รายงานโครงการวิจัย

การควบคุมการปนเปื้อนจุลินทรีย์และสารพิษจากเชื้อราในกระบวนการผลิตผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว

Control of Microbial and Mycotoxins Contamination in Agricultural Commodities During Post-Harvest Handling Processes

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์

Chawalert Trikarunasawat

ปี พ.ศ. ๒๕๖๑

กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

การควบคุมการปนเปื้อนจุลินทรีย์และสารพิษจากเชื้อราในกระบวนการผลิตผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว

Control of Microbial and Mycotoxins Contamination in Agricultural Commodities During Post-Harvest Handling Processes

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์

Chawalert Trikarunasawat

ปี พ.ศ. ๒๕๖๑

คำปรารภ

ผลิตผลในภาคการเกษตรถือว่าเป็นส่วนที่สำคัญของผลิตภัณฑ์มวลรวมของประเทศไทย เนื่องด้วยการเกษตรเป็นอาชีพหลักของประชากรในประเทศ เกษตรกรทำการเพาะปลูกเพื่อให้ได้มาซึ่งผลิตผลและต้องการผลผลิตที่ดี มีคุณภาพ และในปริมาณที่น่าพึงพอใจ รวมไปถึงผู้ประกอบการที่เกี่ยวข้องที่รับเอาผลิตผลแล้วส่งผ่านกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวต่อเนื่องจนถึงผู้บริโภค ความเสียหายที่เกิดจากการปนเปื้อนจุลินทรีย์และสารพิษจากเชื้อราเป็นปัญหาสำคัญที่ควรแก้ไขอย่างเร่งด่วน เนื่องจากการปนเปื้อนจะเกิดขึ้นได้ตลอดกระบวนการผลิต และสารพิษจะยังคงปนเปื้อนอยู่ในผลิตผลตั้งแต่ในแปลง ขั้นตอนการเก็บเกี่ยว ไปจนถึงการแปรรูปและในผลิตภัณฑ์ การตรวจสอบและสำรวจการปนเปื้อนตลอดกระบวนการผลิตจึงมีความจำเป็น ทั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถกำหนดขั้นตอนที่เป็นสาเหตุหลักของการปนเปื้อน อันจะนำไปสู่การหาแนวทางและเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการควบคุมการปนเปื้อน ทำให้จำเป็นต้องมีการวิจัย **การควบคุมการปนเปื้อนจุลินทรีย์และสารพิษจากเชื้อราในกระบวนการผลิตผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว** เพื่อนำมาใช้ปรับปรุงกระบวนการผลิตเพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค คณะผู้ร่วมวิจัยตระหนักถึงความจำเป็นดังกล่าว จึงกำหนดวัตถุประสงค์ในการดำเนินโครงการฯ คือ “เพื่อศึกษาแนวทางในการควบคุมการปนเปื้อนจุลินทรีย์และสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวในกระบวนการผลิต”

รายงานโครงการวิจัยฉบับนี้ จัดทำขึ้นโดยการรวบรวมและสรุปผลการดำเนินงานโครงการวิจัยเดี่ยว เรื่อง “**การควบคุมการปนเปื้อนจุลินทรีย์และสารพิษจากเชื้อราในกระบวนการผลิตผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว**” ดำเนินการในช่วงปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๘ – ๒๕๖๐ ในโครงการฯ ประกอบไปด้วย ๒ กิจกรรม ๗ การทดลอง งานทดลองส่วนใหญ่ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการของกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร และในสถานที่ประกอบการของภาคเอกชนหลายแห่ง ในการดำเนินการโครงการฯ ได้รับความร่วมมือและการสนับสนุนจากคณะผู้ร่วมวิจัย ทั้งในส่วนที่เป็นหัวหน้าการทดลอง ผู้ช่วยนักวิจัย และคณะผู้บริหารทุกระดับ ตลอดจนการอำนวยความสะดวกจากบุคลากรในหน่วยงานทั้งภายใน กองฯ กรมฯ และจากภายนอก ซึ่งการดำเนินงานโครงการฯ อาจไม่บรรลุตามวัตถุประสงค์ หากขาดการช่วยเหลือจากทุกฝ่ายดังที่กล่าวมา จึงขอกราบขอบพระคุณทุกท่านมา ณ ที่นี้

ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์
หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

หน้า

ผู้วิจัย 1

บทนำ 2

บทคัดย่อ 5

1 กิจกรรมการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว 13
2 กิจกรรมการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว 44

บทสรุปและข้อเสนอแนะ 107

บรรณานุกรม 110

ผู้วิจัย

ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์
Chawalert Trikarunasawat

เนตรา สมบูรณ์แก้ว
Nettra Somboonkaew

ศุภรา อัคคะสาระกุล
Suppara Aukkasarakul

สุพี วนศิรากุล
Su-phi Wanasirakul

ชุติมา วิธูรจิตต์
Chutima Vithoonjit

อัจฉราพร ศรีจุดานุ
Atcharaporn Srijudanu

อารีรัตน์ การุณสถิตชัย
Areerat Karunsatitchai

และ

วีรภรณ์ เดชนำบัญชาชัย
Weeraporn Dejnumbunchachai

บทนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคผลผลิตทางการเกษตรมีความตระหนักถึงความสำคัญของคุณภาพและความปลอดภัยในผลิตผลและผลิตภัณฑ์การเกษตร ซึ่งปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อรา เช่น สารแอฟลาทอกซิน สารพิษโอคราทอกซิน เอ สารพิษฟูโมนิซิน ในผลิตผลเกษตรชนิดต่าง ๆ ก็เป็นอีกปัญหาของความปลอดภัยในอาหาร ยอกจากนั้น ยังถูกใช้เป็นเป็นข้อกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศอีกด้วย การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และสารพิษในผลิตผลนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดกระบวนการปฏิบัติทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว นอกจากมีผลกระทบต่อความปลอดภัยของผู้บริโภคแล้ว ยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการแจ้งเตือนจากประเทศผู้นำเข้าสินค้าเกษตรเหล่านี้เมื่อมีการตรวจพบที่ปลายทาง อันเป็นผลจากปัญหาการขาดแคลนข้อมูลที่เป็นปัจจุบันของการปนเปื้อนทั้งจุลินทรีย์และสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลและผลิตภัณฑ์แปรรูป ถือเป็นอุปสรรคสำคัญในการชี้แจงโต้แย้งระเบียบ มาตรการที่ประเทศคู่ค้ากำหนดขึ้นแล้วส่งผลกระทบต่อประเทศไทย หรือแม้การกำหนดระเบียบ มาตรการใด ๆ เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคในประเทศ หากขาดข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์รองรับก็ไม่สามารถทำได้

ภายใต้การแข่งขันทางการค้าระหว่างประเทศอย่างรุนแรงในปัจจุบันนี้ นอกจากปัจจัยพื้นฐานทางด้านเศรษฐกิจ เช่น อัตราแลกเปลี่ยน อัตราดอกเบี้ย ราคาน้ำมัน แล้วยังมีอีกหนึ่งปัจจัยที่จะละเลยความสำคัญไม่ได้นั่นคือ มาตรการที่มิใช่ภาษี (Non-Tariff Measures: NTMs) ซึ่งถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางต่อเนื่อง ทวีความเข้มข้นและครอบคลุมสินค้าหลากหลายชนิดมากขึ้น โดยให้ความสำคัญกับมาตรการที่คุ้มครองผู้บริโภคซึ่งคำนึงถึงสุขภาพอนามัย ความปลอดภัยของผู้บริโภคเป็นหลัก รวมถึงการรักษาสิ่งแวดล้อมตลอดจนสวัสดิการของแรงงาน ดังนั้น มาตรการที่ตอบสนองเป้าหมายเหล่านี้คือ มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Sanitary and Phytosanitary Standard: SPS) และมาตรการอุปสรรคทางการค้าด้านเทคนิค (Technical Barriers to Trade: TBT)

มาตรการ SPS เป็นมาตรการที่ใช้การจำกัดการนำเข้าสินค้าเกษตรกรรมเป็นสำคัญ ด้วยเหตุผลทางสุขอนามัย เพื่อคุ้มครองชีวิต สุขภาพของมนุษย์ สัตว์หรือพืชภายในอาณาเขตของประเทศจากความเสี่ยงที่เกิดจากการเข้ามาหรือแพร่ระบาดของแมลงเชื้อโรค สิ่งมีชีวิตที่เป็นพาหะของโรคหรือสิ่งมีชีวิตที่ก่อให้เกิดโรค สารปรุงแต่ง สิ่งเจือปน สารพิษหรือสิ่งมีชีวิตที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร เครื่องดื่มหรืออาหารสัตว์ เช่น การห้ามนำเข้าสินค้าที่มีสารปนเปื้อนเกินกว่าอัตราที่ประเทศผู้นำเข้ากำหนด เป็นต้น

มาตรการ TBT มีเป้าหมายเพื่อลดการกีดกันทางการค้าที่มิใช่ภาษีจากการกำหนดกฎระเบียบหรือมาตรฐานเกี่ยวกับการซื้อขายสินค้าระหว่างประเทศที่แตกต่างกันของสมาชิก รายละเอียดของความตกลงประกอบด้วยกฎระเบียบทางเทคนิค (Technical Regulations) หมายถึง เอกสารที่กำหนดคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์หรือกระบวนการและกรรมวิธีการผลิตที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ รวมถึงข้อกำหนดทางการบริหาร ซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องปฏิบัติตาม ทั้งนี้กฎระเบียบทางเทคนิคได้แก่ ข้อกำหนดเกี่ยวกับการเรียกชื่อ การใช้สัญลักษณ์ การบรรจุหีบห่อ การทำเครื่องหมายและการติดฉลากผลิตภัณฑ์ เป็นต้น

ตัวอย่างการนำเอามาตรการดังกล่าวมาใช้ เช่น การงดการนำเข้าผักสดของไทยไปประเทศนอร์เวย์ ในปี พ.ศ. 2548 และประเทศกลุ่ม EU การระงับการส่งเนื้อไก่สด แช่เย็น แช่แข็งไปยังตลาดสหรัฐฯ เพราะประเทศไทยมีเชื้อ Viscerotropic Velogenic Newcastle Disease รวมถึงปัญหาของโรคระบาดไข้หวัดนก หรือการที่สหรัฐอเมริกามีการกำหนดให้การแจ้งรายละเอียดสินค้า การมีใบรับรองมาตรฐาน และการจัดทำเครื่องหมายหรือป้ายสินค้า เป็นต้น

ตามความตกลง SPS ได้กำหนดให้ประเทศภาคีสมาชิกใช้มาตรการ SPS ที่อยู่บนพื้นฐานของการประเมินความเสี่ยงที่เหมาะสม โดยในการประเมินความเสี่ยงนี้จะต้องพิจารณาปัจจัยต่าง ๆ คือ หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ กระบวนการและวิธีการผลิตที่เกี่ยวข้อง วิธีการตรวจสอบ การสุ่มตัวอย่าง วิธีการพิสูจน์ การแพร่ระบาดของเชื้อโรคและแมลง การมีอยู่ของเขตปลอดแมลงหรือเชื้อโรคสภาพทางนิเวศวิทยาและสิ่งแวดล้อม การกักกัน หรือการบำบัด โดยมาตรการทุกมาตรการที่ออกมาเพื่อปกป้องความปลอดภัยและสุขอนามัยของสัตว์และพืช จะต้องอยู่บนพื้นฐานของการวิเคราะห์และการประกันจากการชี้วัดที่มีเป้าหมาย และเที่ยงตรงจากข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ให้มากที่สุด ซึ่งข้อมูลเหล่านี้มีความจำเป็นต่อการใช้ทั้งเพื่อกำหนดใช้มาตรการ SPS หรือแนวทางปฏิบัติ (มาตรการ TBT) กับสินค้านำเข้า และใช้โต้แย้งการใช้มาตรการดังกล่าวของประเทศอื่นในกรณีสินค้าส่งออก ซึ่งสินค้าการเกษตรของไทยที่มีทั้งการนำเข้าและส่งออกของไทยหลายชนิดยังขาดข้อมูลดังกล่าว ทั้งนี้ข้อมูลการปนเปื้อนยังสามารถนำมาใช้ในการกำหนดแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนในระบบผลิตอีกด้วย

การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อาจนำไปสู่การปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxins) ซึ่งมีหลายชนิด เช่น โอคราทอกซิน (Ochratoxins) พาทูลิน (Patulin) และแอฟลาทอกซิน (Aflatoxins) สารเหล่านี้เป็นสารพิษจากเชื้อราที่มีความสำคัญเนื่องจากมีความเป็นพิษในระดับสูงและมักพบปนเปื้อนใน ผลไม้บางชนิด พริก พริกไทย กาแฟ องุ่น และผลิตภัณฑ์แปรรูป

ความเสียหายจากโรคพืชและสารพิษจากราหลังการเก็บเกี่ยวของผลิตผลเกษตรมีปัจจัยสำคัญคือ 1) การปนเปื้อนหรือเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุ และ 2) สภาพแวดล้อมหลังการเก็บเกี่ยวมีความเหมาะสมต่อเชื้อสาเหตุ โดยที่เชื้อราเหล่านี้สามารถเข้าทำลายได้ทุกสถานการณ์ ตั้งแต่ กระบวนการผลิต กระบวนการเก็บเกี่ยว กระบวนการเก็บรักษา และกระบวนการขนส่ง ในการแก้ปัญหาผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวดังกล่าวจึงควรพิจารณาใช้วิธีการที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคด้วยการไม่ใช้สารเคมีที่มีอันตราย เพื่อลดปัญหาสารเคมีตกค้าง ทำการพัฒนาคุณภาพผลผลิต ลดการเน่าเสียและยืดอายุการเก็บรักษาด้วยชีววิธี ผสมผสานกับวิธีทางกายภาพ รวมไปถึงการประเมินสถานการณ์การเกิดโรคและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรด้วย

ด้วยเหตุนี้ การกำหนดวิธีควบคุมและป้องกันการเจริญของปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากราจะเริ่มจากการศึกษาการปนเปื้อนในกระบวนการผลิตและผลิตภัณฑ์ แต่ละขั้นตอนโดยเก็บข้อมูลเชื้อราที่พบ

ปริมาณที่พบ การสร้างสารพิษจากรา และวิเคราะห์ข้อมูลที่พบ เพื่อหาสาเหตุหรือขั้นตอนที่เป็นสาเหตุหลักของการปนเปื้อน ซึ่งถือเป็นจุดเสี่ยงที่สำคัญของการปนเปื้อนในกระบวนการผลิต และทำการทดลองวิธีควบคุมโดยนำเอาเทคโนโลยีการควบคุมจากผลงานวิจัยต่าง ๆ นำมาทดสอบความเหมาะสม เพื่อเป็นทางเลือกให้แก่ผู้ประกอบการนำไปใช้ในการควบคุม

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดกระบวนการปฏิบัติทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว การกำหนดวิธีการควบคุมจะเริ่มจากการศึกษาสาเหตุของการปนเปื้อนในกระบวนการผลิต คณะผู้วิจัยได้เริ่มดำเนินการโครงการวิจัย “การควบคุมการปนเปื้อนจุลินทรีย์และสารพิษจากเชื้อราในกระบวนการผลิตผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว” ในช่วงปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 – 2560 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการปนเปื้อนจุลินทรีย์โรคพืช จุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษ และสารพิษจากเชื้อราในกระบวนการและวิธีการผลิตเพื่อให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถใช้กำหนดแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนในระบบผลิต” ประกอบไปด้วย 7 การทดลอง ภายใต้ 2 กิจกรรม คือ 1) กิจกรรมการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว และ 2) กิจกรรมการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว โดยมีผลการดำเนินงานวิจัยดังนี้

1. การศึกษาวิธีควบคุมความเสียหายที่เกิดจากเชื้อ *Penicillium* spp. หลังการเก็บเกี่ยวในพืชตระกูลส้ม พบว่าความเสียหายในแปลงปลูกส่วนใหญ่เกิดจากการกระแทกของผล ภัยธรรมชาติในแปลง การปฏิบัติการเก็บเกี่ยวและการขนส่งผลผลิต ส่วนการควบคุมโรคในแปลง ได้แก่ โรคกรีนนิ่ง ความเสียหายในกระบวนการผลิตในโรงคัดบรรจุส่วนใหญ่ เป็นความเสียหายทางกายภาพ ได้แก่ การช้ำ การเกิดบาดแผล เป็นผลมาจากความเสียหายจากแปลงปลูก ส่งผลให้เกิดการเข้าเกิดการเน่าเสีย และเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายทางบาดแผลหรือรอยช้ำที่เกิดขึ้น อาการจะรุนแรงเพิ่มมากขึ้นหลังการเก็บรักษาเป็นเวลานาน เชื้อที่เข้าทำลายผลส้มสายน้ำผึ้งในกระบวนการผลิตในโรงคัดบรรจุ ได้แก่ เชื้อ *Fusarium* spp. พบมากกว่า 90% การควบคุมโรคในแปลง ได้แก่ โรคกรีนนิ่ง เกษตรกรผู้ปลูกบรรเทาอาการและรักษาต้นส้มด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาผลตกค้างของการใช้ยาปฏิชีวนะในผลส้มเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ความเสียหายในกระบวนการผลิตในโรง ควรมีการคัดแยกผลิตผลที่เกิดบาดแผลและรอยช้ำ เพื่อป้องกันการเสียหายจากเชื้อสาเหตุโรคระหว่างการเก็บรักษาผลิตผลเพื่อรอจำหน่าย ข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการทดลองสามารถใช้เป็นแนวทางในการควบคุมและป้องกันการปนเปื้อนเชื้อราในส้มที่ผลิตภายในประเทศ ตามมาตรการคุ้มครองผู้บริโภคทางด้านสุขภาพอนามัยความปลอดภัยต่อไป

2. การศึกษาการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อรา *Curvalaria* sp. สาเหตุโรคดอกจุดสนิมกล้วยไม้สกุลหวายหลังการเก็บเกี่ยว พบว่าการระบาดของเชื้อสาเหตุของโรคดอกจุดสนิม และปัจจัยที่ส่งเสริมการแพร่ระบาดในแหล่งปลูกกล้วยไม้เพื่อการส่งออก 5 จังหวัด จำนวน 21 แปลง เชื้อรา *C. eragrostidis* ไม่พบเชื้อราสาเหตุในน้ำและดินทุกตัวอย่าง พบเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด ใบไหม้ 8 ไอโซเลท ได้แก่เชื้อรา *Nigrospora* sp., *Fusarium* sp., *Scytalidium* sp., *Fusarium solani*, *Bipolaris* sp., *Nodulissporium* sp., *Drechshera holmii* และ *Colletotrichum* sp. และพบเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. พบวัชพืช จำนวน 15 ชนิด

หญ้ารังนก หญ้าตีนกา หญ้านกเขา หญ้าตีนนก หญ้าตีนตุ๊กแก กระเม็ง ตำลึง ผักปลัง เฟิร์น กระสัง บังบก ผักชีฝรั่ง ปอเทือง น้ำนมราชสีห์ และมะระขี้นก ขณะที่แหล่งจำหน่ายปากคลองตลาด ไม่พบเชื้อราสาเหตุโรคดอกจุดสนิม *C. eragrostidis* แต่พบเชื้อราสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp.ไอโซเลท T03 ควบคุมโรคดอกจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้สกุลหวายได้ดีกว่าชุดควบคุมขณะที่สารเคมี iprodione 50%WP ที่อุณหภูมิ 5 ℃ มีประสิทธิภาพดีที่สุด สามารถนำเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp.ไอโซเลท T03 มาพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรคดอกจุดสนิมกล้วยไม้สกุลหวายหลังการเก็บเกี่ยวได้

3. การศึกษาแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนและการลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในพริก ได้ข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับสถานการณ์การปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในพริกแห้ง และพริกป่นของประเทศไทย การอบพริกแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ จากชุดควบคุมได้ สามารถใช้เป็นคำแนะนำในการควบคุมการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในพริกได้ โดยแนะนำเกษตรกรให้ดูแลการผลิตตั้งแต่กระบวนการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวจนถึงการเก็บรักษาอย่างถูกวิธี โดยคำนึงถึงจุดวิกฤตที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อรากลุ่มที่สร้างสารพิษ

4. การศึกษาแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนสารพิษ patulin ในผลิตผลและผลิตภัณฑ์เกษตร พบว่าผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราในผลไม้แปรรูป 12 ชนิดผลิตภัณฑ์ รวม 338 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อรา 41 ตัวอย่าง คิดเป็น 12.13 % โดยพบว่ามะตูมแห้งมีการปนเปื้อนเชื้อรามากที่สุด คือพบ 28 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่าง 28 ตัวอย่าง ตัวอย่างผลไม้สดนำเข้าจากด่านตรวจพืชเชียงแสน จังหวัดเชียงราย รวม 15 ชนิด จำนวน 192 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อราในทุกตัวอย่าง แต่ไม่พบเชื้อราที่สร้างสารพิษ patulin ตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้และผลไม้แปรรูปรวมทั้งหมด 28 ตัวอย่าง พบว่าไม่มีการปนเปื้อนสารพิษ patulin สามารถใช้ในเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำไปสู่การกำหนดการตรวจติดตามการปนเปื้อนในผลิตผลและผลิตภัณฑ์การเกษตรที่จะมีการนำเข้ามากขึ้นในอนาคต

5. การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษแอฟลาทอกซิน บี1 ในผลผลิตพริกไทย พบการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินในพริกไทยขาว พริกไทยขาวป่น พริกไทยดำ และพริกไทยดำป่น พริกไทยที่ได้จากร้านค้าและมีการจำหน่ายข้ามปี ในขณะที่พริกไทยจากแปลงเกษตรกรที่ผลิตภายในปีพบการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินในปริมาณที่ต่ำกว่า พบการปนเปื้อนในพริกไทยดำระหว่างขั้นตอนการตากสูงที่สุด จึงควรตากทันทีหลังการเก็บเกี่ยว มีวัสดุรองตากที่สะอาด ตากบนพื้นที่ยกสูงจากพื้นดิน ไม่ควรตากบนพื้นดินโดยตรง และหมั่นเกลี่ยผลพริกไทยให้ได้รับแสงแดดอย่างทั่วถึง พบการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* ในพริกไทยขาวในขั้นตอนการหมักจนถึงการล้างและขัดเอาเปลือกออก จึงไม่ควรทำการหมักนานจนเกินไป หรืออาจใช้วิธีการแช่น้ำ และควรตากให้แห้งทันทีหลังขั้นตอนการล้างเพื่อเอาส่วนเปลือกออก ซึ่งเกษตรกรสามารถนำแนวทางการผลิตพริกไทยที่ช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารแอฟลาทอกซินไปใช้ในกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้พริกไทยที่สะอาดปลอดภัยต่อผู้บริโภค

6. การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในกาแฟและผลิตภัณฑ์ กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟดิบแบบแห้งของกาแฟโรบัสต้าของเกษตรกรทางภาคใต้ ในขั้นตอนการหมักและตากผลแห้งเชอรี่เกิดการหมักผลกาแฟในถุงกระสอบต่ออีกเป็นเวลานานจะทำให้สีเปลือกได้ง่ายขึ้น แต่กลับทำให้มีการสะสมความชื้นส่งผลทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราได้แก่ *A. niger*, *A. ochraceus* และ *A. flavus* และสารพิษ AFB_1 และ OTA ขณะที่การผลิตกาแฟอาราบิก้าและทริปิก้าของทางภาคเหนือพบการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษในระดับต่ำ เนื่องจากมีการตากกาแฟกะลาให้แห้งได้เร็วกว่า มีการตากบนตาข่าย และมีหลังคาพลาสติกคลุม เพื่อป้องกันฝนและน้ำค้าง ในระยะการเก็บรักษาในโรงเก็บ มีการคัดเมล็ดดี ภาชนะบรรจุที่สะอาด มีการเก็บรักษาในโรงเก็บถ่ายเทอากาศสะดวก เมล็ดมีความชื้นต่ำกว่า 12% อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์สารพิษในกาแฟคั่วและผลิตภัณฑ์กาแฟที่วางจำหน่ายในท้องตลาดไม่พบการปนเปื้อนของโอคราทอกซิน (OTA) แต่พบแอฟลาทอกซิน (AFB_1) จำนวน 3 จาก 56 ตัวอย่างซึ่งไม่เกินค่ามาตรฐาน แสดงให้เห็นว่าสถานการณ์การปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราในกาแฟพบการปนเปื้อนสารพิษต่ำและปลอดภัยต่อการบริโภค เกษตรกรผู้ผลิตกาแฟโรบัสต้าสามารถนำแนวทางการผลิตกาแฟอาราบิก้าและทริปิก้ามาปรับใช้เพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดการปนเปื้อนได้

7. การศึกษาควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลองุ่นบริโภคสดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากองุ่น พบว่าลูกเกดสีดำนำเข้าจากต่างประเทศทั้งที่นำมาบรรจุลงกล่องในประเทศไทยและตักแบ่งขายตามน้ำหนัก มีการปนเปื้อนของเชื้อรา *A.niger* 100% รองลงมาคือเชื้อรา *Eurotium* sp. พบ 60 และ 50% ตามลำดับ ส่วนลูกเกดสีดำ ลูกเกดสีเหลือง น้ำองุ่น และไวน์ มีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 2.13 - 23.33, 3.07 - 9.93, 1.53 - 4.63 และ 1.87 - 4.83 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบในสวนองุ่นพบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Penicillium* sp. และ *A. aculeatus* ซึ่งสร้างสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตผลของทุกสวนที่ทำการสำรวจ ซึ่งสอดคล้องกันกับผลการตรวจดินและอากาศในสวนนั้น ๆ แนวทางการควบคุมการปนเปื้อนคือสวนควรมีระบบการจัดการที่ดีตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงเก็บเกี่ยว เช่น การตัดแต่งผลองุ่นที่เน่าเสีย ไม่ควรทิ้งไว้ในแปลงปลูก เพื่อเป็นการลดปริมาณเชื้อราและป้องกันมิให้เชื้อราแพร่กระจาย

Abstract

The contamination of microorganism and mycotoxins in agricultural commodities can occur in every step of handling processes either pre-harvest or post-harvest. The control measure of contaminations was start-up by investigation of causal of contamination during production processes. Our researchers conducted the research project “Control of Microbial and Mycotoxins Contamination in Agricultural Commodities During Post-Harvest Handling Processes” the fiscal year 2015-2017, with the objective was "to studies on contamination of pathogenic fungi, mycotoxin producing fungi and mycotoxins in processes and methodology of crop productions for the scientific information those capable used for setting up the guide line of postharvest contamination control measure in production system" The project consisting of 7 experimental under 2 activities, first activity is “Microbial Contamination Agricultural commodities” and the second activity is “Mycotoxin Contamination of Agricultural commodities” The results of those experiments are the following.

The first experiment is “Studies on Postharvest Loss in Tangerine *(Lonicera japonica Thunb)* from *Penicillium* spp.” This research aimed to Studies on Postharvest Loss in Tangerine *(Lonicera japonica Thunb)* from *Penicillium* spp. The research was handled between October 2014 and September 2016 at Chaingmai Province and Postharvest and Processing Research and Development Division. This research was divided 2 parts: Frist was study on the production of Tangerine from the orchard to the packinghouse. The result show that postharvest losses of the orchard causes by many factors such as natural disaster, harvesting and transportation. Moreover, the farmers against treated Tangerine trees with antibiotic. Ampicillin and Amoxy were applied at 15 g/L of water by injected into the trees. There is no postharvest loss caused by fungi on Tangerine fruits. Second, study on the losses and identification of pathogens from the orchard to the packinghouse. Postharvest loss of orchard was a main cause of packinghouse loss such as it was initiated the appeal of fruit rot and the pathogens infection in open wound. This symptom was violently when the Tangerine were storage for long time. In the conclusion, selection of Tangerine had wound and was bruise after harvesting from tree. It was a protection of the appeal of fruit rot and the pathogens infection of Tangerine storage in distribution of the customer. The causal pathogens of Tangerine were *Fusarium* spp, *Cladosporium* sp., *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp. The result indicated that finding the activity of toxin production of *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp. in Tangerine.

Second experiment is “Study on Flower Rusty Spots Contaminate of *Curvularia* sp. In Dendrobium Hybrid Postharvest” Flower rusty spot caused by *Curvularia eragrostidis* is the most important problem of Dendrobium orchids after harvest. Epidemic cause and factor affecting epidemic was studied in 5 cultivar such as Den.Kho Jiranand, *Den.*White Fairy, *Den.*Sonia ‘Jo Daeng’, *Den.*Sonia ‘Earsakul’. The study was carried out in 21 orchid farms of 4 provinces including Bangkok, Nakhon Pathom, Nonthaburi and Samut Sakhon, and 11 samples from flower market (Pakklong Talad) from June to July 2015. We found that the major caused disease was *C. eragrostidis* from Nakhon Pathom farm accounting for 66.67%, then Bangkok, Nonthaburi and Samut Sakhon, respectively. Furthermore, it was found in weed accounting for 6.67% but not in planting material, water, and soil. Surprisingly, antagonistic fungi called *Trichoderma* spp. was found in these materials for 73 isolates. Then the 3 efficient isolates were selected to control disease both *in vitro* and *in vivo*. However, we found no *C. eragrostidis* from flower market, but we found other caused diseases such as *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., and *Cladosporium* sp., etc. The biological control of *in vitro* test showed that T03 and T02 inhibited *C. eragrostidis* mycelium growth for 40.83 and 34.40% respectively at 30°C and filled PDA within 5 days whereas iprodione 50%WP showed 100% inhibition. The *in vivo* test showed that *Trichoderma* spp. isolate T03 had the most efficiency to control disease in every temperature since disease percentage of *Den.* Kho Jiranand kept at 20, 5, and 10°C was 0.35, 0.40, and 0.40 respectively comparing with control and iprodione 50%WP at 0.85 and 0.20 at 5°C respectively.

The third experiment is “Guidelines for Contamination Control and Reduction of Ochratoxin A in Chilli.” Ochratoxin A (OTA) is a toxin causing kidney cancer produced by some species of fungi, e.g. *Aspergillus flavus* and *A. niger*. The contamination of OTA is often found in feed and food including chilli. This research examined the situation of OTA contamination in dried chilli from major production areas in Thailand and determined the method to reduce OTA for enhancing food safety and quality. The data of dried chilli productions were collected from 3 provinces (Nakhon Ratchasima, Ubon Ratchathani and Chaiyaphum). Contaminated toxigenic fungi was observed by direct plate count method and OTA concentrations were analyzed by fluorometry. OTA contaminations were detected in 42 of 87 samples (48.28%) with level between 0.1 and 9.8 µg/kg. The highest OTA amount was detected in sample from Chaiyaphum province at 65 µg/kg. This concentration exceeds maximum level of the European Union (15 µg/kg). *A. niger* was the major toxigenic fungi contaminated in dried chilli from Chaiyaphum province (44.91%), followed by *A. flavus* 32.45% and *A. ochraceus* 2.64%. Randomized Complete Block design was applied for 2 experiments of toxin reduction with 3 replications. Six groups of dried chilli were treated at 70 and 80°C for 30, 45 and 60-minute OTA concentration of dried chilli treated at 80°C for 60 minutes decreased by 77.71% comparing to non-treated chilli (control group).

The forth experiment is "Study on Control of Patulin Contamination in Agricultural Commodities and Processing Products." The inspection of fungal and fungal contamination in agricultural commodities and processing products was conducted leading to be a guideline for setting of control measure. The inspection was conducted at the postharvest disease laboratory, Postharvest and Processing Products Research and Development Division, Department of Agriculture, during the fiscal year 2558-2559. Twelve types of processed fruit products, 338 samples in total, were detected for fungal contamination and 41 samples or 12.13 in percentage were contaminants. It was found that the dried Bael fruit (*Aegle marmelos* (L.) Corrêa) was most contaminated with fungi by 28 samples from 28 specimens, or 100 in percentage. Although there was no patulin contamination in all dried Bael fruit's specimens but highly of fungal contamination revealed that there was risk of contamination from the other mycotoxins. One hundred and ninety-two specimens of 15 species of the importing fresh fruits pass through Chiang Saen checkpoint, Chiang Rai province was collected, and resulted all specimens were contaminants by fungi. Twenty-eight samples of dry fruit and fruit juices were tested by the laboratory of Central Laboratory (Thailand) there was no patulin contamination.

The fifth experiment is "Study on Contamination Control of Fungi and Aflatoxin B_1 in Pepper." Study on contamination control of fungi and aflatoxin B_1 in pepper was to reduce the risk of fungi and aflatoxin B_1 contamination. One hundred and seventy-four samples of pepper product were tested in this study. The white pepper was contaminated with *Aspergillus flavus* at 0.0-13.2%, but not found the fungi in white powder pepper. The contamination of aflatoxin B_1 was analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique. Aflatoxin B_1 contamination was detected in white pepper and white powder pepper at 0.0- 16.2 and 0.0- 12.4 µg/kg, respectively. *A. flavus* content was found in black pepper with 7.1-8.0%, but not found in black powder pepper. Aflatoxin B_1 were detected in black pepper and black powder pepper at 0.0-18.5 and 6.4-59.1 μg/kg, respectively. The contaminations of fungi and aflatoxin B1 in white pepper during the production processing, the highest *A. flavus* was contaminated at 37% and aflatoxin B_1 was detected at 4.21 μg/kg in the incubation process for 5 days. To produce black pepper, samples from sun dried process for 2 days was contamination with *A. flavus* at 3.0% and aflatoxin B_1 content at 5.78 μg/kg. Thus, the recommendation for production of white pepper avoided the incubation in plastic bag and should be dried by sun suddenly after removing the outer skin. Black pepper production should be dried by sun after harvesting, use clean pad drying and avoided placing pepper on ground directly. This method will reduce contamination of fungi and aflatoxin B_1 in pepper.

