ์แก้ว

นางสาวอัจฉราพร ศรีจุดานุ

คำสำคัญ

อิไลซ่า, แอนติซีรั่ม, เอนไซม์คอนจูเกต, โอคราทอกซิน เอ, แถบทดสอบ,วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา, เทคนิค LFIA (Lateral Flow Immunoassay), วิธีการตรวจคัดกรองแบบรวดเร็ว

ELISA, antiserum, enzyme conjugate, ochratoxin A, strip test, immunological assay, Lateral Flow Immunoassay, rapid screening method

บทคัดย่อ

กิจกรรมการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรามีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตผลเกษตรด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา กิจกรรมนี้ประกอบด้วย 3 การทดลอง ดังนี้

การผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ แบบรวดเร็ว โดยผลิตแอนติซีรั่มต่อสาร OTA แบบ polyclonal antibody ในกระต่ายทดลองพันธุ์ New Zealand White จำนวน 4 ตัว เป็นเวลา 15 สัปดาห์ ได้แอนติซีรั่มบริสุทธิ์ต่อสาร OTA 320 มิลลิลิตร และเมื่อทดสอบความเข้มข้นด้วยวิธี Indirect competitive ELISA พบว่า ในสัปดาห์ที่ 8 และ 9 ในกระต่ายทั้ง 4 ตัว มีความเข้มข้นสูง 1:1,024,000 และทดลองการเชื่อมต่อ OTA กับเอนไซม์ Horseradish Peroxidase (HRP) 3 วิธี พบว่า เอนไซม์คอนจูเกตที่เตรียมตามวิธีการที่ 1 โดยใช้ Dimethylformamide (DMF) จะมีค่าความเข้มข้นสูง โดยหลุมทดสอบที่เคลือบด้วย IgG-OTA ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัม ทดสอบร่วมกับ OTA-HRP conjugate ที่เตรียมได้ตามวิธีการที่ 1 โดยเจือจางให้มีความเข้มข้น 1:100 เอนไซม์คอนจูเกต มีความเข้มข้นสูง โดยมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 3.871

การพัฒนาชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ โดยวิธี ELISA ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อหา 1) ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบแบบ Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ic-ELISA) และแบบ Direct Competitive ELISA 2) อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการเคลือบสารในหลุมทดสอบ และ 3) สารละลายที่เหมาะสมในการเจือจางสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน พบว่า สาร Ochratoxin A-Bovine Serum Albumin (OTA-BSA) เข้มข้น 5, 6 และ 7 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (µg/ml) ทดสอบร่วมกับแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ต่อสารโอคราทอกซิน เอ (IgG-OTA) ที่

กรมวิชาการเกษตร

ความเข้มข้น 0.25 µg/ml มีความเหมาะสมในการเคลือบหลุมทดสอบแบบ Indirect Competitive ELISA ส่วนวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ Direct Competitive ELISA ควรเคลือบหลุมทดสอบด้วย IgG-OTA ความเข้มข้น 4, 5 และ 6 µg/ml ทดสอบร่วมกับเอนไซม์คอนจูเกต ความเข้มข้น 1:400 สำหรับอุณหภูมิและเวลาในการเคลือบหลุมทดสอบให้มีประสิทธิภาพ ควรบ่มหลุมทดสอบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (ประมาณ 14-15 ชั่วโมง) ส่วนการเตรียมสารพิษมาตรฐาน ตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการเตรียมสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน มี 3 สูตร คือ Phosphate Buffer Saline +10% Methanol, Phosphate Buffer Saline-Tween 20-Bovine Serum Albumin+7% Methanol และ Phosphate Buffer+1% gelatin

การพัฒนาชุดตรวจสอบโอคราทอกซิน เอ โดยวิธี Lateral Flow Immunoassay โดยใช้หลักการทำปฏิกิริยาระหว่าง OTA ในตัวอย่างจะแข่งขันกับ OTA ที่เชื่อมติดกับโปรตีนซึ่งตรึงอยู่บนแถบกระดาษในการจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง การอ่านผลจะดูจากการเกิดสีที่เส้นทดสอบหรือ test line ถ้าในตัวอย่างมีสารพิษปนเปื้อนอยู่ จะเกิดสีม่วงแดงในตำแหน่ง control line เส้นเดียว ถ้าตัวอย่างไม่มีสารพิษจะปรากฏสีให้เห็นทั้งที่ตำแหน่ง control line และ test line จากการทดสอบพบว่า การใช้แอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเหมาะสมในการติดฉลากกับอนุภาคทอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.6 และจากการทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ OTA-BSA และ goat anti-rabbit IgG สำหรับขีดเส้นในตำแหน่ง test line และ control line พบว่า การใช้ OTA-BSA ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ goat anti-rabbit IgG ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดสีม่วงแดงของอนุภาคทองได้ดีที่สุด แต่จากผลการทดลองสีที่ปรากฏในตำแหน่ง test line ยังไม่เข้มพอเมื่อเทียบกับสีที่ปรากฏในตำแหน่ง control line ยังต้องปรับหาวิธีการเพื่อให้การตรวจสอบมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

The activity of development of mycotoxins analytical methods was aimed to develop rapid screening method for detection the contamination of OTA in agricultural products by immunological assay. In this activity consisted of 3 experiments as follows:

The first one, production of antiserum against OTA for utilization in developing rapid method for OTA detection was done. Polyclonal antibody against OTA were produced in 4 New Zealand White rabbits for 15 weeks. The purify antiserum (IgG-OTA) 320 ml of was obtained. In addition, the concentrations of OTA antiserum were tested by Indirect Competitive ELISA. It was observed that in the week 8 and 9 of antiserum production of 4 rabbits gave the highest concentration at 1:1024000. Furthermore, three conjugation methods of OTA with Horseradish Peroxidase (HRP) were tested. OTA-HRP conjugate of method 1 using Dimethylformamide (DMF) gave the high concentration with

the optical density (O.D.) at 3.871 when the microwell was coated with 6 µg/ml of IgG-OTA and OTA-HRP concentration 1:100.

The aims of development of OTA test kit by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) were to develop a rapid mycotoxin analysis method by determining the appropriate 1) concentrations of Ochratoxin A-Bovine Serum Albumin (OTA-BSA) and antiserum against OTA (IgG-OTA) for Indirect Competitive ELISA, and OTA-BSA and enzyme conjugate for Direct Competitive ELISA, 2) temperature and duration for coating incubation, and 3) OTA standards diluent. For the Indirect Competitive ELISA, the optimum concentration of OTA-BSA were 5, 6 and 7 micrograms/milliliter (µg/ml) with IgG-OTA at the concentration of 0.25 µg/ml. Whilst, the Direct Competitive ELISA was coated with IgG-OTA at the concentration of 4, 5 and 6 µg/ml with the concentration of enzyme conjugate 1:400. In addition, an appropriate time for coated well was incubated at 4oC overnight (approx. 14-15 hr.). For preparation of OTA standard solution, 3 formulations of Phosphate Buffer Saline + 10% Methanol, Phosphate Buffer Saline-Tween 20-Bovine Serum Albumin + 7% Methanol and Phosphate Buffer + 1% gelatin were effective for dilution.

Whilst, the Lateral Flow Immunoassay was developed for the detection of ochratoxin A (OTA) in agricultural products. The detection is based on the competition between OTA in sample and OTA-protein conjugate immobilized on test strip for the binding to colloidal gold-labeled OTA antibodies. The results can be observed from the presence of purple red color in the test line (T). The high concentration of OTA in sample will result in no visible line in the test zone. While the sample without OTA will form visible color in both test line and control line. In this study, OTA-antibodies (OTA-IgG) at 100 µg/ml were suitable for conjugated with colloidal gold diameter of 40 nanometer, the pH of the solution was adjusted to 8.6. The suitable concentration of OTA-BSA and goat anti-rabbit IgG for test line and control line were 0.8 mg/ml. However, the color that appears in the test line is light color compared to control line. Thus, there would be a need to improve suitable method to get more effective test kit.

บทนำ

การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราแบบรวดเร็วถือเป็นมาตรการหนึ่งที่แก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษในผลิตผลเกษตร โดยการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารพิษในผลิตผลเกษตรก่อนการส่งออกหรือนำเข้า เพื่อเป็นการเพิ่มคุณภาพสินค้าเกษตรให้มีความปลอดภัยต่อผู้ซื้อและผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น และเนื่องจากปัจจุบันโอคราทอกซิน เอ เป็นสารพิษที่มีปัญหาตรวจพบการปนเปื้อน

กรมวิทยาศาสตร์

มากขึ้นทั้งในพริก เครื่องเทศ ธัญพืช กาแฟ และไวน์ เป็นต้น ในยุโรป โอคราทอกซิน เอ จัดเป็นสารพิษจากเชื้อราที่มีความสำคัญเป็นลำดับสาม เนื่องมาจากอันตรายที่อาจก่อให้เกิดการเสียชีวิตได้ในมนุษย์ ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยวิธีรวดเร็ว เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์โดยไม่ต้องนำเข้าชุดทดสอบจากต่างประเทศ รวมทั้งสามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ การตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ชีววิธี วิธีทางเคมี และวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา ซึ่งแต่ละวิธีมีความแตกต่างกันในด้านความยากง่ายของวิธีการ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการ และระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ เป็นต้น ดังนั้นในการเลือกวิธีการวิเคราะห์จึงขึ้นอยู่กับความพร้อมของห้องปฏิบัติการ ความสามารถของผู้ตรวจวิเคราะห์ และวัตถุประสงค์ของการตรวจวิเคราะห์เป็นหลัก ปัจจุบันประเทศผู้นำเข้ามีการกำหนดมาตรฐานสินค้าและผลิตภัณฑ์สำหรับผู้ส่งออก ซึ่งสารพิษจากเชื้อราจัดเป็นข้อกำหนดหนึ่งที่ต้องมีการทดสอบให้เป็นไปตามหลักเกณฑ์มาตรฐานการส่งออก รวมทั้งควรมีการตรวจวิเคราะห์ผลิตผลเกษตรก่อนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

กรมวิชาการเกษตรประสบผลสำเร็จในการพัฒนาชุดตรวจสอบแอฟลาทอกซินสำเร็จรูปสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารพิษแอฟลาทอกซินอย่างง่ายในผลิตผลเกษตร ซึ่งชุดตรวจสอบดังกล่าวมีการจำหน่ายในเชิงพาณิชย์แล้ว โดยมีประสิทธิภาพและความแม่นยำเทียบเท่ากับชุดตรวจสอบที่นำเข้าจากต่างประเทศ และราคาต่ำกว่ามาก ซึ่งเป็นการช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนสารพิษแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตรได้มากยิ่งขึ้น จากปัญหาการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตผลเกษตรเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสารพิษดังกล่าวจัดเป็นสารพิษที่เป็นอันตรายต่อคนและสัตว์ โดยก่อให้เกิดความผิดปกติต่อระบบการทำงานของไต (nephrotoxic) และ การพัฒนาการเกิดความผิดปกติ (teratogenic) เป็นสารพิษที่อาจก่อให้เกิดมะเร็ง และทำให้ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ผิดปกติ ดังนั้น การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ โดยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตผลเกษตร โดยการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนในผลิตผลเกษตรเบื้องต้นด้วยวิธีที่รวดเร็วและไม่ยุ่งยาก อีกทั้งยังช่วยลดค่าใช้จ่ายการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศอีกด้วย นอกจากนี้เทคนิค Immunochromatographic ที่เรียกว่า Lateral Flow Immunoassay Strip Test เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้ตรวจสอบสารพิษในผลิตเกษตร โดยใช้เวลาในการตรวจสอบรวดเร็ว สะดวกต่อการนำไปใช้ ผลการวิเคราะห์จะบอกได้ในเชิงคุณภาพ หากกรมวิชาการสามารถพัฒนาชุดทดสอบ Lateral Flow Strip ชนิดนี้สำเร็จ จะสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตผลเกษตร ทั้งผลิตผลที่มีการนำเข้าและส่งออก โดยไม่ต้องนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการคัดกรองผลิตผลเกษตรในเบื้องต้นได้ งานวิจัยในกิจกรรมนี้จึงมุ่งเน้นการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบรวดเร็วด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา โดยเริ่มศึกษาตั้งแต่ขั้นตอนการผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ และเอนไซม์คอนจูเกต เพื่อนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ ELISA และการศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยวิธี Lateral Flow Immunoassay Strip Test สำหรับใช้ในการตรวจคัดกรองผลิตผลเกษตรได้อย่างรวดเร็ว ยกระดับคุณภาพสินค้าเกษตรและเพิ่มความปลอดภัยให้แก่ผู้บริโภค