The sixth experiment is "Study on Fungal and Mycotoxins Contamination in Coffee and Product." Study on fungal and analysis of Ochratoxin A (OTA) and Aflatoxin B_1 (AFB_1) contamination in coffee that grown and consumed in Thailand. The purpose of this study was to evaluate the situation of mycotoxin contamination in coffee bean and coffee product during 2014 and 2016 cultivation seasons. Sixty samples, three types of coffee beans, dried cherries, parchment coffee, green bean were collected from the farms and markets in Chiangmai, Chiangrai, Mae Hong Son, Tak, Lampang, Chumphon and Ranong. Post-harvest fungi were enumerated by direct plating whereas OTA and AFB_1 were analyzed by ELISA. The result showed that coffee drying process had high percentage of *Aspergillus* toxigenic species, 100% belonging to *Aspergillus niger*, 14.93% belonging to *A. ochraceus* and 8.29% belonging to *A. flavus*. Among those contaminated samples, there were 6% of total samples contained amount of AFB_1 higher than 20 microgram/kilogram (ppb) at maximum levels 63.10 ppb, while 13% of total samples contained amount of OTA higher than 20 ppb at maximum levels 56.05 ppb. Fifty-four samples, three types of coffee products, roasted coffee, traditional roasted coffee and instant coffee were analyzed for mycotoxins contamination by HPLC. The results showed that three samples of coffee products were contaminated with AFB_1, and the samples were found to be positive AFB_1 for the first time in Thailand, although their levels were low for consumer's safety consumption.

The seventh experiment is "Study on the controlling of fungi and mycotoxin contamination in fresh grape and product." The contamination of fungi and ochratoxin A was studied in grape product including 24, 7 and 14 samples from raisin, grape juice and wine, respectively. The black raisin imported from foreign countries was divided into 2 parts packed in the box and distributed in a bag in Thailand. We found that 100% of *Aspergillus niger* was contaminated in both box and bag and 60 and 50% of *Eurotium* sp. was contaminated in both box and bag, respectively whereas the contamination of the black raisin imported and packed in foreign countries was 50% of *Eurotium* sp. and then 25% of *A. niger* and *Penicillium* sp. There was no contamination in golden raisin, grape juice and wine. The ochratoxin A contamination was inspected by ELISA. We found that the ochratoxin A in black raisin, golden raisin, grape juice and wine was 2.13-23.33, 3.07-9.93, 1.53-4.63 and 1.87-4.83 µg/kg., respectively. Then we studied the contamination of fungi and ochratoxin A from orchard in 4 stages of growth development We found that the ochratoxin A of the first stage (30-40 days after fruit set) and the second stage (60-70 days after fruit set) of every orchard was ranged 7.95-11.90 µg/kg. and *Alternaria* sp*., Cladosporium* sp. and *A. aculeatus* were also contaminated in these stages. The ochratoxin A of the third stage (90-100 days after fruit set) and the fourth stage (120 days after fruit set) of every orchard was ranged 2.90-20.3 µg/kg. Moreover, we found that *Penicillium* sp., *A. aculeatus* and *Alternaria* sp. were also contaminated in these stages. When we inspected the environment of planting field we found that *A. aculeatus* and *Penicillium* sp. were high in soil and air. Therefore, the good management from planting to harvest was important to reduce fungi and ochratoxin A.

1 กิจกรรมการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว

1 Microbial Contamination Agricultural commodities

หัวหน้ากิจกรรม

นายชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์

คำสำคัญ

การปนเปื้อน ผลิตผลเกษตร จุลินทรีย์ หลังการเก็บเกี่ยว

Microbial, Contamination, Agriculture, commodities

บทคัดย่อ

กิจกรรมการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในกระบวนการและวิธีการผลิตเพื่อให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถใช้กำหนดแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนในระบบผลิต ประกอบด้วย 2 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาวิธีควบคุมความเสียหายที่เกิดจากเชื้อ *Penicillium* spp. หลังการเก็บเกี่ยวในพืชตระกูลส้ม ได้ศึกษาวิธีควบคุมความเสียหายที่เกิดจากเชื้อ *Penicillium* spp. หลังการเก็บเกี่ยวของผลส้มสายน้ำผึ้ง มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาข้อมูลการปนเปื้อนเชื้อรา *Penicillium* spp. ในกระบวนการผลิตส้มสายน้ำผึ้งภายในประเทศ ดำเนินงานตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2557 ถึง กันยายน 2559 ที่ แปลงเกษตรกรผู้ปลูกส้มสายน้ำผึ้งกับโรงงานคัดบรรจุส้มสายน้ำผึ้งเอกชนจังหวัดเชียงใหม่ และกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร การทดลองนี้แบ่งเป็น 2 ตอน คือ ตอนที่ 1 ศึกษาการผลิตและการจัดการสวนส้มและโรงคัดบรรจุส้ม พบว่า ความเสียหายในแปลงปลูกส่วนใหญ่เกิดจากการกระแทกของผล ภัยธรรมชาติในแปลง การปฏิบัติการเก็บเกี่ยวและการขนส่งผลผลิต นอกจากนี้ พบว่า เกษตรกรผู้ปลูกบรรเทาอาการโรคกรีนนิ่งและรักษาต้นส้มด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะ คือ แอมพิซิลิน และแอมม๊อกซี่ อัตราส่วน 15 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ฉีดเข้าต้นส้มโดยตรง และไม่พบความเสียหายจากเชื้อราในผลส้มหลังการเก็บเกี่ยวจากแปลง ตอนที่ 2 ศึกษาความเสียหายและจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคจากการผลิตและการจัดการสวนส้มและโรงคัดบรรจุส้ม พบว่า ความเสียหายในกระบวนการผลิตในโรงคัดบรรจุส่วนใหญ่ เป็นความเสียหายทางกายภาพ ได้แก่ การช้ำ การเกิดบาดแผล เป็นผลมาจากความเสียหายจากแปลงปลูก ส่งผลให้เกิดการเข้าเกิดการเน่าเสียและเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายทางบาดแผลหรือรอยช้ำที่เกิดขึ้น อาการจะรุนแรงเพิ่มมากขึ้นหลังการเก็บรักษาเป็นเวลานาน ดังนั้น ควรมีการคัดแยกผลิตผลที่เกิดบาดแผลและรอยช้ำ เพื่อป้องกันการเสียหายจากเชื้อ

สาเหตุโรคระหว่างการเก็บรักษาผลิตผลเพื่อรอจำหน่ายให้กับผู้บริโภค โดยเชื้อที่เข้าทำลายผลส้มสายน้ำผึ้งในกระบวนการผลิตในโรงคัดบรรจุ ได้แก่ เชื้อ *Fusarium* spp. พบมากกว่า 90% รองลงมาคือ เชื้อ *Cladosporium* sp., *Aspergillus* spp และ *Penicillium* spp. ดังนั้น ควรมีการศึกษาความสามารถในการสร้างสารพิษจากเชื้อรา *Aspergillus* spp และ *Penicillium* spp. ที่พบในผลส้มสายน้ำผึ้ง เพื่อใช้เป็นข้อมูลความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคต่อไป

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อรา *Curvalaria* sp. สาเหตุโรคดอกจุดสนิมกล้วยไม้สกุลหวายหลังการเก็บเกี่ยว พบว่าโรคดอกสนิมหรือจุดสนิม (flower rusty spot) มีสาเหตุจากเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* เป็นปัญหาสำคัญในการส่งออกของกล้วยไม้สกุลหวายตัดดอก จะแสดงอาการโรคหลังจากเก็บเกี่ยวแล้ว จึงศึกษาการระบาดของเชื้อสาเหตุโรคดอกจุดสนิม และปัจจัยที่ส่งเสริมการแพร่ระบาดในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ขาวสนาน พันธุ์ขาว5เอ็น พันธุ์บอมโจแดง พันธุ์เอียสกุล และพันธุ์ลูกผสม (หวายสี) จากแปลงปลูกเพื่อส่งออก 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกรุงเทพมหานคร นครปฐม นนทบุรี และสมุทรสาคร จำนวน 21 แปลง (ดำเนินการเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม 2558) พบว่าดอกกล้วยไม้จากแปลงในจังหวัดนครปฐมมีเชื้อราสาเหตุ *C. eragrostidis* มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 66.67 รองลงมาจังหวัดกรุงเทพมหานคร นนทบุรี และสมุทรสาคร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบเชื้อราสาเหตุในวัชพืช ร้อยละ 6.67 ส่วนปัจจัยอื่น ๆ เช่น วัสดุปลูก น้ำ ดิน ไม่พบเชื้อราสาเหตุ *C. eragrostidis* และคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพได้ 3 ไอโซเลท คือ T01 T02 T03 จากวัชพืชและวัสดุปลูก ทั้งหมดจำนวน 73 ไอโซเลท และแหล่งจำหน่ายปากคลองตลาดจังหวัดกรุงเทพมหานคร โดยสุ่มเก็บดอกที่แสดงอาการโรคดอกจุดสนิม 11 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อราสาเหตุโรคดอกจุดสนิมทุกตัวอย่าง แต่พบเชื้อราสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ ได้แก่ *Alternaria* sp., *Collectotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp. เมื่อทดสอบชีววิธีด้วยเชื้อรา T02 T03 และสารเคมี iprodione 50%WP บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 10,20,30 และ 40°C พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท T03 และ T02 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ยร้อยละ 40.83 และ 34.40 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30°C และเจริญเติบโตคลุมทับเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ภายใน 5 วันหลังจากวางเชื้อ เมื่อเทียบกับสารเคมี iprodione 50%WP มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบการควบคุมโรคดอกจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ขาวสนานด้วยเชื้อรา T02 T03 และสารเคมี iprodione 50%WP โดยชีววิธีที่อุณหภูมิ 5,10 และ20°C พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp.ไอโซเลท T03 เกิดโรคน้อยที่สุดทุกอุณหภูมิ เกิดโรค 0.35% 0.40% และ 0.40% อุณหภูมิ 20 5 และ 10°C ตามลำดับ และชุดควบคุมเกิดโรค 0.85% เมื่อเทียบกับสารเคมี iprodione 50%WP ที่อุณหภูมิ 5 °C มีประสิทธิภาพดีที่สุดเกิดโรค 0.20%

Abstract

The objective of activity “Microbial Contamination Agricultural commodities” are studies on microbial contamination in processes and methodology of crop productions for

the scientific information those capable used for setting up the guide line of postharvest contamination control measure in production system. The activity consisting of 2 experiments.

The first experiment is “Studies on Postharvest Loss in Tangerine *(Lonicera japonica Thunb)* from *Penicillium* spp.” This research aimed to Studies on Postharvest Loss in Tangerine *(Lonicera japonica Thunb)* from *Penicillium* spp. The research was handled between October 2014 and September 2016 at Chaingmai Province and Postharvest and Processing Research and Development Division. This research was divided 2 parts: Frist was study on the production of Tangerine from the orchard to the packinghouse. The result show that postharvest losses of the orchard causes by many factors such as natural disaster, harvesting and transportation. Moreover, the farmers against treated Tangerine trees with antibiotic. Ampicillin and Amoxy were applied at 15 g/L of water by injected into the trees. There is no postharvest loss caused by fungi on Tangerine fruits. Second, study on the losses and identification of pathogens from the orchard to the packinghouse. Postharvest loss of orchard was a main cause of packinghouse loss such as it was initiated the appeal of fruit rot and the pathogens infection in open wound. This symptom was violently when the Tangerine were storage for long time. In the conclusion, selection of Tangerine had wound and was bruise after harvesting from tree. It was a protection of the appeal of fruit rot and the pathogens infection of Tangerine storage in distribution of the customer. The causal pathogens of Tangerine were *Fusarium* spp, *Cladosporium* sp*., Aspergillus* spp and *Penicillium* spp. The result indicated that finding the activity of toxin production of *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp. in Tangerine.

Second experiment is “Study on Flower Rusty Spots Contaminate of *Curvularia* sp. In Dendrobium Hybrid Postharvest” Flower rusty spot caused by *Curvularia eragrostidis* is the most important problem of Dendrobium orchids after harvest. Epidermic cause and factor affecting epidermic was studied in 5 cultivar such as *Den.*Kho Jiranand, *Den.*White Fairy, *Den.*Sonia ‘Jo Daeng’, *Den.*Sonia ‘Earsakul’. The study was carried out in 21 orchid farms of 4 provinces including Bangkok, Nakhon Pathom, Nonthaburi and Samut Sakhon, and 11 samples from flower market (Pakklong Talad) from June to July 2015. We found that the major caused disease was *C. eragrostidis* from Nakhon Pathom farm accounting for 66.67%, then Bangkok, Nonthaburi and Samut Sakhon, respectively. Furthermore, it was found in weed accounting for 6.67% but not in planting material, water, and soil. Surprisingly, antagonistic fungi called *Trichoderma* spp. was found in these materials for 73 isolates. Then the 3 efficient isolates were selected to control disease both *in vitro* and *in vivo*. However, we found no *C. eragrostidis* from flower market, but we found other caused diseases such as *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., and *Cladosporium* sp., etc. The biological control of *in vitro* test showed that T03 and T02 inhibited *C. eragrostidis* mycelium growth for 40.83 and 34.40% respectively at 30°C and filled PDA within 5 days whereas iprodione 50%WP showed 100% inhibition. The *in vivo* test showed that *Trichoderma* spp. isolate T03 had the most efficiency to control disease in every temperature since disease percentage of *Den.* Kho Jiranand kept at 20, 5, and 10°C was 0.35, 0.40, and 0.40 respectively comparing with control and iprodione 50%WP at 0.85 and 0.20 at 5°C respectively.

บทนำ

ผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิดที่พบการปนเปื้อนเชื้อราอันนำไปสู่การเน่าเสีย นอกเหนือจากการมีรูปลักษณ์ไม่พึงประสงค์ทำให้ไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคแล้ว ยังอาจพบการสร้างสารพิษโดยเชื้อราที่เข้าทำลายด้วย ความเสียหายจากโรคพืชและสารพิษจากราหลังการเก็บเกี่ยวของผลิตผลเกษตรมีปัจจัยสำคัญคือ 1) การปนเปื้อนหรือเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุ และ 2) สภาพแวดล้อมหลังการเก็บเกี่ยวมีความเหมาะสมต่อเชื้อสาเหตุ

ความเสียหายของผลส้มหลังการเก็บเกี่ยวส่วนใหญ่เกิดจากโรคราเขียว มีสาเหตุจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Pennicillium digitatum* และ *Pennicillium italicum* การตรวจสอบเชื้อรา *Penicillium spp.* ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตส้มภายในประเทศ ทำให้ทราบขั้นตอนที่เชื้อเข้าทำลาย สามารถเลือกใช้วิธีควบคุมและป้องกันการเกิดโรคที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมกับขั้นตอนที่เกิดปัญหานั้น

เชื้อราสาเหตุโรคดอกจุดสนิมกล้วยไม้มีพืชอาศัยหลายชนิด สปอร์ของเชื้อราสามารถปนเปื้อนได้ทั้งจากดิน น้ำ วัสดุปลูก ต้นกล้วยไม้ และอากาศ ถ้าเกษตรกรขาดการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวที่ดีและเหมาะสมจะทำให้เชื้อราสาเหตุโรคดอกจุดสนิมเข้าทำลายดอกกล้วยไม้ทำให้ผลผลิตเสียหาย หรือไม่ได้คุณภาพส่งผลกระทบต่อการค้าต่อไป

การทบทวนวรรณกรรม

ส้มเขียวหวานสดที่ผลิตภายในประเทศประมาณ 277,284 ตัน (ข้อมูลปี พ.ศ. 2553) มีการส่งออกในปริมาณที่น้อยมาก เมื่อเทียบกับปริมาณผลผลิตที่ผลิตได้ คือปริมาณ 8,365 ตัน มูลค่า 164.13 ล้านบาท ประเทศนำเข้าที่สำคัญได้แก่ ประเทศเมียนมาร์ ฮ่องกงจีน ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซียและกัมพูชา (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) ในปี 2559 มีปริมาณการผลิตภายในประเทศคือ 152,779 ตัน มูลค่า 17,141 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) ปัญหาที่พบมาก ได้แก่ การเน่าเสียหลังการเก็บเกี่ยวและระหว่างกระบวนการขนส่งจากการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น โรคราสีเขียวที่เกิดจากเชื้อ *Penicillium digitatum* และ โรคราสีเทา *P. italicum* เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค จึงควรมีการตรวจสอบการปนเปื้อนและแนวทางการควบคุมเชื้อ *Penicillium* spp.ในส้ม เพื่อจัดทำข้อมูลพื้นฐานปริมาณเชื้อสาเหตุในส้มทั้งที่ผลิตได้ภายในประเทศ และจากการนำเข้าจากต่างประเทศ

ประเทศไทยผลิตและส่งออกดอกกล้วยไม้สกุลหวายเป็นอับดับ 1 ของโลก ซึ่งตลาดหลักคือ จีน ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา อินเดีย อิตาลี และอื่น ๆ มีอื่น ๆ มีปริมาณส่งออกปี 2553 จำนวน 55,258 ตัน คิดเป็นมูลค่าส่งออก 2,727,598 ล้านบาท และปี 2554 มีปริมาณส่งออก 54,989 ตัน คิดเป็นมูลค่าส่งออก 2,773,390

ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) โดยแหล่งผลิตใหญ่ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร กรุงเทพฯ ราชบุรี กาญจนบุรี และนนทบุรี

ปัญหาที่สำคัญในการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ คือเรื่องโรคและแมลง โรคพืชที่เป็นปัญหาสำคัญในการส่งออกของกล้วยไม้ตัดดอกคือโรคดอกสนิมหรือจุดสนิม (flower rusty spot) มีสาเหตุจากเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* (Henn.) J.A. Meyer ซึ่งมักจะพบมากในกล้วยไม้สกุลหวาย เช่น หวายขาว หวายชมพู หวายมาดาม หวายซีซาร์ และหวายลูกผสมทุกชนิดอย่างรุนแรง เชื้อสาเหตุจะเข้าทำลายดอกกล้วยไม้ตั้งแต่ในแปลงแต่อาการโรคจะในช่วงหลังการเก็บเกี่ยวหรือระหว่างขนส่งภายใน 8-24 ชั่วโมง (พิบูลย์, 2549) โรคนี้ระบาดได้ดีในช่วงฤดูฝนหรือสภาพที่มีน้ำค้างลงจัดโดยเฉพาะช่วงฤดูฝนและต้นฤดูหนาวประมาณเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม (นิยมรัฐ, 2544; พิบูลย์, 2549)

ดังนั้นจึงควรศึกษาการปนเปื้อนและแนวทางวิธีการควบคุมเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* สาเหตุโรคดอกจุดสนิมกล้วยไม้สกุลหวาย

พาทูลิน (patulin) คือ สารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin) ที่ สร้างจากเชื้อรา *Penicillium expansum* , *Penicillium patulum* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคเน่า (blue mold rot) ของผลไม้ เช่น แอปเปิล สาลี่ องุ่น แตงเมล่อน สตรอเบอรี่ และผลไม้ในกลุ่ม stone fruit เช่น พรุน และ ท้อ เป็นสารพิษที่มีเป็นพิษต่อระบบประสาท (neurotoxin) เป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (Carcinogen) ค่ามาตรฐานสากล Codex Alimentarius 2003 กำหนด ค่า patulin ไม่เกิน 50 μg/kg ในน้ำแอปเปิล เครื่องดื่มอื่น ๆ และผลิตผลอื่น ๆ (Barkai-Golan and Paster, 2008) ซึ่งปัจจุบันมีการนำเข้าผลิตผลสดและผลิตภัณฑ์แปรรูปที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน

เชื้อราที่สร้างสารพิษและสารพิษพาทูลินเป็นจำนวนมากและมีแนวโน้มมากขึ้นในอนาคต และมีการผลิตภายในประเทศด้วย นอกจากนี้ ไทยเรายังขาดแคลนข้อมูลการปนเปื้อนเชื้อราที่สร้างสารพิษและสารพิษพาทูลินที่จะนำมาใช้ให้เป็นประโยชน์ ทั้งด้านความปลอดภัยของผู้บริโภคภายในประเทศและการกำหนดระเบียบหรือมาตรการระหว่างประเทศคู่ค้าซึ่งมีความสำคัญมากในปัจจุบัน เห็นได้จากการที่สหภาพยุโรป ออกระเบียบ (Commission Regulation) ที่ COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 ควบคุมระดับสูงสุดของสาร Patulin ในอาหารมนุษย์ ที่ผลิตมาจากหรือมีส่วนผสมของผลิตภัณฑ์แอปเปิล เพื่อป้องกันและลดสาร Patulin ในน้ำแอปเปิลและเครื่องดื่มประเภทอื่น ๆ ที่มีน้ำแอปเปิลเป็นส่วนผสม โดยกำหนด Maximum levels ในน้ำแอปเปิล 50 μg/kg และในผลิตภัณฑ์อื่น ๆจากแอปเปิลต่ำลงเป็น 10-25 μg/kg ซึ่งสอดคล้องกับมาตรฐาน Codex

ระเบียบวิธีวิจัย

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาวิธีควบคุมความเสียหายที่เกิดจากเชื้อ *Penicillium* spp. หลังการเก็บเกี่ยวในพืชตระกูลส้ม

ระยะเวลาเริ่มต้น – สิ้นสุด ปี 58-59

ตอนที่1 ศึกษาการผลิตและการจัดการสวนส้มและโรงคัดบรรจุส้ม

ติดต่อและสัมภาษณ์เกษตรกรปลูกส้มสายน้ำผึ้งที่ผ่านการรับรอง GAP ของกรมวิชาการเกษตร จำนวน 2 รายใหญ่ และเจ้าหน้าที่ของโรงคัดบรรจุส้มสายน้ำผึ้งเอกชนในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 1 โรงงาน

ตอนที่2 ศึกษาความเสียหายและจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคจากการผลิตและการจัดการสวนส้มและโรงคัดบรรจุส้ม

การเก็บตัวอย่างในแปลงและโรงคัดบรรจุ

2.1 เก็บตัวอย่างเพื่อการจำแนกความเสียหายทางกายภาพและการเน่าเสีย แยกเชื้อและจำแนกเชื้อสาเหตุโรคในผลส้ม ดินน้ำ และเชื้อในอากาศในสภาพแวดล้อมเพาะปลูกจากแปลง

- ตัวอย่างผลส้มสายน้ำผึ้ง ส้มออร่า ส้มผิวทอง ต้นละ 4 ผล สลับต้นเว้นต้น จำนวน 40 ผลต่อพันธุ์

- ตัวอย่างดินจากแปลงปลูกส้มทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยกำหนดจุดเก็บตัวอย่างในแปลงส้มแบบสลับฟันปลา แปลงละ 5 ตำแหน่ง โดยมีปริมาตรรวม 300 กรัม จัดเป็น 1 ตัวอย่าง เก็บทั้งหมด 3 ตัวอย่าง

- ตัวอย่างเชื้อในอากาศตามตำแหน่งการเก็บตัวอย่างดินของแปลงปลูกส้มทั้ง 3 สายพันธุ์ ด้วยการวางเพลทที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ตามตำแหน่งการเก็บตัวอย่างดินของแปลงปลูกส้ม จำนวน 5 ตัวอย่างต่อแปลง ตำแหน่งละ 1 เพลท เก็บตัวอย่าง 5 เพลทต่อแปลง เก็บตัวอย่างทั้งหมด 15 เพลท

- ตัวอย่างน้ำ จำนวน 2 ตัวอย่างจากบ่อน้ำและหัวก๊อกพ่นน้ำจากแปลงปลูกส้มในแต่ละแปลง เก็บตัวอย่างทั้งหมด 6 ตัวอย่างเพื่อจำแนกเชื้อสาเหตุโรคจากแปลงปลูกและสภาพแวดล้อมในการเพาะปลูก

2.2 เก็บตัวอย่างเพื่อจำแนกความเสียหายทางกายภาพและการเน่าเสีย แยกเชื้อและจำแนกเชื้อสาเหตุโรคในผลส้ม น้ำ สารเคลือบ เชื้อในอากาศในสภาพแวดล้อมของกระบวนการผลิตส้มในโรงคัดบรรจุ ทั้ง 6 ขั้นตอน ดังนี้

- ตัวอย่างผลส้มสายน้ำผึ้ง ในกระบวนการผลิตส้มสายน้ำผึ้งของโรงคัดบรรจุส้ม ประกอบด้วย 6 ขั้นตอน ๆละ 84 ผลเพื่อจำแนกความเสียหายทางกายภาพและการเน่าเสีย หากผลที่เน่าเสียที่มีเชื้อราเกิดขึ้น นำไปจำแนกเชื้อสาเหตุโรค

- ตัวอย่างเชื้อในอากาศในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตส้มสายน้ำผึ้งในโรงคัดบรรจุส้ม ด้วยการเปิดเพลทที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในแต่ละขั้นตอน ประกอบด้วย 6 ขั้นตอน ๆละ 3 เพลท

- ตัวอย่างน้ำและสารเคลือบในการล้างและเคลือบผลส้ม ปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง จำนวน 5 ตัวอย่าง เพื่อจำแนกเชื้อสาเหตุโรค

การเตรียมตัวอย่างจากแปลงและโรงคัดบรรจุเพื่อจำแนกเชื้อสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการ

การเตรียมตัวอย่างผลส้มที่เก็บจากแปลงและโรงคัดบรรจุ ย้ายมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน และทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่า โดนแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting technique บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรค หลังจากนั้น ทำการย้ายเชื้อให้บริสุทธิ์ในอาหารสังเคราะห์ (Selective media) ด้วยวิธี streak plate technique และทำการเก็บเชื้อในอาหาร nutrient agar แบบ slat agar เพื่อใช้ในการพิสูจน์โรคตามวิธีของ Koch (Koch' postulation) โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA นาน 7-10 วัน นำไปปลูกเชื้อบนผลปกติ ตรวจดูอาการโรคที่เกิดขึ้นและแยกเชื้อซ้ำอีกครั้งเพื่อพิสูจน์ว่าเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน เพื่อสังเกตอาการโรค และความเสียหายที่เกิดขึ้น

การเตรียมสารละลายเชื้อสาเหตุโรคจากดิน โดยชั่งดินน้ำหนัก 1 กรัมต่อน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร เขย่า เจือจาง 10^{-6} -10^{-7} เท่า และนำมาเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDA ด้วยวิธี spread plate technique โดยใช้ปริมาตรเชื้อ 30 ไมโครลิตรต่อเพลท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคจากดิน

การเตรียมตัวอย่างเชื้อในอากาศที่ได้จากแปลงและโรงคัดบรรจุ นำมาเลี้ยงและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคจากอากาศ

การเตรียมสารละลายเชื้อสาเหตุโรคจากน้ำและสารเคลือบ โดยตวงน้ำหรือสารเคลือบ ปริมาณ 1 มล ต่อน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร เขย่า เจือจาง 10^{-1} -10^{-2} เท่า และนำมาเลี้ยงเชื้อในอาหาร Dichloran 18% glycerol agar (DG18) ด้วยวิธี spread plate technique โดยใช้ปริมาตรเชื้อ 30 ไมโครลิตรต่อเพลท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคจากน้ำและสารเคลือบ

บันทึกความเสียหายและจำแนกเชื้อ ดังต่อไปนี้

- ผลส้มสายน้ำผึ้ง ส้มออร่า ส้มผิวทอง

-ประเมินความเสียหายทางกายภาพและการเน่าเสียที่เกิดขึ้นและจำแนกเชื้อสาเหตุโรค

-ตรวจปริมาณสารพิษจากเชื้อรา

- ดิน น้ำและสารเคลือบ อากาศในสภาพแวดล้อมของแปลงและการปฏิบัติงานทั้ง 6 ขั้นตอนในโรงคัดบรรจุ จำแนกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการสังเกตสี ลักษณะของโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคที่เกิดขึ้น

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อรา *Curvalaria* sp. สาเหตุโรคดอกจุดสนิมกล้วยไม้สกุลหวายหลังการเก็บเกี่ยว

ระยะเวลาเริ่มต้น – สิ้นสุด ปี 58-59

1. ศึกษาการระบาดของเชื้อสาเหตุของโรคดอกจุดสนิม และปัจจัยที่ส่งเสริมการแพร่ระบาดในแหล่งปลูก แหล่งจำหน่ายกล้วยไม้สกุลหวาย

1.1 แหล่งปลูก

สุ่มเก็บดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ขาวสนาน พันธุ์ขาว 5 เอ็น พันธุ์บอมโจแดง พันธุ์เอียสกุล และพันธุ์ลูกผสม(หวายสี) ที่แสดงอาการโรคดอกจุดสนิมกล้วยไม้ จากแปลงเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้สกุลหวายเพื่อส่งออกจาก 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกรุงเทพฯ จำนวน 5 แปลง จังหวัดนครปฐม จำนวน 6 แปลง จังหวัดนนทบุรี จำนวน 5 แปลง และจังหวัดสมุทรสาคร จำนวน 5 แปลง รวมทั้งหมด จำนวน 21 แปลง โดยเก็บตัวอย่างดอกกล้วยไม้ที่แสดงอาการโรคดอกจุดสนิมกล้วยไม้ ตัวอย่างวัสดุปลูก น้ำ ดิน และวัชพืชที่แสดงอาการโรคใบจุด ใบไหม้ ในแปลงปลูกกล้วยไม้ รัศมี 50 เมตร โดยตัวอย่างดอกกล้วยไม้ วัสดุปลูก และวัชพืช แยกเชื้อสาเหตุและเชื้อราปฏิปักษ์ด้วยเทคนิค tissue transplanting บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ส่วนน้ำและดิน แยกเชื้อด้วยวิธี dilution plate ที่ความเข้มข้น 10^4 เท่า บนอาหาร PDA นอกจากนี้ยังเก็บข้อมูลสภาพภูมิอากาศในแปลงปลูกทุกแปลง (ดำเนินการเดือนมิถุนายน 2558)

1.2 แหล่งจำหน่าย

ซื้อกล้วยไม้สกุลหวายจากตลาดปากคลองตลาด จ.กรุงเทพมหานคร จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ขาวสนาน 3 ตัวอย่าง พันธุ์ขาว 5 เอ็น 3 ตัวอย่าง พันธุ์ลูซี่สีชมพู 4 ตัวอย่าง และพันธุ์บอมโจแดง 1 ตัวอย่าง รวมทั้งหมดจำนวน 11 ตัวอย่าง ที่ปลูกในจังหวัดกรุงเทพฯ นครปฐม และสมุทรสาคร โดยสุ่มตัวอย่างดอกกล้วยไม้ที่แสดงอาการโรคดอกจุดสนิมมาแยกเชื้อสาเหตุ และเชื้อราปฏิปักษ์ด้วยเทคนิค tissue transplanting บนอาหาร PDA (ดำเนินการเดือนกรกฎาคม 2558)

2. ศึกษาการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคดอกจุดสนิมกล้วยไม้โดยชีววิธีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

2.1. คัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ ที่ได้จากตัวอย่างทั้งหมด โดยการทดสอบประสิทธิภาพการยังยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. eragrostidis* บนอาหาร PDA

2.2. ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราปฏิปักษ์ ต่อการยังยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. eragrostidis* โดยเปรียบเทียบกับสารเคมี iprodione 50%WP ความเข้มข้น 100 ppm บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 10 20 30 และ 40 ℃ วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) ทำ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 10 petri disc วัดผลการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคดอกจุดสนิมที่ 7 วัน

3. ศึกษาควบคุมโรคดอกจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้สกุลหวายโดยชีววิธี

3.1. นำเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท T02 และ T03 มาทดสอบการควบคุมการเกิดโรคดอกจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้พันธุ์ขาวสนาน โดยพ่นสารละลายสปอร์เชื้อรา *C. eragrostidis* ความเข้มข้น 6.7X 10^6cfu/ml บนช่อดอกกล้วยไม้จนทั่ว นำใส่ถุงพลาสติกให้ความชื้นและบ่มที่อุณหภูมิ 14 ℃ เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำช่อดอกกล้วยไม้มาพ่นสารละลายสปอร์เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท T02 และ T03 ความเข้มข้น 10^7cfu/ml ให้ทั่วช่อดอกกล้วยไม้ และใส่ถุงพลาสติกให้ความชื้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 10 และ 20℃ ตรวจนับจำนวนแผลบนดอกที่ 10 วัน ตรวจนับจำนวนแผลที่เกิดขึ้นบนดอกกล้วยไม้เป็นความรุนแรงของโรค วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ช่อดอก เปรียบเทียบกับชุดควบคุม และสารเคมี iprodione 50%WP ความเข้มข้น 100 ppm เกณฑ์การวัดระดับความรุนแรงการเกิดโรคดังนี้

0	ไม่เกิดโรค
1	เกิดโรค 1-2 ดอกต่อช่อ
2	เกิดโรคมากกว่า 2 ดอกต่อช่อ

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาวิธีควบคุมความเสียหายที่เกิดจากเชื้อ *Penicillium* spp. หลังการเก็บเกี่ยวในพืชตระกูลส้ม

ตอนที่1 ศึกษาการผลิตและการจัดการสวนส้มและโรงคัดบรรจุส้ม

จากการสัมภาษณ์เกษตรกรปลูกส้มสายน้ำผึ้งที่ผ่านการรับรอง GAP ของกรมวิชาการเกษตร จำนวน 2 ราย คือ สวนส้มของเกษตรกร และสวนส้มเอกชน และเจ้าหน้าที่ของโรงคัดบรรจุส้มสายน้ำผึ้งของเอกชนในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ พบว่า

การผลิตและการจัดการสวนส้มของเกษตรกร ที่อยู่ บ้านสันฮ่าง ต.บ้านหลวง อ.แม่อาย จ.เชียงใหม่ ประกอบด้วยสวนส้ม 2 แปลงใหญ่ ได้แก่

แปลงที่ 1 มีพันธุ์ส้มที่ปลูกมี 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์สายน้ำผึ้ง และพันธุ์ผิวทอง

การจัดการในแปลงส้ม หากเกิดการระบาดของโรคกรีนนิ่ง เกษตรกรทำการฉีดยาปฏิชีวนะเข้าต้นส้มเพื่อรักษาต้นส้มให้ฟื้นตัว โดยยาที่ใช้มี 2 ชนิด คือ ยาแอมพิซิลิน และแอมม๊อกซี่ ใช้ฉีดเข้าต้นส้มสลับกันทุก 3 เดือน อัตราการใช้คือ 15 กรัม หรือยา 30 เม็ดละลายในน้ำ 1 ลิตร โดยพื้นที่ 1 ไร่ ใช้ประมาณ 600-800 กรัม และระหว่างการฉีดยาดังกล่าว จะผสมปุ๋ยชื่อทางการค้า นูแท็ก ปริมาณ 2 ช้อนโต๊ะ ละลายน้ำ 20 ลิตร หรือประมาณ 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ร่วมด้วย

การเตรียมต้นส้มเพื่อให้ยาปฏิชีวนะ จากการใช้สว่านเจาะเฉียง 45 องศา ลึกประมาณ 2-3 เซนติเมตร ที่ส่วนโคนต้นตอส้ม

วิธีการให้ยาปฏิชีวนะกับต้นส้ม เริ่มการนำยาปฏิชีวนะดังกล่าว บรรจุในขวดพลาสติก 800 มล. ต่อสายออกมาจำนวน 4 สายต่อ 1 ขวด (รูปที่ 1 (1) และ (2)) เสียบสายที่จะให้ยาเข้าไปในต้นส้มก่อน เหลือไว้ 1 สาย เพื่อเอาไว้สูบลมเข้าไปในขวด โดยต่อสายเส้นนั้นเข้ากับที่สูบลม ใช้ที่สูบลมติดมาตรวัดแรงดัน 4 บาร์ สูบลมเข้าไปในขวดประมาณ 60 ปอนด์ (รูปที่ 1 (3)) พับสายและถอดที่สูบลมออก จากนั้นจึงเสียบเข้าไปในต้นส้มเป็นสายสุดท้าย (รูปที่ 1 (4)) แล้วห้อยขวดคว่ำหัวลงในแนวดิ่ง เพื่อให้สารละลายยาผ่านท่อเข้าสู่ต้นส้มได้ง่ายขึ้น (รูปที่ 1 (5) และ (6)) ใช้เวลาประมาณ 4-5 ชั่วโมง หรือครึ่งวัน ยาจะถูกดูดเข้าไปในต้นส้มจนหมด หากความเข้มข้นของสาร (EC) > 2 อาจทำให้ส้มใบไหม้ได้

หากยาเหลือในขวดพลาสติกอยู่ เกษตรกรจะทำการอัดลมเข้าไปในขวดอีกครั้งจนยาหมดขวด ถ้าต้นส้มยังไม่สามารถดูดยาขึ้นไปได้จะต้องเปลี่ยนน้ำยา แสดงว่ายาเสื่อมสภาพ ราคายาแอมพิซิลิน 35,000 บาทต่อถัง 25 กิโลกรัม หรือกิโลกรัมละ 2,000 บาท ถ้าใช้แบบกระปุก ราคากระปุกละ 500 บาท และราคาที่อัดลม 4 บาร์ ราคา 550 บาท

ปุ๋ยที่ให้ต้นส้ม ใช้ปุ๋ยสูตร 46-0-0 ปริมาณ 200 กรัมต่อต้น และปุ๋ยสูตร 0-0-40 ปริมาณ 100 กรัมต่อต้น ส่วนการให้น้ำ ใช้หัวมินิสปริงเกอร์ ให้น้ำเป็นเวลา 1.5-2.0 ชั่วโมง ทุก ๆ 2 วัน

ปัญหาที่พบในแปลงปลูก คือ ภัยธรรมชาติ เช่น ลูกเห็บตก, โรค ได้แก่ โรคกรีนนิ่ง โรคแคงเกอร์, แมลงศัตรูพืช ได้แก่ เพลี้ยไฟ เพลี้ยไก่แจ้ หนอนชอนใบ เพลี้ยอ่อน, ไรแดง ส่วนการเก็บผลผลิต ใน 1 ปี จะเก็บส้มไว้เพียง 2-3 รุ่น

แปลงที่ 2 ปลูกส้ม 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์สายน้ำผึ้ง พันธุ์ทองอำพัน และพันธุ์เหลืองทอง มีอายุต้นส้ม 1-2 ปี การให้น้ำ ใช้มินิสปริงเกอร์ ให้น้ำเป็นเวลา 1.5-2.0 ชั่วโมง สลับวันเว้นวัน

การผลิตของสวนส้มเอกชน ภายใต้การดูแลบริษัทเชียงใหม่มิตรเกษตร: แปลงและโรงคัดบรรจุอยู่ที่ ต.บ้านหลวง อ.แม่อาย จ.เชียงใหม่ การผลิตส้มของบริษัทนี้ ส่งขายตลาดภายในประเทศ 100% การขนส่งผลิตผลไปยังตลาดปลายทาง ขนส่งโดยรถบรรทุก มีความจุ 300 ตะกร้า ๆ ละ 20 กิโลกรัม ตลาดปลายทางคือ ตลาดไท และตลาดสี่มุมเมือง

การเก็บเกี่ยวผลผลิต เก็บในตอนเช้า ประมาณ 7.00 น. เก็บไว้ในที่ลมและระบายอากาศได้ดี และขนย้ายไปยังโรงคัดบรรจุเพื่อเข้าสู่กระบวนการปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยว

การปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวในโรงคัดบรรจุ มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เก็บรวบรวมผลิตผลจากแปลงปลูก ทำความสะอาดด้วยน้ำและสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 50 พีพีเอ็ม เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวส้ม และผึ่งให้แห้ง นาน 1 คืน

ขั้นตอนที่ 2 ทำความสะอาดขัดผิวด้วยลูกกลิ้งแปรงปัดที่มีความแข็งของขนแปรง 3 ระดับความหยาบ และซับน้ำด้วยฟองน้ำ ฉีดพ่นด้วยน้ำยากันราชื่อทางการค้าคือ Toxin M ปริมาณ 20 กรัมต่อน้ำ 200 ลิตร และเป่าด้วยลมเย็นให้แห้ง

ขั้นตอนที่ 3 การเคลือบผิวด้วยสารละลายแว๊กร่วมกับอิมาซาลิล ในอัตราส่วน 40 ลิตรต่อ 60 มิลลิลิตร และทำให้แห้งด้วยลมร้อน ที่ 35-40 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนที่ 4 คัดคุณภาพและขนาดผล สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ส้มคัดเกรดบรรจุกล่อง 10 กิโลกรัม แบ่งเกรดเป็น AA จำนวน 72 ผลต่อกล่อง และ A จำนวน 84 ผลต่อกล่อง ส้มคัดเกรดมีมากถึง 60 % ของปริมาณผลิตผลที่เก็บเกี่ยวได้ทั้งหมด กลุ่มที่ 2 ส้มตะกร้า มีประมาณ 30% ของปริมาณที่เก็บเกี่ยวผลิตผล ลักษณะส้มตกเกรดจากกลุ่มที่ 1 คือผิวเป็นลาย ไม่สวย ปราศจากแผล โรคและตำหนิ กลุ่มที่ 3 ส้มปัดเป็นส้มที่มีตำหนิ รอยแผลหรือช้ำที่ผิว เนื้อนิ่ม ฟ่าม หรือด้าน แข็ง ส่วนใหญ่นำไปแปรรูปเป็นน้ำส้มคั้น

ขั้นตอนที่ 5 บรรจุกล่อง ความจุ 10 กิโลกรัม

ขั้นตอนที่ 6 เก็บรักษาในห้องเย็น ที่ 5 องศาเซลเซียส เพื่อรอการขนส่งสู่ตลาดปลายทาง

ตอนที่ 2 ศึกษาความเสียหายและจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคจากการผลิตและการจัดการสวนส้มและโรงคัดบรรจุส้ม

สุ่มเก็บตัวอย่างในการผลิตส้ม ณ แปลงปลูกส้มสายน้ำผึ้ง ส้มออร่า และส้มผิวทอง จำนวน 3 แปลง และโรงคัดบรรจุขนาดใหญ่ จำนวน 1 โรง ที่อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ สามารถแบ่งได้ 6 ขั้นตอน โดยเก็บตัวอย่าง จำนวน 84 ตัวอย่างในแต่ละขั้นตอนต่อรอบ จำนวน 2 รอบ พบว่า ความเสียหายดังต่อไปนี้

2.1 ความเสียหายจากเชื้อราของผลส้มสายน้ำผึ้ง ส้มออร่า และส้มผิวทองหลังเก็บเกี่ยวจากแปลงปลูก หลังย้ายมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน พบว่า ส้มสายน้ำผึ้ง เกิดเชื้อราสีขาวที่ขั้วผลบริเวณรอยตัด จำนวน 40 ผล (ภาพที่ 7) ส้มออร่า เกิดเชื้อราสีขาวที่ขั้วผลบริเวณรอบตัด จำนวน 20 ผล (ภาพที่ 8) และผลส้มผิวทอง เกิดเชื้อราสีขาวที่ผิวผล และการยุบตัวขยายเกือบทั่วทั้งผล จำนวน 40 ผล (ภาพที่ 9) นอกจากนี้ พบว่า ความเสียหายส่วนใหญ่เกิดจากการกระแทกของผล ภัยธรรมชาติในแปลง การปฏิบัติการเก็บเกี่ยวและการขนส่งผลผลิต

ตัวอย่างดินจากแปลงปลูกส้มทั้ง 3 พันธุ์ ตรวจพบเชื้อรา *Aspergillus niger, A. flavas, Trichodrma* spp., *Fusarium* spp., *Collectotrichum* sp.**,** *Cladosporium* sp. และ unknown

ตัวอย่างเชื้อในอากาศในสภาพแวดล้อมในการปลูกส้มทั้ง 3 สายพันธุ์ ตรวจพบเชื้อราชนิดเดียวกับที่พบในตัวอย่างดิน

ตัวอย่างน้ำ ไม่พบเชื้อราเกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2 ความเสียหายทางกายภาพและการเน่าเสียของผลส้มสายน้ำผึ้งที่ผ่านการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวในโรงคัดบรรจุ ประกอบด้วย 6 ขั้นตอน สุ่มเก็บขั้นตอนละ 84 ผล และนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน หากผลที่เน่าเสียที่มีเชื้อราเกิดขึ้น นำไปจำแนกเชื้อสาเหตุโรค พบว่า

ขั้นตอนที่ *1* เก็บรวบรวมผลิตผลจากแปลงปลูก ทำความสะอาดด้วยน้ำและสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 50 พีพีเอ็ม เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวส้ม และผึ่งให้แห้ง นาน 1 คืน พบการเกิดเชื้อราสีขาวที่ขั้วผลที่บริเวณรอยตัด (ภาพที่ 10) เกิดการเน่าเสีย 18 ผล แต่ไม่พบผลเน่าเสียที่มีเชื้อราเกิดขึ้น เสียหายทางกายภาพจากบาดแผลและรอยช้ำ จำนวน 32 ผลจากการเก็บตัวอย่าง 84 ผล สาเหตุความเสียหายทางกายภาพเป็นผลมาจากความเสียหายจากแปลงปลูกและความชอกช้ำ การเกิดบาดแผล จากการกระแทกของผลผลิตที่มีปริมาณมาก การขนส่งและการลำเลียงผลผลิตเพื่อรอเข้าสายพานในขั้นตอนถัดไป

ขั้นตอนที่ 2 ทำความสะอาดขัดผิวด้วยลูกกลิ้งแปรงปัดที่มีความแข็งของขนแปรง 3 ระดับความหยาบและซับน้ำด้วยฟองน้ำ ฉีดพ่นด้วยน้ำยากันราชื่อทางการค้าคือ Toxin M ปริมาณ 20 กรัมต่อน้ำ 200 ลิตร และเป่าด้วยลมเย็นให้แห้ง พบการเกิดเชื้อราสีขาวที่ขั้วผลที่บริเวณรอยตัด (ภาพที่ 11) จำนวน 5 ผล พบการเน่าเสีย 5 ผล แต่ไม่พบผลเน่าเสียที่มีเชื้อราเกิดขึ้น เสียหายทางกายภาพจากบาดแผลและรอยช้ำ จำนวน 22 ผล จากการเก็บตัวอย่าง 84 ผล

ขั้นตอนที่ *3* การเคลือบผิวด้วยสารละลายแว๊กร่วมกับอิมาซาลิล ในอัตราส่วน 40 ลิตรต่อ 60 มิลลิลิตร และทำให้แห้งด้วยลมร้อน ที่ 35-40 องศาเซลเซียส จากการเก็บตัวอย่าง ไม่พบการเกิดเชื้อรา แต่มีความเสียหายจากการช้ำเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย จำนวน 1 ผล พบการเกิดเชื้อราสีขาวที่ขั้วผลที่บริเวณรอยตัด (ภาพที่ 12) เน่าเสีย 22 ผล แต่ไม่พบผลเน่าเสียที่มีเชื้อราเกิดขึ้น เสียหายทางกายภาพจากบาดแผลและรอยช้ำ จำนวน 36 ผลจากการเก็บตัวอย่าง 84 ผล

ขั้นตอนที่ 4 คัดคุณภาพและขนาดผล พบการเกิดเชื้อราสีขาวที่ขั้วผลที่บริเวณรอยตัด (ภาพที่ 13) เน่าเสีย 22 ผล แต่ไม่พบผลเน่าเสียที่มีเชื้อราเกิดขึ้น เนื่องจากเชื้อมีการแพร่กระจายอยู่ในอากาศ โดยเชื้อจะเข้าทางบาดแผล หรือรอยช้ำที่เกิดขึ้นบนผลส้มโดยไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งบาดแผลดังกล่าวเกิดขึ้นก่อนหน้าการสเปรย์แว๊ก หากทำการบ่มเชื้อในสภาพที่เหมาะสม เชื้อที่เข้าสู่ผลส้มทางบาดแผล จะสามารถแสดงอาการของโรคและพัฒนาความรุนแรงได้อย่างรวดเร็ว

ส่วนเสียหายทางกายภาพจากบาดแผลและรอยช้ำ จำนวน 54 ผลจากการเก็บตัวอย่าง 84 ผล เกิดจากการกระแทกของผลผลิตที่มีปริมาณมาก รวมทั้งการทำความสะอาดด้วยแปรงปัดขณะสเปรย์ด้วยน้ำยากันรา ทำให้เกิดการเสียดสีจนเกิดบาดแผลและการช้ำเกิดขึ้น

ขั้นตอนที่ 5 บรรจุกล่อง ความจุ 10 กิโลกรัม พบการเกิดเชื้อราสีขาวที่ขั้วผลที่บริเวณรอยตัด (ภาพที่ 14) เน่าเสีย 24 ผล แต่ไม่พบผลเน่าเสียที่มีเชื้อราเกิดขึ้น เสียหายทางกายภาพจากบาดแผลและรอยช้ำ จำนวน 46 ผลจากการเก็บตัวอย่าง 84 ผล

ขั้นตอนที่ 6 เก็บรักษาในห้องเย็น ที่ 5 องศาเซลเซียส เพื่อรอการขนส่งสู่ตลาดปลายทาง พบการเกิดเชื้อราสีขาวที่ขั้วผลที่บริเวณรอยตัด แต่ไม่พบผลเน่าเสียเกิดขึ้น เสียหายทางกายภาพจากบาดแผลและรอยช้ำ จำนวน 5 ผลจากการเก็บตัวอย่าง 84 ผล หากจำแนกความเสียหายทางกายภาพ พบว่า ส้มที่อยู่ชั้นที่ 3 คือชั้นล่างสุดของกล่อง เสียหายมากที่สุด คือ 3 ผลจาก 28 ผล เกิดจากการน้ำหนักการกดทับของส้มจากกล่องส้มที่วางซ้อนด้านบนและส้มภายในกล่องที่อยู่ชั้น 1 และ 2 รองลงมา คือ ส้มที่อยู่ชั้นบนสุด เพียง 1 ผลจาก 28 ผล เกิดจากน้ำหนักการกดทับของกล่องส้มที่วางซ้อนด้านบน และ ส้มที่อยู่ชั้นกลาง เสียหายเพียง 1 ผลจาก 28 ผล เนื่องจากส้มที่อยู่ชั้น 1 และ 3 รองรับแรงกดทับหรือแรงกระแทกจากกล่องส้มที่วางซ้อนด้านบน และส้มภายในกล่องเดียวกัน

เมื่อยืดระยะเวลาการเก็บรักษาส้มสายน้ำผึ้ง ที่ 5 องศาเซลเซียส นาน 4 เดือน จากการเก็บตัวอย่าง พบ ความเสียหายจากเน่าเสียและเกิดเชื้อรา จำนวน 7 ผล โดยสามารถจำแนกอาการบนผลส้มและเชื้อสาเหตุที่พบได้ ดังนี้

- เชื้อ *Fusarium* sp. พบมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ในระหว่างการเก็บรักษาส้มสายน้ำผึ้ง อาการบนผลส้มที่พบ เกิดเส้นใยสีขาว ฟู แผ่กระจาย เกิดขึ้นที่บริเวณขั้วผล เปลือกผลเน่าช้ำ (ภาพที่ 15, 17, 19, 21, 23 และ 24) แผลบริเวณขั้วยุบตัวลง และลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบเส้นใยสีขาวออกชมพู คล้ายกำมะหยี (ภาพที่ 16, 18, 20, 22 และ 26)

- เชื้อ *Aspergillus* sp อาการบนผลส้มที่พบ เกิดเส้นใยสีเขียวหม่น ขอบรอบสีขาว แผลมีลักษณะเน่าเละ และลักษณะโคโลนี พบเส้นใยสีเขียวเทา ฟุ้งกระจาย (ภาพที่ 23)

- เชื้อ *Cladosporium* sp. อาการบนผลส้มที่พบ เส้นใยสีเขียวขี้ม้า ปุย และลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบเส้นใยสีเขียวเข้มเกือบดำ ฟุ้งกระจาย (ภาพที่ 24 และ 25)

- เชื้อ *Penicillium* spp. อาการบนผลส้มที่พบ ผลส้มมีลักษณะช้ำยุบตัวลงและขยายทั่วทั้งผล คล้ายลักษณะของการเน่าเสีย หลังจากนั้นเกิดเส้นใยเขียวเทาเข้ม ขึ้นเป็นกระจุก กระจายทั่วทั้งผิวผล และลักษณะโคโลนี มีลักษณะฟุ้งกระจายทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ สีเขียวเทาเข้ม ลักษณะ เป็นก้อนกระจุก (ภาพที่ 27 และ 28)

ประสบปัญหาไม่สามารถแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปปลูกเชื้อบนผลปกติ ตรวจดูอาการโรคที่เกิดขึ้น และแยกเชื้อซ้ำอีกครั้งเพื่อพิสูจน์ว่าเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน เพื่อสังเกตอาการโรค และความเสียหายที่เกิดขึ้น รวมถึงการสร้างสารพิษจากเชื้อราได้

- ไม่ทราบเชื้อสาเหตุที่แน่ชัด unknow อาการบนผลส้มที่พบ เส้นใยสีขาวฟู กระจายทั่วบริเวณขั้ว ไม่มีแผล บริเวณกลางผล ผลส้มมีลักษณะนิ่ม และลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบเส้นใยสีชมพู ออกเหลือง (ภาพที่ 29 และ 30)

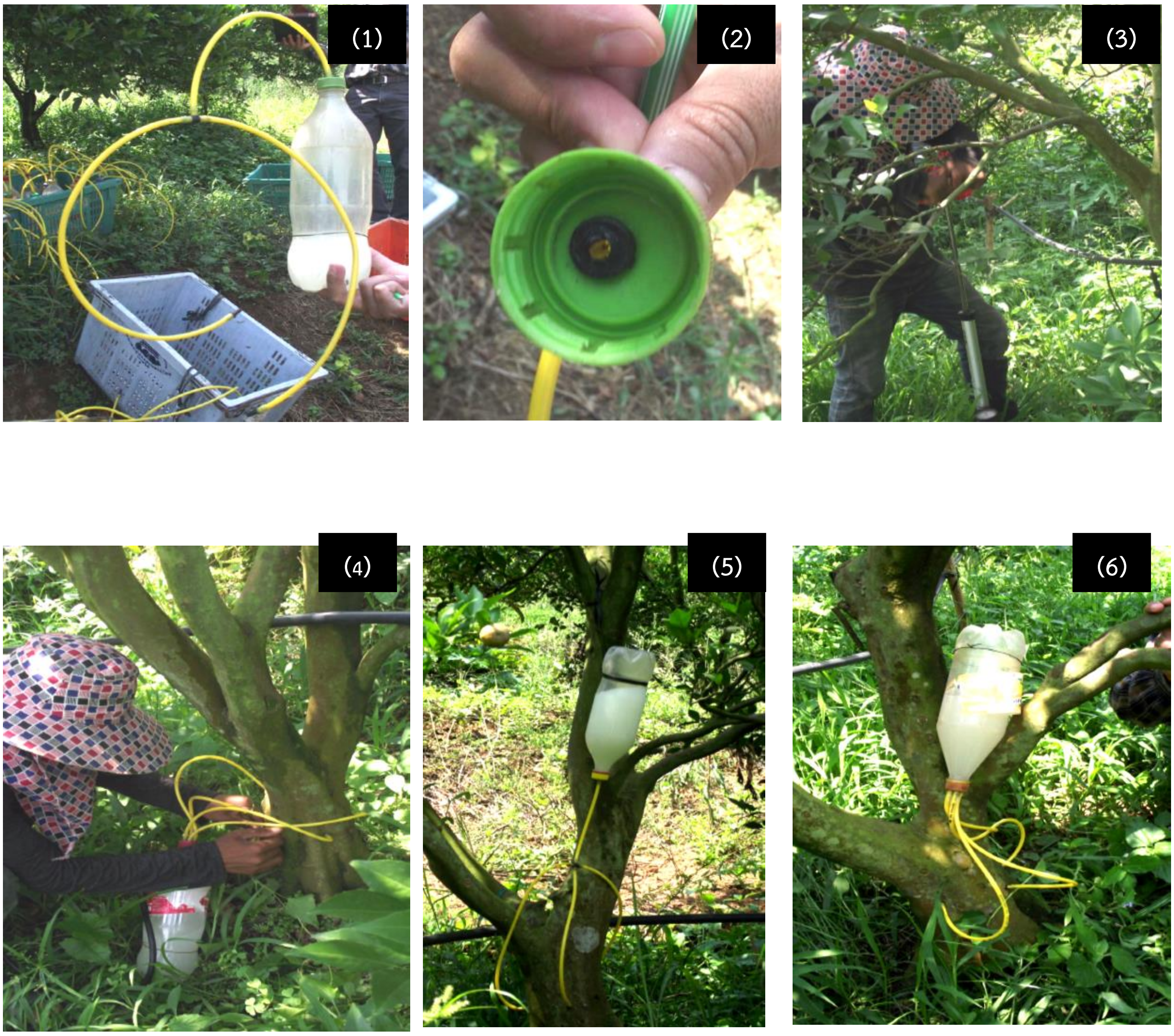
นอกจากนี้พบปัญหาการระบายอากาศและอุณหภูมิ ความชื้น ภายในกล่องบรรจุภัณฑ์ ระหว่างเก็บรักษาเพื่อรอการขนส่งไปยังตลาดปลายทาง ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคเน่าหลังการเก็บเกี่ยว สอดคล้องกับ *Penicillium* spp. เป็นเชื้อสาเหตุโรคที่แพร่ระบาดในอากาศ สามารถเข้าทำลายผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวหากเกิดบาดแผล แต่ไม่แสดงอาการของโรค เชื้อสามารถเข้าทำลายได้ดีที่สุดที่ 24 องศาเซลเซียสโดยเข้าทำลายเมื่อผิวส้มเกิดบาดที่ลึกถึงชั้น albido หรือบริเวณส่วนสีขาวลักษณะคลายฟองน้ำของชั้นเปลือกหุ้ม และจะแสดงอาการในระหว่างการเก็บรักษาเพื่อรอการจัดจำหน่ายเชื้อเจริญเติบโตได้ดี ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 89-91% และ 20-25 องศาเซลเซียส การรุกลามของเชื้อสามารถเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายใน 3 วัน และพัฒนาอาการต่อไปจนผลส้มเน่าเละในที่สุด ความรุนแรงของโรคจะเกิดขึ้นอย่างมากเมื่อเก็บรักษานานเกินไปในสภาพที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค และหากไม่มีการทำลายผลที่เป็นโรคออกไปก็จะรุกลามไปยังผลส้มที่อยู่ข้างเคียง

ตัวอย่างน้ำและสารเคลือบในการล้างและเคลือบผลส้ม ปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง จำนวน 5 ตัวอย่าง ไม่พบลักษณะของเชื้อราที่เจริญขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตัวอย่างเชื้อในอากาศในกระบวนการผลิตส้มสายน้ำผึ้งในโรงคัดบรรจุส้ม ด้วยการเปิดเพลทที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในแต่ละขั้นตอน ประกอบด้วย 6 ขั้นตอน ๆละ 3 เพลท พบว่า มีความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรค เช่น *Aspergillus niger, A. flavas, Trichodrma* spp., *Fusarium* spp., *Collectotrichum* sp., *Cladosporium* sp. และ unknown (ตารางที่ 1) พบเช่นเดียวกับเชื้อที่ตรวจพบในตัวอย่างดินและอากาศในสภาพแปลงปลูก

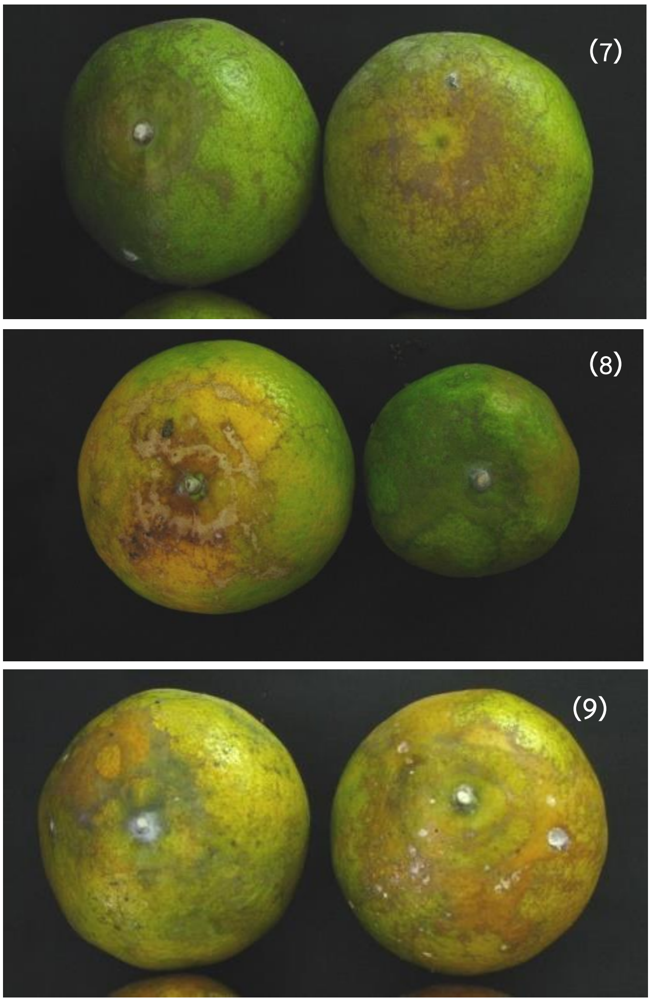
ตารางที่ 1 เชื้อราสาเหตุโรคจากอากาศในระหว่างการปฏิบัติงานหลังการเก็บเกี่ยวในโรงคัดบรรจุส้มสายน้ำผึ้ง

ขั้นตอนกระบวนการผลิต	ตำแหน่งสุ่ม ตย. เชื้อในอากาศ	ผลการตรวจ
จุดรวบรวมผลผลิต (T1&2 32c, %RH 57.6), (t3 32.6,58.6) เข้าอุโมงค์ ฉีดพ่นน้ำ และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 50ppm เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวส้ม ย้ายไป ผึ่งให้แห้ง นาน 1 คืน	จุดที่ 1 ต้นอุโมงค์ พ่นน้ำ	*Aspergillus niger, A. flavas, Trichodrma* spp., *Fusarium* spp.
	จุดที่ 2 ปลายอุโมงค์ พ่นโซ	*Aspergillus niger, A. flavas, Fusarium* spp.
	จุดที่ 3 ผึ่งตาก 1 คืน	*Trichodrma* spp.
การทำความสะอาด (T 32.59 c, %RH 66.6) ด้วยลูกกลิ้งแปรงปัด 3 ระดับความหยาบ+ซับด้วยฟองน้ำ สเปรย์น้ำยากันราToxin M 20 g/น้ำ 200 Lite เป่าด้วยลมเย็นให้แห้ง	จุดที่ 1 ขัดหยาบ	*Fusarium* spp., *Collectotrichum* sp.
	จุดที่ 2 พ่นน้ำยากันรา	-
	จุดที่ 3 ทางเข้าอุโมงค์ลม	*Trichodrma* spp.
การเคลือบแว๊ก (T 33.1 c, %RH 66.1) ด้วยการสเปรย์สารละลายแว๊ก 40 Lite ผสมอิมาซาลิล 60 ml และเปล่าด้วยลมร้อน ที่ 35-40°C ให้แห้ง	จุดที่ 1 ปลายอุโมงค์ลม	*Fusarium* spp., *Cladosporium* sp.
	จุดที่ 2 ใต้ท่อแว๊ก	*Trichodrma* spp.
	จุดที่ 3 ทางเข้าอุโมงค์ลมร้อน	*Fusarium* spp.,
การคัดคุณภาพและขนาดผล (T 33.1 c, %RH 66.1)	จุดที่ 1 ปลายอุโมงค์ลมร้อน	ราส้ม
	จุดที่ 2 รางด้านบนตรงกลาง	ราส้ม
	จุดที่ 3 รางด้านล่าง	ราส้ม
	จุดที่ 4 ก่อนเข้าเครื่องคัดไซด์	*Trichodrma* spp.
บรรจุกล่อง	จุดที่ 1 ลูกระนาดกลาง	*Aspergillus niger, Fusarium* spp.
	จุดที่ 2 รางบรรจุ ซ้าย face	*Trichodrma* spp., *Aspergillus niger*
	จุดที่ 3 รางบรรจุ ขวา face	*Trichodrma* spp., *Aspergillus niger, A. flavas*
ห้องเย็น (T 16.6 c, %RH 13.3)..**15 min later** (T 4.7 c, % RH 99.9).	จุดที่ 1 มุมห้องด้านหน้า	unknown
	จุดที่ 2 กลางห้อง	unknown
	จุดที่ 3 มุมห้องด้านใน	unknown



ภาพที่ 1 – 6 วิธีการให้ยาปฏิชีวนะกับต้นส้มเพื่อรักษาอาการจากโรคกรีนนิ่ง

(1) ขวดพลาสติกที่ใช้ฉีดสาร (2) การต่อสายออกจากฝาขวด
(3) สูบอัดลมเข้าไปในขวดพลาสติก (4) เสียบสายสุดท้ายเข้าในต้นส้ม
(5) – (6) มัดขวดติดกับต้นส้มและห้อยขวดคว่ำหัวลงในแนวดิ่ง

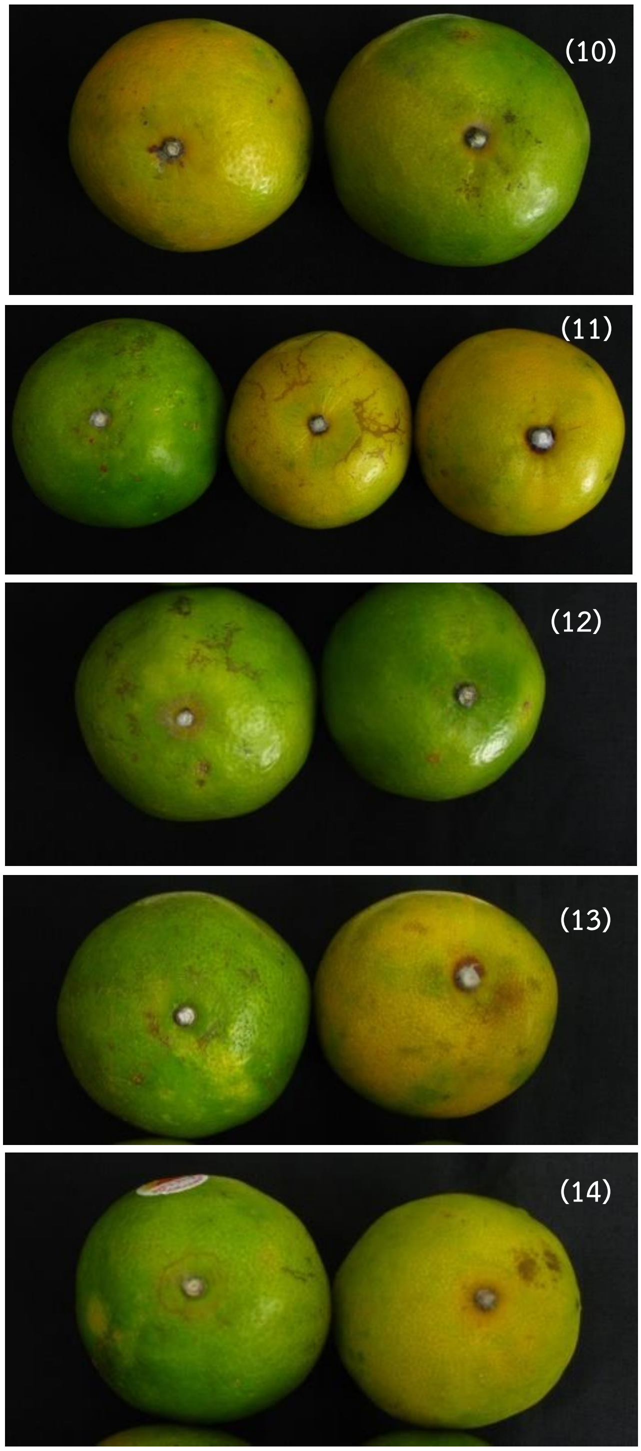


ภาพที่ 7-9 ลักษณะเส้นใยที่รอยตัดขั้วบนผลส้มสายน้ำผึ้ง ส้มออร่า และส้มสีทอง ที่เก็บจากแปลงปลูก