กรมวิชาการเกษตร

การทบทวนวรรณกรรม

สารพิษจากเชื้อราเป็นสารที่มีโมเลกุล ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและรส การที่จะทราบว่าผลิตผลเกษตรหรือผลิตภัณฑ์มีการปนเปื้อนของสารพิษหรือไม่ ต้องทำการการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งมีด้วยกันหลายวิธี การวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรานิยมใช้วิธีทางเคมี เช่น วิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) (Bennett and Richard, 1994) ซึ่งทั้งสองวิธีดังกล่าวต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน มีความยุ่งยาก ซับซ้อน และมีราคาแพง ไม่สะดวกต่อการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก ๆ ปัจจุบันหลายประเทศได้ทำการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษโดยการใช้วิธีทาง immunological assay เช่น การใช้วิธี ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (อมรา, 2551) วิธี ELISA ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในการตรวจประเมินปริมาณสารพิษจากเชื้อรา เนื่องจากเป็นปฏิกิริยาที่มีความรวดเร็วและเฉพาะเจาะจงและราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับวิธีการอื่น โดยมีการใช้ polyclonal antibodies ในการตรวจวิเคราะห์ข้าวบาร์เลย์ และข้าวสาลี โดยวิธี indirect competitive ELISA ได้อย่างประสบผลสำเร็จ (Morgan *et al*., 1983; Lee and Chu, 1984) การวิเคราะห์สารพิษ ด้วยวิธี ELISA อาศัยการทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี้ ดังนั้นส่วนประกอบที่สำคัญของวิธีทาง Immunoassay ที่ต้องเตรียมเป็นสิ่งแรก คือ การผลิตแอนติบอดี (Antibody) ต่อสารพิษนั้น ๆ (Chu, 1984)

สารโอคราทอกซิน เอ (Ochratoxins A) เป็นสารพิษจากเชื้อราที่มีความสำคัญเป็นลำดับสามในยุโรป อันเนื่องมาจากอันตรายที่อาจก่อให้เกิดการเสียชีวิตได้ในมนุษย์ The International Agency for Research on Cancer (IARC) จัดสารพิษ Ochratoxin A อยู่ใน class 2B group คือ อาจก่อให้เกิดมะเร็งได้ในมนุษย์ (Edwin *et al.,* 2010) การปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ เป็นปัญหาที่พบในผลิตผลเกษตรหลายชนิด Sangare-Tigori et al. (2006) รายงานว่า โอคราทอกซิน เอ เป็นพิษต่อไตในสัตว์ทุกชนิดที่ทำการศึกษา และมีแนวโน้มเป็นพิษมากที่สุดต่อมนุษย์ เนื่องจากมนุษย์ใช้ระยะเวลาที่ปริมาณสารพิษถูกขับถ่ายหรือทำลายไปครึ่งหนึ่งยาวนานมากกว่าสัตว์ชนิดอื่น ๆ โอคราทอกซิน เอ มีผลทำให้ตัวอ่อนผิดปกติ มีพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน เป็นสารก่อมะเร็งที่มีผลกระทบทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สารพันธุกรรม เกิดการกลายพันธุ์ และเป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogenic) ซึ่งทั้งหมดนำไปสู่การเกิดโรคที่เป็นอันตรายในปัจจุบัน การปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ พบได้ในผลิตภัณฑ์อาหาร และอาหารสัตว์หลายชนิด เช่น ในกลุ่มธัญพืช ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช ไวน์ ผลิตภัณฑ์จากนม ผลไม้ ผัก beans ผลิตภัณฑ์อาหารแห้ง ถั่ว งา เครื่องเทศ ธัญพืชสำหรับทารก อาหารสำหรับทารกที่มีส่วนผสมของนม เป็นต้น (Chen et al., 2018)

Radoi *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาการตรวจวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในไวน์ โดยใช้วิธี Direct competitive ELISA ซึ่ง มีการเตรียมสาร OTA–HRP โดยปฏิกิริยา covalently linking 1,1'-carbonyldiimidazole ระหว่าง OTA และ HRP และตรวจสอบปฏิกิริยาการคอนจูเกตโดย fluorescence, UV-vis spectrophotometry, SDS–PAGE, Western blot และ immunoassay ซึ่งการ

ตรวจโดย fluorescence พบว่า ที่ช่วงคลื่น 295 นาโนเมตร OTA-HRP มี excitation wavelength 438-444 นาโนเมตร และ the tryptophan emission peak blue-shifted อยู่ในช่วง 326-318 นาโนเมตร

Zhang *et al*. (2011) ได้ทำการศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในธัญพืช โดยวิธี competitive indirect ELISA (ci-ELISA) โดยสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในช่วง 0.55-6.75 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และมีค่า limit of detection (LOD) ที่ 0.15 ng/mL และมีปฏิกิริยาข้ามในการตรวจจับ ochratoxin B 17 เปอร์เซ็นต์ และ deoxynivalenol, fumonisin B_1 หรือ aflatoxin B_1 น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ประเทศไทยโดยกระทรวงสาธารณสุข (2563) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 414 เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน ได้กำหนดปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดของสารโอคราทอกซิน เอ สำหรับพริกแห้งหรือพริกป่นที่ 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรย์ และข้าวสาลี 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

เทคนิค Lateral flow immunoassay หรือ Immunochromatographic assay เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบรวดเร็ว (rapid test) ในรูปแบบแถบทดสอบ (strip test) ที่ใช้หลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี สารพิษหรือแอนติเจนในตัวอย่างจะแข่งขันกับสารพิษที่เชื่อมติดกับโปรตีนซึ่งตรึงอยู่บนกระดาษในการจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง โดยอาศัยของเหลวหรือสารละลายเป็นตัวพาให้แอนติเจนไหลผ่านบริเวณที่มีแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง ในลักษณะ capillary จากล่างขึ้นสู่บน หรือลักษณะ lateral flow จากซ้ายไปขวา การอ่านผลจะดูจากแถบสีที่เกิดขึ้นบริเวณเส้นทดสอบ (test zone) ซึ่งสามารถอ่านผลได้ภายใน 10-15 นาที (Bazin *et al.*, 2010) และเนื่องจากสามารถอ่านผลการทดสอบได้เอง ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือในการแปรผล สะดวกต่อการนำไปใช้วิเคราะห์ผลในเชิงคุณภาพ จึงได้มีการพัฒนาชุดทดสอบแบบ strip test นี้ มาใช้อย่างกว้างขวาง เช่น ชุดตรวจการตั้งครรภ์ ชุดตรวจสารเสพติด ชุดตรวจวินิจฉัยโรค และชุดตรวจคุณภาพอาหาร รวมถึงการตรวจสอบการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรด้วย (Dzantiev *et al*, 2014)

Urusov *et al*. (2011) พัฒนาชุดทดสอบสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยเทคนิค LFIA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเชื่อมติดกับอนุภาคทอง ใช้หลักการแข่งขันของสารโอคราทอกซิน เอ ในตัวอย่าง และโอคราทอกซิน เอ ที่เชื่อมติดกับโปรตีนบนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสจับกับแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทอง ถ้ามีการปนเปื้อนของสารพิษจะไม่พบแถบสีบริเวณเส้นทดสอบ (test line) สามารถอ่านผลการทดสอบได้ภายใน 10 นาที นอกจากนี้ Liu et al. (2018) พัฒนาชุดทดสอบสารโอคราทอกซิน เอ ในไวน์แดง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เชื่อมติดกับอนุภาคทองขนาด 15 นาโนเมตร ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และสามารถตรวจจับสารโอคราทอกซิน เอ ได้ต่ำสุดที่ปริมาณ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. การผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ แบบรวดเร็ว

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2558 - กันยายน 2561

สถานที่ทำการทดลอง กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

1.1 การเสนอโครงการต่อคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง (National Laboratory Animal Centre Animal Care and Use Committee, NLAC-ACUC)

จัดทำแบบฟอร์มเสนอโครงการวิจัยการผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ จากกระต่ายต่อคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง ดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

1.2 การผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ

1.2.1 การเตรียมแอนติเจน

ผลิตแอนติซีรั่มแบบ polyclonal antibody โดยเตรียมสาร OTA-BSA adjuvant เป็นแอนติเจนสำหรับการฉีดกระต่ายทดลอง การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก เตรียม OTA-BSA ปริมาณ 300 ไมโครกรัม ผสมกับ Complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:2 ใช้ magnetic stirrer ปั่นสารให้ละลายผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน ในการฉีดกระตุ้น (Boosts) เตรียมสารละลาย OTA-BSA 250 ไมโครกรัม ผสมกับ Incomplete Freund's Adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ปั่นสารให้ละลายผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน

1.2.2 การฉีดแอนติเจนในกระต่ายทดลอง

เก็บเลือดกระต่ายก่อนทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรกเพื่อใช้เป็น normal serum สำหรับเปรียบเทียบคุณภาพแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ โดยเจาะเลือดบริเวณเส้นเลือดแดงใหญ่กลางใบหูของกระต่ายทดลอง เก็บเลือดประมาณ 3-5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองปิดฝาและวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อดูดเก็บเฉพาะส่วนของน้ำเหลือง (serum) ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรกนำแอนติเจนที่เตรียมไว้ฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังคอของกระต่ายทดลอง (subcutaneous injection) ใช้แอนติเจนปริมาณ 1 มิลลิลิตร ต่อกระต่าย 1 ตัว โดยแบ่งฉีดบริเวณใต้ผิวหนัง 4 ตำแหน่ง ๆ ละ 250 ไมโครลิตร และหลังจากนั้น 3 สัปดาห์ ฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนสำหรับ Boosts ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ต่อกระต่าย 1 ตัว โดยแบ่งฉีดแบบ subcutaneous injection 2 ตำแหน่ง และ ฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณต้นขาหลัง (Intramuscular injection) 2 ตำแหน่ง (Harlow and Lane, 1988) ทำการฉีดกระตุ้น 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 เดือน

1.2.3 การเจาะเลือดกระต่ายเพื่อเก็บแอนติซีรั่ม

หลังการฉีดแอนติเจนครั้งแรกประมาณ 3 สัปดาห์ ทำการเจาะเลือดบริเวณเส้นเลือดแดงใหญ่กลางใบหูของกระต่ายทดลอง และทำการเจาะเก็บทุกสัปดาห์เป็นเวลา 15 สัปดาห์ เก็บเลือดกระต่ายที่ได้ใส่ในหลอดทดลองวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อให้เกล็ดเลือดจับตัวเป็นก้อน (blood clots) จากนั้นดูดเก็บเฉพาะส่วนของน้ำเหลือง (serum) ใส่ใน

กรมวิชาการเกษตร

micro tube หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำให้เป็นแอนติซีรั่มบริสุทธิ์

1.2.4 การทดสอบความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้เบื้องต้น

ทดสอบความเข้มข้นเบื้องต้นด้วยเทคนิคการตกตะกอนผ่านวุ้น (Agar Gel Immunodiffusion Test) ด้วยวิธี Ouchterlony Double Diffusion Test ในจานเลี้ยงเชื้อ โดยเทวุ้น Agarose ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ เมื่อวุ้นแข็งตัวทำการเจาะหลุมตามแผนผังที่วางไว้ โดยเจาะหลุมเป็นกลุ่ม มีหนึ่งหลุมอยู่ตรงกลาง และมีหลุมล้อมรอบอีก 6 หลุม ขนาดความกว้างของหลุมประมาณ 0.5 เซนติเมตร เตรียมหลุมทดสอบได้ประมาณ 4 กลุ่มต่อจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจะนำแอนติซีรั่มมาเจือจางใน 0.01M Phosphate Buffered Saline (PBS) ให้มีความเข้มข้นเป็น 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 และ1:320 หยดแอนติซีรั่มที่เตรียมลงในหลุม 6 หลุมที่อยู่รอบ ๆ และหยดแอนติเจน (OTA-BSA) ลงในหลุมตรงกลาง นำจานเลี้ยงเชื้อไปใส่ในกล่องที่มีความชื้นปิดฝาแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาอ่านผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

1.2.5 การทำแอนติซีรั่มให้บริสุทธิ์

เตรียมแอนติซีรั่มให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Ammonium precipitation โดยนำแอนตีซีรั่ม (Crude Serum) จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 0.5-1 มิลลิลิตร จนได้ตะกอนสีขาวขุ่น จากนั้นนำแอนติซีรั่มเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะเกิดการตกตะกอนของแอนติซีรั่ม ทิ้งน้ำส่วนใสให้เหลือแต่ตะกอน แล้วนำตะกอนที่ได้มาละลายใน 1 มิลลิลิตร ของ 0.01M PBS และทำซ้ำขั้นตอนข้างต้นอีกครั้งโดยผสมกับสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวจนได้ตะกอนสีขาวขุ่น จากนั้นนำแอนติซีรั่มเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง นำตะกอนที่ได้มาละลายใน 0.01M PBS แล้วดูดสารละลายที่ได้ใส่ dialysis tubing cellulose membrane ทำการ dialysis โดยนำแอนติซีรั่มที่อยู่ใน dialysis tubing แช่ในน้ำกลั่น 2 ลิตร วางบนเครื่องกวนสาร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้ว dialysis อีกครั้งโดยเปลี่ยนจากน้ำกลั่นเป็น 0.01M PBS ทำซ้ำ 2 ครั้ง และ dialysis ต่อข้ามคืน นำส่วนที่ผ่านการ dialysis แล้วมาแบ่งใส่ micro tube หลอดละ 500 ไมโครลิตร แล้วเก็บแอนติซีรั่มโอคราทอกซิน เอ บริสุทธิ์ที่ผลิตได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2.6 การวัดความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้