ภาพที่ 7 ผลส้มสายน้ำผึ้ง

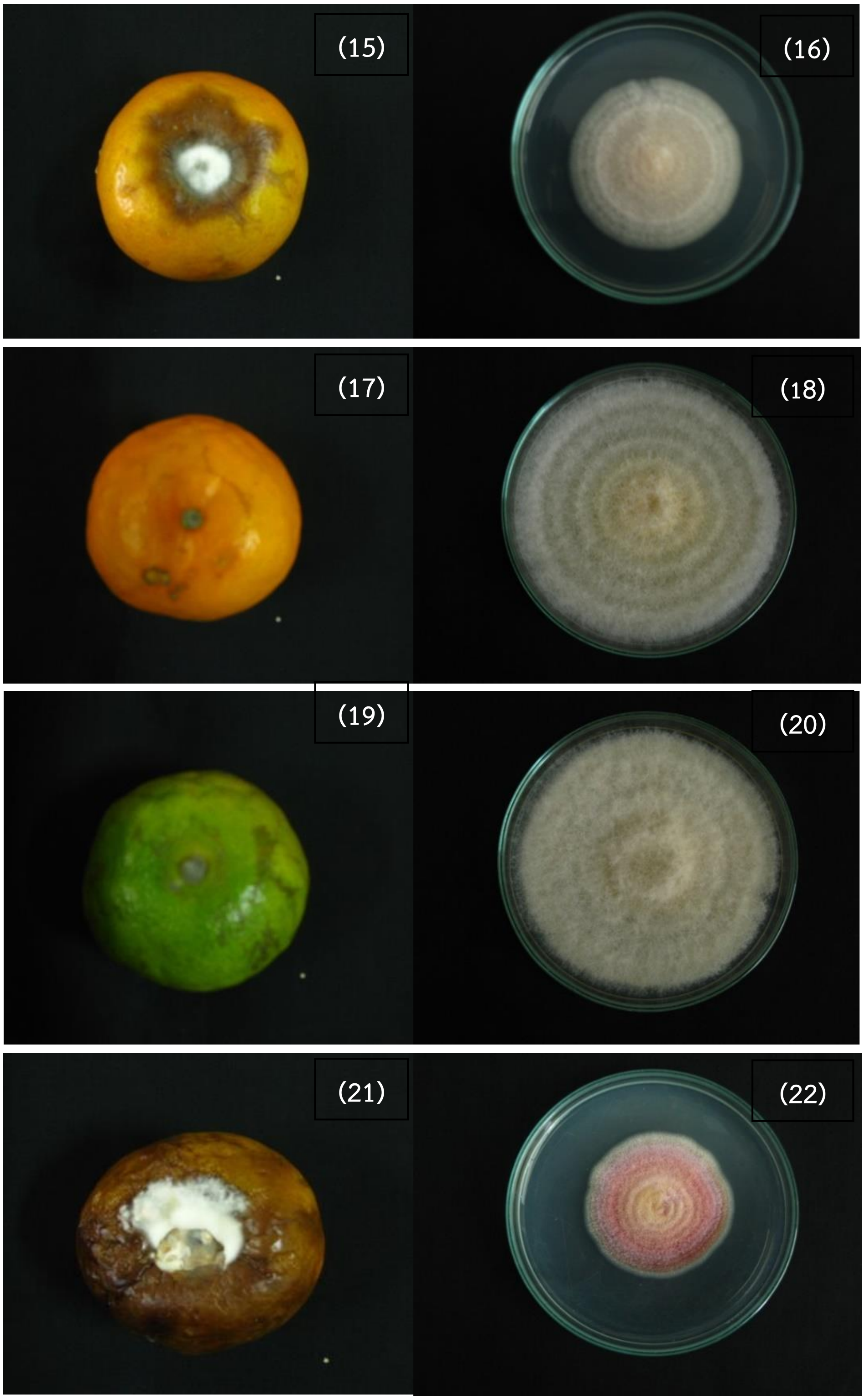
ภาพที่ 8 ผลส้มออร่า

ภาพที่ 9 ผลส้มผิวทอง

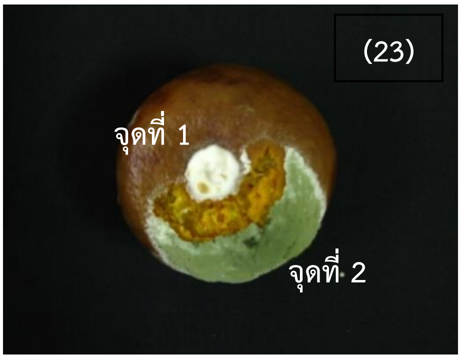


ภาพที่ 10-14 ลักษณะเส้นใยที่รอยตัดขั้วบนผลส้มสายน้ำผึ้ง ที่ผ่านการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวในโรงคัดบรรจุ

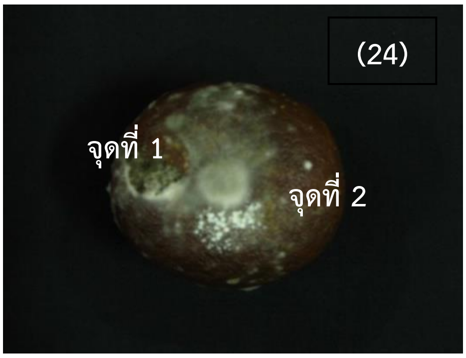
ภาพที่ 10 ผลส้มที่ผ่านการทำความสะอาดเบื้องต้นและผึ่งให้แห้ง 1 คืนในขั้นตอนเก็บรวบรวม
ภาพที่ 11 ผลส้มที่ผ่านการทำความสะอาดขัดผิวและพ่นด้วยน้ำยากันรา
ภาพที่ 12 ผลส้มที่ผ่านการเคลือบผิวด้วยสารละลายแว๊กและอิมาซาลิลเพื่อป้องกันเชื้อรา
ภาพที่ 13 ผลส้มที่ผ่านการคัดคุณภาพและขนาดผล
ภาพที่ 14 ผลส้มที่บรรจุลงกล่อง ความจุ 10 กิโลกรัม

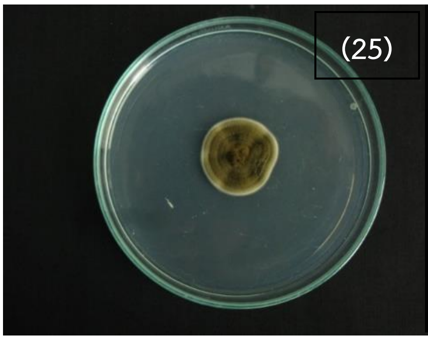

(15)
(16)
(17)
(18)
(19)
(20)
(21)
(22)

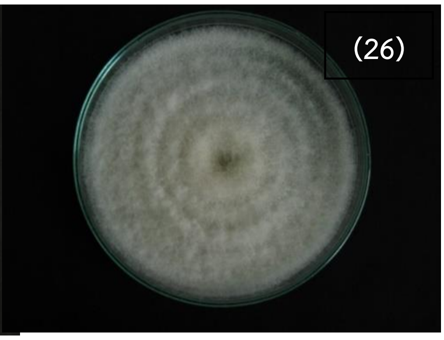
ภาพที่ 15-22 ลักษณะเส้นใยบนผลส้มสายน้ำผึ้งเก็บรักษาที่ 5องศาเซลเซียส นาน 4 เดือน (ภาพที่ 15, 17, 19 และ 21) และโคโลนีของเชื้อ *Fusarium* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ภาพที่ 16, 18, 20 และ 22)



ภาพที่ 23 ลักษณะเส้นใย *Fusarium* sp.(จุดที่ 1) และ *Aspergillus* sp. (จุดที่ 2) บนผลส้มสายน้ำผึ้งเก็บรักษาที่ 5องศาเซลเซียส นาน 4 เดือน



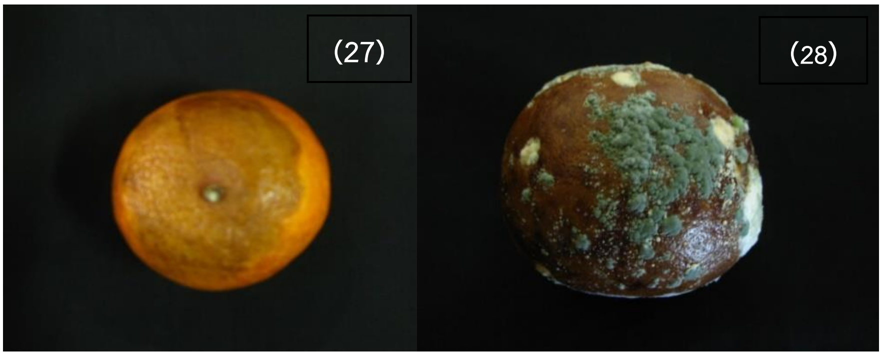




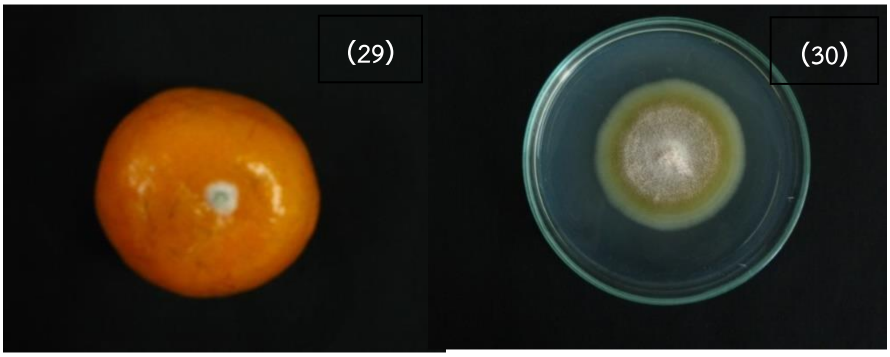
ภาพที่ 24 ลักษณะเส้นใย เชื้อ *Cladosporium* sp (จุดที่ 1) และ *Fusarium* sp. (จุดที่ 2) บนผลส้มสายน้ำผึ้งเก็บรักษาที่ 5องศาเซลเซียส นาน 4 เดือน

ภาพที่ 25 โคโลนีของ *Cladosporium* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

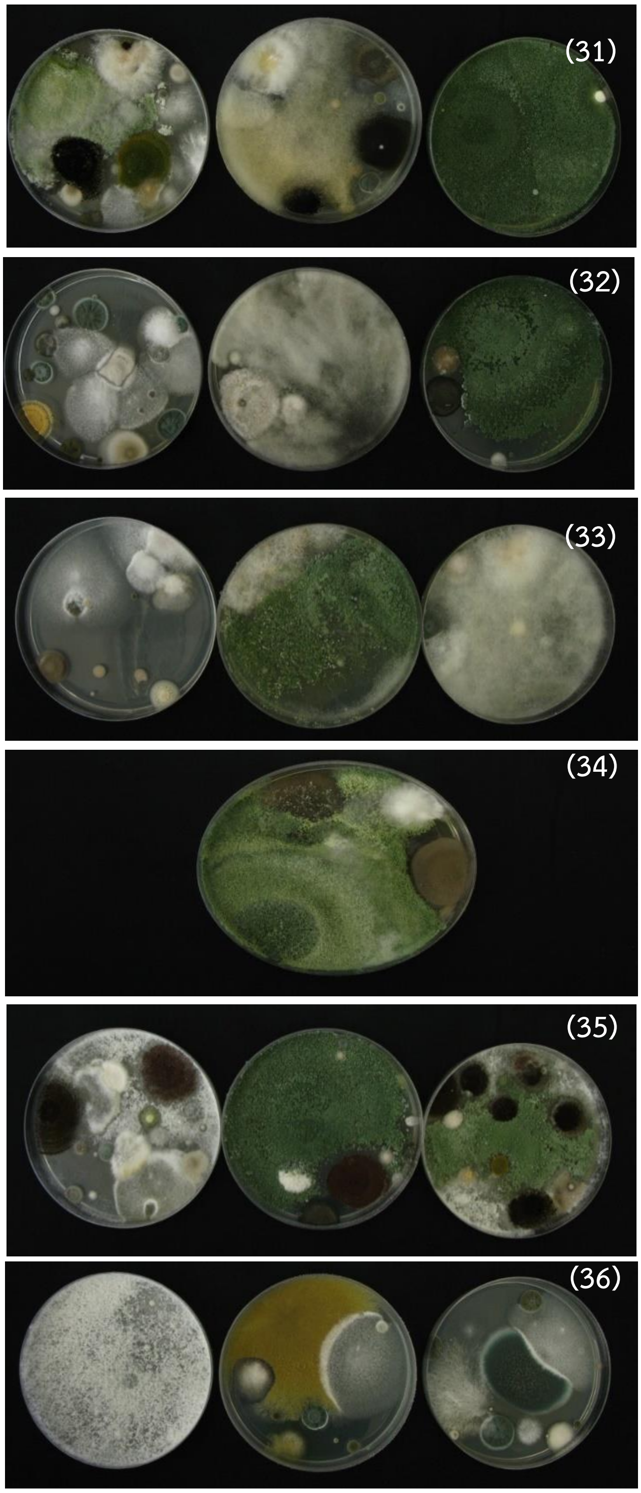
ภาพที่ 26 โคโลนีของ *Fusarium* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA



ภาพที่ 27 และ 28 ลักษณะเส้นใยของเชื้อ *Penicillium* spp.บนผลส้มสายน้ำผึ้งเก็บรักษาที่ 5องศาเซลเซียส นาน 4 เดือน



ภาพที่ 29 และ 30 ลักษณะเส้นใยบนผลส้มสายน้ำผึ้งเก็บรักษาที่ 5องศาเซลเซียส นาน 4 เดือน และโคโลนีของเชื้อสาเหตุที่ไม่แน่ชัดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 31-36 ลักษณะเส้นใยเชื้อราจากอากาศภายในโรงคัดบรรจุหลังผ่านการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยว

ภาพที่ 31 ทำความสะอาดเบื้องต้นและผึ่งให้แห้ง 1 คืนในขั้นตอนเก็บรวบรวม

ภาพที่ 32 ทำความสะอาดขัดผิวและพ่นด้วยน้ำยากันรา

ภาพที่ 33 การเคลือบผิวด้วยสารละลายแว็กและอิมาซาลิลเพื่อป้องกันเชื้อรา

ภาพที่ 34 การคัดคุณภาพและขนาดผล

ภาพที่ 35 การบรรจุลงกล่อง ความจุ 10 กิโลกรัม

ภาพที่ 36 การเก็บรักษาในห้องเย็นที่ 5 องศาเซลเซียส

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อรา *Curvalaria* sp. สาเหตุโรคดอกจุดสนิมกล้วยไม้สกุลหวายหลังการเก็บเกี่ยว

ระยะเวลาเริ่มต้น – สิ้นสุด ปี 54-56

1. ศึกษาการระบาดของเชื้อสาเหตุของโรคดอกจุดสนิม และปัจจัยที่ส่งเสริมการแพร่ระบาดในแหล่งปลูกและแหล่งจำหน่ายกล้วยไม้สกุลหวาย

1.1 แหล่งปลูก

เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดมาแยกเชื้อสาเหตุ *C. eragrostidis* และเชื้อราปฏิปักษ์ด้วยเทคนิค tissue transplanting บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) โดยพบดังนี้ (ภาพผนวกที่ 1)

จังหวัดสมุทรสาคร 5 แปลง

- ดอกกล้วยไม้ที่แสดงอาการโรค พบเชื้อรา *C. eragrostidis* 3 แปลง กล้วยไม้พันธุ์ขาว5เอ็น 2 แปลง และพันธุ์ขาวสนาน 1 แปลง คิดเป็นร้อยละ 60

- วัสดุปลูก ไม่พบเชื้อราสาเหตุแต่พบเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. (T01) 1 แปลง จากกาบมะพร้าว

- วัชพืช ไม่พบเชื้อราสาเหตุและเชื้อราปฏิปักษ์ทุกแปลง จากหญ้ารังนก นกเขา กระเม็ง ผักปลัง ผักกระสัง และเฟิร์น

จังหวัดนครปฐม 6 แปลง

- ดอกกล้วยไม้ที่แสดงอาการโรค พบเชื้อรา *C. eragrostidis* 4 แปลง กล้วยไม้พันธุ์ทิพย์ชมพู 1 แปลง พันธุ์บอมโจแดง 1 แปลงและพันธุ์ขาวสนาน 2 แปลงคิดเป็นร้อยละ 66.67

- วัสดุปลูก ไม่พบเชื้อราสาเหตุและเชื้อราปฏิปักษ์ทุกแปลง จากกาบมะพร้าว

- วัชพืช ไม่พบเชื้อราสาเหตุและเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 3 แปลง จากหญ้าตีนกา ตีนตุ๊กแก ตำลึง กระสังและบัวบก

จังหวัดนนทบุรี 5 แปลง

- ดอกกล้วยไม้ที่แสดงอาการโรค พบเชื้อรา *C. eragrostidis* 3 แปลง กล้วยไม้พันธุ์เฉลิมกรุง 1 แปลง และพันธุ์บอมโจแดง 2 แปลงคิดเป็นร้อยละ 60

- วัสดุปลูก ไม่พบเชื้อราสาเหตุและเชื้อราปฏิปักษ์ จากกาบมะพร้าว

- วัชพืช ไม่พบเชื้อราสาเหตุและเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 5 แปลง จากหญ้าตีนกา ตีนนก ตีนตุ๊กแก ผักชีฝรั่ง ปอเทือง น้ำนมราชสีห์ และตำลึง

จังหวัดกรุงเทพมหานคร 5 แปลง

- ดอกกล้วยไม้ที่แสดงอาการโรค พบเชื้อรา *C. eragrostidis* 1 แปลง กล้วยไม้พันธุ์ขาว5เอ็น 1 แปลง คิดเป็นร้อยละ 20

- วัสดุปลูก ไม่พบเชื้อราสาเหตุแต่พบเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. (T02 และ T03) 2 แปลง จากกาบมะพร้าว

- วัชพืช พบเชื้อรา *C. eragrostidis* 1 แปลง จากหญ้าตีนนก และไม่พบเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 3 แปลง จากหญ้าตีนนก และมะระขี้นก

นอกจากนี้น้ำและดินจากแปลงปลูกทุกตัวอย่าง ไม่พบทั้งเชื้อราสาเหตุและเชื้อราปฏิปักษ์ แต่พบเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด ค่าความเป็ดกรดด่าง (pH) ของน้ำที่ใช้รดต้นกล้วยไม้ในแปลงปลูกทุกแปลงอยู่ช่วงระหว่าง 6.83-8.35 โดยตัวอย่างวัชพืชทั้งหมดจำนวน 15 ชนิด จำแนกเป็น 2 กลุ่ม คือ ใบแคบ 5 ชนิด ได้แก่ หญ้ารังนก หญ้าตีนกา หญ้านกเขา หญ้าตีนนก หญ้าตีนตุ๊กแก และใบกว้าง 10 ชนิด ได้แก่ กระเม็ง ตำลึง ผักปลังเฟิร์น กระสัง บัวบก ผักชีฝรั่ง ปอเทือง น้ำนมราชสีห์ และมะระขี้นก พบเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด ใบไหม้ 8 ไอโซเลท ได้แก่เชื้อรา *Nigrospora* sp., *Fusarium* sp., *Scytalidium* sp., *Fusarium solani*, *Bipolaris* sp., *Nodulissporium* sp., *Drechshera holmii* และ *Colletotrichum* sp. เชื้อราอื่น ๆ ไม่สามารถจำแนกได้ 58 ไอโซเลท และพบเชื้อรา *C. eragrostidis* 1 แปลงในจังหวัดกรุงเทพมหานคร จากหญ้าตีนนก (ตารางที่ 1 และ 2)

- ข้อมูลสภาพภูมิอากาศ(มิ.ย.58) - ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ (RH) ในแปลงอยู่ช่วงระหว่าง 25.70-65.9

- อุณหภูมิ (T) ในแปลงอยู่ช่วงระหว่าง 28.80-44.60 °C

1.2 แหล่งจำหน่าย

จากการสุ่มดอกกล้วยไม้จาก 11 ตัวอย่างที่แสดงอาการโรคดอกจุดสนิมนำมาแยกด้วยเทคนิค tissue transplanting บนอาหาร PDA ไม่พบเชื้อราสาเหตุโรคดอกจุดสนิม *C. eragrostidis* แต่พบเชื้อราสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ ได้แก่ *Alternaria* sp., *Collectotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp. และเชื้อราอื่น ๆ จำนวน 15 ไอโซเลท ซึ่งเชื้อราอื่น ๆ นี้ไม่มีประสิทธิภาพการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคดอกจุดสนิมได้

ตารางที่ 1 ข้อมูลการตรวจเชื้อราสาเหตุโรคดอกจุดสนิมจากดอกและใบกล้วยไม้ วัสดุปลูก น้ำ ดิน ค่า pH ของน้ำ ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ อุณหภูมิ และวัชพืช จากแปลงกล้วยไม้สกุลหวายตัดดอก เพื่อส่งออกในจังหวัดกรุงเทพมหานคร นครปฐม นนทบุรี และสมุทรสาคร

ลำดับ	ชื่อ-สกุล	พันธุ์	พื้นที่(ไร่)	อายุต้น(ปี)	ดอกและใบโรคจุดสนิม	วัสดุปลูก	วัชพืช	น้ำ	ดิน (10^4)	pH น้ำ	RH	T(^{0}C)
จังหวัดสมุทรสาคร												
1	ธวัชชัย ใจบางยาง	ขาวสนาน	15	1.5	ไม่พบ*	กาบมะพร้าว$^{2/}$	หญ้ารังนก	ไม่พบ	ไม่พบ	7.85	50.00	39.10
2	ทศพล เจริญสุกใส	ขาว 5 เอ็น	6	3	*C. eragrostidis*	กาบมะพร้าว	หญ้าตีนตุ๊กแก กระเม็ง	ไม่พบ	ไม่พบ	7.36	42.00	39.70
3	ชัชชัย แสงสว่าง	ขาวสนาน	7	3	ไม่พบ	กาบมะพร้าว	ตำลึง ผักปลัง หญ้านกเขา	ไม่พบ	ไม่พบ	7.6	56.70	32.00
4	เสรี จันทร์ผ่องใส	ขาวสนาน	10	2	*C. eragrostidis*	โฟม	เฟิร์น	ไม่พบ	ไม่พบ	7.85	53.00	36.30
5	พินิจ ฮีสวัสดิ์	ขาว 5 เอ็น	10	4	*C. eragrostidis*	กาบมะพร้าว	หญ้านกเขา ผักกระสัง	ไม่พบ	ไม่พบ	7.8	50.00	37.00
จังหวัดนครปฐม												
1	พุฒิพงศ์ จงกิตติพิภัทร์	บอมโจแดง ทิพย์ชมพู	10 10	1.6 2	ไม่พบ *C. eragrostidis*	กาบมะพร้าวในอิฐบล๊อค	หญ้าตีนตุ๊กแก หญ้าตีนนก ตำลึง	ไม่พบ	ไม่พบ	7.34	48.90	35.50
2	พงศ์ปรีชา จงกิตติพิภัทร์	บอมโจแดง ขาวสนาน	20 2	2 2	*C. eragrostidis*	กาบมะพร้าวในอิฐบล๊อค	กระสัง ตำลึง หญ้าตีนนก	ไม่พบ	ไม่พบ	7.3	40.90	38.60
3	ธนวัตร อมรจิระศักดิ์	ขาวสนาน	5	4	*C. eragrostidis*	ซาแลน	ไม่พบวัชพืช	ไม่พบ	ไม่พบ	6.83	25.70	44.60
4	กิริยากร โฆสิตานนท์	ขาวสนาน บอมโจแดง	15 4	5 5	*C. eragrostidis*	กาบมะพร้าวชิ้นเล็กบนซาแลน	ไม่พบวัชพืช	ไม่พบ	ไม่พบ	7.5	71.00	39.30
5	สมศักดิ์ โตเร็ว	บอมโจแดง	40	1.7	ไม่พบ	กะบะกาบมะพร้าว	หญ้าตีนกา บัวบก	ไม่พบ	ไม่พบ	7.36	47.10	37.00
6	อำนาจ เอื้อเฟื้อ	ขาวสนาน	3	0.5	ไม่พบ	กะบะกาบมะพร้าว	ไม่พบวัชพืช	ไม่พบ	ไม่พบ	7.2	35.80	38.10
จังหวัดนนทบุรี												
1	นิพล ชัยวงศ์รุ่งเรือง	เฉลิมกรุง	5	4	*C. eragrostidis*	กาบมะพร้าว	หญ้าตีนกา	ไม่พบ	ไม่พบ	8.04	65.90	28.80
2	บุญมาก สิทธิสา	ขาว 5 เอ็น	2	0.6	ไม่พบ	กาบมะพร้าว	หญ้าตีนนก	ไม่พบ	ไม่พบ	7.09	60.70	29.60
3	เล็ก จันทร์สิริพรชัย	บอมโจแดง	4	3	*C. eragrostidis*	กาบมะพร้าว	หญ้าตีนตุ๊กแก ตำลึง	ไม่พบ	ไม่พบ	6.94	45.00	36.50
4	นัฐวุฒิ เนตรประไพ	บอมโจแดง	5	3	*C. eragrostidis*	กาบมะพร้าว	ผักชีฝรั่ง หญ้าตีนกา	ไม่พบ	ไม่พบ	6.94	48.10	36.40
5	นัฐวุฒิ เนตรประไพ	ขาวสนาน	7	0.7	ไม่พบ	กาบมะพร้าว	ปอเทือง น้ำนมราชสีห์	ไม่พบ	ไม่พบ	7.55	48.60	39.10
จังหวัดกรุงเทพมหานคร												
1	ไฉน ชูสังฆ์	บอมโจแดง	5	3	ไม่พบ	กาบมะพร้าว	หญ้าตีนนก	ไม่พบ	ไม่พบ	7.32	42.50	39.00
2	สุชิน ชูสังข์	บอมโจแดง	7	3	ไม่พบ	กาบมะพร้าว	หญ้าตีนนก	ไม่พบ	ไม่พบ	7.36	38.30	40.30
3	สกลวัฒน์ โตโสภณ	ขาว 5 เอ็น	18	4	*C. eragrostidis*	กาบมะพร้าว	ไม่พบวัชพืช	ไม่พบ	ไม่พบ	7.03	42.00	41.40
4	สาย อมแย้ม	เอียสกุล	6	3	ไม่พบ	กาบมะพร้าว	ไม่พบวัชพืช	ไม่พบ	ไม่พบ	7.12	48.60	35.60
5	ยงยุทธ์ ชูสังข์	บอมโจแดง	7	3	ไม่พบ	กาบมะพร้าว	มะระขี้นก	ไม่พบ	ไม่พบ	8.55	47.50	35.70

หมายเหตุ

* ไม่พบ หมายถึง ไม่พบเชื้อราสาเหตุโรคดอกจุดสนิม *C. eragrostidis*

[1/] น้ำ หมายถึงน้ำที่ใช้รดต้นกล้วยไม้ในแปลงปลูก

[2/] กาบมะพร้าวเรือใบ หมายถึงกาบมะพร้าวเรือใบ

ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่าง เชื้อราสาเหตุและเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากดอกกล้วยไม้ วัชพืช และวัสดุปลูกจากแหล่งปลูกและแหล่งจำหน่ายกล้วยไม้ (เดือนมิ.ย.-ก.ค.2558)

แหล่งปลูก/แหล่งขาย	**จำนวนตัวอย่าง (ตัวอย่าง)**			**เชื้อราสาเหตุ**	**เชื้อราปฏิปักษ์**
	ดอกกล้วยไม้	**วัชพืช**	**วัสดุปลูก**	*C. eragrostidis*	*Trichoderma* spp.
นครปฐม	6	20	8	4	0
กทม.	2	12	7	1	2
นนทบุรี	7	14	5	3	0
สมุทรสาคร	14	20	9	3	1
ปากคลองตลาด	34	-	-	0	0
รวม	63	66	29	11	3

2. ศึกษาการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคดอกจุดสนิมกล้วยไม้สกุลหวายโดยชีววิธีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

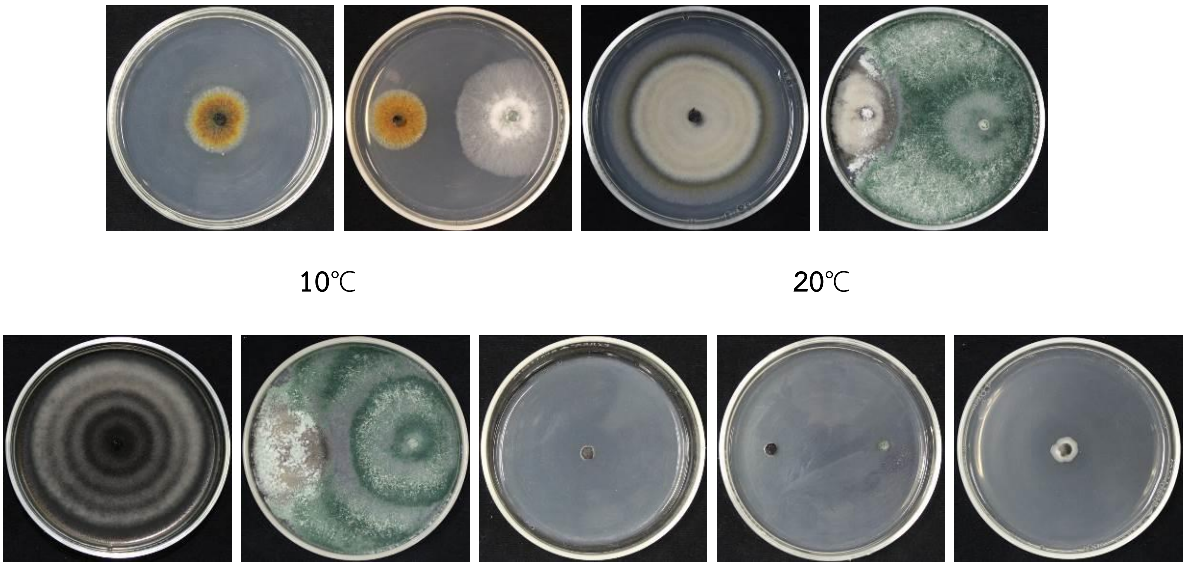
2.1. คัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ จำนวน 73 ไอโซเลท ที่แยกเชื้อได้จากดอกกล้วยไม้ วัชพืชและวัสดุปลูกจากแปลงปลูกกล้วยไม้ พบเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพได้ 3 ไอโซเลท คือ T01 T02 T03

2.2 ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราปฏิปักษ์ต่อการยังยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. eragrostidis* พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท T03 และ T02 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเฉลี่ยร้อยละ 40.83 และ 34.40 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 ℃ สามารถเจริญเติบโตคลุมทับเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ภายใน 5 วันหลังจากวางเชื้อ ซึ่งอารีรัตน์ เทียนขาว (2550) พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* สาเหตุโรคดอกจุดสนิม (Flower rusty spot) ดอกกล้วยไม้สกุลหวายในระดับห้องทดลองและแปลงทดลองได้ผลดีเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี เมื่อเทียบกับสารเคมี iprodione 50%WP มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้ 100 เปอร์เซ็นต์(ภาพที่ 1 และตารางที่ 3) สอดคล้องกับสุณีรัตน์ และคณะ (2554) พบว่าการใช้สารเคมี iprodione 50%WP ตามอัตราที่แนะนำในฉลากสามารถยับยั้งเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* สาเหตุโรคใบไหม้ของปาล์มน้ำมันได้ดีที่สุดในห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพเชื้อรา *Trichoderma* spp. T02 ,T03 ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใย เชื้อรา *C. eragrostidis* บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 10 20 30 และ 40℃ เป็นเวลา 3 และ 5 วัน

treatment	% inhibition					
	3 days			5 days		
temperature(˚C)	10	20	30	10	20	30
T02	-3.70	16.39	18.42	22.66	31.57	34.40
T03	7.20	15.67	34.01	26.36	36.43	40.83
C. eragrostidis	-	0	0	0	0	0
iprodione 50%WP	100	100	100	100	100	100

หมายเหตุ: ที่อุณหภูมิ 40℃ เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. และเชื้อราสาเหตุ *C. eragrostidis* ไม่เจริญเติบโต



10℃ 20℃

30℃ 40℃ iprodione 50%WP

ภาพที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุ *C. eragrostidis* ด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp.(T03) และสารเคมี iprodione 50%WP ที่อุณหภูมิ 10 20 30 และ 40℃ เป็นเวลา 5 วัน

3. ศึกษาควบคุมโรคดอกจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้สกุลหวายโดยชีววิธี

พบว่า ที่อุณหภูมิ 5 ℃ สารเคมีมีประสิทธิภาพดีที่สุดเกิดโรค 0.20% รองลงมา ที่T03 และ T02 เกิดโรค 0.40% และ 0.45% ตามลำดับเมื่อเทียบกับชุดควบคุมเกิดโรค 0.75%

ที่อุณหภูมิ 10 ℃ T03 มีประสิทธิภาพดีที่สุดเกิดโรค 0.40% รองลงมา ที่T03 T02 และสารเคมีเกิดโรค 0.60% เท่ากันเมื่อเทียบกับชุดควบคุมเกิดโรค 0.80%

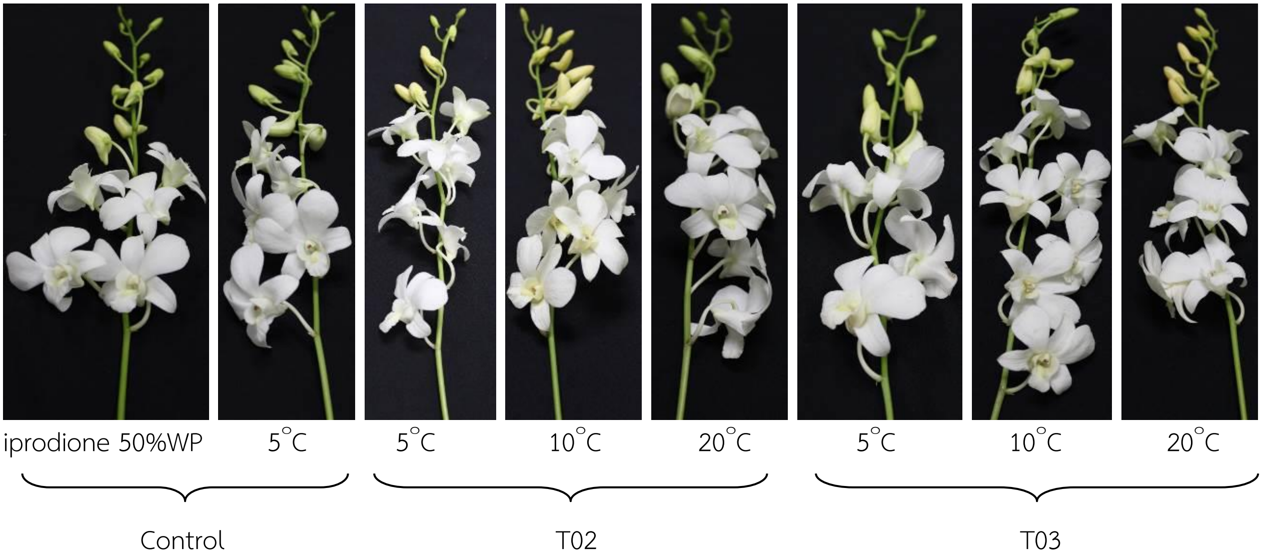
ที่อุณหภูมิ 20 ℃ T03 เกิดโรคน้อยที่สุด 0.35% รองลงมา ที่ T02 และสารเคมี เกิดโรค 0.50% และ 0.55% ตามลำดับเมื่อเทียบกับชุดควบคุมเกิดโรค 0.85% (ภาพที่2 และตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท T02 และ T03 ในการควบคุมการเกิดโรคดอกจุดสนิมกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ขาวสนาน ที่อุณหภูมิ 5 10 และ 20℃ เป็นเวลา 10 วัน

treatment	Temperature (°C)		
	5	10	20
T02	0.45abc[1/]	0.60abc	0.50abc
T03	0.40ab	0.40ab	0.35b
iprodione 50%WP	0.20a	0.60abc	0.55abc
C. eragrostidis	0.75abcd	0.80abcd	0.85abcd

cv. (%) = 124.04

[1/] Means followed by same letters in columns are not significantly different by DMRT (P≤ 0.05)



ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุ *C. eragrostidis* ด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท T02 และT03 ที่อุณหภูมิ 5 10 และ20 ℃ เป็นเวลา 10 วัน

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาวิธีควบคุมความเสียหายที่เกิดจากเชื้อ *Penicillium* spp. หลังการเก็บเกี่ยวในพืชตระกูลส้ม

1.ความเสียหายในแปลงปลูกส่วนใหญ่เกิดจากการกระแทกของผล ภัยธรรมชาติในแปลง การปฏิบัติการเก็บเกี่ยวและการขนส่งผลผลิต ส่วนการควบคุมโรคในแปลง ได้แก่ โรคกรีนนิ่ง เกษตรกรผู้ปลูกบรรเทาอาการและรักษาต้นส้มด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะ ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาผลตกค้างของการใช้ยาปฏิชีวนะในผลส้มเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคต่อไป

2.ความเสียหายในกระบวนการผลิตในโรงคัดบรรจุส่วนใหญ่ เป็นความเสียหายทางกายภาพ ได้แก่ การช้ำ การเกิดบาดแผล เป็นผลมาจากความเสียหายจากแปลงปลูก ส่งผลให้เกิดการเข้าเกิดการเน่าเสีย และเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายทางบาดแผลหรือรอยช้ำที่เกิดขึ้น อาการจะรุนแรงเพิ่มมากขึ้นหลังการเก็บรักษาเป็นเวลานาน ดังนั้น ควรมีการคัดแยกผลิตผลที่เกิดบาดแผลและรอยช้ำ เพื่อป้องกันการเสียหายจากเชื้อสาเหตุโรคระหว่างการเก็บรักษาผลิตผลเพื่อรอจำหน่ายให้กับผู้บริโภค

3.เชื้อที่เข้าทำลายผลส้มสายน้ำผึ้งในกระบวนการผลิตในโรงคัดบรรจุ ได้แก่ เชื้อ *Fusarium* spp. พบมากกว่า 90% และเชื้อราสาเหตุโรคอื่น ๆ คือ *Cladosporium* sp., *Aspergillus* spp และ *Penicillium* spp. ดังนั้น ควรมีการศึกษาความสามารถในการสร้างสารพิษจากเชื้อรา *Aspergillus* spp และ *Penicillium* spp. ที่พบในผลส้มสายน้ำผึ้ง เพื่อใช้เป็นข้อมูลความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคต่อไป

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อรา *Curvalaria* sp. สาเหตุโรคดอกจุดสนิมกล้วยไม้สกุลหวายหลังการเก็บเกี่ยว

1. การระบาดของเชื้อสาเหตุของโรคดอกจุดสนิม และปัจจัยที่ส่งเสริมการแพร่ระบาดในแหล่งปลูกกล้วยไม้เพื่อการส่งออกจาก 5 จังหวัด จำนวน 21 แปลง พบเชื้อรา *C. eragrostidis* จำนวน 11 แปลง ในดอกกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ขาว 5 เอ็น บอมโจแดง ขาวสนาน ทิพย์ชมพู และเฉลิมกรุง คิดเป็นร้อยละ 52.38% วัสดุปลูก พบเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. 2 ไอโซเลท ได้แก่ T02 และ T03 จาก 2 แปลงในจังหวัดกรุงเทพมหานคร นอกจากนี้น้ำและดินทุกตัวอย่างไม่พบเชื้อราสาเหตุและเชื้อราปฏิปักษ์ แต่พบเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด ซึ่งน้ำที่ใช้รดต้นกล้วยไม้ในแปลงปลูกค่าความเป็ดกรดด่าง (pH)อยู่ช่วงระหว่าง 6.83-8.35 พบวัชพืช จำนวน 15 ชนิด จำแนกเป็น 2 กลุ่ม คือ ใบแคบ 5 ชนิด ได้แก่ หญ้ารังนก หญ้าตีนกา หญ้านกเขา หญ้าตีนนก หญ้าตีนตุ๊กแก และใบกว้าง 10 ชนิด ได้แก่ กระเม็ง ตำลึง ผักปลัง เฟิร์น กระสัง บังบก ผักชีฝรั่ง ปอเทือง น้ำนมราชสีห์ และมะระขี้นก พบเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด ใบไหม้ 8 ไอโซเลท ได้แก่เชื้อรา *Nigrospora* sp., *Fusarium* sp., *Scytalidium* sp., *Fusarium solani*, *Bipolaris* sp., *Nodulissporium* sp., *Drechshera holmii* และ *Colletotrichum* sp. และพบเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. 1 ไอโซเลท ได้แก่ T01 จากหญ้าตีนนกและแหล่งจำหน่ายปากคลองตลาด 1 แห่ง กล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมจำนวน 11 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อรา

สาเหตุโรคดอกจุดสนิม *C. eragrostidis* แต่พบเชื้อราสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ จำนวน 5 ชนิด สภาพภูมิอากาศความชื้นสัมพัทธ์ในแปลงอยู่ช่วงระหว่าง 25.70-65.9 และอุณหภูมิในแปลงอยู่ช่วงระหว่าง 28.80-44.60 ℃

2. ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราปฏิปักษ์ต่อการยังยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. eragrostidis* พบว่า เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท T02 และ T03 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ยร้อยละ 40.83 และ 34.40 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 ℃ สามารถเจริญเติบโตคลุมทับเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ภายใน 5 วัน หลังจากวางเชื้อ เมื่อเทียบกับสารเคมี iprodione 50%WP มีประสิทธิภาพการยับยั้งได้ 100%

3. ควบคุมโรคดอกจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้สกุลหวายโดยชีววิธี พบว่า เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp.ไอโซเลท T03 เกิดโรคน้อยที่สุดทุกอุณหภูมิ โดยอุณหภูมิ 20 5 และ 10℃ เกิดโรค 0.35% 0.40% และ 0.40 % ตามลำดับ และชุดควบคุมเกิดโรค 0.85 % เมื่อเทียบกับ สารเคมี iprodione 50 % WP ที่อุณหภูมิ 5 ℃ มีประสิทธิภาพดีที่สุดเกิดโรค 0.20%

2 กิจกรรมการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว

2 Mycotoxin Contamination of Agricultural commodities

หัวหน้ากิจกรรม

นางสาวศุภรา อัคคะสาระกุล

คำสำคัญ

การปนเปื้อน สารพิษจากเชื้อรา ผลิตผลเกษตร

Mycotoxin, Contamination, Agriculture, commodities

บทคัดย่อ

กิจกรรมการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษและสารพิษจากเชื้อราในกระบวนการและวิธีการผลิตเพื่อให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถใช้กำหนดแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนในระบบผลิต กิจกรรมนี้ประกอบด้วย 5 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 2.1 แนวทางการควบคุมการปนเปื้อนและการลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในพริก งานวิจัยนี้ได้สำรวจสถานการณ์การปนเปื้อนพริกแห้งในประเทศ และหาวิธีการลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ เพื่อพัฒนาคุณภาพของพริกแห้งให้มีความปลอดภัย โดยเก็บข้อมูลวิธีการผลิตพริกแห้งใน 3 จังหวัด (นครราชสีมา อุบลราชธานี และชัยภูมิ) ทดสอบการปนเปื้อนเชื้อราที่สร้างสารพิษในพริกแห้ง ด้วยวิธี direct plate count และวิเคราะห์การปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยวิธี fluorometry พบว่าจากพริกแห้งจำนวน 87 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ 0.1-9.8 µg/kg จำนวน 42 ตัวอย่าง (48.28 %) และมีเพียง 1 ตัวอย่างที่พบสารโอคราทอกซิน เอ สูง 65 µg/kg ซึ่งเกินค่ามาตรฐานที่สหภาพยุโรปกำหนด (15 µg/kg) โดยตัวอย่างจากจังหวัดชัยภูมิ พบการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ สูง มีการปนเปื้อนเชื้อรา *A. niger* มากที่สุด 44.91% รองลงมาคือเชื้อรา *A. flavus* 32.45% และ *A. ochraceus* 2.64% ทดสอบวิธีการลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในพริกแห้งด้วยตู้อบลมร้อน วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block (RCB) ทำ 2 การทดลอง ที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส จำนวน 3 ซ้ำ โดยการอบด้วยลมร้อนนาน 30, 45 และ 60 นาที พบว่า การอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ จากชุดควบคุม (พริกแห้งที่ไม่ผ่านการอบ) ได้มากที่สุด 77.71%

การทดลองที่ 2.2 ศึกษาแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนสารพิษ patulin ในผลิตผลและผลิตภัณฑ์เกษตร ได้ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์แปรรูปเพื่อใช้

เป็นแนวทางในการควบคุม ได้ดำเนินการในห้องปฏิบัติการโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2558-2559 โดยทำการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราในผลไม้แปรรูป 12 ชนิดผลิตภัณฑ์ รวม 338 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อรา 41 ตัวอย่าง คิดเป็น 12.13 % โดยพบว่ามะตูมแห้งมีการปนเปื้อนเชื้อรามากที่สุด คือพบ 28 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่าง 28 ตัวอย่าง คิดเป็น 100 % แม้ว่าจะไม่พบการปนเปื้อนสารพิษ patulin แต่อาจมีความเสี่ยงที่จะปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราชนิดอื่น การเก็บตัวอย่างผลไม้สดนำเข้าจากด่านตรวจพืชเชียงแสน จังหวัดเชียงราย รวม 15 ชนิด จำนวน 192 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อราในทุกตัวอย่าง แต่ไม่พบเชื้อราที่สร้างสารพิษ patulin และการตรวจสอบการปนเปื้อนสารพิษ patulin ตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้และผลไม้แปรรูปรวมทั้งหมด 28 ตัวอย่าง โดยห้องปฏิบัติการ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) พบว่าไม่มีการปนเปื้อนสารพิษ patulin

การทดลองที่ 2.3 การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษแอฟลาทอกซิน บี1 ในผลผลิตพริกไทย ได้ศึกษาศึกษาแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อราและสารแอฟลาทอกซิน บี1 ในผลผลิตพริกไทย สำหรับการปฏิบัติเพื่อลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนเชื้อราและสารแอฟลาทอกซิน บี1 ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราโดยวิธี Direct plating และวิเคราะห์สารแอฟลาทอกซิน บี1 ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ในตัวอย่างพริกไทยพร้อมบริโภคจากร้านค้าทั่วไปและจากเกษตรกร รวม 174 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* ในตัวอย่างพริกไทยขาวเม็ด จำนวน 0-13.2% แต่ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อราในพริกไทยขาวป่น การปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 ในพริกไทยขาวเม็ดพบ 0.0-16.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พริกไทยขาวป่นพบ 0.0-12.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม การปนเปื้อน *A. flavus* ในพริกไทยดำเม็ดพบ 7.1-8.0% แต่ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อราในพริกไทยดำป่น การปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 ในพริกไทยดำเม็ดพบปริมาณ 0.0-18.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พริกไทยดำป่นพบ 6.4 - 59.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิต พบว่า พริกไทยขาวที่ได้จากขั้นตอนการหมักที่ระยะเวลา 15 วัน มีการปนเปื้อนของเชื้อราและสารแอฟลาทอกซิน บี 1 สูงสุด โดยพบ *A. flavus* จำนวน 37% และพบสารแอฟลาทอกซิน บี 1 ปริมาณ 4.21 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนการปนเปื้อนของเชื้อราในพริกไทยดำ พบ *A. flavus* จำนวน 3% ปริมาณสารแอฟลาทอกซิน บี1 สูงสุด 5.78 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างพริกไทยดำที่ได้จากขั้นตอนการตากแห้งก่อนทำการฝัด ดังนั้นในการผลิตพริกไทยขาวควรหลีกเลี่ยงการหมักในถุงพลาสติกหรือในภาชนะใด ๆก็ตาม และควรตากทันทีหลังขั้นตอนการขัดล้างเพื่อเอาส่วนเปลือกออก การผลิตพริกไทยดำ ควรตากทันทีหลังการเก็บเกี่ยว ใช้วัสดุรองตากที่สะอาด ตากบนลานตากหรือตากบนพื้นที่ยกขึ้นสูงจากพื้นดิน และหมั่นเกลี่ยผลพริกไทยให้ได้รับแสงแดดอย่างทั่วถึง แนวทางดังกล่าวจะช่วยลดโอกาสในการปนเปื้อนของเชื้อราและสารแอฟลาทอกซินลงในพริกไทยลงได้

การทดลองที่ 2.4 ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในกาแฟและผลิตภัณฑ์ ได้ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ และแอฟลาทอกซิน บี1 ในเมล็ดกาแฟและผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในประเทศระหว่างปี พ.ศ. 2557-2559 เพื่อให้ทราบสถานการณ์การปนเปื้อนของเชื้อราและ

สารพิษในกาแฟ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากแปลงของเกษตรกรและผลิตภัณฑ์จากแหล่งจำหน่ายในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน ตาก ลำปาง ชุมพร และระนอง ประกอบด้วยตัวอย่างผลแห้ง กาแฟกะลา และกาแฟดิบ จำนวน 60 ตัวอย่าง ตรวจนับชนิดเชื้อราในเมล็ดกาแฟดิบที่อยู่ในกระบวนการผลิตโดยวิธี Direct plating และวิเคราะห์สารพิษในตัวอย่างด้วยวิธี ELISA ผลการตรวจวิเคราะห์พบว่าเมล็ดกาแฟดิบมีการปนเปื้อนสารพิษ OTA สูงกว่า 20 พีพีบี จำนวน 8 ตัวอย่าง (13%ของตัวอย่างทั้งหมด) พบปริมาณการปนเปื้อนสูงสุด 56.05 พีพีบี และพบการปนเปื้อนสารพิษ AFB_1 สูงกว่า 20 พีพีบี จำนวน 4 ตัวอย่าง (6%ของตัวอย่างทั้งหมด) พบปริมาณปนเปื้อนสูงสุด 63.10 พีพีบี ผลการวิเคราะห์ชนิดเชื้อรา พบปริมาณเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่สร้างสารพิษ OTA เฉลี่ย 100% และ *A. ochraceus* เฉลี่ย 14.93% และเชื้อราที่สร้างสารพิษAFB_1 พบเชื้อรา *A. flavus*เฉลี่ย 8.29% ในช่วงการหมักและตากแห้งพบมากที่สุด 4 จาก 5 แหล่งผลิต ในขณะที่การวิเคราะห์สารพิษด้วยวิธี HPLC ในตัวอย่างกาแฟคั่วและผลิตภัณฑ์ 4 ชนิด คือ คั่วบด โบราณ และสำเร็จรูป จำนวน 56 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์สารพิษ OTA พบว่าทุกตัวอย่างตรวจไม่พบการปนเปื้อนของสารพิษ ในขณะที่พบการปนเปื้อนของสารพิษAFB_1 จำนวน 3จาก 56 ตัวอย่างซึ่งไม่เกินค่ามาตรฐาน ปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดเท่ากับ 4.37 พีพีบี การตรวจสอบแสดงให้เห็นว่าสถานการณ์การปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราในกาแฟพบการปนเปื้อนสารพิษต่ำและปลอดภัยต่อการบริโภค

การทดลองที่ 2.5 ศึกษาควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลองุ่นบริโภคสดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากองุ่น ได้ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากองุ่น จากตัวอย่างลูกเกด 24 ตัวอย่าง น้ำองุ่น 7 ตัวอย่าง และไวน์ 14 ตัวอย่าง พบว่าลูกเกดสีดำนำเข้าจากต่างประเทศชนิดบรรจุลงกล่องในประเทศไทยและแบบตักแบ่งขาย พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. niger* 100% ทั้งสองแบบ รองลงมาคือ *Eurotium* sp. 60% และ 50% ส่วนลูกเกดสีดำที่ผลิตและบรรจุในต่างประเทศ พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Eurotium* sp. มากที่สุด 50% รองลงมาคือเชื้อรา *A. niger* และ *Penicillium* sp. 25% ลูกเกดสีเหลือง น้ำองุ่น และไวน์ ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อรา เมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ โดยวิธี ELISA พบการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในลูกเกดสีดำ ลูกเกดสีเหลือง น้ำองุ่น และไวน์ มีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 2.13-11.83, 3.07-9.13, 1.53-4.63 และ 1.87-4.83 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและสารโอคราทอกซิน เอ จากสวน ใน 4 ระยะการเจริญเติบโต พบว่าองุ่นระยะที่ 1 (หลังติดผล 30-40 วัน) และ ระยะที่ 2 (หลังติดผล 60-70 วัน) ของทุกสวน มีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ สูง ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 7.95-119.0 ไมโครกรัม/กิโลกรัม พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. และ *A. aculeatus* ส่วนองุ่นระยะที่ 3 (หลังติดผล 90-100 วัน) และระยะที่ 4 (หลังติดผล 120 วัน) ของทุกสวนมีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 2.90-20.3 ไมโครกรัม/กิโลกรัม พบการปนเปื้อนของเชื้อรา*Penicillium* sp., *A. aculeatus* และ *Alternaria* sp. เมื่อทำการตรวจสภาพแวดล้อมในแปลงปลูก พบเชื้อรา *A. aculeatus* และ *Penicillium* sp. ปริมาณที่สูงในดินและอากาศ ดังนั้นควรมีระบบการจัดการที่ดีตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงเก็บเกี่ยว เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารโอคราทอกซิน เอ

Abstract

The objective of activity "Mycotoxin Contamination of Agricultural commodities" are studies on contamination of mycotoxin producing fungi and mycotoxins in processes and methodology of crop productions for the scientific information those capable used for setting up the guide line of postharvest contamination control measure in production system. The activity consisting of 5 experiments.

The first experiment is "Guidelines for Contamination Control and Reduction of Ochratoxin A in Chilli." Ochratoxin A (OTA) is a toxin causing kidney cancer produced by some species of fungi, e.g. *Aspergillus flavus* and *A. niger*. The contamination of OTA is often found in feed and food including chilli. This research examined the situation of OTA contamination in dried chilli from major production areas in Thailand and determined the method to reduce OTA for enhancing food safety and quality. The data of dried chilli productions were collected from 3 provinces (Nakhon Ratchasima, Ubon Ratchathani and Chaiyaphum). Contaminated toxigenic fungi was observed by direct plate count method and OTA concentrations were analyzed by fluorometry. OTA contaminations were detected in 42 of 87 samples (48.28%) with level between 0.1 and 9.8 µg/kg. The highest OTA amount was detected in sample from Chaiyaphum province at 65 µg/kg. This concentration exceeds maximum level of the European Union (15 µg/kg). *A. niger* was the major toxigenic fungi contaminated in dried chilli from Chaiyaphum province (44.91%), followed by *A. flavus* 32.45% and *A. ochraceus* 2.64%. Randomized Complete Block design was applied for 2 experiments of toxin reduction with 3 replications. Six groups of dried chilli were treated at 70 and 80°C for 30, 45 and 60-minute OTA concentration of dried chilli treated at 80°C for 60 minutes decreased by 77.71% comparing to non-treated chilli (control group).

The second experiment is "Study on Control of Patulin Contamination in Agricultural Commodities and Processing Products." The inspection of fungal and fungal contamination in agricultural commodities and processing products was conducted leading to be a guideline for setting of control measure. The inspection was conducted at the postharvest disease laboratory, Postharvest and Processing Products Research and Development Division, Department of Agriculture, during the fiscal year 2558-2559. Twelve types of processed fruit products, 338 samples in total, were detected for fungal contamination and 41 samples or

12.13 in percentage were contaminants. It was found that the dried Bael fruit (*Aegle marmelos* (L.) Corrêa) was most contaminated with fungi by 28 samples from 28 specimens, or 100 in percentage. Although there was no patulin contamination in all dried Bael fruit's specimens but highly of fungal contamination revealed that there was risk of contamination from the other mycotoxins. One hundred and ninety-two specimens of 15 species of the importing fresh fruits pass through Chiang Saen checkpoint, Chiang Rai province was collected, and resulted all specimens were contaminants by fungi. Twenty-eight samples of dry fruit and fruit juices were tested by the laboratory of Central Laboratory (Thailand) there was no patulin contamination.

The third experiment is "Study on Contamination Control of Fungi and Aflatoxin B_1 in Pepper." Study on contamination control of fungi and aflatoxin B_1 in pepper was to reduce the risk of fungi and aflatoxin B_1 contamination. One hundred and seventy-four samples of pepper product were tested in this study. The white pepper was contaminated with *Aspergillus flavus* at 0.0-13.2%, but not found the fungi in white powder pepper. The contamination of aflatoxin B_1 was analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique. Aflatoxin B_1 contamination was detected in white pepper and white powder pepper at 0.0- 16.2 and 0.0- 12.4 µg/kg, respectively. *A. flavus* content was found in black pepper with 7.1-8.0%, but not found in black powder pepper. Aflatoxin B_1 were detected in black pepper and black powder pepper at 0.0-18.5 and 6.4-59.1 µg/kg, respectively. The contaminations of fungi and aflatoxin B1 in white pepper during the production processing, the highest *A. flavus* was contaminated at 37% and aflatoxin B_1 was detected at 4.21 µg/kg in the incubation process for 5 days. To produce black pepper, samples from sun dried process for 2 days was contamination with *A. flavus* at 3.0% and aflatoxin B_1 content at 5.78 µg/kg. Thus, the recommendation for production of white pepper avoided the incubation in plastic bag and should be dried by sun suddenly after removing the outer skin. Black pepper production should be dried by sun after harvesting, use clean pad drying and avoided placing pepper on ground directly. This method will reduce contamination of fungi and aflatoxin B_1 in pepper.

The forth experiment is "Study on Fungal and Mycotoxins Contamination in Coffee and Product." Study on fungal and analysis of Ochratoxin A (OTA) and Aflatoxin B_1 (AFB_1) contamination in coffee that grown and consumed in Thailand. The purpose of this study was to evaluate the situation of mycotoxin contamination in coffee bean and coffee product during 2014 and 2016 cultivation seasons. Sixty samples, three types of coffee beans, dried cherries, parchment coffee, green bean were collected from the farms and markets in Chiangmai, Chiangrai, Mae Hong Son, Tak, Lampang, Chumphon and Ranong. Post-harvest fungi were enumerated by direct plating whereas OTA and AFB_1 were analyzed by ELISA. The result showed that coffee drying process had high percentage of *Aspergillus* toxigenic species, 100% belonging to *Aspergillus niger*, 14.93% belonging to *A. ochraceus* and 8.29% belonging to

A. flavus. Among those contaminated samples, there were 6% of total samples contained amount of AFB_1 higher than 20 microgram/kilogram (ppb) at maximum levels 63.10 ppb, while 13% of total samples contained amount of OTA higher than 20 ppb at maximum levels 56.05 ppb. Fifty-four samples, three types of coffee products, roasted coffee, traditional roasted coffee and instant coffee were analyzed for mycotoxins contamination by HPLC. The results showed that three samples of coffee products were contaminated with AFB_1, and the samples were found to be positive AFB_1 for the first time in Thailand, although their levels were low for consumer's safety consumption.

The fifth experiment is "Study on the controlling of fungi and mycotoxin contamination in fresh grape and product." The contamination of fungi and ochratoxin A was studied in grape product including 24, 7 and 14 samples from raisin, grape juice and wine, respectively. The black raisin imported from foreign countries was divided into 2 parts packed in the box and distributed in a bag in Thailand. We found that 100% of *Aspergillus niger* was contaminated in both box and bag and 60 and 50% of *Eurotium* sp. was contaminated in both box and bag, respectively whereas the contamination of the black raisin imported and packed in foreign countries was 50% of *Eurotium* sp. and then 25% of *A. niger* and *Penicillium* sp. There was no contamination in golden raisin, grape juice and wine. The ochratoxin A contamination was inspected by ELISA. We found that the ochratoxin A in black raisin, golden raisin, grape juice and wine was 2.13-23.33, 3.07-9.93, 1.53-4.63 and 1.87-4.83 µg/kg., respectively. Then we studied the contamination of fungi and ochratoxin A from orchard in 4 stages of growth development We found that the ochratoxin A of the first stage (30-40 days after fruit set) and the second stage (60-70 days after fruit set) of every orchard was ranged 7.95-11.90 µg/kg. and *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. and *A. aculeatus* were also contaminated in these stages. The ochratoxin A of the third stage (90-100 days after fruit set) and the fourth stage (120 days after fruit set) of every orchard was ranged 2.90-20.3 μg/kg. Moreover, we found that *Penicillium* sp., *A. aculeatus* and *Alternaria* sp. were also contaminated in these stages. When we inspected the environment of planting field we found that *A. aculeatus* and *Penicillium* sp. were high in soil and air. Therefore, the good management from planting to harvest was important to reduce fungi and ochratoxin A.