เปรียบเทียบความเข้มข้นของแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ของกระต่ายแต่ละตัวที่เตรียมได้แต่ละครั้งกับ normal serum ด้วยวิธี Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay โดยเคลือบหลุมทดสอบด้วย OTA-BSA ที่ละลายใน 0.01M PBS ความเข้มข้น 1:20,000 ปริมาณหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทสารในหลุมทดสอบทิ้ง ล้างหลุมทดสอบด้วย 0.01M PBS + 0.05% Tween 20 (PBS-T) 3 ครั้ง แล้วหยด blocking buffer หรือPBS-BSA (0.01M PBS + 0.1% Bovine Serum Albumin) ลงในหลุมทดสอบ หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำหลุมทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วเทสารในหลุมทดสอบทิ้ง ล้างหลุมทดสอบด้วย PBS-T 3 ครั้ง จากนั้นเตรียม normal serum และแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ที่ผลิตได้ให้มีความเข้มข้นต่างกัน 12 ความเข้มข้น (1:100, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000, 1:128000,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

1:256000, 1:512000, 1:1024000) โดยละลายด้วย PBS-BSA หยดแอนติซีรั่มแต่ละความเข้มข้นลงในหลุมทดสอบหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เทสารในหลุมทดสอบทิ้ง และล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง หยด 50 ไมโครลิตร Goat Anti-Rabbit IgG-HRP Conjugate ลงไปในหลุมทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เทสารในหลุมทดสอบทิ้ง และล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง หยด TMB substrate (3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine) หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ปฏิกิริยาจะเกิดสีฟ้าเข้มจนถึงใสในหลุมทดสอบ หยุดปฏิกิริยาด้วย 2.89M Phosphoric acid โดยหยดลงในหลุมทดสอบ หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำหลุมทดสอบไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density; O.D.) ด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (nm) และวิเคราะห์ผลเป็นค่า Titer หรือ ความเจือจางสูงสุดของแอนติซีรั่มของกระต่ายทดลองทั้ง 4 ตัว ที่ยังทำปฏิกิริยากับสารโอคราทอกซิน เอ โดยดูได้จากค่าการดูดกลืนแสงของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ในแต่ละสัปดาห์เปรียบเทียบกับซีรั่มก่อนการฉีดแอนติเจน

1.3. การเตรียมเอนไซม์คอนจูเกต (OTA-HRP conjugate)

ทดลองเตรียมการเชื่อมต่อสารโอคราทอกซิน เอ กับเอนไซม์ Horseradish Peroxidase (HRP) 3 วิธีการ ดังนี้

วิธีการที่ 1 เตรียม OTA-HRP conjugate ตามวิธีการของ Schwerdt *et al*. (1999) โดยมีสาร *N*-hydroxysuccinimide (NHS), Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) และ Dimethylformamide (DMF) ในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อ เติมสาร OTA 1.6 µmol ลงใน 7.5 µmol NHS และ 15 µmol DCC ละลายสารทั้ง 3 ชนิดด้วย 65 µl DMF แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเชื่อมต่อกับเอนไซม์ HRP โดยหยดสารละลายที่ได้ลงใน 0.25 µmol HRP ที่ละลายใน 1.5 ml 0.13 mmol/l sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$) แล้วบ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนำสารที่ได้มา dialysis ใน Phosphate Buffer Saline (PBS) ข้ามคืนโดยทำการเปลี่ยน buffer ทุกวัน เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้ได้สาร OTA-HRP ที่บริสุทธิ์ ดูด OTA-HRP ใส่ในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

วิธีการที่ 2 เตรียม OTA-HRP conjugate ตามวิธีการของ Stachowiak *et al.* (2017) โดยเตรียม OTA 1.362 µmol ละลายใน 300 µl dimethyl sulfoxide (DMSO) และเตรียม 50 µl ของ DCC และ NHS (80 mM) ที่ละลายใน DMSO นำสารละลาย DCC และ NHS ที่เตรียมได้เติมลงในสารละลาย OTA นำไปเขย่าและบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เตรียม 227 nmol HRP ละลายใน 1.7 ml Sodium Phosphate Buffer (PB) เติมสารละลาย OTA ที่บ่มข้ามคืนลงในสารละลาย HRP นำไปเขย่าและบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ดูด OTA-HRP เพื่อนำไป dialysis ใน dialyzing buffer (0.9% sodium chloride) เป็นเวลา 3 วัน โดยเปลี่ยน buffer วันละ 2 ครั้ง นำคอนจูเกตที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

วิธีการที่ 3 เตรียม OTA-HRP conjugate ตามวิธีการของ Radoi *et al.* (2009) โดยละลาย 5 mg OTA ใน 500 µl acetone และเติมด้วย 7.5 mg 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เตรียมเอนไซม์ HRP โดยชั่ง HRP 21 mg ละลายใน 2 ml

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

carbonate buffer นำสารละลาย OTA มาหยดลงในสารละลาย HRP แล้วนำสารละลายที่ได้ไปเขย่าและบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แยก OTA ที่ไม่ได้คอนจูเกตโดยการผ่าน NAP-10 column โดยมี PBS เป็น mobile phase เก็บเฉพาะส่วนที่คอนจูเกต OTA-HRP ซึ่งมีสีน้ำตาลไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์คอนจูเกตที่เตรียมได้แต่ละวิธีการ โดยนำ OTA-HRP conjugate ที่เตรียมได้ไปทดสอบความเข้มข้นและนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกัน

1.4 ทดสอบความเข้มข้นของ OTA-HRP conjugate

นำ OTA-HRP ที่เตรียมได้ทั้ง 3 วิธีการ มาทดสอบความเข้มข้นด้วยวิธี Direct competitive ELISA โดยเคลือบหลุมทดสอบด้วยแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ บริสุทธิ์ (IgG-OTA) ที่ผลิตได้ ความเข้มข้น 5, 6 และ 7 µg/ml หลุมละ 100 µl บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทสารในหลุมทดสอบทิ้ง นำมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง แล้วหยด blocking buffer (PBS-BSA) หลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำหลุมทดสอบมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง และเตรียม OTA-HRP conjugate ที่ได้จากแต่ละวิธีการให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 8 ระดับ (1:100, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000 และ 1:64000) โดยเจือจางด้วย PBS-BSA หยด OTA-HRP conjugate แต่ละความเข้มข้นลงในหลุมทดสอบ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มหลุมทดสอบไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เทสารในหลุมทดสอบทิ้งและล้างหลุมทดสอบด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง หยด TMB substrate ลงไปทุกหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มหลุมทดสอบนาน 10 นาที ปฏิกิริยาจะเกิดสีฟ้าเข้มจนถึงใสในหลุมทดสอบ หยุดปฏิกิริยาด้วย 2.89M Phosphoric acid โดยหยดลงในหลุมทดสอบหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำหลุมทดสอบไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm

2. การพัฒนาชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ โดยวิธี ELISA

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

2.1 การเตรียมแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ต่อสารโอคราทอกซิน เอ (IgG-OTA)

โดยเตรียมแอนติซีรั่ม (Crude Serum) ให้เป็นอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin G, IgG) ด้วยวิธี Ammonium precipitation

2.1.1 นำแอนติซีรั่มที่ผลิตได้จากการทดลองการผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 0.5-1 มิลลิลิตร จนได้ตะกอนสีขาวขุ่น

2.1.2 นำแอนติซีรั่มเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จะเกิดการตกตะกอนของแอนติซีรั่ม

2.1.3 ทิ้งน้ำส่วนใสให้เหลือแต่ตะกอน

2.1.4 นำตะกอนที่ได้มาละลายใน 1 มิลลิลิตร ของ 0.01M Phosphate buffer saline (PBS)

2.1.5 เติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวจนได้ตะกอนสีขาวขุ่น

กรมวิชาการเกษตร

2.1.6 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 1.2 ถึง 1.4 แล้วดูดสารละลายที่ได้ใส่ dialysis tubing cellulose membrane

2.1.7 ทำการ dialysis โดยนำแอนติซีรั่มที่อยู่ใน dialysis tubing แช่ในน้ำกลั่น 2 ลิตร วางบนเครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

2.1.8 dialysis อีกครั้งโดยเปลี่ยนจากน้ำกลั่นเป็น 0.01M PBS ทำซ้ำ 2 ครั้ง

2.1.9 dialysis ต่อข้ามคืน นำส่วนที่ผ่านการ dialysis แล้วมาแบ่งใส่ micro tube หลอดละ 500 ไมโครลิตร แล้วเก็บแอนติซีรั่มโอคราทอกซิน เอ บริสุทธิ์ (IgG-OTA) ที่ผลิตได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการทดลอง

นำแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ที่ผลิตได้มาปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (mg/ml) ด้วย 0.01M PBS โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 280 nm

2.2 ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารที่ใช้ในหลุมทดสอบ ด้วยวิธี Checkerboard titration test

2.2.1 การตรวจวิเคราะห์แบบ Indirect Competitive ELISA ทดสอบโดยเจือจาง OTA-BSA ด้วยสารละลาย 0.01M PBS ให้มีความเข้มข้น 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 และ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (µg/ml) สำหรับเคลือบหลุมทดสอบ และเตรียมแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ต่อสารโอคราทอกซิน เอ (IgG-OTA) ที่เจือจางด้วยสารละลาย PBS-BSA ให้มีความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 µg/ml นำไปทดสอบร่วมกันเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ โดยมีวิธีการดังนี้

2.2.1.1 เคลือบหลุมทดสอบด้วย OTA-BSA ที่ละลายใน 0.01M PBS ที่ความเข้มข้น 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 และ 0.5 µg/ml หลุมละ 100 ไมโครลิตร (µl)

2.2.1.2 นำหลุมทดสอบบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.1.3 นำหลุมทดสอบออกมา เทสารในหลุมทิ้ง จากนั้นล้างด้วย Phosphate Buffer Saline-Tween 20 (PBS-T) 3 ครั้ง เคาะหลุมทดสอบบนกระดาษให้แห้ง

2.2.1.4 หยด blocking buffer (Phosphate Buffer Saline-Bovine Serum Albumin; PBS-BSA) ลงในหลุมทดสอบ หลุมละ 150 µl แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2.2.1.5 เทสารในหลุมทิ้งและล้างหลุมทดสอบด้วย PBS-T 3 ครั้ง หยดแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ต่อสารโอคราทอกซิน เอ ที่ละลายด้วย PBS-BSA ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 µg/ml ลงในหลุม ๆ ละ 100 µl

2.2.1.6 นำหลุมทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที

2.2.1.7 เทสารในหลุมทิ้งและล้างหลุมทดสอบด้วย PBS-T 3 ครั้ง เคาะหลุมทดสอบบนกระดาษให้แห้ง

2.2.1.8 หยดตามด้วย secondary antibody (Goat Anti-Rabbit IgG-HRP conjugate) ความเข้มข้น 1:3,000 หลุมละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที

2.2.1.9 เทสารในหลุมทิ้งและล้างหลุมทดสอบด้วย PBS-T 3 ครั้ง เคาะหลุมทดสอบบนกระดาษให้แห้ง

2.2.1.10 หยด TMB substrate หลุมละ 100 µl บ่มนาน 10 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.1.11 หยุดปฏิกิริยาในหลุมทดสอบด้วย 2.89M Phosphoric acid หลุมละ 100 µl นำหลุมทดสอบไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (optical density; O.D.) ด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

2.2.2 การตรวจวิเคราะห์แบบ Direct Competitive ELISA ทดสอบโดยเจือจาง IgG-OTA ด้วยสารละลาย coating buffer ให้มีความเข้มข้น 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 และ 1 µg/ml สำหรับเคลือบหลุมทดสอบ และเตรียมเอนไซม์คอนจูเกต (OTA-HRP conjugate) ที่เจือจางด้วยสารละลาย PBS-BSA ให้มีความเข้มข้น 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 และ 1:6400 นำไปทดสอบร่วมกันเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ โดยมีวิธีการดังนี้

2.2.2.1 เคลือบหลุมทดสอบด้วย IgG-OTA ที่ละลายใน coating buffer ความเข้มข้น 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 และ 0.5 µg/ml หลุมละ 100 µl

2.2.2.2 นำหลุมทดสอบบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.2.3 นำหลุมทดสอบออกมา เทสารในหลุมทิ้ง จากนั้นล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เคาะหลุมทดสอบบนกระดาษให้แห้ง

2.2.2.4 หยด blocking buffer (PBS-BSA) ลงในหลุมทดสอบ หลุมละ 150 µl แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2.2.2.5 เทสารในหลุมทิ้งและล้างหลุมทดสอบด้วย PBS-T 3 ครั้ง หยด OTA-HRP conjugate ที่เจือจางด้วย PBS-BSA ให้มีความเข้มข้น 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 และ 1:6400 ลงในหลุมทดสอบ หลุมละ 100 µl