บทนำ

สารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxins) หลายชนิด เช่น โอคราทอกซิน (Ochratoxins) พาทูลิน (Patulin) และแอฟลาทอกซิน (Aflatoxins) เป็นสารพิษจากเชื้อราที่มีความสำคัญเนื่องจากมีความเป็นพิษในระดับสูง และมักพบปนเปื้อนใน ผลไม้บางชนิด พริก พริกไทย กาแฟ องุ่น และผลิตภัณฑ์แปรรูป การกำหนดวิธีควบคุมและป้องกันการเจริญของปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากรา จะเริ่มจากการศึกษาการปนเปื้อนในกระบวนการผลิตและผลิตภัณฑ์ แต่ละขั้นตอนโดยเก็บข้อมูลเชื้อราที่พบ ปริมาณที่พบ การสร้างสารพิษจากรา และวิเคราะห์ข้อมูลที่พบ เพื่อหาสาเหตุหรือขั้นตอนที่เป็นสาเหตุหลักของการปนเปื้อน ซึ่งถือเป็นจุดเสี่ยงที่สำคัญของการปนเปื้อนในกระบวนการผลิต และทำการทดลองวิธีควบคุมโดยนำเอาเทคโนโลยีการควบคุมจากผลงานวิจัยต่าง ๆ นำมาทดสอบความเหมาะสม เพื่อเป็นทางเลือกให้แก่ผู้ประกอบการนำไปใช้ในการควบคุม

ข้อมูลจากการศึกษาการปนเปื้อนในกระบวนการผลิตและผลิตภัณฑ์สามารถนำไปใช้ในการกำหนดเทคโนโลยีการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และสารพิษในกระบวนการผลิตที่เหมาะสม เป็นทางเลือกให้แก่ผู้ประกอบการนำไปใช้ และใช้เป็นข้อมูลการปนเปื้อนในสินค้าเกษตรเชิงวิทยาศาสตร์เพื่อการกำหนดมาตรการความปลอดภัยของผู้บริโภค

การทบทวนวรรณกรรม

องุ่นเป็นไม้ผลเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง มีรายงานการปนเปื้อนของเชื้อราในองุ่นสด ลูกเกด และผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ขององุ่น โดยพบสารพิษ ochratoxin A จากผลองุ่นที่ติดเชื้อรา *A. carbonarius*, *A. niger* และ *Aspergillus* spp. คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission) กำหนดให้มีระดับการปนเปื้อน สูงสุดของโอคราทอกซิน เอ ในน้ำองุ่น และไวน์ทุกชนิดที่ 2 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และในองุ่นแห้งที่ 10 ไมโครกรัม/กิโลกรัม (Anon, 2005) จึงควรมีการตรวจสอบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ทั้งที่ผลิตในประเทศ การศึกษากระบวนการผลิตเพื่อหาจุดเสี่ยงที่อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราและแนวทางในการควบคุม และตรวจสอบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์นำเข้า ทั้งนี้เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคและใช้เป็นข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์ในการกำหนดระเบียบหรือมาตรการการค้าระหว่างประเทศ

พริกขี้หนู (Chilli pepper) มีความสำคัญต่อวิถีชีวิตคนไทย ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน พริกเป็นเครื่องปรุงอาหารที่สำคัญประจำบ้านและครัวไทย ปี 2556 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกพริก 348,539 ไร่ และมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ จากเดิมในปี 2553 ที่มีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 474,000 ไร่ เพราะเกษตรกรหันไปปลูกพืชอื่น ที่มีการดูแลง่ายกว่าและขายผลผลิตได้ราคาสูงกว่า แม้ว่าผลตอบแทนสุทธิต่อไร่ของการปลูกพริกจะสูงกว่าก็ตาม (วีระ และ เยาวรัตน์, 2557) พื้นที่การปลูกพริกกระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ส่วนใหญ่เป็นการปลูกพริกขี้หนูเม็ดใหญ่ รองลงมาเป็นพริกชี้ฟ้า ซึ่งพื้นที่ปลูกพริกขี้หนู ส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยมีแหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา รองลงมาคือ จังหวัดชัยภูมิ อุบลราชธานี ศรีสะเกษ ฯลฯ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2554) แต่เนื่องจากความต้องการในการบริโภคและประโยชน์ที่มากมายของพริก ทำให้พริกยังคงเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่สามารถนำไปใช้ได้ทั้งในแง่ของการ

บริโภคและเป็นยารักษาโรค พริกขี้หนูเม็ดเล็กและพริกขี้หนูเม็ดใหญ่นิยมใช้ประกอบอาหาร ทำพริกแห้ง พริกป่น ปรุงแต่งรสในการทำซอสพริก ส่งออกในรูปของพริกสดและพริกแห้ง และใช้เป็นส่วนประกอบของยารักษาโรคต่าง ๆ โดยสารสำคัญในพริกที่ชื่อ แคปไซซิน (Capsaicin) สามารถนำไปทำเป็นยาที่ใช้ในทางการแพทย์ เช่น ยาลดอาการปวดศรีษะไมเกรน ยาช่วยลดปริมาณสารคอเลสเตอรอล และยาบรรเทาอาการอักเสบของข้อเป็นต้น ผลผลิตส่วนใหญ่เกษตรกรจะนิยมจำหน่ายในรูปพริกแห้ง เนื่องจากได้ราคาดีกว่าพริกสด อีกทั้งพริกสดมีข้อจำกัด เช่น เกิดการเน่าเสียง่าย คุณภาพของพริกไม่สม่ำเสมอ หรือมีปริมาณที่มากเกินความต้องการ จึงทำให้ผู้บริโภคหันไปนิยมใช้พริกแห้งมากขึ้น ซึ่งการทำพริกแห้งที่นิยมกันโดยทั่วไป คือ การตากแดดกลางแจ้ง แต่ก็ต้องขึ้นอยู่กับสภาวะอากาศด้วย คุณภาพของพริกแห้งจึงไม่มีความสม่ำเสมอ รวมทั้งเกิดการปนเปื้อนจากแมลง หนู นก และจุลินทรีย์ ส่งผลให้คุณภาพของพริกแห้งไม่ได้มาตรฐานความปลอดภัย (ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว, 2552) ซึ่งในการทำพริกแห้งส่วนใหญ่จะใช้วิธีการตากบนพื้นดินที่รองด้วยตาข่ายพลาสติก ทำให้เกิดโอกาสในการปนเปื้อนเชื้อราที่อยู่ในดินได้ง่าย รวมทั้งในขั้นตอนการเก็บรักษาหากมีการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม เก็บในที่มีความชื้นสูง ซึ่งเหมาะแก่การสร้างสารพิษของเชื้อราก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนสารพิษที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เช่น แอฟลาทอกซิน (Aflatoxin) และโอคราทอกซิน (Ochratoxin) เป็นต้น ซึ่งสารพิษเหล่านี้จะไปเกาะจับกับ DNA และ RNA ในร่างกาย ทำให้กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ผิดปกติ และก่อให้เกิดมะเร็ง นอกจากนี้การปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลทางการเกษตรยังถูกนำมาใช้เป็นเครื่องต่อรองราคาในการซื้อขายผลิตผลดังกล่าวทั้งในระดับประเทศและระหว่างประเทศ ทำให้แต่ละประเทศกำหนดค่าการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในอาหารชนิดต่าง ๆ ไม่เท่ากัน

จากปัญหาสารพิษจากเชื้อราที่ปนเปื้อนในพริกเนื่องมาจากการผลิตและการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม ดวงจันทร์ และ วนิดา (2545) ได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องเทศได้แก่ พริกขี้หนู พริกชี้ฟ้า (ชนิดที่เป็นเมล็ดพริกแห้งและชนิดป่นละเอียด), พริกไทยป่น, กระเทียม (ชนิดสด เจียวกับน้ำมัน และชนิดผง), หอมแดง (ชนิดสด และชนิดผง), น้ำจิ้มสะเต๊ะ, ซีอิ๊ว และอื่น ๆ ได้แก่ เครื่องแกงสำเร็จรูป, น้ำพริกเผา, ซอสพริก, ซุปสกัด โดยจำนวนตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด) พริกขี้หนู พริกชี้ฟ้า 35 (ทั้งเมล็ด) , 29 (ป่นละเอียด) 37, 27, 17, 2, 5 และ 11 ตัวอย่าง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเครื่องเทศทั้งหมด 160 ตัวอย่าง ตรวจพบแอฟลาทอกซินปนเปื้อน 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5 ปริมาณที่พบอยู่ระหว่าง 6.59 - 61.28 พีพีบี โดยจะพบในพริกทั้งเมล็ด 4 ตัวอย่าง ปริมาณที่พบอยู่ระหว่าง 12.26 - 61.28 พีพีบี พริกป่น 3 ตัวอย่างปริมาณที่พบคือ 7.84, 12.94 และ 14.40 พีพีบี นอกจากนี้ยังมีรายงานจากสถาบันอาหารซึ่งสุ่มตัวอย่างพริกขี้หนูป่นจากร้านค้าในเขตกรุงเทพฯ จังหวัดนนทบุรี และ ปทุมธานี จำนวน 5 ตัวอย่าง เพื่อนำมาวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ พบว่าทุกตัวอย่างมีสารโอคราทอกซิน เอ ปนเปื้อน และมี 1 ตัวอย่างที่พบปนเปื้อนเกินมาตรฐานของอียู (European Union) ที่อนุญาตให้ปนเปื้อนได้ไม่เกิน 30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม (สถาบันอาหาร, 2556) Iqbal *et al.* (2013) รายงานว่า จากการสุ่มตัวอย่างพริก 170 ตัวอย่าง (chilli sauce, crushed chilli และ powdered chilli) มาตรวจสอบการปนเปื้อนแอฟลาทอกซิน และโอคราทอกซิน เอ พบว่า ตรวจพบการปนเปื้อนแอฟลาทอกซินใน chilli sauce, crushed chilli และ powdered chilli จากตัวอย่างที่จำหน่ายใน

ตลาด 39, 59 และ 56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบการปนเปื้อนแอฟลาทอกซินจากตัวอย่างในร้านอาหาร 29, 54 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในส่วนของสารโอคราทอกซิน เอ พบการปนเปื้อนใน chilli sauce, crushed chilli และ powdered chilli จากตัวอย่างที่จำหน่ายในตลาด 19, 38 และ 38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากตัวอย่างในร้านอาหาร 17, 50 และ 41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

นอกจากปัญหาสารแอฟลาทอกซินในพริกที่มีการรายงานพบการปนเปื้อนแล้ว จะเห็นได้ว่ามีการรายงานการพบการปนเปื้อนสารโอคราทอกซินเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งคณะกรรมาธิการยุโรปได้ออกประกาศกฎระเบียบ Commission Regulation (EU) 2015/1137 of 13 July 2015 ซึ่งเป็นการปรับระดับค่าตกค้างสูงสุดของสาร Ochratoxin A (OTA) เพื่อให้สอดคล้องกับผลวิจัยประเมินความเสี่ยงที่หน่วยงานความปลอดภัยด้านอาหารประจำสหภาพยุโรปกำหนดขึ้น เนื่องจากสารโอคราทอกซิน เอ สามารถก่อให้เกิดมะเร็งได้เมื่อมีการสะสมในร่างกาย โดยกำหนดให้ Ochratoxin A ใน *Capsicum* spp. (dried fruits thereof, whole or ground, including chillies, chilli powder, cayenne and paprika) มีค่าตกค้างสูงสุดเท่ากับ 15 µg/kg มีผลบังคับใช้ตั้งแต่ 1 มกราคม 2558 (European Commission, 2015) และเพื่อให้เกิดความสอดคล้องกับสถานการณ์ที่มีรายงานการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ เพิ่มขึ้น จึงควรมีการสำรวจการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในพริกแห้ง และพริกป่น เพื่อเป็นข้อมูลสถานการณ์การปนเปื้อนในประเทศ พร้อมทั้งหาวิธีการในการลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ เพื่อพัฒนาคุณภาพของพริกแห้งให้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและได้มาตรฐานในการส่งออก

พริกไทย ในหลายประเทศมีการรายงานการพบการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซิน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในพริกไทยดำ จึงควรมีการตรวจสอบการปนเปื้อนเพื่อใช้ในการประเมินความเสี่ยงในผลิตภัณฑ์ทั้งในประเทศและนำเข้า โดยศึกษากระบวนการผลิตเพื่อหาสาเหตุของการปนเปื้อนของเชื้อราและสารแอฟลาทอกซิน เพื่อเป็นแนวทางการลดการปนเปื้อน และเพิ่มคุณภาพของสินค้าให้ได้มาตรฐาน ปลอดภัยต่อผู้บริโภค อีกทั้งยังสามารถนำข้อมูลไปใช้ในการกำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนและการกำหนดระเบียบหรือมาตรการนำเข้าพริกไทยได้อีกด้วย

ประเทศไทยมีแนวโน้มการบริโภคกาแฟเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ โดยเฉพาะกาแฟที่ชงจากกาแฟคั่ว (Roasted coffee) รายงานจากสหภาพยุโรป กล่าวว่ากาแฟเป็นแหล่งของการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราที่สำคัญ ได้แก่ โอคราทอกซิน ในประเทศญี่ปุ่นพบการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินในเมล็ดกาแฟดิบอยู่ระหว่าง 2.0–32.9 พีพีบี (Nakajima*et al.*, 1997) ซึ่งเกินค่ามาตรฐานกำหนด แต่ในประเทศไทยยังไม่มีรายงาน สหภาพยุโรปได้กำหนดระดับการปนเปื้อน AFB_1 ในอาหารบริโภคไม่เกิน 2 พีพีบี (EU Regulation Commission, 2010) และประเทศไทยกำหนด 20 พีพีบี (กระทรวงสาธารณสุข,2529) แต่ในประเทศไทยมีรายงานยังขาดข้อมูลการสำรวจการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราในกาแฟและผลิตภัณฑ์ที่เป็นปัจจุบัน ดังนั้น การตรวจสอบการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราและเชื้อสาเหตุในกาแฟหลังการเก็บเกี่ยวจนถึงผลิตภัณฑ์กาแฟที่วางจำหน่ายในท้องตลาด ทำให้ทราบสถานการณ์การปนเปื้อนและนำข้อมูลไปประกอบในกิจกรรมประเมินความเสี่ยง (Risk assessment) ของการพบการปนเปื้อนสารพิษในการบริโภคกาแฟของคนไทยต่อไป

นอกจากนี้ข้อมูลการปนเปื้อนในกระบวนการผลิตกาแฟจะนำไปสู่การกำหนดแนวทางลดการปนเปื้อนได้ ในกระบวนการผลิตหลังการเก็บเกี่ยวกาแฟตั้งแต่การนำเมล็ดมาทำความสะอาด กะเทาะเปลือก คั่ว บด บรรจุ และผลิตภัณฑ์ที่วางจำหน่าย กระบวนการเหล่านี้เป็นจุดสำคัญของการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราได้ทุกขั้นตอน วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้จึงได้วิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษที่อยู่ในกระบวนการผลิต เพื่อจะนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับกำหนดแนวทางการผลิตกาแฟที่มีคุณภาพและทำให้ประชาชนสามารถเลือกซื้อกาแฟดื่มบริโภคได้อย่างปลอดภัย

ระเบียบวิธีวิจัย

การทดลองที่ 2.1 แนวทางการควบคุมการปนเปื้อนและการลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในพริก

ระยะเวลาเริ่มต้น – สิ้นสุด ปี 59-60

1. ข้อมูลการผลิตและการแปรรูปพริกแห้งและพริกป่น

ทำแบบสอบถามเพื่อสัมภาษณ์เกษตรกร เก็บข้อมูลขั้นตอนการปฏิบัติของเกษตรกรในการผลิตพริกแห้ง และพริกป่น ในพื้นที่ (ภาพที่ 1) โดยเก็บข้อมูลแหล่งปลูก ฤดูปลูก วิธีการทำแห้ง การเก็บรักษา และการแปรรูปเป็นพริกแห้ง ของเกษตรกร ใน 3 พื้นที่ ได้แก่ อ.ขามสะแกแสง จ.นครราชสีมา จำนวน 33 ราย อ.ม่วงสามสิบ จ.อุบลราชธานี จำนวน 17 ราย และ อ.จัตุรัส จ.ชัยภูมิ จำนวน 37 ราย รวมทั้งหมด 87 ราย การผลิตพริกป่นของเกษตรกร ในพื้นที่ อ.ขามสะแกแสง จ.นครราชสีมา จำนวน 10 ราย และ อ.จัตุรัส จ.ชัยภูมิ จำนวน 2 ราย รวมทั้งหมด 12 ราย และสรุปข้อมูลทั้งหมดเพื่อให้ได้ภาพรวมของกระบวนการผลิตและการแปรรูป

ภาพที่ 1 เก็บข้อมูลขั้นตอนการผลิตพริกแห้งและพริกป่นโดยใช้แบบสอบถามสัมภาษณ์เกษตรกรผู้ผลิต

2. การปนเปื้อนของเชื้อราและสารโอคราทอกซิน เอ ในพริก

2.1 เก็บตัวอย่างพริกแห้งและพริกป่น ตัวอย่างละ 1 กิโลกรัม มาตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราด้วยวิธี direct plate count โดยนำพริกแห้งแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) 0.825% นาน 2 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และวางบนอาหาร Dichloran Glycerol (DG 18) agar

จำนวน 2 ผลต่อจานเลี้ยงเชื้อ (plate) ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5-7 วัน เพื่อตรวจสอบชนิดของเชื้อราที่พบและเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน (ภาพที่ 2) โดยคำนวณจาก

$$\%\ \text{การปนเปื้อนทั้งหมดของเชื้อรา 1 species ที่พบ} = \frac{\text{จำนวนเชื้อราที่พบทั้งหมดของ 1 species} \times 100}{\text{จำนวนเชื้อราที่พบทั้งหมดของทุก species}}$$

ภาพที่ 2 ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราในพริกแห้ง ด้วยวิธี direct plate count

2.2 วิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ เพื่อเก็บข้อมูลการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในแต่ละตัวอย่าง ด้วยวิธี fluorometry นำตัวอย่างพริกแห้งมาบดให้ละเอียด สกัดตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่างพริกแห้งและพริกป่นที่ได้ ตัวอย่างละ 50 กรัม เติมด้วยตัวทำละลาย Methanol:1% Sodium bicarbonate (70:30 v/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และปั่นตัวอย่างด้วยเครื่องปั่นที่ระดับความเร็วสูงสุด นาน 2 นาที นำตัวอย่างที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 ดูดสารสกัดที่ได้ 10 มิลลิลิตร เจือจางด้วย 2% Tween-20/Phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้กรองผ่าน Glass Microfiber filter ดูดสารสกัดที่กรองได้ 10 มิลลิลิตร นำไป Cleanup โดยผ่าน Immunoaffinity column (Ochra test affinity column®) ที่อัตรา 1-2 หยดต่อวินาที และล้าง column ด้วย 2% Tween-20/PBS และ น้ำกลั่น (ภาพที่ 3) elute ตัวอย่างที่ได้ด้วย eluting solution 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน glass cuvette นำตัวอย่างที่ได้ไปอ่านค่าด้วยเครื่อง fluorometer (ภาพที่ 4)

ภาพที่ 3 Clean-up สารสกัดตัวอย่างที่ได้โดยผ่าน Immunoaffinity column ที่อัตรา 1-2 หยดต่อวินาที

ภาพที่ 4 นำตัวอย่างที่ได้ไปอ่านค่าด้วยเครื่อง fluorometer

2.3 ทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (proficiency testing) ในการตรวจวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ด้วยวิธีการ fluorometry โดยทำการสอบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง (chilli powder 04297 FAPAS®) จาก Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) ผลการทดสอบจะใช้ค่า Z-Score ใช้ในการประเมินผลการเข้าร่วมของห้องปฏิบัติการทดสอบ คำนวณจาก

$$Z = \frac{(X - X_a)}{\sigma_p}$$

โดย X = ผลของห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วม

X_a = ค่าที่กำหนดหรือค่าอ้างอิง

σ_p = ค่าเบี่ยงเบนจากการทดสอบ

ซึ่งเป็นการคำนวณหาอัตราส่วนของการเบี่ยงเบนระหว่างค่าอ้างอิง และค่าของห้องปฏิบัติการต่อค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการเข้าร่วมทั้งหมด

3. การลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในพริก

ทดสอบวิธีการลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในพริก โดยใช้ตู้อบลมร้อน วางแผนการทดลองแบบ RCB ทำ 2 การทดลอง ที่ 2 อุณหภูมิ คือ 70 และ 80 องศาเซลเซียส จำนวน 3 ซ้ำ โดยมีกรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 อบด้วยลมร้อน นาน 30 นาที
กรรมวิธีที่ 2 อบด้วยลมร้อน นาน 45 นาที
กรรมวิธีที่ 3 อบด้วยลมร้อน นาน 60 นาที
กรรมวิธีที่ 4 ไม่ผ่านการอบด้วยลมร้อน (ชุดควบคุม)

ชั่งพริกแห้งตัวอย่างละ 100 กรัม ใส่ถาด แล้วนำไปอบด้วยลมร้อนตามกรรมวิธีต่าง ๆ และนำพริกแห้งที่ผ่านกรรมวิธีต่าง ๆ แล้วมาบดให้ละเอียด นำไปวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ และสกัดตัวอย่างโดยผ่าน Ochra test affinity column เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยวิธี fluorometry บันทึกข้อมูลปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ โดยการคำนวณจากสูตร

$$\% \text{ การลดลงของปริมาณสาร OTA} = \frac{(\text{ปริมาณ OTA จากชุดควบคุม} - \text{ปริมาณ OTA จากตัวอย่าง}) \times 100}{\text{ปริมาณ OTA จากชุดควบคุม}}$$

การทดลองที่ 2.2 ศึกษาแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนสารพิษ patulin ในผลิตผลและผลิตภัณฑ์เกษตร

ระยะเวลาเริ่มต้น – สิ้นสุด ปี 58-59

การศึกษาการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อราที่สร้าง patulin และการปนเปื้อน patulin ในผลไม้สดทั้งนำเข้าและผลิตในประเทศ และผลิตภัณฑ์ จะแยกออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ

1. ศึกษาการปนเปื้อนในผลิตผลและผลิตภัณฑ์ โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.1 เก็บตัวอย่างและข้อมูลการปนเปื้อนในผลไม้สดและผลิตภัณฑ์แปรรูป (น้ำผลไม้ และผลไม้อบแห้ง) จากแหล่งต่าง ๆ โดยบันทึกลักษณะ แหล่งที่มา ผู้ผลิต

1.2 นำตัวอย่างผลไม้สดและผลไม้อบแห้งจากข้อ 1.1 มาทำการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราที่สร้าง patulin ด้วยวิธี Direct plating method โดยนำสุ่มตัวอย่างที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ มาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5 x 0.5 ซม. แล้ววางลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อรา DG18 แล้วบ่มเชื้อนาน 14 วัน ระหว่างการบ่มเชื้อสังเกตการณ์เจริญของเชื้อราหากพบเชื้อรา *Penicillium* spp. ให้บันทึกผลและทำการแยกเชื้อราบริสุทธิ์โดยนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato dextrose agar เก็บไว้เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อรา

1.3 นำตัวอย่างและผลไม้อบแห้งและน้ำผลไม้ รวม 28 ตัวอย่างจากข้อ 1.1 ส่งตรวจสอบสารพิษ patulin ตามวิธีมาตรฐานสากลของ AOAC (AOAC Official Method 2000.02 Patulin in Clear and Cloudy Apple Juices and Apple Puree) ที่ห้องปฏิบัติการ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย)

2. ศึกษาการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราที่สร้าง patulin โดยชีววิธี

2.1 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการทดลอง “การใช้แบคทีเรียดินควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร” นำมาทดสอบการควบคุมเชื้อรา *Penicillium* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างผลิตผลและผลิตภัณฑ์

2.2 การทดสอบวิธีการควบคุมการปนเปื้อนในระดับห้องปฏิบัติการ

2.2.1 เตรียมเซลล์แบคทีเรียแขวนลอย (cell suspension)

นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว NB มา centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างเซลล์ตะกอนด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วและปั่นเหวี่ยงอีก 2 ครั้ง เก็บส่วนตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และปรับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียให้ได้ค่า OD เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ($1\text{x}10^{8}$ เซลล์ต่อมิลลิตร)

2.2.2 การเตรียมสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ของเชื้อรา *Penicillium* spp.

เลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* spp. ในอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน นำสปอร์ไปผสมในน้ำกลั่นผสม tween 20 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นับสปอร์ให้มีจำนวนสปอร์ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* spp.

ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา โดยวิธี dual culture ในอาหาร PDA+NA หยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Penicillium* spp. ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ และหยดเซลล์แบคทีเรียแขวนลอย 5 ไมโครลิตร ห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2.5 เซนติเมตร จำนวน 4 ด้าน ระยะห่างระหว่างหยดของสารละลายแบคทีเรียประมาณ 2.5 เซนติเมตร บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ดังนี้

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

C = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในจานควบคุม

T = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในจานทดสอบ

การทดลองที่ 2.3 การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษแอฟลาทอกซิน บี1 ในผลผลิตพริกไทย

ระยะเวลาเริ่มต้น – สิ้นสุด ปี 58-59

1. ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราในพริกไทยพร้อมบริโภคและระหว่างกระบวนการผลิต

1.1 การสุ่มเก็บตัวอย่างพริกไทย

- พริกไทยพร้อมบริโภคจากเกษตรกรและร้านค้าปลีก
- พริกไทยในระหว่างกระบวนการผลิต จากแปลงเกษตรกรใน จ. จันทบุรี

1.2 ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราด้วยวิธี Direct plating method ล้างตัวอย่างพริกไทยด้วย 1% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) นาน 2 นาที ซับตัวอย่างให้แห้ง วางตัวอย่างลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran Glycerol Agar (DG18) จำนวน 10 เมล็ดต่อจานเลี้ยงเชื้อ ตัวอย่างละ 5 จานเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน

1.3 บันทึกจำนวนเชื้อราที่พบ

$$\%\ \text{การปนเปื้อนของเชื้อรา} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่พบเชื้อ}}{\text{จำนวนเมล็ดที่วาง}} \times 100$$

2. ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซิน บี1 ในพริกไทย

วิเคราะห์ปริมาณสารแอฟลาทอกซิน บี 1 ในตัวอย่างด้วยวิธี ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป DOA –Aflatoxin ELISA Test Kit ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ตามวิธีการดังนี้

2.1 บดตัวอย่างพริกไทยให้ละเอียด แล้วชั่งใส่ขวดรูปชมพู่ปริมาณ 20 กรัมต่อขวด

2.2 เติมเมทานอล 70% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในขวด เขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที นาน 30 นาที

2.3 เทส่วนใสผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 4 แล้วนำสารสกัดที่ได้มาเจือจางเป็น 1:20 เท่า ด้วย 0.01 M Phosphate Buffer Saline

2.4 หยดสารพิษมาตรฐาน 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ และสารสกัดที่เจือจางแล้ว 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ

2.5 หยดเอ็นไซม์คอนจูเกต (AFB_1 - HRP conjugate) 50 ไมโครลิตร ตามลงไปทุกหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

2.6 ล้างหลุมทดสอบด้วย 0.01 M Phosphate Buffer Saline - Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง

2.7 หยด Substrate 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

2.8 หยด Stopping solution 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบทุกหลุม ปฏิกิริยาจะเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง

2.9 อ่านความเข้มของสีด้วยเครื่อง MicroELISA Reader ที่ช่วงคลื่น 450 นาโนเมตร

3. ศึกษาแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษในกระบวนการผลิต

3.1 ประเมินการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุ และปริมาณสารพิษในแต่ละขั้นตอนการผลิต บันทึกข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุและปริมาณสารพิษที่พบ

3.2 วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารแอฟลาทอกซิน บี1 ในขั้นตอนการผลิต และกำหนดแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารแอฟลาทอกซิน บี1 ในการผลิตพริกไทย

Table 1 The contamination of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 in pepper.

Sample	Source of sample	No. of sample	contamination (%)		AFB1 (µg/kg)
			A. flavus	AFB1	
white pepper	market/supermarket	17	0.0	92.5	0.0-16.2
	farmer	25	13.2	100.0	1.0-8.1
white powder pepper	market/supermarket	15	0.0	92.9	0.0-12.4
	farmer	10	0.0	100.0	3.3-10.1
black pepper	market/supermarket	25	8.0	100	3.6-18.5
	farmer	65	7.1	83.1	0.0-11.8
black powder pepper	market/supermarket	7	0.0	100	6.4-59.1
	farmer	10	0.0	100	7.7-14.6
		174			

Table 2 The contamination of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 in pepper production.

Sample	No. of sample	Contamination of *A. flavus* (%)	Contamination of AFB1 (µg/kg)
production of white pepper			
fully mature pepper (red berries)	10	0	0.00-2.53
pepper were incubated for 10-15 days	10	37	1.97-4.21
pepper were removed the outer skin and washed	10	12	1.24-3.34
pepper were sun dried	10	7	2.56-3.48
production of black pepper			
mature pepper (green berries)	10	0	0.00–1.92
pepper were sun dried for 2 days (include stalk)	10	3	0.87-5.78
pepper were sun dried for 4 days (include stalk)	10	2	3.45-5.36
dried pepper and removed stalks	10	0	2.09-3.69

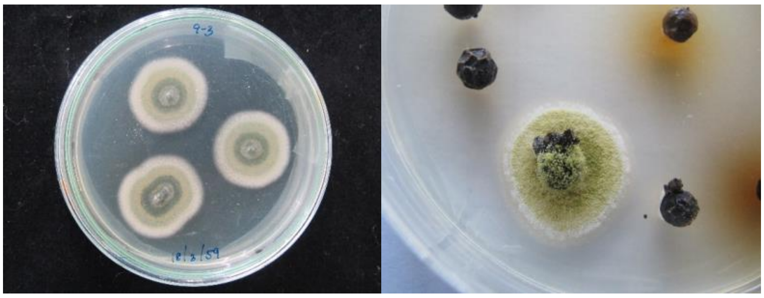


Figure 1 The contamination of *Aspergillus flavus* in pepper samples.

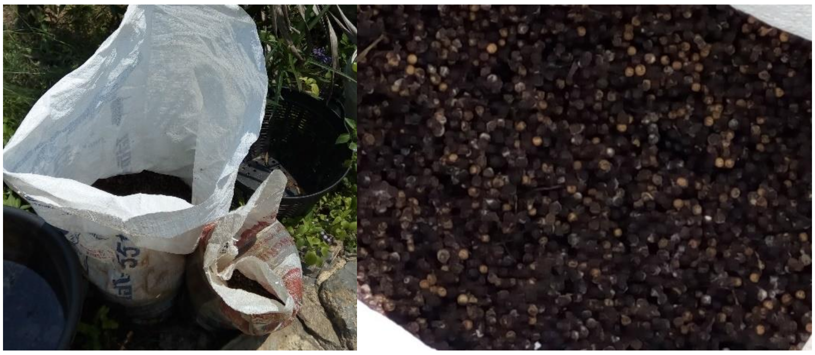


Figure 2 The incubation of pepper in plastic bag (a), and these peppers was contaminated by fungi (b).

การทดลองที่ 2.4 ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในกาแฟและผลิตภัณฑ์

ระยะเวลาเริ่มต้น-สิ้นสุด ปี 58-59

1. การเก็บตัวอย่างเมล็ดกาแฟดิบ ผลิตภัณฑ์กาแฟ และการตรวจนับเชื้อรา

1.1 การเก็บตัวอย่างกาแฟดิบ

สุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดกาแฟดิบของเกษตรกรและศูนย์วิจัยของกรมวิชาการเกษตรในฤดูกาลผลิตปี พ.ศ. 2557/2558 และ 2558/2559 ประกอบด้วยตัวอย่างกาแฟอาราบิก้า (*Coffea arabica*) จากศูนย์วิจัยเกษตรหลวงขุนวาง จากบ้านแม่แจ่ม จังหวัดลำปาง จากบ้านห้วยห้อม จังหวัดแม่ฮ่องสอน จากดอยช้าง และศูนย์วิจัยเกษตรที่สูงดอยวาวี จังหวัดเชียงราย และร้านค้าจังหวัดเชียงใหม่ ตาก เชียงราย กาแฟทริปิก้า (*Coffeaarabica* var. *typica*) จากศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ส่วนกาแฟโรบัสต้า (*Coffea robusta*) เก็บจากศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร และจากเกษตรกรในจังหวัดชุมพร และระนอง สุ่มตัวอย่างหนักประมาณ 300 –500 กรัม จำนวน 3 ซ้ำ นำมาตรวจนับเชื้อราจากเมล็ดด้วยวิธี Direct plating ทำโดยฆ่าเชื้อที่ผิวตัวอย่างเมล็ดกาแฟโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 1% นาน 5 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองฆ่าเชื้อในจาน

เลี้ยงเชื้อ จากนั้นวางเมล็ดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18) บ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

1.2 การเก็บตัวอย่างกาแฟคั่ว กาแฟโบราณ และกาแฟ**สำเร็จรูป**

เก็บตัวอย่างกาแฟคั่ว 5 ชนิด ทั้งกาแฟอาราบิกาคั่ว โรบัสต้าคั่ว อาราบิก้าผสมโรบัสต้าคั่ว กาแฟโบราณ และกาแฟสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายในร้านค้า ห้างสรรพสินค้า และผลิตภัณฑ์ OTOP ในเขตกรุงเทพมหานคร เขตภาคเหนือ และภาคใต้ สุ่มตัวอย่างน้ำหนักประมาณ 300–500 กรัมจำนวน 3 ซ้ำ เพื่อนำมาวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา

3. การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราด้วยวิธี ELISA และ HPLC

นำตัวอย่างกาแฟมาสกัดสารพิษและวิเคราะห์ปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ (OTA) และสารพิษแอฟลาทอกซิน (AFB_1) ในตัวอย่างที่สุ่มมาทั้งหมดด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปและยืนยันผลด้วยวิธีทางเคมี HPLC

4. ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษในกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟดิบและผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในประเทศ

เก็บตัวอย่างในแต่ละขั้นตอนการผลิต ตั้งแต่จากแปลงเกษตรกรไปจนตลอดกระบวนการผลิตนำตัวอย่างมาตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราและตรวจการปนเปื้อนสารพิษโดยวิธี ELISA และ HPLC ตามวิธีในข้อ 2

5. การบันทึกข้อมูล

รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลการปนเปื้อนเมล็ดกาแฟและผลิตภัณฑ์โดยแยกระหว่างตัวอย่างเมล็ดและผลิตภัณฑ์กาแฟที่ผลิตในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ตามวัตถุประสงค์

การทดลองที่ 2.5 ศึกษาควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลองุ่นบริโภคสดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากองุ่น

ระยะเวลาเริ่มต้น-สิ้นสุด ปี 58-59

1. ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อรา และสารพิษจากเชื้อราในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากองุ่น

เก็บตัวอย่างลูกเกด (ชนิดบรรจุแบบกล่องและตักแบ่งขาย) น้ำองุ่น และไวน์ ที่วางจำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานคร จากซุปเปอร์มาร์เก็ตและตลาดทั่วไป โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเดือน มกราคม-มีนาคม 2558 รวมทั้งหมด 45 ตัวอย่าง แบ่งเป็น ลูกเกด 24 ตัวอย่าง (ชนิดสีดำและสีเหลือง) ทั้งที่นำเข้าจากต่างประเทศแต่นำมาบรรจุลงกล่องในประเทศไทยหรือตักแบ่งขายในตลาด และชนิดบรรจุลงกล่องจากต่างประเทศแล้ว ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 500 -1000 กรัม แล้วแต่ขนาดบรรจุหีบห่อ น้ำองุ่น 7 ตัวอย่าง และไวน์ 14 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ๆละ 750 -1000 มิลลิลิตรเพื่อใช้ตรวจการปนเปื้อนของเชื้อรา และสารโอคราทอกซิน เอ

1.1 การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในลูกเกดด้วยวิธี Direct plate count

สุ่มตัวอย่างลูกเกด ทั้ง 24 ตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำ ๆละ 100 เมล็ดมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา potato dextrose agar (PDA) จำนวน 5 เมล็ด/จานเลี้ยงเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วันตรวจนับเชื้อราที่ปนเปื้อน (%)

$$\text{การปนเปื้อนเชื้อรา (\%)} = \frac{\text{จำนวนลูกเกดที่ปนเปื้อนเชื้อรา}}{\text{จำนวนลูกเกดทั้งหมด}} \times 100$$

บันทึกลักษณะของเชื้อราและจำแนกชนิดของเชื้อราที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากองุ่น โดยการดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteritics) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic characters) และกล้องสเตอริโอ (stereo microscpoe)

1.2 การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในน้ำองุ่น และไวน์ ด้วยวิธี Dilution plate count

นำน้ำองุ่น 7 ตัวอย่าง และไวน์ 14 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ มาตรวจการปนเปื้อนด้วยวิธี dilution plate count โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำองุ่นและไวน์เป็นความเข้นข้นเริ่มต้น และนำมาเจือจาง (น้ำองุ่นหรือไวน์ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร) ดูดตัวอย่างจำนวน 100 ไมโครลิตรหยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล (sterile spreader) ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกผลตรวจนับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร PDA โดยนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี นำไปคำนวณหาจำนวนเชื้อที่มีอยู่ในตัวอย่างเป็น CFU/มิลลิลิตร

การคำนวณปริมาณจุลินทรีย์

$$\text{ปริมาณจุลินทรีย์ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (โคโลนี)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่ขึ้นใน plate (โคโลนี)}}{\text{ระดับความเจือจาง}}$$

2.ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากองุ่น โดยวิธี Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

2.1 การเตรียมตัวอย่างและสกัดสารโอคราทอกซิน เอ จากตัวอย่าง

- ลูกเกด25 กรัม เติมสารเมทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดและผสมคลุกเคล้าให้เป็นเนื้อเดียวกันใส่ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyerflask) ขนาด 250 มิลลิลิตร(อัตราส่วน 1:4) ปิดปากขวดด้วยจุกยางแล้วนำขวดแก้วไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อัตราความเร็ว 300 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ให้ตกตะกอน แล้วนำส่วนที่ใสมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ส่วนที่กรองได้นำไปตรวจสารโอคราทอกซิน เอ

- น้ำองุ่นและไวน์ 25 มิลลิลิตร เติมสารเมทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ผสมคลุกเคล้าให้เป็นเนื้อเดียวกันใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร(อัตราส่วน 1:4) ปิดปากขวดด้วยจุกยางแล้วนำขวดแก้วไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อัตราความเร็ว 300 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ให้ตกตะกอน แล้วนำส่วนที่ใสมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ส่วนที่กรองได้นำไปตรวจสารโอคราทอกซิน เอ

2.2 การวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ด้วยวิธี ELISA โดยชุดทดสอบสำเร็จรูป Veratox® NEOGEN (USA) ใช้หลุมทดสอบชนิด 48 หลุม/เพลท ที่เคลือบด้วยแอนตีซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ

- หยดสารพิษมาตรฐานโอคราทอกซิน เอ 100 ไมโครลิตรลงไปในหลุมผสมสารระดับความเข้มข้น คือ 0 0.5 1.25 2.5 และ 6.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และหยดสารสกัดตัวอย่าง ลงในหลุมถัดไป 100 ไมโครลิตร

- หยดเอ็นไซม์คอนจูเกต 100 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมผสมสารทุกหลุม ผสมให้เข้ากัน ดูดสารที่ผสมแล้ว 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ บ่มไวในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที ล้างหลุมทดสอบ 3 ครั้ง ด้วย 0.01M phosphate buffer saline-tween 20 (PBS-T) ซับให้แห้ง

- หยดซับเสตรท (substrate) 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารหยุดปฏิกิริยา (stopping solution) 100 ไมโครลิตร อ่านค่าความเข้มสี และปริมาณสารโอคราทอกซิน เอด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader (Sunrise ของ Tecan) ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณเป็นปริมาณสารพิษมีหน่วยเป็นไมโครกรัม/กิโลกรัม (พีพีบี) ปฏิกิริยาจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเมื่อมีสารพิษน้อยและเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อปริมาณสารพิษเพิ่มมากขึ้น

3. ทดสอบการสร้างสารโอคราทอกซิน เอ ของเชื้อราที่ปนเปื้อนในลูกเกด บนอาหารเหลว yeast extract sucrose (YES medium)

นำเชื้อราที่ปนเปื้อนจากข้อ 1.1 มาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เพื่อทดสอบการสร้างสารพิษของเชื้อราในอาหารเหลว YES medium โดยนำเชื้อราที่ปนเปื้อนเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 5 วัน มาทำสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดสปอร์แขวนลอย 10 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลว YES medium 9 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบกำหนดเวลา ดูดอาหารเหลวที่มีเชื้อราไปตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ความเร็วรอบ 15,000 rpm นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปตรวจสารโอคราทอกซิน เอ โดยวิธี ELISA

4. ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อรา และสารพิษจากเชื้อราจากองุ่นผลสดในแปลงปลูก

เก็บตัวอย่างองุ่นสายพันธุ์แบล็คโอปอล จากแปลงปลูก จำนวน 3สวน ที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี 2 สวน ที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 1 สวน ในเดือน สิงหาคม 2558 และเก็บตัวอย่างองุ่นสายพันธุ์ชีราส ที่อำเภอภูเรือ จังหวัดเลย จำนวน 1 สวน ในเดือน มกราคม 2559 เก็บผลองุ่น 4 ระยะการเจริญเติบโต ระยะที่ 1 หลังการติดผล 30-40 วัน ระยะที่ 2 หลังการติดผล 60-70 วัน ระยะที่ 3 หลังการติดผล 90-100 วัน และระยะที่ 4 หลังการติดผล 120 วัน โดยในทุกระยะการเจริญเติบโตเก็บตัวอย่างละ 5 ซ้ำ ๆ 1 กิโลกรัม เพื่อใช้ตรวจการปนเปื้อนของเชื้อรา และสารโอคราทอกซิน เอ

4.1 ตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในองุ่นผลสดด้วยวิธี Direct plate count

แต่ละตัวอย่างจะทำการสุ่มผลองุ่นจำนวน 5 ช่อ ๆละ 20 ผล มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA จำนวน 5ผล/จานเลี้ยงเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วันตรวจนับเชื้อราที่ปนเปื้อน(%)

$$\text{การปนเปื้อนเชื้อรา (\%)} = \frac{\text{จำนวนผลองุ่นที่ปนเปื้อนเชื้อรา}}{\text{จำนวนผลองุ่นทั้งหมด}} \times 100$$

บันทึกลักษณะของเชื้อราและจำแนกชนิดของเชื้อราที่ปนเปื้อนในผลองุ่น โดยการดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.2 ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ ในองุ่นผลสดใน**แปลงปลูก**โดยวิธี ELISA

4.2.1 การเตรียมตัวอย่างและสกัดสารโอคราทอกซินจากตัวอย่าง โดยชั่งองุ่นผลสด 25 กรัม เติมสารเมทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดและผสมคลุกเคล้าให้เป็นเนื้อเดียวกันใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร(อัตราส่วน 1:4) ปิดปากขวดด้วยจุกยางแล้วนำขวดแก้วไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อัตราความเร็ว 300 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ให้ตกตะกอนแล้วนำส่วนที่ใสมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ส่วนที่กรองได้นำไปตรวจสารโอคราทอกซิน เอ

4.2.2 การวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ด้วยวิธี ELISA โดยชุดทดสอบสำเร็จรูป Veratox® NEOGEN (USA) ใช้หลุมทดสอบชนิด 48 หลุม/เพลท ที่เคลือบด้วยแอนตีซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ ตามขั้นตอนในข้อ 2.2

5.การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในสภาพแวดล้อมจากแปลงปลูก

5.1 การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในดิน บริเวณแปลงปลูก ด้วยวิธี Dilution plate count

การสุ่มเก็บตัวอย่างดินจะสุ่มในบริเวณรอบ ๆที่เก็บตัวอย่างองุ่น โดยขุดเฉพาะผิวหน้าดินเนื่องจากต้องการดูการปนเปื้อนที่ผิวดิน โดย 1 จุดขุด 5 ตำแหน่ง นำมาผสมรวมกันในถุงพลาสติกให้ได้น้ำหนัก 500 กรัม นำมาตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในดิน ด้วยวิธี dilution plate count (ตัวอย่างดินจำนวน 1 กรัม ต่อน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร) ดูดตัวอย่างจำนวน 100 ไมโครลิตรหยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DG18 เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกผลตรวจนับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร DG18 โดยนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี นำไปคำนวณหาจำนวนเชื้อที่มีอยู่ในตัวอย่างเป็น CFU/มิลลิลิตร

การคำนวณปริมาณจุลินทรีย์

$$\text{ปริมาณจุลินทรีย์ต่อตัวอย่าง 1 กรัม (โคโลนี)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่ขึ้นใน plate (โคโลนี)}}{\text{ระดับความเจือจาง}}$$

5.2 การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในอากาศ บริเวณแปลงปลูก

การตรวจเชื้อปนเปื้อนในอากาศจะเก็บบริเวณแปลงองุ่น โดยเปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ DG 18 ไว้บริเวณต้นองุ่นที่เก็บตัวอย่าง นาน 30 นาที และเดินรอบแปลงที่ทำการเก็บองุ่น โดยเดินต้านลมเปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อถือเดินรอบแปลง ในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของผลองุ่น ทั้ง 4 ระยะจำนวน 10 ซ้ำ เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับเชื้อราที่ปนเปื้อน

6. ประเมินเข้าทำลายของเชื้อราปนเปื้อน และปริมาณสารโอคราทอกซิน เอในแต่ละขั้นตอนการผลิต

6.1 วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารโอคราทอกซิน เอ ในขั้นตอนการผลิต

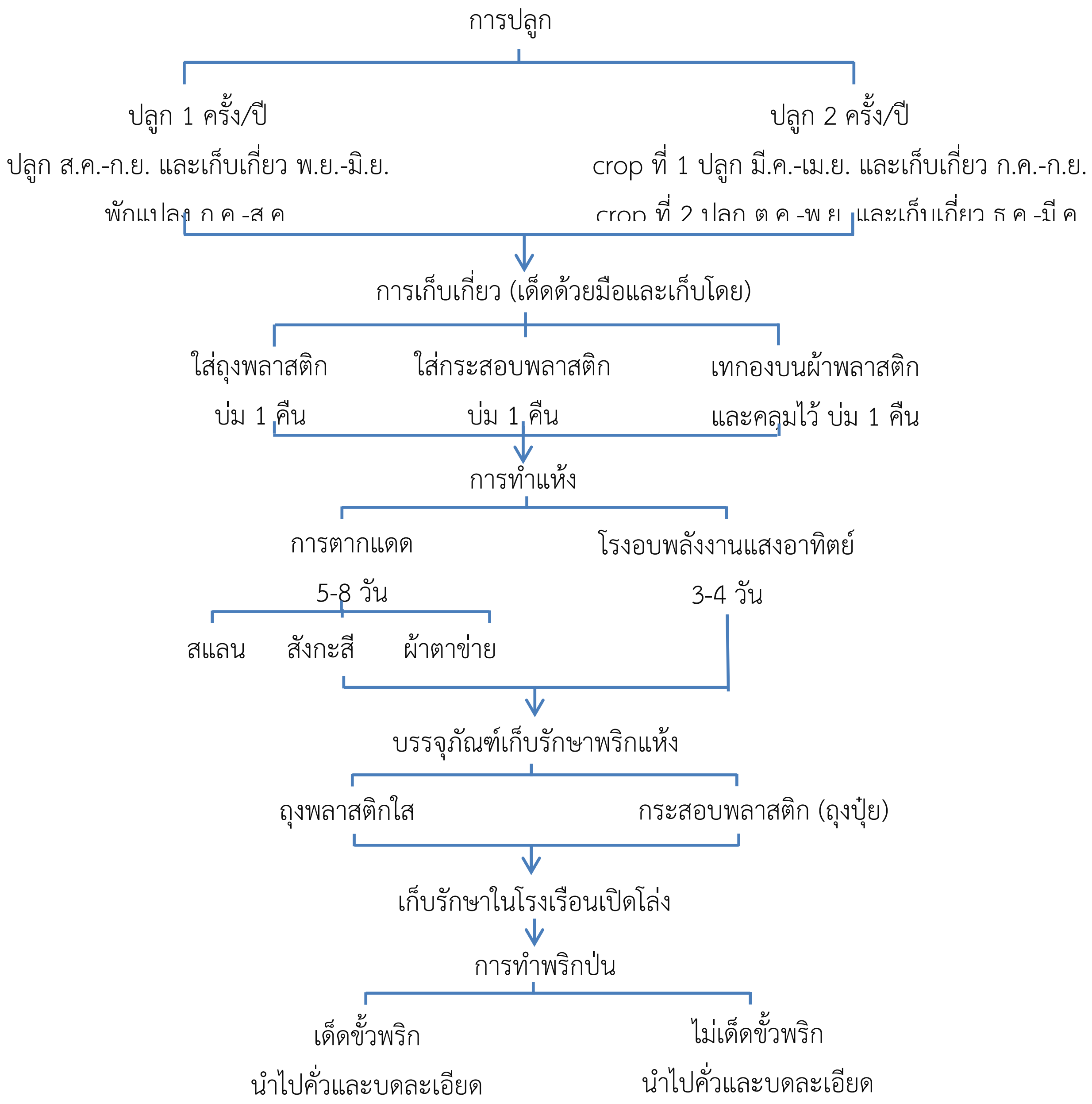
6.2 หาแนวทางการแก้ไขการปนเปื้อนของเชื้อราและสารโอคราทอกซิน เอ ในขั้นตอนการผลิต

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การทดลองที่ 2.1 แนวทางการควบคุมการปนเปื้อนและการลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในพริก

1. ข้อมูลการผลิตและการแปรรูปพริกแห้งและพริกป่น

จากการสำรวจขั้นตอนการผลิตพริกแห้งและพริกป่น ในพื้นที่ทั้ง 3 จังหวัด พบว่ามีการปลูก 2 แบบ คือ ปลูกปีละ 1 ครั้ง โดยมีการพักแปลงประมาณ 2 เดือน และปลูกปีละ 2 ครั้ง โดยไม่มีการพักแปลง ซึ่งมีรายละเอียดขั้นตอนตามที่แสดงใน ภาพที่ 5


การปลูก
ปลูก 1 ครั้ง/ปี
ปลูก ส.ค.-ก.ย. และเก็บเกี่ยว พ.ย.-มิ.ย.
พักแปลง ก.ค.-ส.ค.
ปลูก 2 ครั้ง/ปี
crop ที่ 1 ปลูก มี.ค.-เม.ย. และเก็บเกี่ยว ก.ค.-ก.ย.
crop ที่ 2 ปลูก ต.ค.-พ.ย. และเก็บเกี่ยว ธ.ค.-มี.ค.
การเก็บเกี่ยว (เด็ดด้วยมือและเก็บโดย)
ใส่ถุงพลาสติก
บ่ม 1 คืน
ใส่กระสอบพลาสติก
บ่ม 1 คืน
เทกองบนผ้าพลาสติก
และคลุมไว้ บ่ม 1 คืน
การทำแห้ง
การตากแดด
5-8 วัน
สแลน
สังกะสี
ผ้าตาข่าย
โรงอบพลังงานแสงอาทิตย์
3-4 วัน
บรรจุภัณฑ์เก็บรักษาพริกแห้ง
ถุงพลาสติกใส
กระสอบพลาสติก (ถุงปุ๋ย)
เก็บรักษาในโรงเรือนเปิดโล่ง
การทำพริกป่น
เด็ดขั้วพริก
นำไปคั่วและบดละเอียด
ไม่เด็ดขั้วพริก
นำไปคั่วและบดละเอียด

ภาพที่ 5 แผนผังสรุปขั้นตอนการผลิตพริกแห้งและพริกป่นของเกษตรกร 3 พื้นที่ (จังหวัดนครราชสีมา, อุบลราชธานี และ ชัยภูมิ)

1.1 การปลูกมี 2 แบบ คือ

1. ปลูก 1 ครั้งต่อปี โดยเริ่มปลูก เดือนสิงหาคม-กันยายน และเก็บเกี่ยวผลผลิตในช่วงพฤศจิกายน-มิถุนายน และพักแปลงช่วงเดือน สิงหาคม-กันยายน
2. ปลูก 2 ครั้งต่อปี โดยช่วงที่ 1 เริ่มปลูกประมาณเดือนมีนาคม-เมษายน และเก็บเกี่ยวกรกฎาคม-กันยายน ช่วงที่ 2 เริ่มปลูกประมาณเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน และเก็บเกี่ยวธันวาคม-มีนาคม

1.2 การเก็บเกี่ยว ใช้แรงงานคนเด็ดด้วยมือ และมีการบ่มทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้พริกมีสีแดงสม่ำเสมอกัน โดย

- ใส่ถุงพลาสติกใส บ่มทิ้งไว้ 1 คืน
- ใส่ในกระสอบพลาสติก บ่มทิ้งไว้ 1 คืน
- เทกองแล้วนำผ้าพลาสติกมาคลุม บ่มไว้ 1 คืน

1.3 การตากแห้ง มี 2 วิธี คือ

- การตากแดด โดยตากบนผ้าสแลน สังกะสี หรือผ้าตาข่ายพลาสติกวางบนพื้นดิน เป็นระยะเวลา 5-8 วัน
- การอบด้วยโรงอบพลังงานแสงอาทิตย์ เป็นระยะเวลา 3-4 วัน

1.4 การเก็บรักษา บรรจุในถุงพลาสติกใส หรือกระสอบพลาสติก และเก็บไว้ในโรงเรือน

1.5 การทำพริกป่น มี 2 แบบ คือ

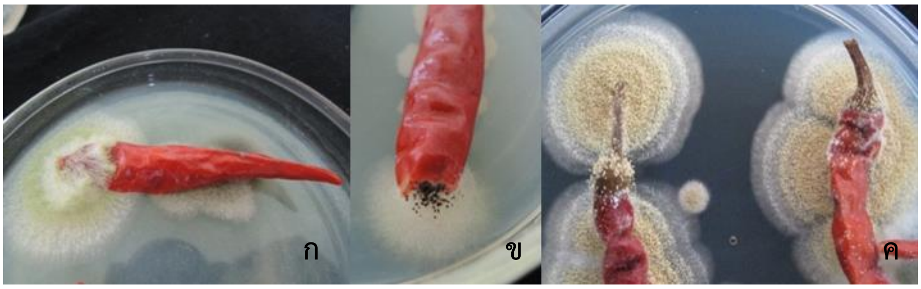
- เด็ดขั้ว แล้วนำมาคั่วและบดละเอียด
- ไม่เด็ดขั้ว แล้วนำมาคั่วและบดละเอียด

1.6 บรรจุภัณฑ์พริกป่น ใส่ในถุงพลาสติก มัดด้วยหนังยาง

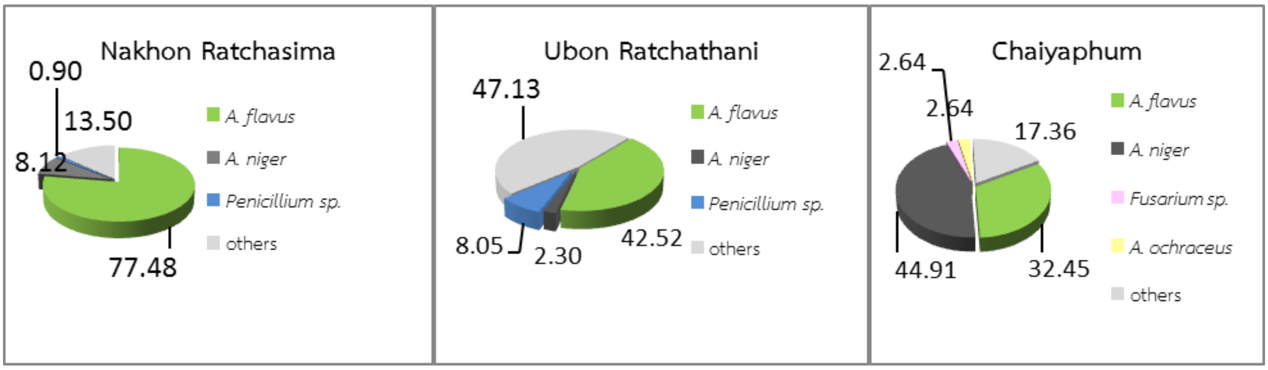
ในขั้นตอนการผลิตพริกแห้งและพริกป่นพบว่า ขั้นตอนที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus* sp. ซึ่งเป็นเชื้อรากลุ่มที่สร้างสารพิษ คือ ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและบ่มทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้พริกมีสีแดงสม่ำเสมอกันนั้น อาจทำให้เชื้อราที่ปนเปื้อนมาจากแปลงเข้าไปทำลายพริกบริเวณที่เกิดรอยแผลจากการเก็บเกี่ยวได้ และในขั้นตอนการตากแห้งโดยการตากบนสแลน หรือผ้าตาข่ายพลาสติกที่วางบนพื้นดิน เป็นอีกหนึ่งจุดเสี่ยงที่อาจเกิดการปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus* sp. จากดิน และความชื้นที่อยู่ในดิน เนื่องจากในการตากแดดต้องอาศัยความร้อนจากธรรมชาติในช่วงกลางวัน แต่ในช่วงกลางคืนที่มีอากาศเย็นลง ความชื้นในอากาศเพิ่มมากขึ้น ทำให้เชื้อราสามารถสร้างสารพิษได้ ในขั้นตอนการทำพริกป่น การเด็ดขั้วก่อนการนำมาคั่วและบด ถ้ามีการคัดเมล็ดพริกที่เน่าเสียออกก่อนช่วยเพิ่มความปลอดภัยในการนำไปทำพริกป่น แต่ในส่วนที่ไม่เด็ดขั้ว พริกที่นำมาทำพริกป่นไม่มีการคัดเลือกก่อนอาจเป็นจุดเสี่ยงที่ทำให้มีการปนเปื้อน สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2548) ได้กำหนดแนวทางการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับพริก โดยแนะนำขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวดังนี้ เก็บเกี่ยวผลิตผลทั้งก้านอย่างระมัดระวัง ไม่ทำให้ผลิตผลเสียหาย และให้นำพริกเข้าที่ร่ม หรือพักในที่มีการระบายอากาศดี และไม่วางสุมทับซ้อน เพราะจะทำให้เกิดการเน่าเสียได้ การปฏิบัติหลังเก็บเกี่ยวพริก ควรดูแลสุขลักษณะของการเก็บเกี่ยวและการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยว ไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อนจากวัตถุอันตรายที่ส่งผลต่อความปลอดภัยในการบริโภค และคัดแยกพริกที่มีตำหนิหรือด้อยคุณภาพออก

2. การปนเปื้อนของเชื้อราและสารโอคราทอกซิน เอ ในพริก

2.1 ผลทดสอบการปนเปื้อนเชื้อราที่สร้างสารพิษในตัวอย่างพริกแห้งโดยวิธี direct plate count พบว่า ตัวอย่างพริกแห้ง อ.ขามสะแกแสง จ.นครราชสีมา จำนวน 33 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus flavus* มากที่สุด 77.48% รองลงมาคือเชื้อรา *A. niger* พบการปนเปื้อน 8.12% และพบเชื้อราในกลุ่มที่ไม่สร้างสารพิษ 13.51% เช่น *Curvularia* sp. และ *Rhizopus* sp. เป็นต้น ตัวอย่างพริกแห้ง จำนวน 17 ตัวอย่าง จาก อ.ม่วงสามสิบ จ.อุบลราชธานี พบการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* 42.52 และ 2.30% ตามลำดับ แต่ตัวอย่างพริกแห้งจาก อ.จัตุรัส จ.ชัยภูมิ จำนวน 37 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อรา *A. niger* มากที่สุด 44.91% รองลงมาคือเชื้อรา *A. flavus* 32.45% และยังพบการปนเปื้อนเชื้อรา *A. ochraceus* 2.64% (ภาพที่ 6) จากตัวอย่างพริกแห้งจากทั้ง 3 พื้นที่ พบว่า จ.ชัยภูมิ ตัวอย่างมีการปนเปื้อนเชื้อรา *A. niger* มากที่สุด และยังพบเชื้อรา *A. ochraceus* ด้วย (ภาพที่ 7) ซึ่งเชื้อรา *A. niger* และ *A. ochraceus* เป็นเชื้อราที่มีการรายงานว่าสร้างสารโอคราทอกซิน เอ โดยเชื้อรา *Aspergillus* และ *Penicillium* บางสปีชีส์ สร้างสารโอคราทอกซิน เอ ในพืชอาหารหลากหลายชนิด *Aspergillus* เป็นเชื้อรากลุ่มหลักที่มีรายงานว่าสร้างสารพิษในเขตร้อนชื้น ในขณะที่ *Penicillium* มักจะพบในเขตหนาว โดยเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* ส่วนใหญ่ที่สร้างสารพิษโอคราทอกซิน เอ จัดอยู่ใน section: *Circumdati* คือ *A. ochraceus* และ section: *Nigri* คือ *A. carbonarius* และ *A. niger* (Wang *et al.,* 2016) เช่นเดียวกับรายงานของ Jeswal and Kumar (2015) ที่ทำการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อราที่สร้างสาร aflatoxin (AFs) ochratoxin A (OTA) และ citrinin (CTN) ในเครื่องเทศของอินเดีย 9 ชนิด (red chilli, black pepper, turmeric, coriander, cumin, fennel, caraway, fenugreek and dried ginger) พบว่า *Aspergillus flavus* and *A. niger* เป็นเชื้อราที่พบการปนเปื้อนมากที่สุดในทุกชนิดของเครื่องเทศ โดยตัวอย่างพริกมีการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินมากถึง 85.4% รองลงมาคือ ขิงแห้ง 77.7% ซึ่ง 56% ของ *A. flavus* ที่ปนเปื้อนในพริก และ 45% ของ *A. ochraceus* ที่พบในพริกไทยดำ สามารถสร้างสารพิษแอฟลาทอกซิน และโอคราทอกซิน เอ ตามลำดับ



ภาพที่ 6 เชื้อรากลุ่มที่สร้างสารพิษที่พบปนเปื้อนในพริกแห้ง (ก) Aspergillus flavus and (ข) A. niger (ค) A. ochraceus



ภาพที่ 7 กราฟแสดงเปอร์เซ็นการปนเปื้อนเชื้อรากลุ่มที่สร้างสารพิษในพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่าง

2.2 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในพริกแห้งใน 3 พื้นที่ พื้นที่แรก อ.ขามสะแกแสง จ.นครราชสีมา พบว่าจากตัวอย่างพริกแห้งจำนวน 33 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ไม่เกินค่ามาตรฐานที่สหภาพยุโรปได้กำหนดไว้ 15 µg/kg โดยพบการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ปริมาณ 0.1-9.8 µg/kg จำนวน 8 ตัวอย่าง คิดเป็น 24.24% จากตัวอย่างทั้งหมดในพื้นที่ และไม่พบการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ จำนวน 25 ตัวอย่าง คิดเป็น 75.76% จากตัวอย่างทั้งหมดในพื้นที่ ตัวอย่างพริกแห้งที่พบการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ สูงสุด เท่ากับ 9.8 µg/kg ทั้ง 33 ตัวอย่างมีปริมาณน้ำอิสระ 0.64-0.68 (ตารางที่ 1) ผลการเก็บข้อมูลพื้นที่ที่ 2 อ.ม่วงสามสิบ จ.อุบลราชธานี พบว่าจากตัวอย่างพริกแห้งจำนวน 17 ตัวอย่าง มีปริมาณน้ำอิสระ 0.62-0.65 พบการปนเปื้อนสารโอคราทอกซินเอ จำนวน 8 ตัวอย่าง ปริมาณ 0.5-4.0 µg/kg คิดเป็น 47.06% จากตัวอย่างทั้งหมดในพื้นที่ และไม่พบการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ จำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็น 52.94% จากตัวอย่างทั้งหมดในพื้นที่ โดยตัวอย่างพริกแห้งที่พบการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ สูงสุด เท่ากับ 4.0 µg/kg (ตารางที่ 1)

พื้นที่ที่ 3 อ.จัตุรัส จ.ชัยภูมิ จากการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ จำนวน 37 ตัวอย่างพบว่า พริกแห้งมีปริมาณน้ำอิสระ 0.54-0.72 มีการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ จำนวน 26 ตัวอย่าง คิดเป็น 70.27% ของตัวอย่างทั้งหมดในพื้นที่ พบการปนเปื้อนปริมาณ 0.1-5.7 µg/kg โดยมี 1 ตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ สูงถึง 65.0 µg/kg และไม่พบการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ จำนวน 11 ตัวอย่าง คิดเป็น 29.73% ของตัวอย่างทั้งหมดในพื้นที่ (ตารางที่ 1)

จากภาพรวมการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในพริกแห้งทั้ง 3 พื้นที่ จำนวน 87 ตัวอย่าง พบว่า มีการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ปริมาณ 0.1-65.0 µg/kg ซึ่งคิดเป็น 48.28% แต่มีเพียงตัวอย่างเดียวจาก จ.ชัยภูมิ ที่พบสารโอคราทอกซิน เอ เกินมาตรฐานที่กำหนด เนื่องจากเมื่อตากพริกบนผ้าสแลนจนแห้งแล้ว จะนำมาคัดแยกใส่ถุงพลาสติกสำหรับรอการจำหน่าย แต่พริกส่วนที่ยังไม่ได้คัดจะม้วนใส่ผ้าสแลนห่อไว้ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เกิดความร้อน รวมทั้งความชื้นในอากาศ ทำให้พริกที่มีการปนเปื้อนเชื้อราสามารถสร้างสารพิษเพิ่มขึ้น และจากข้อมูลการปนเปื้อนเชื้อรายังพบว่าเป็นพื้นที่ที่พบการปนเปื้อนรา *A. niger* และ

A. ochraceus มากที่สุด 44.91 และ 2.64% ตามลำดับ และมีปริมาณน้ำอิสระในตัวอย่างที่ค่อนข้างสูง 0.72 เมื่อเทียบกับพริกแห้งในพื้นที่อื่น สำหรับการทำพริกแห้งโดยการตากแดดจะมีปริมาณน้ำอิสระ 0.55-0.72 และการทำแห้งโดยโรงอบพลังงานแสงอาทิตย์จะมีปริมาณน้ำอิสระต่ำกว่า อยู่ระหว่าง 0.54-0.69 ซึ่งงานวิจัยของ Jalili and Jinap (2012) รายงานว่าจากการตรวจสอบการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน และโอคราทอกซิน เอ ในพริกแห้งประเทศมาเลเซีย พบการปนเปื้อนแอฟลาทอกซิน 65 เปอร์เซ็นต์ และพบการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ปริมาณ 0.2-101.2 ng/g คิดเป็น 81.25% โดยพบว่าตัวอย่างพริกแห้งจากตลาดจะพบปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ สูงกว่าพริกแห้งจากซูเปอร์มาเก็ต

ตารางที่ 1 ปริมาณน้ำอิสระ เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนสารพิษโอคราทอกซิน เอ และ ปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ของตัวอย่างพริกแห้งที่พบการปนเปื้อนในแต่ละพื้นที่ที่ทำการทดสอบ

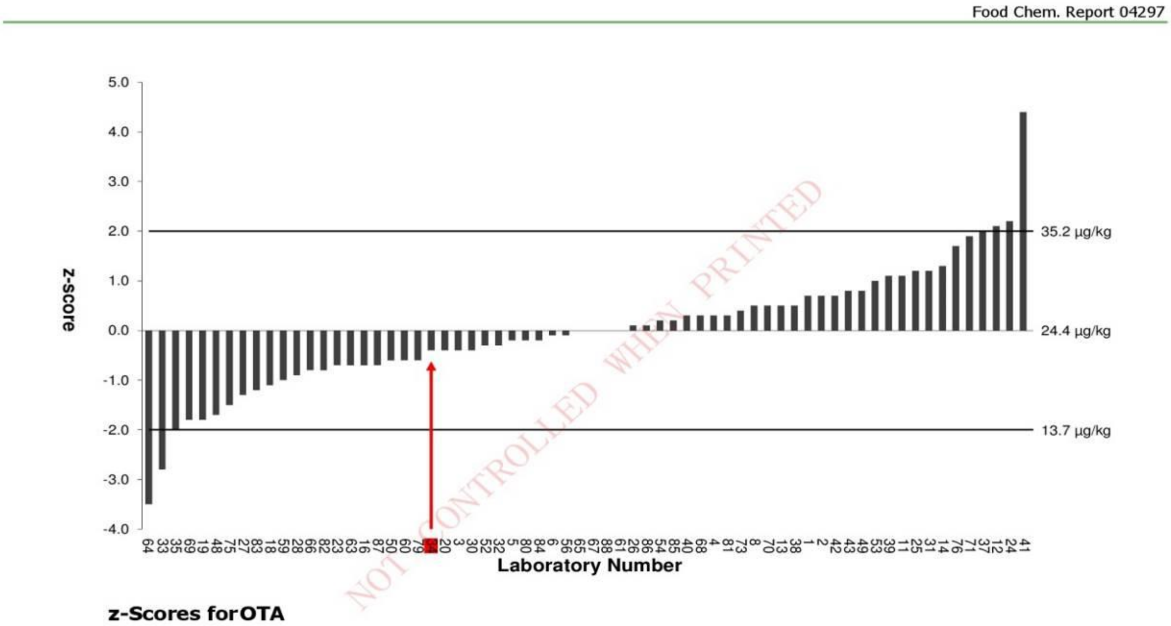
พื้นที่เก็บตัวอย่าง	**จำนวนตัวอย่าง**	**ปริมาณน้ำอิสระ** (a_w)	**จำนวนตัวอย่างที่พบสารพิษ** OTA **(ตัวอย่าง)**		**เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน** OTA	**ปริมาณการปนเปื้อน** OTA **(µg/kg)**
1. อ.ขามสะแกแสง	33	0.64-0.68	พบ	8	24.24	0.1-9.8
จ.นคราชสีมา			ไม่พบ	25	75.76	-
2. อ.ม่วงสามสิบ	17	0.62-0.65	พบ	8	47.06	0.5-4.0
จ.อุบลราชธานี			ไม่พบ	9	52.94	-
3. อ.จัตุรัส	37	0.54-0.72	พบ	26	70.27	0.1-65.0
จ.ชัยภูมิ			ไม่พบ	11	29.73	-
รวม	**87**		**พบ**	**42**	**48.28**	**0.1-65.0**
			ไม่พบ	**45**	**51.72**	**-**

นอกจากนี้ได้มีการเก็บตัวอย่างพริกป่นในพื้นที่ อ.ขามสะแกแสง จ.นครราชสีมา จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ปริมาณ 0.7-3.5 µg/kg ซึ่งไม่เกินค่ามาตรฐานที่สหภาพยุโรปกำหนด มีปริมาณน้ำอิสระ 0.51-0.55 โดยตัวอย่างพริกป่นที่พบการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ สูงสุดเท่ากับ 3.5 µg/kg และวิเคราะห์พริกป่น จำนวน 2 ตัวอย่าง จากกลุ่มผู้ปลูกพริกปลอดภัย จ.ชัยภูมิ พบการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ 0.8 และ 1.9 µg/kg มีปริมาณน้ำอิสระ 0.35 และ 0.37 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณน้ำอิสระ เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนสารพิษโอคราทอกซิน เอ และ ปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ของตัวอย่างพริกป่นที่พบการปนเปื้อนในแต่ละพื้นที่ที่ทำการทดสอบ