2.2.2.6 นำหลุมทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2.2.2.7 เทสารในหลุมทิ้งและล้างหลุมทดสอบด้วย PBS-T 3 ครั้ง เคาะหลุมทดสอบบนกระดาษให้แห้ง

2.2.2.8 หยด TMB substrate หลุมละ 100 µl บ่มนาน 10 นาที

2.2.2.9 หยุดปฏิกิริยาในหลุมทดสอบด้วย 2.89M Phosphoric acid หลุมละ 100 µl นำหลุมทดสอบไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm

2.3 ทดสอบอุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเคลือบหลุมทดสอบ

เคลือบหลุมทดสอบด้วย OTA-BSA ความเข้มข้น 5, 6 และ 7 µg/ml ที่ละลายใน 0.01 M PBS หยดลงในหลุมทดสอบ หลุมละ 100 µl เปรียบเทียบอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ โดยนำหลุมทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 และ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่ม 2, 4, 6 ชั่วโมง และบ่มข้ามคืน (ประมาณ 14-15 ชั่วโมง) เพื่อหาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกาะจับกันของสารในหลุมทดสอบ จากนั้นนำหลุมทดสอบที่เคลือบและบ่มไว้มาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เคาะหลุมทดสอบบนกระดาษให้แห้ง หยด PBS-BSA ลงในหลุมทดสอบ หลุมละ 150 µl แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำหลุมทดสอบที่ได้มาทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA ตามวิธีการในข้อ 2.1.5 ถึง 2.1.11 และดูปฏิกิริยาความเข้มของสีที่เกิดขึ้นในหลุมทดสอบ โดยการอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm

กรมวิชาการเกษตร

2.4 ทดสอบสารละลายที่เหมาะสมในการเตรียมสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน (OTA standard)

โดยเตรียมจากสารโอคราทอกซิน เอ แบบผง 1 มิลลิกรัม เจือจางด้วยสารละลาย toluene + acetic acid (99+1) นำไปอ่านค่าด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 333 nm และคำนวณความเข้มข้นด้วยสูตร

$$\text{OTA } (\mu g/ml) = \frac{A \times MW \times 1000}{\varepsilon}$$

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 333 nm

MW = น้ำหนักโมเลกุลของสารโอคราทอกซิน เอ

ε = ค่าโมลาร์ แอบซอบติวิตี้ ของสารโอคราทอกซิน เอ ใน toluene + acetic acid

เมื่อได้ความเข้มข้นตั้งต้นแล้วนำมาเจือจางต่อให้เป็นสารพิษมาตรฐาน ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (ng/ml) ด้วยสารละลาย 4 สูตร ได้แก่ Phosphate Buffer Saline+10% Methanol (PBS+10%MeOH), Sample and standard dilution buffer (SDB), Phosphate Buffer Saline-Tween20-Bovine Serum Albumin+7%Methanol (PBS-T-BSA+7%MeOH) และ Phosphate Buffer+1% gelatin (PB+1% gelatin) นำสารพิษมาตรฐานทั้ง 3 สูตรที่เตรียมได้ทดสอบกับชุดทดสอบ Veratox® Ochratoxin test kit ขั้นตอนตามคู่มือที่ใช้ในชุดทดสอบ และอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 630 nm

3. การพัฒนาชุดตรวจสอบโอคราทอกซิน เอ โดยวิธี Lateral Flow Immunoassay

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2560 - กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

3.1 การทดสอบความเข้มข้นของแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ในการติดฉลากกับอนุภาคทอง

นำแอนติซีรัมต่อสารโอคราทอกซิน เอ ที่ได้จากการทดลอง “การผลิตแอนติซีรัมต่อสารโอคราทอกซิน เอ เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ แบบรวดเร็ว” มาเตรียมแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ บริสุทธิ์ (IgG-OTA) ปรับให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย 0.01M PBS (phosphate buffer saline) วัดค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 1.4 ที่ช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร หยดแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ที่ระดับความเข้มข้น 200, 150, 100, 50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลุมทดสอบ หลุมละ 10 ไมโครลิตร แล้วหยดสารละลายอนุภาคทองที่ระดับความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ ตามลงไป 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 10% หลุมละ 100 ไมโครลิตร บันทึกการเปลี่ยนแปลงสีของอนุภาคทองที่ระดับความเข้มข้นของแอนติบอดี และค่าความเป็นกรด-ด่างของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการเชื่อมติดกัน โดยคัดเลือกจากความสามารถในการจับกันได้หมดของ OTA-IgG กับอนุภาคทอง ทำการทดสอบซ้ำเพื่อดูความคงที่ของความเข้มข้นของ OTA-IgG และความเป็นกรด-ด่างของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการเชื่อมติดกัน

กรมวิชาการเกษตร

3.2 การติดฉลากอนุภาคทองด้วยแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ (colloidal gold- labeled OTA-IgG)

นำสารละลายอนุภาคทองปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ เติมสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) เข้มข้น 1% ปริมาตร 37.5, 50, 75, 100 และ 125 ไมโครลิตร หรือที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง 7.0, 7.4, 7.7, 8.6 และ 9.5 ตามลำดับ กวนสารละลายเบาๆ เติม OTA-IgG ที่ความเข้มข้น 50 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราส่วน OTA-IgG ต่ออนุภาคทองเท่ากับ 1:10 กวนเบาๆ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติม โบวีนซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA) เข้มข้น 10% กวนเบาๆ เป็นเวลา เป็นเวลา 60 นาที ปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ที่เติมน้ำตาลซูโครส 1, 10 และ 20%

3.3 การเตรียมแผ่นปล่อยตัวตรวจจับ (Conjugate Released Pad, CRP)

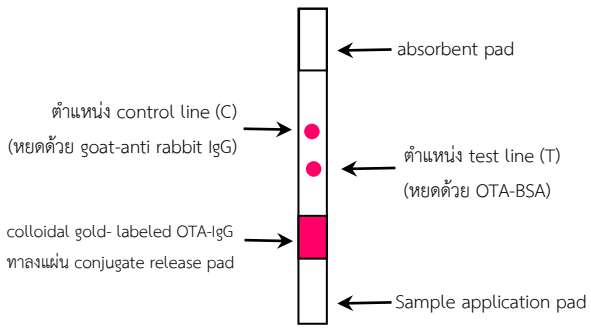
นำแผ่น CRP ที่ตัดให้มีขนาดกว้างประมาณ 0.7 เซนติเมตร มาวางบนกระดาษที่สะอาด ใช้พู่กันจุ่มสารละลาย colloidal gold- labeled OTA-IgG ทาลงบนกระดาษ CRP ให้ทั่ว

3.4 การเตรียม OTA-BSA และ goat anti-rabbit IgG สำหรับเส้น test line และ control line

นำแผ่น Nitrocellulose Membrane (NCM) ติดลงบนแผ่นรองรับปฏิกิริยา (Backing Pad) ขีดเส้น control line (C) และเส้น test line (T) ห่างกันประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยใช้ปากกาหมึกซึมจุ่ม OTA-BSA ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.8, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ขีดลงบนเส้น test line และปากกาอีกด้ามจุ่ม Goat Anti-Rabbit IgG (2^{nd} antibody) ความเข้มข้น 0.5, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ขีดลงตรงตำแหน่งเส้น control line แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที แต่ในการทดสอบเบื้องต้นจะทำการหยด OTA-BSA และ goat anti-rabbit IgG ลงบน strip test ที่ตัดให้มีขนาดประมาณ 0.4 เซนติเมตร

3.5 การประกอบชุดตรวจสอบ OTA แบบ Strip Test

นำชิ้นส่วนต่างๆ ซึ่งประกอบด้วยแผ่นรองรับตัวอย่าง (sample application pad, SAP) แผ่นปล่อยตัวตรวจจับ (conjugate release pad, CRP) กระดาษไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) แผ่นดูดซับตัวอย่าง absorbent pad แผ่นติดส่วนประกอบชุดทดสอบ (Plastic Backing Card) มาประกอบเป็นชุดตรวจสอบ



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ แบบรวดเร็ว

ตามพระราชบัญญัติสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ พ.ศ. 2558 ที่ใช้กำกับดูแลและส่งเสริมการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของประเทศไทย ทำให้การใช้สัตว์ทดลองจะต้องเป็นไปตามมาตรฐานสากล รวมทั้งให้มีคณะกรรมการกำกับดูแลเพื่อทำหน้าที่ในการพิจารณาอนุมัติโครงการ และกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ให้สอดคล้องกับจรรยาบรรณ โครงการวิจัยการผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ จากกระต่าย ได้ผ่านการพิจารณาและแก้ไขจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยง และการใช้สัตว์ทดลอง (NLAC-ACUC) แล้ว จึงได้ดำเนินการเลี้ยงกระต่ายทดลองสายพันธุ์ New Zealand White อายุ 3 เดือน น้ำหนัก 2,500-3,000 กรัม เพศเมีย จำนวน 4 ตัว ที่ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับทำการทดลอง ในการเก็บเลือดกระต่ายทดลองสามารถเจาะเก็บเลือดกระต่ายได้ประมาณ 6-8 มิลลิลิตร ต่อกระต่าย 1 ตัว ต่อครั้ง นำเลือดมาดูดเก็บเฉพาะส่วนซีรั่มได้ประมาณ 3-5 มิลลิลิตร ต่อกระต่าย 1 ตัว ต่อครั้ง รวมการทดลองทั้งหมด 18 สัปดาห์ ทำการเก็บเลือดกระต่ายทดลองทั้งหมด 15 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายจะทำการเก็บเลือดกระต่ายทดลองทั้งตัว ได้แอนติซีรั่มทั้งหมดประมาณ 420 มิลลิลิตร

ผลการทดสอบความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้เบื้องต้นด้วยวิธี Ouchterlony double diffusion test พบว่า แอนติซีรั่มที่ผลิตได้เป็นแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาแอนติเจน (OTA-BSA) ที่อยู่ในหลุมกลางแพร่กระจายเข้าหากันรอบทิศทางกับแอนติซีรั่มที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในตัวกลางที่เป็นวุ้น เกิดการตกตะกอนเป็นแถบตะกอน (precipitin band) เกิดขึ้นในวุ้น ซึ่งปฏิกิริยาความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นเป็นแบบ identity คือ แอนติซีรั่มทั้งสองหลุม มีความเหมือนกันทางภูมิคุ้มกันวิทยา ในการเก็บแอนติซีรั่มครั้งที่ 1 ถึงครั้งที่ 3 ความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ยังน้อย จะเกิดแถบปฏิกิริยาที่ความเข้มข้น 1:20 เมื่อเทียบกับ normal serum ซึ่งไม่มีการฉีดแอนติเจนจะพบว่า ไม่เกิดแถบปฏิกิริยาในหลุมทดสอบและแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ ที่ผลิตได้ความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถเกิดปฏิกิริยาในหลุมทดสอบคือ 1:160 ในการเจาะเลือดสัปดาห์ที่ 7 จากกระต่ายตัวที่ 3 ซึ่งแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ในแต่ละครั้งมีความเข้มข้นแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของกระต่ายทดลองแต่ละตัว จากแอนติซีรั่มที่ผลิตได้สามารถตกตะกอนให้เป็นแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ต่อสารโอคราทอกซิน เอ (IgG-OTA) ได้ประมาณ 320 มิลลิลิตร

วัดความเข้มข้นของแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ (Purified IgG) ที่ผลิตได้ด้วยวิธี Indirect Competitive ELISA พบว่า แอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ ค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 หลังจากการฉีดกระตุ้น โดยสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในหลุมทดสอบที่มีสีเหลืองเข้มแสดงถึงแอนติซีรั่มบริสุทธิ์มีความเข้มข้นมาก หลุมที่มีสีเหลืองจางแอนติซีรั่มมีความเข้มข้นน้อย ซึ่งแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ ของกระต่ายทั้ง 4 ตัว ที่ผลิตได้สัปดาห์ที่ 2 และ 3 แอนติซีรั่มที่ผลิตได้ยังมีความเข้มข้นน้อยอยู่ที่ประมาณ 1:16,000 แต่ในสัปดาห์ที่ 8 และ 9 กระต่ายทั้ง 4 ตัวมีความเข้มข้นของแอนติซีรั่มบริสุทธิ์สูง ปฏิกิริยาที่

กรมวิชาการเกษตร

เกิดขึ้นในหลุมทดสอบมีสีเหลืองเข้ม โดยมีความเข้มข้นสูงถึง 1:1,024,000 ความเข้มข้นของแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ในกระต่ายทดลองแต่ละตัวจะมีความแตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์ โดยหลังการฉีดกระตุ้นในแต่ละครั้ง กระต่ายทดลองจะผลิตแอนติบอดีเพิ่มสูงขึ้น กระต่ายทั้ง 4 ตัว ผลิตแอนติซีรั่มมีความเข้มข้นสูงถึง 1:1,024,000 ในการเก็บเลือดครั้งที่ 8, 9 และ 10 (AS8, AS9, AS10) แต่ในครั้งที่ 10 กระต่ายตัวที่ 4 ผลิตแอนติซีรั่มลดลงเหลือ 1:512,000

ค่าการสิ้นสุดปฏิกิริยา (Titer) ของกระต่ายทดลองทั้ง 4 ตัว ดูได้จากค่าการดูดกลืนแสงของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ในแต่ละสัปดาห์เปรียบเทียบกับซีรั่มก่อนการฉีดแอนติเจน (NS) ซึ่งถ้าปฏิกิริยากับแอนติเจนในหลุมทดสอบเป็นสีเหลืองเข้มค่าการดูดกลืนแสงสูง แสดงว่าแอนติซีรั่มมีค่า Titer สูง แต่ถ้าปฏิกิริยากับแอนติเจนในหลุมเป็นสีเหลืองจาง ค่าการดูดกลืนแสงต่ำ แอนติซีรั่มมีค่า Titer ต่ำ ในการทดลองพบว่ากระต่ายตัวที่ 1 แอนติซีรั่มที่ผลิตได้ในสัปดาห์แรก (AS1) มีค่า Titer ต่ำ อยู่ที่ 1:16,000 และมีค่า Titer สูงขึ้นในสัปดาห์ต่อ ๆ มา โดยมีค่า Titer สูงสุดถึง 1:1,024,000 ในสัปดาห์ที่ 9 และ 11 (AS9 และ AS11) เช่นเดียวกับกระต่ายตัวที่ 2, 3 และ 4 เนื่องจากเป็นช่วงที่กระต่ายทดลองเจริญเติบโตมีความแข็งแรงสมบูรณ์เต็มที่ และมีการฉีดแอนติเจนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 2 ครั้งแล้ว แต่ในสัปดาห์ที่ 13 และ 15 กระต่ายทั้ง 4 ตัว มีค่า Titer ต่ำลง อยู่ที่ 1:32,000 แม้จะมีการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันแล้วก็ตาม

ผลการเชื่อมต่อ ochratoxin A กับเอนไซม์ Horseradish Peroxidase (HRP) ตามวิธีการที่ 1 โดยใช้ Dimethylformamide (DMF) ในการทำปฏิกิริยาได้ OTA-HRP conjugate ประมาณ 2 มิลลิลิตร ซึ่งเอนไซม์คอนจูเกตที่ผ่านการ dialysis ใน PBS ได้สารละลายสีน้ำตาลขุ่น ส่วนวิธีการที่ 2 ที่ใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) ในการทำปฏิกิริยา หลังผ่านการ dialysis ด้วย 0.9% sodium chloride ได้ OTA-HRP conjugate ที่มีสีน้ำตาลใสกว่าวิธีการแรก ประมาณ 2 มิลลิลิตร และสุดท้ายวิธีการที่ 3 ทำปฏิกิริยาด้วย 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) แล้วแยกเอาส่วน OTA ที่ไม่ได้คอนจูเกตออก โดยการผ่าน NAP-10 column ได้ OTA-HRP conjugate ประมาณ 4 มิลลิลิตร

ในการทดสอบ OTA-HRP conjugate ที่มีความเข้มข้นสูงจะทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มที่เคลือบในหลุมทดสอบเกิดเป็นสีฟ้าเข้ม ซึ่งผลการทดสอบความเข้มข้นของเอนไซม์คอนจูเกต OTA-HRP ที่เตรียมได้ด้วยวิธี Direct competitive ELISA พบว่า เกิดปฏิกิริยาในหลุมทดสอบเรียงกันจากสีฟ้าเข้ม-สีฟ้าจางตามความเข้มข้นของ OTA-HRP conjugate โดยหลุมที่มีความเข้มข้นของ OTA-HRP conjugate มาก (1:100) สีในหลุมทดสอบเป็นสีฟ้าเข้ม ส่วนหลุมที่มีความเข้มข้นของ OTA-HRP conjugate น้อย (1:64000) สีในหลุมทดสอบเป็นสีฟ้าจาง และจากการนำเอนไซม์คอนจูเกตจาก 3 วิธีการ มาทดสอบจะเห็นได้ว่า OTA-HRP conjugate ที่เตรียมได้ตามวิธีการที่ 1 ดีที่สุด ปฏิกิริยาที่เกิดในหลุมทดสอบมีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าวิธีการที่ 2 และ 3 ในทุกความเข้มข้น โดยเอนไซม์คอนจูเกตที่ผลิตได้มีความเข้มข้นสูงถึง 1:64,000 และเมื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในหลุมทดสอบที่เคลือบด้วย IgG-OTA ความเข้มข้น 6 µg/ml และเอนไซม์คอนจูเกตความเข้มข้น 1:100 ที่เตรียมได้ตามวิธีการที่ 1, 2 และ 3 ปฏิกิริยาในหลุมทดสอบมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 3.871 รองลงมาคือวิธีการที่ 2 และ 3 ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 3.782 และ 0.867 ตามลำดับ และจากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของ IgG-OTA ที่ 5, 6 และ 7 µg/ml มีค่าการดูดกลืนแสงที่ใกล้เคียงกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. การพัฒนาชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ โดยวิธี ELISA

แอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ บริสุทธิ์ (IgG-OTA) จะมีลักษณะใส ไม่มีสี นำมาปรับให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml ด้วย 0.01M PBS โดยนำแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ช่วงคลื่น 280 nm ให้มีค่าเท่ากับ 1.4 ซึ่งแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ที่ได้มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 1 mg/ml เพื่อเป็นความเข้มข้นตั้งต้นสำหรับนำไปเจือจางใช้ในการทดสอบต่อไป ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบแบบ Indirect Competitive ELISA พบว่า สีของปฏิกิริยาในหลุมทดสอบมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.518-4.065 ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นของ IgG-OTA สูง 0.5-2 µg/ml ปฏิกิริยาในหลุมทดสอบจะมีสีเข้มมาก ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 3.424-4.065 แต่เมื่อความเข้มข้นของ IgG-OTA ลดลงที่ 0.03125-0.25 µg/ml ค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงตามลำดับ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.518-3.21 ซึ่งระดับความเข้มข้นเหมาะสมที่จะนำไปทดสอบต่อไป คือ OTA-BSA 5, 6 และ 7 µg/ml สำหรับใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบ และ IgG-OTA ที่ความเข้มข้น 0.25 µg/ml สีของปฏิกิริยาในหลุมทดสอบ มีค่าความเข้มแสง 2.858, 3.009 และ 3.018 ตามลำดับ

ทดสอบความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบแบบ Direct Competitive ELISA พบว่า ปฏิกิริยาในหลุมทดสอบมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.559-3.832 ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นของ OTA-HRP conjugate 1:100-1:200 ความเข้มข้นของสารมากหลุมทดสอบมีสีฟ้าเข้ม แต่เมื่อความเข้มข้นของ OTA-HRP conjugate ลดลง สีในหลุมทดสอบจะจางลง ตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 1:400-1:6,400 ปฏิกิริยาในหลุมทดสอบจะมีสีฟ้าจนถึงสีฟ้าจาง โดยมีค่าการดูดกลืนแสง 2.981-0.559 ซึ่งระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับทดสอบแบบ Direct Competitive ELISA ต่อไป คือ IgG-OTA 4, 5 และ 6 µg/ml สำหรับการเคลือบหลุมทดสอบ และทดสอบร่วมกับ OTA-HRP conjugate ที่ความเข้มข้น 1:400 สีของปฏิกิริยาในหลุมทดสอบ มีค่าการดูดกลืนแสง 2.716, 2.789 และ 2.870 ตามลำดับ สำหรับความเข้มข้นเบื้องต้นที่ได้ยังต้องไปทดสอบร่วมกับสารพิษมาตรฐาน และอาจต้องมีการปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมเพื่อให้หลุมทดสอบเกิดสีที่แตกต่างกันชัดเจน

จากการทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบแบบ Indirect Competitive ELISA พบว่า การเคลือบหลุมทดสอบแบบรวดเร็วด้วย OTA-BSA ความเข้มข้น 5, 6 และ 7 µg ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4-6 ชั่วโมง OTA-BSA เกาะจับในหลุมทดสอบได้ดี ซึ่งในการทดสอบร่วมกับ IgG-OTA ที่ความเข้มข้น 0.25 µg/ml สีของปฏิกิริยาในหลุมทดสอบ มีค่าการดูดกลืนแสง 2.990-3.388 ส่วนการบ่มนาน 2 ชั่วโมง สีในหลุมทดสอบจะมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่าอยู่ที่ 2.840-3.002 แต่ในการบ่มแบบข้ามคืน (ประมาณ 14-15 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สีในหลุมทดสอบจะเข้มกว่าการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เล็กน้อย โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปฏิกิริยาในหลุมทดสอบ มีค่าการดูดกลืนแสงสูง 3.046-3.296 ส่วนการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส มีค่าการดูดกลืนแสง 3.011-3.196 ดังนั้น ในการเคลือบหลุมทดสอบเพื่อให้ OTA-BSA เกาะจับในหลุมทดสอบได้ดี ควรบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

นำสารโอคราทอกซิน เอ แบบผงมาละลายด้วย toluene + acetic acid และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 333 นาโนเมตร ได้ค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.505 นำมาคำนวณปริมาณสารโอครา

ลิขสิทธิ์กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ทอกซิน เอ ตั้งต้นได้ 37.48 µg/ml และนำมาทดสอบกับสารละลายในการเตรียมเป็นสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐานทั้ง 4 สูตร โดยเจือจางให้มีความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5และ 10 ng/ml โดยใช้ PBS+10% MeOH, SDB, PBS-T-BSA+7% MeOH และ PB+1% gelatin เป็นตัวทำละลาย ทดสอบกับชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ Veratox® Ochratoxin test kit พบว่า ตัวทำละลาย 3 สูตร คือ PBS-T-BSA+7% MeOH, PBS+10% MeOH และ PB+1% gelatin ใช้เป็นสารเจือจางสำหรับเตรียมเป็นสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐานได้ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) เท่ากับ 0.9973, 0.9938 และ 0.9903 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐานของชุดทดสอบ Veratox® Ochratoxin test kit ที่มีค่า r เท่ากับ 0.9985 และ 0.9959 ส่วนสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน ที่ละลายด้วย SDB มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9848 ตามหลักการแล้วองค์ประกอบของสารเจือจางมาตรฐานจะใกล้เคียงกับเมทริกซ์ตัวอย่าง เช่น หากวัดความเข้มข้นของแอนติเจนในส่วนของเหลวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสารเจือจางมาตรฐานและ blocking buffer มักจะนำมาใช้เป็นสารเจือจางมาตรฐานเช่นกัน

3. การพัฒนาชุดตรวจสอบโอคราทอกซิน เอ โดยวิธี Lateral Flow Immunoassay

ความเข้มข้นของแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ในการจับกับอนุภาคทองที่ระดับความเป็นกรด-ด่างต่างกัน ทำการทดสอบปฏิกิริยาในหลุมทดสอบ พบว่า OTA-IgG ที่ความเข้มข้น 50-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเชื่อมติดกับอนุภาคทองที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง 7.0-9.5 หรือเติมสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 1% ปริมาตร 5-20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของ OTA-IgG ที่เหมาะสมในการเชื่อมติดกับอนุภาคทอง สังเกตจากการจับกันได้หมดของ OTA-IgG กับอนุภาคทอง ถ้า OTA-IgG จับกับอนุภาคได้หมด เมื่อหยดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 10% ลงไป สีของอนุภาคทองจะไม่เปลี่ยน ถ้า OTA-IgG น้อยไปจะจับกับอนุภาคทองไม่หมด อนุภาคทองที่เหลือจะทำปฏิกิริยากับโซเดียมคลอไรด์เกิดการตกตะกอน ทำให้สีของอนุภาคทองเปลี่ยนจากสีม่วงแดงเป็นสีฟ้าอมเทา จากการทดสอบซ้ำเพื่อดูความคงที่ในการจับกันของ OTA-IgG กับอนุภาคทอง วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง MicroELISA Reader คัดเลือกหลุมทดสอบที่ให้ความเข้มสีใกล้เคียงกับสีของอนุภาคทอง โดยพบว่า OTA-IgG ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถจับกับอนุภาคทองได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.0-7.4 และสารละลายอนุภาคทองจะเริ่มเปลี่ยนสีเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มสูงขึ้น ขณะที่ OTA-IgG ความเข้มข้น 100-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถจับกับอนุภาคทองได้หมดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4-9.5 โดยที่สีของอนุภาคทองยังคงใกล้เคียงกับสีเดิม

การติดฉลากอนุภาคทองด้วย OTA-IgG โดยใช้อนุภาคทองปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับระดับความเป็นกรด-ด่าง 7.0, 7.4, 7.7, 8.6 และ 9.5 ใช้ OTA-IgG ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายตะกอน colloidal gold- labeled OTA-IgG ด้วยด้วย passive gold diluent (50 mM $NaH_2PO_4.H_2O$ + 1% BSA) ในปริมาตร 0.05-0.1 เท่าของปริมาตรอนุภาคทองเริ่มต้น พบว่า การเติมสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนต เข้มข้น 1% ปริมาตร 75 ไมโครลิตร หรือที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.6 ทดสอบเติมน้ำตาลซูโครส 1, 10 และ 20% พบว่า การเติมน้ำตาลซูโครส 10 และ 20% และทาลงบน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

แผ่น CRP ที่อัตรา 6 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ให้สีของ test line ที่ชัดเจนขึ้น แต่สีที่สังเกตได้ไม่แตกต่างกันจึงเลือกเติมซูโครสที่ 10% แผ่น CRP ที่ทาด้วย colloidal gold- labeled OTA-IgG แล้ว สามารถเก็บในถุงอลูมินั่มฟอยล์ เก็บในที่แห้ง อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการเตรียมชุดทดสอบต่อไป

นำแผ่น CRP ที่ตัดให้มีขนาดกว้างประมาณ 0.7 เซนติเมตร มาวางบนกระดาษที่สะอาด ใช้พู่กันเบอร์ 0 จุ่มสารละลาย colloidal gold- labeled OTA-IgG ทาลงบนกระดาษ CRP ปริมาตร 6 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

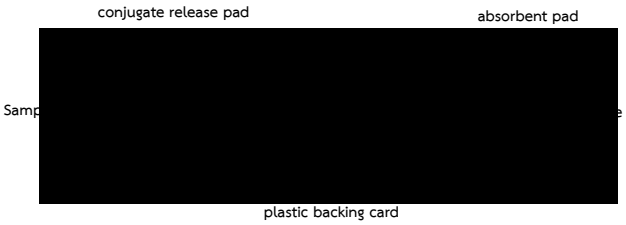
ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ OTA-BSA และ goat anti-rabbit IgG (GAR) โดยทำการหยด OTA-BSA ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ ได้แก่ 0.25, 0.5, 0.8, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ GAR ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 0.5, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตร 0.4 ไมโครลิตรต่อ strip test หรือ 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร เปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นบนตำแหน่ง test line และ control line โดยใช้บัฟเฟอร์ 0.01M PBS ซึ่งไม่มีสารพิษเป็นตัวอย่างทดสอบ พบว่าเมื่อหยดบัฟเฟอร์ลงแผ่นรองรับตัวอย่าง (sample application pad) ของเหลวจะไหลผ่านแผ่น CRP ที่มี OTA-IgG ติดฉลากกับอนุภาคทอง OTA-IgG จะจับกับ OTA-BSA ที่ตรึงอยู่บนกระดาษในตำแหน่ง test line ทำให้เกิดสีม่วงแดงของอนุภาคทอง พบการเกิดสีชัดเจนที่สุดเมื่อหยด OTA-BSA ที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของเหลวไหลต่อไปและจับกับ Goat Anti-Rabbit IgG ที่ตรึงอยู่บนกระดาษ ทำให้เกิดสีม่วงแดงในตำแหน่ง control line โดยเลือกใช้ Goat Anti-Rabbit IgG ที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากสีปรากฏมีความเข้มเพียงพอแล้ว

เมื่อทดสอบหยดสารพิษมาตรฐานโอคราทอกซิน เอ ความเข้มข้น 0, 2, 5, 10, 20 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบการเกิดสีไม่แตกต่างกัน ซึ่งตามหลักการของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีควรจะพบการเกิดสีจางลงเมื่อความเข้มข้นของสารพิษสูงขึ้น สารพิษจากตัวอย่างจะเกาะจับกับแอนติบอดีที่ผูกติดกับอนุภาคทองและเคลื่อนที่ไปยัง test line และ control line บนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส ถ้าในตัวอย่างมีสารพิษปนเปื้อนอยู่ จะเกิดสีม่วงแดงให้เห็นเฉพาะที่ control line ถ้าในตัวอย่างไม่มีสารพิษจะปรากฏสีให้เห็นทั้งในตำแหน่ง control line และ test line) สารโอคราทอกซิน เอ จะจับกับ OTA- IgG ที่ติดฉลากกับอนุภาคทอง และไหลไปที่ตำแหน่ง test zone ถ้าปริมาณสารพิษมากแอนติบอดีจะจับกับอนุภาคทองหมด ไม่เหลือมาจับกับ OTA-BSA ที่ตำแหน่ง test line แต่ถ้าปริมาณสารพิษมีน้อย ก็จะพบสีของอนุภาคทองจางแต่จากผลการทดสอบที่ให้ผลไม่เป็นไปตามทฤษฎี อาจเกิดจากปริมาณแอนติบอดีมีมากกว่าแอนติเจน จึงทำให้เกิดการจับกับแอนติเจนที่ตำแหน่ง test line ได้ไวกว่า หรืออาจเกิดจากอัตราการไหลที่เร็วไป ต้องทำการทดสอบกระดาษไนโตรเซลลูโลสและของเหลวที่ใช้ในการทดสอบตัวอย่างเพิ่มเติมต่อไป นอกจากนี้สีที่ปรากฏในตำแหน่ง test line ยังค่อนข้างจาง จึงต้องทำการปรับวิธีการเพื่อให้ OTA- IgG ที่ผูกติดกับอนุภาคทองสามารถจับกับ OTA-BSA ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ประกอบชิ้นส่วนต่างๆ ลงบนแผ่นติดส่วนประกอบชุดทดสอบ (plastic backing card) โดยลำดับแรกทำการติดกระดาษไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) ลงไป กำหนดจุดสำหรับการขีดเส้น test line และ control line ห่างกัน 0.5 เซนติเมตร ขีดเส้นด้วย OTA-BSA และ goat anti-rabbit IgG

ศูนย์วิทยทรัพยากร

บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำแผ่นปล่อยตัวตรวจจับ (conjugate release pad, CRP) ที่ทาด้วย colloidal gold-labeled OTA-IgG และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาทีแล้ว มาติดตรงส่วนด้านล่างของกระดาษไนโตรเซลลูโลส โดยติดให้เกยกันประมาณ 0.1 เซนติเมตร แล้วติดแผ่นรองรับตัวอย่าง (sample application pad, SAP) ลงตรงด้านล่างให้เกยทับแผ่นปล่อยตัวตรวจจับ สุดท้ายทำการติดแผ่นดูดซับตัวอย่าง absorbent pad ในส่วนบนให้เกยทับแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส



สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

กิจกรรมการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราทำการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ โดยเริ่มการศึกษาตั้งแต่ขั้นตอนการผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ และเอนไซม์คอนจูเกต ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญสำหรับการนำไปพัฒนาเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ทางภูมิคุ้มกันวิทยา การทดลองผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ ในกระต่ายทดลอง ได้ผ่านการพิจารณาและแก้ไขจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง ตามพระราชบัญญัติสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ พ.ศ. 2558 สามารถผลิตเป็นแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ต่อสารโอคราทอกซิน เอ (IgG-OTA) ได้ประมาณ 320 มิลลิลิตร การทดสอบความเข้มข้นของแอนติซีรั่ม ที่ผลิตได้เบื้องต้นโดยวิธี Ouchterlony double diffusion test พบว่าแอนติซีรั่มที่ผลิตได้เป็นแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ และเมื่อทดสอบความเข้มข้นของแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ที่ผลิตได้ด้วยวิธี Indirect Competitive ELISA พบว่าในสัปดาห์ที่ 8 และ 9 ในกระต่ายทั้ง 4 ตัว มีความเข้มข้นของแอนติซีรั่มบริสุทธิ์สูง โดยมีความเข้มข้น 1:1,024,000 และวิธีการเชื่อมต่อ ochratoxin A กับเอนไซม์ Horseradish Peroxidase (HRP) เอนไซม์คอนจูเกตที่เตรียมโดยใช้ Dimethylformamide (DMF) ในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อ จะให้ความเข้มข้นสูงสุดถึง 1:64,000 โดยมีความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ คือ 5 µg/ml ซึ่งแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ ที่ผลิตได้ และ OTA-HRP conjugate ที่เตรียมได้ จะเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญเพื่อนำไปใช้พัฒนาเป็นวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ แบบ Indirect- หรือ Direct-competitive ELISA ต่อไป จากนั้นนำแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ที่ได้มาปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 mg/ml เป็นความเข้มข้นตั้งต้นสำหรับนำไปเจือจางต่อเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเคลือบหลุมทดสอบ ซึ่งการเคลือบหลุมทดสอบสำหรับตรวจวิเคราะห์แบบ Indirect Competitive ELISA ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ OTA-BSA 5, 6 และ 7 µg/ml ร่วมกับ IgG-OTA ที่ความเข้มข้น 0.25 µg/ml ส่วนวิธีวิเคราะห์แบบ Direct Competitive ELISA เคลือบหลุมทดสอบด้วย IgG-OTA ความเข้มข้น 4,

กรมวิชาการเกษตร

5 และ 6 µg/ml ร่วมกับเอนไซม์คอนจูเกต ความเข้มข้น 1:400 และการเคลือบหลุมทดสอบให้มีประสิทธิภาพ ควรบ่มหลุมทดสอบข้ามคืน (14-15 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และจากการทดสอบสารพิษมาตรฐานที่เตรียมเองกับชุดตรวจสอบต่างประเทศ ตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการเตรียมสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน มี 3 สูตร คือ Phosphate Buffer Saline+10% Methanol, Phosphate Buffer Saline-Tween20-Bovine Serum Albumin+7% Methanol และ Phosphate Buffer+1% gelatin ซึ่งความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบ และการเตรียมสารพิษมาตรฐานยังต้องนำมาทดสอบต่อร่วมกันเพื่อพัฒนาให้ได้ชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

การพัฒนาชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยเทคนิค lateral flow immunoassay หรือชุดทดสอบแบบ strip test ในเบื้องต้น สามารถเตรียมการติดฉลากของแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ กับอนุภาคทอง โดยใช้อนุภาคทองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร ที่ความเป็นกรด-ด่าง 8.6 เชื่อมติดกับแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายตะกอนอนุภาคทองที่ติดฉลากแล้วด้วย passive gold diluent ปริมาตร 0.05 เท่าของปริมาตรอนุภาคทองเริ่มต้น โดยเติมน้ำตาลซูโครส 10% ใช้ OTA-BSA ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดในตำแหน่ง test line และใช้ Goat Anti-Rabbit IgG ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดในตำแหน่ง control line ให้ผลการทดสอบโดยพบการเกิดสีชัดเจนที่สุด แต่ในตำแหน่ง test line สีที่ปรากฏยังไม่เข้มเพียงพอเมื่อเทียบกับสีที่ปรากฏในตำแหน่ง control line ยังต้องปรับหาวิธีการใหม่ ซึ่งอาจทำได้โดยการปรับความเข้มข้นของสารละลาย การปรับสูตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลายตะกอนอนุภาคทอง การปรับเปลี่ยนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ตลอดจนส่วนประกอบต่าง ๆ ทั้งนี้เพื่อให้ชุดตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

กรมวิชาการเกษตร

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

กิจกรรมที่ 1 วิธีการควบคุมเพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษในพื้นที่เพาะปลูกถั่วลิสง

ใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *Aspergillus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ *A. flavus* 561 เพื่อควบคุมเชื้อรา *A. flavus* A39 สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ และลดปริมาณแอฟลาทอกซินในถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ในระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว โดยใช้วิธีการฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา 561 พ่นหลังการปลูกถั่วลิสง 15 และ 30 วัน สามารถยับยั้งการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินได้ดีที่สุดถึง 65.28-100% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (ดินผสม A39 อย่างเดียว) และพบว่าในกรรมวิธีพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus* 561 เพียงอย่างเดียว มีประสิทธิภาพการลดปริมาณสารพิษจากดินตามธรรมชาติได้มากกว่า 70% ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดเชื้อรา เพื่อนำไปปรับใช้กับถั่วลิสงและผลิตผลเกษตรในเชิงพาณิชย์ได้

ในส่วนของแมลงศัตรูถั่วลิสง ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณมดเสี้ยนดินถั่ว (*Dorylus orientalis* Westwood) ต่อการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซิน ทำการทดสอบในสภาพแปลงที่ อ.น้ำยืน จ.อุบลราชธานี โดยการหยดสปอร์แขวนลอยลงบริเวณโคนต้นถั่วลิสง จำนวน 20 ต้น พบว่า ถั่วลิสงเมล็ดเสียที่เกิดจากการทำลายของมดเสี้ยนดิน เท่ากับ 6.2 กิโลกรัม (น้ำหนักแห้ง) และปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน 17.4-19.6 พีพีบี เมื่อวางกับดักในแปลงถั่วลิสง จะพบมดเสี้ยนดิน และมดชนิดอื่นๆ ทั้งหมด 11 ชนิด เป็นมดเสี้ยนดินจำนวนมากที่สุดเท่ากับ 3,874 ตัว ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรของปริมาณมดและปริมาณอะฟลาทอกซิน ของเชื้อรา *A. flavus* เท่ากับ 0.456 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณมดเสี้ยนดินและมดชนิดอื่น ๆ ที่พบในแปลงถั่วลิสงมีแนวโน้มว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ซึ่งความเสียหายของผลผลิตถั่วลิสงที่เกิดจากมดเสี้ยนดิน เป็นเพียงปัจจัยหนึ่งเท่านั้น เพราะยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างพิษอะฟลาทอกซิน ได้แก่ ความชื้นสัมพัทธ์ หรือความชื้นในเมล็ด

วิธีการควบคุมในระยะเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษาถั่วลิสงเป็นอีกหนึ่งขั้นตอนที่สำคัญ วิธีการตากถั่วลิสงเพื่อผลิตถั่วลิสงเมล็ดแห้ง 3 วิธี คือ วิธีที่ 1 ปลิดฝักถั่วลิสงทันที คัดเมล็ดดีด้วยมือ ตากบนตาข่ายมุ้งไนลอนที่วางบนแผ่นรองไม่ให้ถั่วลิสงสัมผัสพื้นดิน พลิกกลับกองวันละ 2 ครั้ง ตาก 7 วัน วิธีที่ 2 ตากทั้งต้นโดยการมัดลำต้นเข้าด้วยกันให้ส่วนฝักอยู่ด้านบน ตาก 1 วัน ปลิดฝัก คัดเมล็ดดี และตากบนลานปูนต่ออีก 6 วัน วิธีที่ 3 ปลิดฝักถั่วลิสงทันที และตากบนตาข่ายมุ้งไนลอนบนลานปูน 7 วัน พบว่า การตากทั้ง 3 วิธี ถั่วลิสงมีการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินไม่เกินข้อกำหนดปริมาณแอฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสง (20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม) และมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นในเมล็ดต่ำกว่ามาตรฐานถั่วลิสงเมล็ดแห้งกำหนด (9 เปอร์เซ็นต์) เมื่อนำถั่วลิสงที่ได้จากการตากทั้ง 3 วิธีมาเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน มาทดสอบการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 ถั่วลิสงที่ได้จากการตากวิธีที่ 2 มีการปนเปื้อนน้อยสุด เฉลี่ย 3.2 ไมโครกรัม/กิโลกรัม หลังเก็บรักษา 4-6เดือน ถั่วลิสงมีโปรตีนเฉลี่ยลดลง ส่วนปริมาณไขมันจะลดลงในเดือนที่ 6 ของการเก็บรักษา

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 2 การใช้ประโยชน์จากเชื้อราและแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และการสร้างสารแอฟลาทอกซิน พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* C57 ที่แยกได้จากดิน และเลี้ยงในอาหารเหลว NB (nutrient broth) มีอัตราการเจริญสูงสุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยแบคทีเรียเจริญได้ดีที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แบคทีเรียเจริญได้ดีที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8 เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 ของเชื้อรา *A. flavus* A39 ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 สูง พบว่า *B. subtilis* C57 อายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 ได้ดีที่สุดเฉลี่ย 55.5% เท่ากัน

นำแบคทีเรีย *B. subtilis* C57 มาพัฒนาต่อยอดเป็นชีวภัณฑ์ พบว่า สูตรชีวภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเตรียมชีวภัณฑ์ต้นแบบคือ ใช้แป้งข้าวเจ้า 2000 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 20 มิลลิลิตร และซูโครส 200 กรัม ผสมรวมกันกับเชื้อ *B. subtilis* C57 ที่เลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส อายุ 24 ชม. เจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้มีค่า OD เท่ากับ 1 ที่ 600 นาโนเมตร 400 มิลลิลิตร บรรจุถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ขนาด 10 กรัม โดยมีระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะสามารถเก็บรักษาได้คือ ไม่เกิน 2 เดือน ภายใต้สภาพอุณหภูมิต่ำในตู้เย็น ขณะที่การใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* A39 พบว่าการใช้ชีวภัณฑ์กับถั่วลิสงโดยให้ 10 กรัม พร้อมปลูกหรือให้ 10 กรัม ก่อนปลูก 3 วันมีแนวโน้มที่สามารถลดประชากร *A. flavus* และลดปริมาณการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสงได้ดีกว่าการให้ในช่วงออกดอก

คัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มปลอดภัยที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารที่ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* (A39) ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus plantarum1* (LS603, LS901), *L. plantarum2* (LS1802), *L. pentosus* (LS704, LS1701, LS1702, LS1703, LS1704, LS1709) และ *L. salivarius* (LS604) ซึ่งการใช้สารละลายเซลล์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ในอาหาร PDA ได้ 12.51-18.54% โดย *L. pentosus* LS1704 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุด 18.54 เปอร์เซ็นต์ และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ในอาหาร PDA+MRS ได้ 100% การใช้สารละลายปราศจากเซลล์พบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 0.75-7.27% ส่วนการทดสอบเพื่อยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี1 พบว่า เซลล์แบคทีเรียสามารถยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี1 ได้ 9.77-19.52%

กิจกรรมที่ 3 การประโยชน์จากสารสกัดพืชในการการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษ

พัฒนาให้อนุภาคนาโน (nanoparticles) ของสารสกัดพืชวงศ์ขิงให้สามารถไปใช้ควบคุมเชื้อราและสารพิษในผลิตผลเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพ พบว่า สารละลาย $AgNO_3$ เข้มข้น 4.0 mM ปริมาตร 6 ส่วน ต่อสารสกัดพืช 4 ส่วน บ่มที่อุณหภูมิ 95°C นาน 20-30 นาที เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการ

กรมวิชาการเกษตร

สังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน และอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากไพล ขมิ้นอ้อย และขมิ้นชัน เข้มข้น 40,000 ppm สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อ *A. flavus* และ *A. niger* และส่งผลต่อการลดการผลิตสารพิษของเชื้อราได้

พัฒนานำกากสมุนไพรที่ผ่านกระบวนการสกัดสารสำคัญออกไปแล้ว มาผลิตเป็นกระดาษและเคลือบสารสกัดสมุนไพรเพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษ โดยกากพืช พบว่า กระดาษเยื่อตะไคร้มีความแข็งแรงกว่า ทนต่อแรงดึงได้ดี มีความยืดหยุ่นสูงกว่า เมื่อนำกระดาษทั้งสองชนิดมาเคลือบสารสกัดพืช กระดาษเยื่อข่า และกระดาษเยื่อตะไคร้ที่เคลือบสารสกัดข่าเข้มข้น 60% ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ และจากกรรมวิธีกระดาษเคลือบสารสกัด 70% สารสกัดข่าสามารถซึมลงในกระดาษเยื่อตะไคร้ได้เร็วกว่าในกระดาษเยื่อข่า ทำให้กระดาษพื้นผิวไม่เฉอะแฉะ จึงนำกระดาษตะไคร้ฟอกขาวไปทดสอบเคลือบสารสกัดข่าความเข้มข้น 60 และ 70% ห่อหุ้มพริกขี้หนูแห้งก่อนบรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ากระดาษตะไคร้ฟอกขาวเคลือบด้วยสารสกัดข่าสามารถช่วยชะลอการเปลี่ยนสีของพริกแห้ง และลดปริมาณสารอะฟลาทอกซิน บี1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำคั้นกระเทียมสดต่อคุณภาพการเก็บรักษาพริกแห้ง เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารอะฟลาทอกซิน โดยใช้พริกแห้งจากโรงอบพลังงานแสงอาทิตย์ มีความชื้น 12.88% ตรวจพบสารอะฟลาทอกซินเริ่มต้น 4.50 พีพีบี นำมาคลุกด้วยน้ำคั้นกระเทียมสด ความเข้มข้น 0 50 และ 100% บรรจุในถุงพลาสติก PP ถุงซิปพลาสติกใส PE และถุงซิปเมทัลไลท์ เก็บที่อุณหภูมิห้อง พบว่าการคลุกพริกแห้งด้วยน้ำคั้นกระเทียมสด และชนิดของถุง ไม่มีผลต่อปริมาณสารอะฟลาทอกซิน แต่พริกแห้งที่บรรจุในถุงซิปเมทัลไลท์ มีค่าความชื้นเพิ่มขึ้นต่ำที่สุด 15.07% เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 4 เดือน ส่วนการทดสอบช่วงเวลาการสร้างสารอะฟลาทอกซิน ในพริกแห้งที่ใส่สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Aspergillus flavus* บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบปริมาณสารอะฟลาทอกซินสูงสุด เท่ากับ 45.89 พีพีบี

กิจกรรมที่ 4 พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา

ผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ แบบ polyclonal antibody ในกระต่ายทดลอง โดยผ่านการพิจารณาและแก้ไขจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง ตามพระราชบัญญัติสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ พ.ศ. 2558 สามารถผลิตเป็นแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ต่อสารโอคราทอกซิน เอ (IgG-OTA) ได้ประมาณ 320 มิลลิลิตร แอนติซีรั่มบริสุทธิ์ที่ผลิตได้ ในสัปดาห์ที่ 8 และ 9 ในกระต่ายทั้ง 4 ตัว มีความเข้มข้นของแอนติซีรั่มบริสุทธิ์สูงถึง 1:1,024,000 และเตรียมเอนไซม์คอนจูเกตโดยการเชื่อมต่อสาร OTA กับเอนไซม์ Horseradish Peroxidase โดยใช้ Dimethylformamide ในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อ ซึ่งได้ความเข้มข้นสูงสุดถึง 1:64,000 เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญเพื่อนำไปใช้พัฒนาเป็นวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ แบบ Indirect- หรือ Direct-competitive ELISA ต่อไป

การเคลือบหลุมทดสอบสำหรับตรวจวิเคราะห์แบบ Indirect Competitive ELISA ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ OTA-BSA 5, 6 และ 7 µg/ml ร่วมกับ IgG-OTA ที่ความเข้มข้น 0.25 µg/ml ส่วนวิธีวิเคราะห์แบบ Direct Competitive ELISA เคลือบหลุมทดสอบด้วย IgG-OTA ความเข้มข้น 4, 5 และ

กรมวิชาการเกษตร

6 µg/ml ร่วมกับเอนไซม์คอนจูเกต ความเข้มข้น 1:400 และการเคลือบหลุมทดสอบ ควรบ่มหลุมทดสอบข้ามคืน (14-15 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และจากการทดสอบสารพิษมาตรฐานที่เตรียมเองกับชุดตรวจสอบต่างประเทศ ตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการเตรียมสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน มี 3 สูตร คือ Phosphate Buffer Saline+10% Methanol, Phosphate Buffer Saline-Tween20-Bovine Serum Albumin+7%Methanol และ Phosphate Buffer+1% gelatin ซึ่งความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบ และการเตรียมสารพิษมาตรฐานยังต้องนำมาทดสอบต่อร่วมกันเพื่อพัฒนาให้ได้ชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

พัฒนาชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยเทคนิค lateral flow immunoassay สามารถเตรียมการติดฉลากของแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ กับอนุภาคทอง โดยใช้อนุภาคทองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร ที่ความเป็นกรด-ด่าง 8.6 เชื่อมติดกับแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายตะกอนอนุภาคทองที่ติดฉลากแล้วด้วย passive gold diluent ปริมาตร 0.05 เท่าของปริมาตรอนุภาคทองเริ่มต้น โดยเติมน้ำตาลซูโครส 10% ใช้ OTA-BSA ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดในตำแหน่ง test line และใช้ Goat Anti-Rabbit IgG ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดในตำแหน่ง control line ให้ผลการทดสอบโดยพบการเกิดสีชัดเจนที่สุด แต่ในตำแหน่ง test line สีที่ปรากฏยังไม่เข้มเพียงพอเมื่อเทียบกับสีที่ปรากฏในตำแหน่ง control line ยังต้องปรับหาวิธีการใหม่ ซึ่งอาจทำได้โดยการปรับความเข้มข้นของสารละลาย การปรับสูตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลายตะกอนอนุภาคทอง การปรับเปลี่ยนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ตลอดจนส่วนประกอบต่าง ๆ ทั้งนี้เพื่อให้ชุดตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

กรมวิชาการเกษตร

บรรณานุกรม

กิจกรรมที่ 1 วิธีการควบคุมเพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษในพื้นที่เพาะปลูกถั่วลิสง

สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน. 2563. เอกสารคำแนะนำ เทคโนโลยีการผลิตถั่วลิสง. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 10 หน้า.

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน). 2559. ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และ ถั่วลิสง: ทิศทางพืชเศรษฐกิจไทยในอาเซียน. บริษัท พรทรัพย์การพิมพ์ จำกัด. 160 หน้า.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2553. การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับถั่วลิสง. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 4900-2553. 34 หน้า.

Bhusal, K. and D. Khanal. 2018. Incidence of maize weevil (*Sitophilus zeamais* Motsch) and its association with green fungus (*Aspergillus flavus* Link) in maize under storage at Chitwan and Surkhet districts of Nepal. Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science. 35: 135-142.

Cotty P.J. and J.E. Mellon. 2006. Ecology of aflatoxin producing fungi and biocontrol of aflatoxin contamination. Mycotoxin Res. 22: 110-117.

Dharmaputra, O.S. 2003. Control of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* in peanuts using nonaflatoxigenic *A. flavus*, *A. niger* and *Trichoderma harzianum.* BIOTROPIA (21) : 32-44.

Dorner J.W. 2004. Biological control of aflatoxin contamination of crops. J. Toxicol. Toxin Rev. 23(2&3) :425–450.

Dorner, J.W., Cole, R.J. and D.T. Wicklow. 1999. Aflatoxin reduction in corn through field application of competitive fungi. Journal of Food Protection 62(6): 650-656.

Kilman, S. 1993. Food-safety strategy pits germ vs. germ. The Wall street Journal, March 16, B2.

Nesci, A., P.S. Barra and M.G. Etcheverry. 2011. Integrated management of insect vectors of *Aspergillus flavus* in stored maize, using synthetic antioxidants and natural phytochemicals. Journal of Stored Products Research. 47(3): 231-237.

Suttajit, M. 1990. Prevention and control of mycotoxins. Agriculture and Consumer Protection, FAO corporate document repository. Retrieved February 14, 2021, from http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036e0q.htm.

Wicklow, D.T., B.W. Horn, O.L. Shotwell, C.W. Hesseltine and R.W. Caldwell. 1988. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. Phytopathology 78: 68 - 74.

กรมวิชาการเกษตร

Wright, F.V. 1991. Assessment of insect infestation in stored maize and their relationship to *Aspergillus flavus* contamination in R.L. Simple, A.S. Frio, P.A. Hicks and J.V. Lozare. Mycotoxin prevention and control in food grains. UNDP/FAO Regional Network inter-Country Cooperation on Postharvest Technology and Quality Control of Food grains.

กิจกรรมที่ 2 การใช้ประโยชน์จากเชื้อราและแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษ

สุพี วนศิรากุล ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์ และ อัจฉราพร ศรีจุดานุ. 2560. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* และสารแอฟลาทอกซิน บี1. รายงานเรื่องเต็มผลการทดลองสิ้นสุดปีงบประมาณ 2560, กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร, กรมวิชาการเกษตร, หน้า 46-56.

สุรางค์ สุธิราวุธ. 2555. การตรวจสอบปริมาณและชนิดจุลินทรีย์ที่ใช้ทางการเกษตรจากผลิตภัณฑ์นำเข้า. สืบค้นจาก: http://www.doa.go.th/biotech/pdf-ktk/i_book_1.pdf. 20กุมภาพันธ์ 2564.

อมรา ชินภูติ. 2551. สารพิษจากเชื้อราและการจัดการ. หน้า1-21. ใน: เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการการตรวจวิเคราะห์สารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตรอย่างรวดเร็วโดยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป “DOA-Aflatoxin ELISA Test Kit”. สำนักวิจัยพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร.

อวันวี เพชรคงแก้ว. 2550. การลดระดับการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราโดยเชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก (ถั่วเน่า). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 189 หน้า.

Baker, C.J., Stavely, J.R. and Mork, N. 1985. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field condition. Plant Disease., 69: 770-772.

Gordon, R.E. 1989. The Genus *Bacillus*; In Practical Handbook of microbiology Edited by W.M. O’Leary 681pp. CRC Press Inc. pp 109-126.

Haskard, C. 2001. Surface binding of aflatoxin B_1 by lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology 67: 3086-3091.

Hernandez-Mendoza A., Garcia, H.S. and Steele, J.L. 2009. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B_1. Food and Chemical Toxicology 47(6): 1064-1068.

กรมวิชาการเกษตร

Khanafari, A., Soudi, H. and Miraboulfathi, X. 2007. Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B_1 production in corn. Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering 4: 163-168.

Magnusson, J. and J. Schürer. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. Applied and Environmental Microbiology 67: 1-5.

Nesci, A.V., R.V. Bluma and M.G. Etcheverry. 2005. *In vitro* selection of maize rhizobacteria to study potential biological control of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin production. European Journal of Plant Pathology 113: 159-171.

Palumbo, J.D., J.L. Baker and N.E. Mahoney. 2006. Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds. Microbial Ecology 52: 45-52.

Paul, E.A. and Clark, F.E. 1996. Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, San Diego.

Schillinger, U., Kaya, M. and Lücke, F.K. 1991. Behaviour of Listeria monocytogenes in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of Lactobacillus sake. Journal of Applied Bacteriology, 70(6): 473–478.

Teniola, O.D., P.A. Addo, I.M. Brost, P. Färber, K.D. Jany, J.F. Alberts, W.H. van Zyl, P.S. Steyn and W.H. Holzapfel. 2005. Degradation of aflatoxin B_1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov. DSM44556(T). International Journal of Food Microbiology 105(2): 111-7.

Yueng, D.L. and Laquata, I. 2003. New Horizons in nutrition. Heinz Handbook of Nutrition. (9^{th} edition) Heinz Corporation Research Center, H.J. Heinz. 266 p.

กิจกรรมที่ 3 การประโยชน์จากสารสกัดพืชในการการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษ

บุญญวดี จิระวุฒิ เนตรา สมบูรณ์แก้ว สุพี วนศิรากุล อัฉราพร ศรีจุดานุ และอมรา ชินภูติ. 2558. การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินโดยสารออกฤทธิ์จากกระเทียม. วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 33 (1): 15-28.

ศิริพร เต็งรัง สุปรียา ศุขเกษม กนกศักดิ์ ลอยเลิศ และ ประยูร เอ็นมาก. 2556. วิจัยและพัฒนาแผ่นใยอัดจากวัสดุเหลือใช้ในอุตสาหกรรมเกษตร. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2556 สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 295-311.

อัจฉรา พัฒนเดช. 2543. *เชื้อรา Aspergillus* ที่สร้างแอฟลาทอกซินในพืชสมุนไพรตากแห้ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 135 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร

อมรา ชินภูติ ศุภรา อัคคะสาระกุล และชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์. 2553. การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรในการควบคุมและลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินในเมล็ดข้าวโพดและถั่วลิสง. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม ประจำปี 2552. สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 218-230.

Abd El-Khalek, H.H. 2013. Chemopreventive potential of some plant essential oils against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus* growth and mycotoxin production. International Journal of Microbiology and Immunology Research, 1(3): 37-46.

Ankri, S. and D. Mirelman. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes and Infection 2: 125-129.

Azizinezhad, F., Nasrollahi, Z. and Sadrnezhaad, S.K. 2014. Synthesis of silver nanoparticles with the using of camomile plant. European Journal of Experimental Biology 4: 124-127.

Bilgrami K.S., K.K. Sinha and A.K. Sinha. 1992. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol and onion and garlic extracts. Indian Journal of Medical Research 96:171-175.

Curtis, H., U. Noll, J. Stormann and A. J. Slusarenko. 2004. Broad-spectrum activity of the volatile hytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. Physiological and Molecular Plant Pathology 65: 79-89.

Feldberg, R.S., S.C. Chang, A.N. Kotik, M. Nadler, Z. Neuwirth, D.C. Sundstrom and N.H. Thompson. 1988. In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 32: 1763-1768.

Ji, J.H., Jung, J.H., Kim, S.S., Yoon, J.U., Park, J.D., Choi, B.S., Chung, Y.H., Kwon, I.H., Jeong, J., Han, B.S., Shin, J.H., Sung, J.H., Song, K.S. and Yu I.J. 2007. Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. Inhalation Toxicology 19: 857-871.

Kim, Y.S., Kim, J.S., Cho, H.S., Rha, D.S., Kim, J.M., Park, J.D., Choi, B.S., Lim, R., Chang, H.K., Chung, Y.H., Kwon, I.H., Jeong, J., Han, B.S. and Yu I.J. 2008. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related issue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. Inhalation Toxicology 20: 575-583.

Prasad, R. and Swamy, V.S. 2013. Antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by bark extract of *Syzygium cumii*. Journal of Nanoparticles. doi: 10.1155/2013/431218.

กรมวิชาการเกษตร

Priya Banerjee, Mantosh Satapathy, Aniruddha Mukhopahayay and Papita Das. 2014. Leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticle from widely available Indian plants: synthesis, characterization, antimicrobial property and toxicity analysis. Bioresources and Bioprocessing 1:3.

Rodriguez, A., Nerin, C. and Batlle, R. 2008. New cinnamon-based active paper packaging against *Rhizopus stolonifer* food spoilage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 6364-6369.

Sandosskuma, R., M.Karthikeyan., S. Mathiyazhagan., M. Mohankumar., G. Chandrasekar and R. Velazhahan. 2007. Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and detoxification of aflatoxin B_1 by the medicinal plant zimmu (*Allium sativum* L. x *Allium cepa L.*). World Journal of Microbiology and Biotechnology 23 (7): 1007-1014.

Siddhant Jain and Mohan Singh Mehata. 201 7. Medicinal Plant Leaf Extract and Pure Flavonoid Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles and their Enhanced Antibacterial Property. Scientific Reports 7, Article number: 15867.

Tassaneeyakul, W., E. Razzazi-Fazeli, and S. Porasuphatana. 2004. Contamination of aflatoxins in herbal medicinal product in Thailand. Mycopathologia. 158: 239-244.

Yabaya, A., A. Orukotan and M. Jonathan 2010. Determination of anti *Salmonella typhi* activity of the crude extract of *Allium sativum* (garlic). Journal of Biological Sciences and Bioconservation 2: 22-28.

Yenchai, C., Prasanphen. K., Doodee. S. 2004. Bioactive flavonoids from Kaempferia Parvifor. Fitoterapia 75(1): 89-92.

กิจกรรมที่ 4 พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา

กระทรวงสาธารณสุข. 2563. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 414 (พ.ศ. 2563) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 137 ตอนพิเศษ 118ง ลงวันที่ 20 พฤษภาคม พ.ศ. 2563.

อมรา ชินภูติ. 2551. สารพิษจากเชื้อราและการจัดการ. หน้า1-21. *ใน:* เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการการตรวจวิเคราะห์สารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตรอย่างรวดเร็วโดยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป “DOA-Aflatoxin ELISA Test Kit”. สำนักวิจัยพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร. กรมวิชาการเกษตร.

Bazin, I., E. Nabais and M. Lopez-Ferber. 2010. Raid Visual Tests: Fast and Reliable Detection of Ochratoxin A. Toxins 2: 2230-2241.

กรมวิชาการเกษตร

Bennett, G.A. and Richard, J.L. 1994. Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxaldehyde derivative of fumonisins. Journal of AOAC International 77: 501-506.

Chen, W., L. Chen, B. Zhang, Z. Zhou, Y. Shen, X. Liao, J. Yang, Y. Wang, X. Li, Y. Li and X.L. Shen. 2018. Advances in Biodetoxification of Ochratoxin A-A Review of the Past Five Decades. Frontiers in Microbiology 9(1386): 1-11.

Chu, F.S. 1984. Immunoassays for analysis of mycotoxins. Journal Food Protection 47: 562-569.

Edwin R. Palencia, Dorothy M. Hinton, and Charles W. Bacon. 2010. Review The black *Aspergillus* species of maize and peanuts and their potential for mycotoxin production. Toxins 2: 399-416.

Dzantiev, B.B., N.A. Byzova, A.E. Urusov, A.V. Zherdev. 2014. Immunochromatographic methods in food analysis. Trends in Analytical Chemistry 55: 81-93.

Harlow E.d. and D. Lane. 1988. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1988, 726 p.

Lee S.C. and F.S. Chu. 1984. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of ochratoxin A in wheat. Journal - Association of Official Analytical Chemists 67: 45-49.

Morgan, M.R.A., McNerney, R. and Chan, H.W.S. 1983. Enzyme Linked Immunosorbent Assay of ochratoxin A in barley. Journal - Association of Official Analytical Chemists 66: 1481-1484.

Radoi, A., Dumitru, L. and Marty, J.L. 2009. Ochratoxin A in some French wines: application of a direct competitive ELISA based on an OTA-HRP conjugate. Analytical Letters 42: 1187-1202.

Sangare-Tigori, B., S. Moukha, J.H. Kouadio, D.S. Dano, A.M. Betbeder, A. Achour and E.E. Creppy. 2006. Ochratoxin A in human blood in Abidjan, Côte d'Ivoire. Toxicon 47(8): 894 – 900.

Schwerdt, G., Freudinger, R., Silbernagl, S. and Gekle, M. 1999. Ochratoxin A-binding proteins in rat organs and plasma and in different cell lines of the kidney. Toxicology 135: 1-10.

Stachowiak, M.O., Kleintjens, T., Sajic, N., Haasnoot, W., Campbell, K., Elliott, C.T. and Salden, M. 2017. T-2 Toxin/HT-2 Toxin and ochratoxin A ELISAs development and in-house validation in food in accordance with commission regulation (EU) no 519/2014. Toxins 9(388): 11-18.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

Urusov, A.E., S.N. Kostenko, P.G. Sveshnikov, A.V. Zherdev and B.B. Dzantiev. 2011. Immunochromatographic Assay for the Detection of Ochratoxin A. Journal of Analytical Chemistry 66: 770-776.

Zhang, A., Ma, Y., Feng, L., Wang, Y., He, C., Wang, X. and Zhang, H. 2011. Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China. Food Control 22: 1723-1728.

กรมวิชาการเกษตร