พื้นที่เก็บตัวอย่าง	**จำนวนตัวอย่าง**	**ปริมาณน้ำอิสระ (a_w)**	**จำนวนตัวอย่างที่พบสารพิษ OTA (ตัวอย่าง)**		**เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน OTA**	**ปริมาณการปนเปื้อน OTA (µg/kg)**
1. อ.ขามสะแกแสง	10	0.51-0.55	พบ	10	100	0.7-3.5
จ.นครราชสีมา			ไม่พบ	-	-	-
2. อ.จัตุรัส	2	0.35, 0.37	พบ	2	100	0.8, 1.9
จ.ชัยภูมิ			ไม่พบ	-	-	-
รวม	**12**		**พบ**	**12**	**100**	**0.7-3.5**
			ไม่พบ	**-**	**-**	**-**

2.3 ผลการทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (proficiency testing) ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วม ลำดับที่ 34 ในการตรวจวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ด้วยวิธีการ fluorometry กับตัวอย่างอ้างอิง (chilli powder 04297 FAPAS®) พบว่า สารโอคราทอกซิน เอ ที่ตรวจวิเคราะห์ได้จากห้องปฏิบัติการมีปริมาณ 22.1 µg/kg ซึ่งค่าที่กำหนดหรือค่าอ้างอิงคือ 24.4 µg/kg ทำให้ค่า Z-Score ที่ได้อยู่ในช่วง $-2 \leq z \leq 2$ เป็นค่าที่ยอมรับได้ (ภาพที่ 8) Thompson *et al.* (2006) รายงานว่าประมาณ 95% ของค่า Z-Score จะอยู่ในช่วงระหว่าง -2 และ +2 ซึ่งเครื่องหมาย (- หรือ +) จะเป็นค่าที่ชี้ให้เห็นถึงข้อผิดพลาดว่าผลที่ได้เป็น negative หรือ positive error โดยค่าที่อยู่ในช่วงจะแสดงว่าผลนั้นยอมรับได้หรือเป็นที่น่าพอใจ



ภาพที่ 8 กราฟแสดงผลการตรวจวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ โดยวิธี fluorometry ของห้องปฏิบัติการ (Lab. no.34) พบว่าผลยอมรับได้อยู่ในช่วงค่า z-score ของ FAPAS® proficiency test

3. การลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในพริก

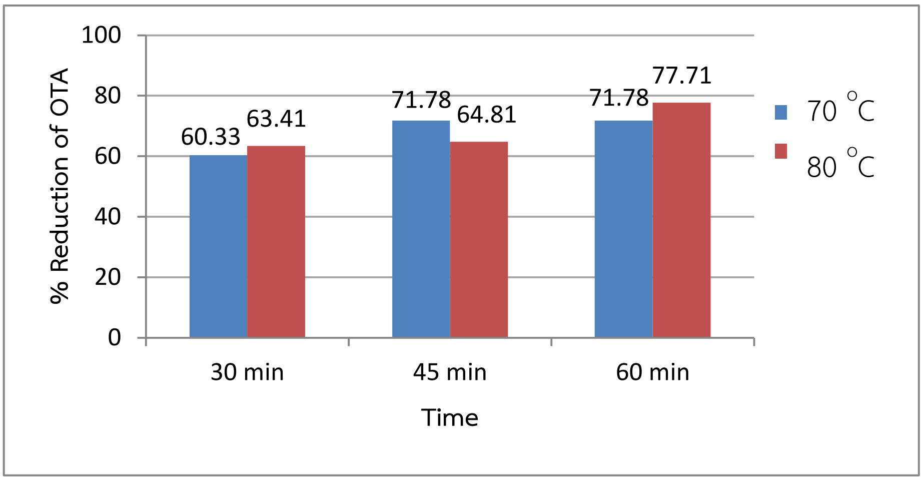
ทดสอบวิธีการลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในพริกแห้งด้วยตู้อบลมร้อนพบว่า การอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 30, 45 และ 60 นาที มีปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยการอบด้วยลมร้อนทั้ง 2 อุณหภูมิ นาน 30, 45 และ 60 นาที มีปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ เฉลี่ย 0.87, 0.72 และ 0.58 µg/kg ตามลำดับ แต่ทำให้สารพิษโอคราทอกซินลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (พริกแห้งไม่ผ่านการให้ความร้อน) ที่พบว่ามีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ เฉลี่ย 2.28 µg/kg (ตารางที่ 3) เปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ จากชุดควบคุมพบว่า การอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ จากชุดควบคุมได้มากที่สุด 77.71% (ภาพที่ 9) ซึ่งพริกที่ได้ค่อนข้างจะแห้งกรอบแตกหักได้ง่าย สารโอคราทอกซิน เอ มีความคงตัวในความร้อน การลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในข้าวสาลีแห้งลง 50 เปอร์เซ็นต์ ต้องใช้เวลามากกว่า 10 ชั่วโมง (700 นาที) และ 200 นาที ที่อุณหภูมิ 100 และ 150 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Varga *et al.*, 2016; Boudra *et al.*, 1995)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ที่ผ่านการอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 และ 80oC

กรรมวิธี	อุณหภูมิ (°C)		ค่าเฉลี่ยปริมาณ OTA(1) (µg/kg)
	70	80	
	ปริมาณ OTA (µg/kg)	ปริมาณ OTA (µg/kg)	
อบด้วยลมร้อน นาน 30 นาที	0.96	0.78	0.87 a
อบด้วยลมร้อน นาน 45 นาที	0.68	0.75	0.72 a
อบด้วยลมร้อน นาน 60 นาที	0.68	0.48	0.58 a
ไม่ผ่านการอบด้วยลมร้อน (ชุดควบคุม)	2.42	2.14	2.28 b
ค่าเฉลี่ย	1.18 a	1.04 a	1.11

cv = 37.9%

(1) Mean in a column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT



ภาพที่ 9 กราฟเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในตัวอย่างพริกแห้งที่ผ่านกรรมวิธีอบด้วยตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 70 และ 80oC นาน 30, 45 และ 60 นาที

ค่าปริมาณน้ำอิสระที่วัดได้จากการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ทำให้พริกแห้งมีปริมาณน้ำอิสระเฉลี่ยน้อยที่สุด 0.35 รองลงมาคือ การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที มีปริมาณน้ำอิสระ 0.38 และในการอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที มีปริมาณน้ำอิสระเฉลี่ยเท่ากัน คือ 0.43 ค่า Water Activity เป็นปัจจัยที่สำคัญในการควบคุมและป้องกันการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์อาหาร จึงมีผลโดยตรงต่อการกำหนดอายุการเก็บรักษาของ

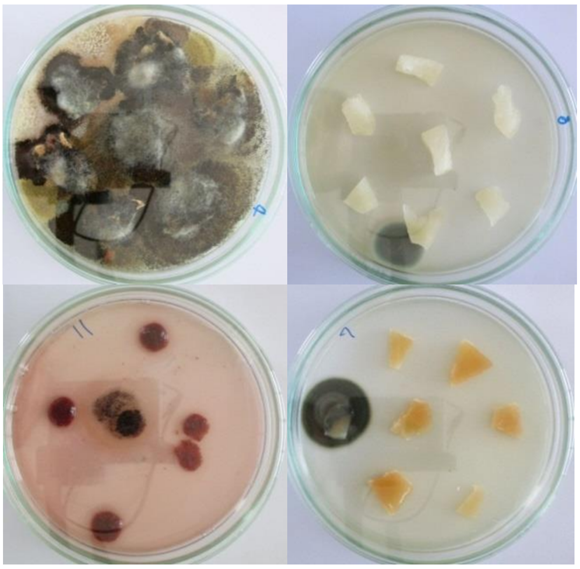
ผลิตภัณฑ์อาหาร เนื่องจากค่า Water Activity เป็นปัจจัยที่ชี้ระดับปริมาณน้ำต่ำสุดในอาหารที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ เราสามารถใช้ค่า Water Activity ในการควบคุมและป้องกันการเสื่อมเสียของอาหารที่เกิดขึ้นจากเชื้อจุลินทรีย์ได้ เพราะเชื้อจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตได้ภายใต้ค่า Water Activity ที่จำกัด โดยเราจะทำให้อาหารมีค่า Water Activity ต่ำกว่าที่เชื้อจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตได้ ตัวอย่างเช่น ราส่วนใหญ่จะไม่เจริญเติบโตที่ค่า Water Activity ต่ำกว่า 0.7 (ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว, 2546)

การทดลองที่ 2.2 ศึกษาแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนสารพิษ patulin ในผลิตผลและผลิตภัณฑ์เกษตร

จากการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในผลไม้แปรรูป 12 ชนิดผลิตภัณฑ์ รวม 338 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) พบการปนเปื้อนเชื้อรา 41 ตัวอย่าง โดยพบว่ามะตูมแห้งมีการปนเปื้อนเชื้อรามากที่สุดคือทุกตัวอย่างที่ทำการทดสอบ (28/28) โดยมีข้อสังเกตว่าใช้วิธีการแบ่งบรรจุเป็นถุงโดยใช้ภาชนะบรรจุคือถุงพลาสติกที่ผูกปากถุงด้วยยางวง แม้ว่าจะไม่พบการปนเปื้อนสารพิษ patulin แต่อาจมีความเสี่ยงที่จะปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราชนิดอื่น รองลงมาคือฝรั่งอบ (4/30) และมะละกออบแห้งและสับปะรดอบ (2/28) ขณะที่ ลูกพรุนไม่มีเมล็ดและมะม่วงอบ ไม่พบการปนเปื้อน

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณการปนเปื้อนเชื้อราในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ผลไม้แปรรูป

ลำดับ	ชนิดผลไม้แปรรูป	น้ำหนักสุทธิ	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนการปนเปื้อน
1	พุทราจีน - เม็ดเล็ก	228g	28	1
2	บ๊วยสามรส	60g	28	1
3	ฝรั่งอบ	60g	30	4
4	มะตูมแห้ง	118g	28	28
5	ลูกพรุนไม่มีเมล็ด	150g	28	0
6	มะละกอ 3 รส	40g	28	0
7	มะละกออบแห้ง	50g	28	2
8	สับปะรดอบ	60g	28	2
9	มะม่วงอบ	50g	28	0
10	พุทราเค็ม	40g	28	1
11	มะขามแก้ว	60g	28	1
12	มะม่วงแก้ว	40g	28	1
		รวม	338	41



ภาพที่ 1 การปนเปื้อนของเชื้อราในผลไม้แปรรูป

จากการเก็บตัวอย่างผลไม้สดนำเข้าจากด่านตรวจพืชเชียงแสน จังหวัดเชียงราย รวม 15 ชนิด จำนวน 192 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราด้วยวิธี Direct Plate Count Method ตรวจนับการปนเปื้อนของเชื้อราที่ปนเปื้อน และจำแนกเชื้อราที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ พบการปนเปื้อนเชื้อราในทุกตัวอย่าง แต่การจำแนกชนิดของเชื้อราและความสามารถในการสร้างสารพิษ patulin ในเชื้อราที่แยกได้ ไม่พบเชื้อราที่สร้างสารพิษ patulin

และจากการตรวจสอบการปนเปื้อนสารพิษ patulin ตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้และผลไม้แปรรูปรวมทั้งหมด 28 ตัวอย่าง โดยห้องปฏิบัติการ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) พบว่าไม่มีการปนเปื้อนสารพิษ patulin

ตารางที่ 1 ชนิดและจำนวนตัวอย่างผลไม้นำเข้า

ลำดับ	**ชนิดผลไม้**	**จำนวนตัวอย่าง**
1	ส้ม CK550/59 JPK	13
2	ส้ม CK547 JPK	14
3	ส้ม CK535 PA	12
4	ส้ม CK555 NORTH	14
5	ส้ม CK565 JPK	16
6	แอปเปิล CK502/59 NORTH	7
7	ทับทิม 524 D8	8
8	สาลี่ไข่ CK481/58	7
9	องุ่น 562	40
10	แอปเปิล ฟูจิ	8
11	แอปเปิล จีน	7
12	สาลี่	8
13	สาลี่ไข่	15
14	พลับ	8
15	ส้มจีน	15
	รวม	192

การทดลองที่ 2.3 การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษแอฟลาทอกซิน บี1 ในผลผลิตพริกไทย

1. ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราในพริกไทยพร้อมบริโภคและระหว่างกระบวนการผลิต

การปนเปื้อนของเชื้อราในตัวอย่างพริกไทยพร้อมบริโภคที่ได้จากแปลงเกษตรกร และร้านค้าต่าง ๆ รวม 174 ตัวอย่าง ได้แก่ พริกไทยขาวเม็ด 42 ตัวอย่าง พริกไทยขาวป่น 25 ตัวอย่าง พริกไทยดำเม็ด 90 ตัวอย่าง และพริกไทยดำป่น 17 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของเชื้อราในพริกไทยขาวเม็ดที่สุ่มเก็บจากเกษตรกร มีการปนเปื้อนของเชื้อรามากกว่าพริกไทยที่ซื้อจากร้านค้า เชื้อราที่พบได้แก่ *A. flavus* *A. niger*, *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp. โดยพบการปนเปื้อนของเชื้อราที่สร้างสารแอฟลาทอกซิน บี1 คือ *A. flavus* (Figure 1) ในพริกไทยขาวเม็ดจากเกษตรกรจำนวน 13.2% และไม่พบเชื้อรา *A. flavus* ในตัวอย่างพริกไทยขาวเม็ดจากร้านค้า ซึ่งจากการศึกษาขั้นตอนการผลิตพริกไทยขาวของเกษตรกร พบว่า หลังจากที่เกษตรกรเก็บผลพริกไทยที่แก่จัด เกษตรกรจะนำเมล็ดพริกไทยมาแช่น้ำหรือใส่ถุงพลาสติกหมักไว้ 10-15 วัน เพื่อให้เปลือกนิ่ม หลังจาก

นั้นจะล้างเพื่อขัดเอาส่วนเปลือกออกให้เหลือแต่เมล็ด แล้วนำไปตากแดด ในกรณีของการหมักพบว่ามีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรามาก (Figure 2) และหากหมักไว้นานเชื้อราอาจมีการสร้างสารพิษได้ ในขณะที่พริกไทยขาวที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรม จะใช้วิธีการอบหรือตากให้แห้งแล้วจึงนำมาแช่ด้วยคลอรีนเพื่อให้เมล็ดพริกไทยมีสีขาวสม่ำเสมอ โอกาสในการปนเปื้อนเชื้อราจึงมีน้อยกว่า ส่วนพริกไทยดำพบ *A. flavus* ในพริกไทยจากเกษตรกรและร้านค้าในปริมาณใกล้เคียงกัน โดยพบ 7.1 และ 8.0% ตามลำดับ แต่ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* ในพริกไทยขาวป่นและพริกไทยดำป่น (Table 1)

การปนเปื้อนของเชื้อราในตัวอย่างพริกไทยระหว่างกระบวนการผลิต พบว่า พริกไทยขาวที่ได้จากขั้นตอนการหมักที่ระยะเวลา 15 วัน มีการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* มากที่สุด จำนวน 37% พริกไทยที่ได้จากการล้างและขัดเอาเปลือกออกพบ *A. flavus* จำนวน 12% และหลังการตากแห้งพบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* จำนวน 7% สำหรับการปนเปื้อนในตัวอย่างพริกไทยดำ พบการปนเปื้อน *A. flavus* จำนวน 3% ในพริกไทยดำที่ได้จากขั้นตอนการตากเป็นระยะเวลา 2 วัน และในพริกไทยดำที่แห้งแล้วแต่ยังมีขั้วปนอยู่พบ *A. flavus* จำนวน 2% (Table 2)

2. ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซิน บี 1 ในพริกไทย

การปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 ในพริกไทยขาวเม็ดพร้อมบริโภค พบการปนเปื้อนสารพิษปริมาณ 0.0-16.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยพบการปนเปื้อนสูงสุดในตัวอย่างพริกไทยจากร้านค้าซึ่งเป็นพริกไทยที่เก็บไว้ข้ามปี ปริมาณ 16.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่พริกไทยจากแปลงเกษตรกรซึ่งเป็นพริกไทยที่ผลิตใหม่ภายในปีมีการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซิน บี1 สูงสุด 8.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พริกไทยขาวป่นพบสารแอฟลาทอกซินปริมาณ 0.0-12.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบการปนเปื้อนสูงสุด 12.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างพริกไทยป่นจากร้านค้าซึ่งเป็นพริกไทยที่เก็บไว้ข้ามปี ในขณะที่พริกไทยจากแปลงเกษตรกรซึ่งเป็นพริกไทยที่ผลิตใหม่ภายในปีมีการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซิน บี1 สูงสุด 10.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับพริกไทยดำเม็ดพบสารแอฟลาทอกซิน บี1 ปริมาณ 3.6-18.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยพบปริมาณสูงสุด 18.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างพริกไทยดำเม็ดที่สุ่มเก็บจากร้านค้า ส่วนตัวอย่างพริกไทยดำที่สุ่มเก็บจากเกษตรกร ซึ่งเป็นพริกไทยที่ผลิตใหม่ภายในปีพบปริมาณสารแอฟลาทอกซินสูงสุด 11.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับพริกไทยดำป่นพบการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 ปริมาณ 6.4-59.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยพบสูงสุดในตัวอย่างพริกไทยที่สุ่มเก็บจากร้านค้าบริเวณชายแดนไทย-กัมพูชา และเป็นพริกไทยที่ผลิตจากประเทศกัมพูชา ส่วนพริกไทยดำป่นจากเกษตรกรพบการปนเปื้อนสูงสุด 14.6 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Table 1)

การปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 ในตัวอย่างพริกไทยระหว่างกระบวนการผลิต พบว่า พริกไทยขาวที่ได้จากขั้นตอนการหมักที่ระยะเวลา 15 วัน มีการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 มากที่สุด โดยพบการปนเปื้อน 4.21 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และพบปริมาณ 3.48 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในพริกไทยขาวที่ตากแห้งแล้ว สำหรับการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 ในตัวอย่างพริกไทยดำ พบการปนเปื้อน 0.87-5.78

ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างที่ได้จากการตากเป็นเวลา 2 วัน และในพริกไทยตากแห้งที่ยังมีขั้วปนอยู่พบการปนเปื้อน 3.45-5.36 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Table 2)

3. ศึกษาแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษในกระบวนการผลิต

จากการสำรวจข้อมูลการผลิตพริกไทยในจังหวัดจันทบุรี พบว่า ฤดูการเก็บเกี่ยวพริกไทยอยู่ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์–มีนาคม โดยเกษตรกรจะเก็บเกี่ยวผลพริกไทยเป็น 2 ประเภท ได้แก่ การเก็บผลพริกไทยที่แก่จัด ผลเริ่มมีสีแดงจนถึงแดงจัด สำหรับทำพริกไทยขาว และจะเก็บผลพริกไทยที่แก่ ผลมีสีเขียวเข้ม เพื่อใช้ทำพริกไทยดำ จากการสุ่มตัวอย่างพริกไทยในแต่ละขั้นตอนการผลิต พบว่า การผลิตพริกไทยขาวมีโอกาสพบการปนเปื้อนของเชื้อราและสารแอฟลาทอกซิน บี1 ได้มากกว่าการผลิตพริกไทยดำ ซึ่งการศึกษากระบวนการผลิตพริกไทยขาวในครั้งนี้ เกษตรกรจะใช้วิธีการหมักพริกไทยในถุงพลาสติกหรือภาชนะปิดปาก เพื่อให้เปลือกพริกไทยเปื่อยยุ่ย ซึ่งเป็นสภาวะที่เชื้อราสามารถเจริญได้ดี หากเกษตรกรไม่ตากเมล็ดให้แห้งทันที ก็มีโอกาสสูงที่จะพบการปนเปื้อนเชื้อราและสารแอฟลาทอกซิน บี1 ในผลิตภัณฑ์ได้ ส่วนในกระบวนการผลิตพริกไทยดำ การปนเปื้อนของเชื้อราจะพบในขั้นตอนการตากผลผลิต ซึ่งอาจเกิดการปนเปื้อนของเชื้อราจากดิน และถ้าหากเกษตรกรตากผลผลิตไม่แห้งดี หรือเก็บเมล็ดพริกไทยไว้ในที่ที่มีความชื้น ก็มีผลทำให้เชื้อราเจริญและสร้างสารพิษได้ ดังนั้นหากควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราได้ตั้งแต่ในระยะเริ่มต้น ก็จะสามารถลดโอกาสในการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 ได้

จากการศึกษาข้อมูลในเบื้องต้น สามารถประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารแอฟลาทอกซินในระหว่างกระบวนการผลิตพริกไทยได้ดังนี้

1. การตากพริกไทย เกษตรกรบางรายใช้ผ้าใบปูกับพื้นดินโดยตรง ทำให้มีโอกาสในการปนเปื้อนของเชื้อราได้สูง

2. กระบวนการผลิตพริกไทยขาว ขั้นตอนการหมักในถุงพลาสติก เพื่อให้ส่วนเปลือกของพริกไทยหลุดออก พริกไทยจะอยู่ในสภาวะร้อนชื้น ทั้งอุณหภูมิและความชื้นมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา ทำให้พบการปนเปื้อนของเชื้อราในปริมาณค่อนข้างสูง

3. การเก็บเมล็ดพริกไทยในขณะที่เมล็ดยังไม่แห้งดี ทำให้เมล็ดมีความชื้นเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา

จากสาเหตุดังกล่าว จึงกำหนดแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารแอฟลาทอกซินในการผลิตพริกไทยดังนี้

1. หลังจากเก็บเกี่ยวผลพริกไทยแล้วควรทำการตากทันที และควรตากบนลานตาก หรือตากบนพื้นที่ยกสูงจากพื้นดิน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราจากดิน

2. การผลิตพริกไทยขาว ในระหว่างขั้นตอนหมักในถุงพลาสติก ควรตั้งไว้ในที่อากาศถ่ายเทสะดวก และไม่ควรหมักทิ้งไว้นานเกินไป หรืออาจใช้วิธีการแช่น้ำแต่ควรทำการเปลี่ยนน้ำทุกวัน เพื่อลดโอกาสในการปนเปื้อนของเชื้อราและการสร้างสารพิษของเชื้อรา และเมื่อขัดล้างแล้ว ควรตากให้แห้งทันที

3. ในขณะตากควรหมั่นเกลี่ยผลพริกไทยให้ได้รับแสงแดดอย่างทั่วถึง

4. ตากพริกไทยให้แห้งสนิทก่อนการเก็บรักษา และควรเก็บรักษาพริกไทยในที่ที่มีอากาศถ่ายเทสะดวก

การทดลองที่ 2.4 ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในกาแฟและผลิตภัณฑ์

1. ชนิดของเชื้อราและเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเมล็ดกาแฟดิบ

ผลการศึกษาชนิดของเชื้อราที่พบในเมล็ดกาแฟดิบจำนวน 4 ชนิด คือ ผลสด ผลแห้ง กาแฟกะลาแห้ง และกาแฟดิบ พบการปนเปื้อนเชื้อราหลังการเก็บเกี่ยว 6 ชนิด คือ *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus, Penicillium* spp., *Fusarium* spp. และ *Rhizopus* spp. ผลการวิเคราะห์ชนิดเชื้อราพบเชื้อราที่สร้าง OTA ได้แก่ *A. niger* เฉลี่ย 42.22% และ *A. ochraceus* เฉลี่ย 11.67% และเชื้อราที่สร้าง AFB_1 พบเชื้อรา *A. flavus* เฉลี่ย 6.21% ในตัวอย่างผลแห้งโรบัสต้าที่ยังไม่สีเปลือกของเกษตรกรทางภาคใต้ จังหวัดชุมพรและระนอง ช่วงการหมักและตากแห้งพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. niger* ที่เป็นสาเหตุของการสร้างสาร OTA มากที่สุด 51.20% รองลงมา ได้แก่ เชื้อรา *A. ochraceus* พบในอัตรา 26.13% ทั้งนี้เชื้อราที่เป็นสาเหตุของการสร้างสาร AFB_1 พบ *A. flavus* ในอัตรา 13.13% และพบเชื้อราหลังการเก็บเกี่ยวที่ไม่ก่อให้เกิดสารพิษ ได้แก่ *Pennicillium* spp. อัตรา 26.58% *Fusarium* spp. อัตรา 10.50% และ *Rhizophus* spp. อัตรา 0.75% (Figure 1, Table 1) สอดคล้องกับงานวิจัยของปานหทัยและคณะ (2554) ที่พบการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. niger* complex ในเมล็ดกาแฟโรบัสต้าที่ผลิตทางภาคใต้ อัตรา 80-100 %

2. ปริมาณสารพิษจากเชื้อราและเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเกินค่ามาตรฐานกำหนด

2.1 เมล็ดกาแฟดิบที่อยู่ในกระบวนการผลิต

จากการตรวจวิเคราะห์สารพิษในเมล็ดกาแฟดิบด้วยวิธี ELISA ณ ห้องปฏิบัติการสารพิษจากเชื้อรา กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ประกอบด้วยผลแห้ง กะลาแห้ง และเมล็ดกาแฟดิบ รวมทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์สารพิษพบการปนเปื้อน OTA ซึ่งเกินค่ามาตรฐาน 56 ตัวอย่าง และไม่เกินค่ามาตรฐาน (≥20 พีพีบี) 4 ตัวอย่าง พบปริมาณสารพิษสูงสุด 63.10 พีพีบีส่วนผลการตรวจสารพิษ AFB_1 พบตัวอย่างซึ่งไม่เกินค่ามาตรฐาน จำนวน 53 ตัวอย่าง และเกินค่ามาตรฐาน จำนวน 7 ตัวอย่าง การปนเปื้อนปริมาณสูงสุด 56.05 พีพีบี (Table 2)

2.2 กาแฟคั่วและผลิตภัณฑ์

จากการส่งตัวอย่างกาแฟคั่วและผลิตภัณฑ์ทั้งในประเทศและนำเข้าไปตรวจวิเคราะห์สารพิษ OTA และAFB_1 ด้วยวิธี HPLC ณ ห้องปฏิบัติการกลาง กทม. และคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กทม. ประกอบด้วยตัวอย่างผลิตภัณฑ์กาแฟอาราบิก้า จากจังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ และเชียงราย กาแฟโบราณ กาแฟคั่ว และกาแฟเกล็ดโรบัสต้า จากเกษตรกรและร้านค้าในจังหวัดชุมพร และระนอง พบว่า ทุกตัวอย่างตรวจไม่พบการปนเปื้อนของ OTA ค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (LOD) เท่ากับ 0.2 พีพีบี และพบการปนเปื้อน AFB_1 จำนวน 3 จาก 56 ตัวอย่าง ปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดเท่ากับ 4.37 พีพีบี ค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.12 พีพีบี ซึ่งไม่เกินค่ามาตรฐานประเทศไทยกำหนด (Table 3)

3. ช่วงเวลาการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษในกาแฟและผลิตภัณฑ์ในแต่ละกระบวนการผลิต

ระยะเก็บเกี่ยว

กาแฟอาราบิก้าทางภาคเหนือในปี 2557/58 ได้ทำการสุ่มเก็บผลกาแฟสดบนต้นที่ผลสดสุกสีแดง 70% ในจังหวัดเชียงใหม่ พบการปนเปื้อนเชื้อราดำในกลุ่ม *A. niger* เพียง 3% ในปี 2557/58 ได้ทำการสุ่มเก็บผลสดโรบัสตาของเกษตรกร 2 ราย ซึ่งมีการเก็บผลสดสุกสีแดงมากกว่า 70% นำมาตรวจชนิดเชื้อราที่สร้างสารพิษ พบการปนเปื้อนของเชื้อราดำในกลุ่ม *A. niger* อัตรา 71.5% ส่วน (Table 1)

ระยะการหมัก

ปี 2558/59 สุ่มเก็บเมล็ดกาแฟของเกษตรกรทางภาคใต้ 3 ราย ซึ่งมีการหมักในถุงกระสอบ ผลการวิเคราะห์สารพิษพบ AFB_1 พบค่าปริมาณสารพิษสูงสุด 24.80 พีพีบี และพบ OTA ค่าปริมาณสารพิษสูงสุด 30.75 พีพีบี (Table 2) ซึ่งเกินค่ามาตรฐานประเทศไทยและประเทศคู่ค้ากำหนด ผลการวิเคราะห์เชื้อราพบการปนเปื้อนของเชื้อราในกลุ่ม *A. niger* มากที่สุดอัตรา 100%

ระยะตากแห้งบนลาน

ปี 2558/59 สุ่มเก็บเมล็ดกาแฟโรบัสตาของเกษตรกรทางภาคใต้ 2 ราย พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. niger* สูงอัตรา 100% เนื่องจากมีฝนตกหนักในช่วงการตากและการตากที่จะมีทั้งผลกาแฟสุกและยังไม่สุกรวมกัน เป็นสาเหตุทำให้เกิดความชื้นและเกิดเชื้อราในกองกาแฟส่วนเมล็ดกาแฟดิบของเกษตรกรภาคเหนือจะมีการปนเปื้อนไม่สูงมากนัก จากการสุ่มเมล็ดกาแฟดิบในระยะการตากแห้งปี 2557/58 พบการปนเปื้อนเชื้อราในกลุ่ม *A. niger* อัตรา 56.00 % และพบปริมาณสารพิษ AFB$_1$ ที่ระดับ 0.00-17.50พีพีบีและ OTA ที่ระดับ 2.20-6.40พีพีบี

ผลิตภัณฑ์กาแฟดิบ

สุ่มเก็บเมล็ดกาแฟดิบจำนวน 47 ตัวอย่างในปี 2557/58 และ2558/59พบการปนเปื้อนสารพิษAFB$_1$ ที่ระดับ8.25-34.65พีพีบีและ OTA ที่ระดับ 0.80-19.90 พีพีบี และพบการปนเปื้อนเชื้อราในกลุ่ม *A. niger* อัตรา 72.00% และ *A. flavus* อัตรา 0.40%

Table 1 Percentage of fungi found in post-harvest system of Thai coffee beans after plating with surface disinfection.

Stage	Types	No. of test seeds	% Fungal contamination							
			A. niger	*A. flavus*	*A. ochraceus*	*Fusarium*	*ennicillium*	*Rhizophus*	Other	Total
Harvesting	Arabica cherries	100	3.00	3.00	0.00	0.00	17.00	0.00	0.00	23.00
	Robusta cherries	100	71.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	71.50
Processing (mucilage & drying)	Robusta dried cherries	200	100.00	8.50	0.50	0.00	10.50	0.00	0.00	119.50
	Arabica parchment coffee	200	56.00	40.00	4.00	0.00	87.50	3.00	0.00	190.50
	Arabica green bean	120	30.80	0.00	0.00	0.00	8.30	0.00	0.00	39.10
Storage	Arabica green bean	160	16.20	0.00	0.60	0.60	3.70	0.00	2.50	23.60
	Typica parchment coffee	100	18.00	0.00	100.00	42.00	0.00	0.00	0.00	160.00
Product	Arabica green bean	240	12.50	0.40	0.00	1.20	0.00	1.60	0.80	16.50
	Robusta green bean	150	72.00	0.00	0.00	0.00	0.00	16.00	0.00	88.00
	Total	**1,370**	**380.00**	**55.90**	**105.10**	**43.80**	**127.00**	**20.60**	**3.30**	
	Mean		**42.22**	**6.21**	**11.68**	**4.87**	**14.11**	**2.29**	**0.37**	

Table 2 The situation of OTA and AFB_1 contamination in Thai coffee beans.

Process	Source	Sample	OTA			AFB_1		
			No. of contaminated samples	Amount of OTA (ppb)	No. of over standard samples*	No. of contaminated samples	Amount of AFB_1 (ppb)	No. of over standard samples*
Dry	Chumphon HRC	Robusta cherries	2	27.85-63.10	2 (100%)	2	21.30-56.05	2 (100%)
	Chumphon	Robusta cherries	3	19.20-30.75	2 (66%)	3	18.95-24.80	2 (66%)
	Chumphon, Ranong	Robusta green bean	18	1.30-8.50	0 (0%)	18	8.75-34.65	2 (11%)
	Lampang	Robusta green bean	1	1.95	0 (0%)	1	15.60	0 (0%)
Wet	Chiang rai HRC	Typica parchment coffee	0	0.00	0 (0%)	0	0.00	0 (0%)
	Lampang	Arabica parchment coffee	2	0.10–0.15	0 (0%)	2	12.60-14.40	0 (0%)
	Wavee	Arabica parchment coffee	3	3.10-6.40	0 (0%)	3	11.65-15.95	0 (0%)
	Doi chang	Arabica parchment coffee	2	2.20-3.40	0 (0%)	2	10.10-13.65	0 (0%)
	Chiang mai	Arabica green bean	9	0.80-2.70	0 (0%)	9	8.85-17.50	0 (0%)
	Mae Hong Son	Arabica green bean	1	5.60	0 (0%)	1	9.35	0 (0%)
	Doi chang	Arabica green bean	14	1.40-19.90	0 (0%)	14	8.25-18.30	0 (0%)
	Wavee	Arabica green bean	4	3.00-7.30	0 (0%)	4	9.85-20.50	1 (33%)
		Total	**60**	**0.00-63.10**	**4(6%)**	**60**	**0.00-56.05**	**7(11%)**

* Maximum level limited of OTA and AFB_1 contamination not more than 20 microgram/kilogram (ppb)

Table 3 Mycotoxin level in Thai coffee during 2014-2016.

Source	Sample	OTA			AFB_1		
		No. of contaminated samples	Amount of OTA (ppb)	No. of over standard samples*	No. of contaminated samples	Amount of AFB_1 (ppb)	No. of over standard samples*
local	roasted	3	Not detected - 4.37	0 (0%)	0	Not detected	0 (0%)
	traditional	0	Not detected	0 (0%)	0	Not detected	0 (0%)
	instant	0	Not detected	0 (0%)	0	Not detected	0 (0%)
import	instant	0	Not detected	0 (0%)	0	Not detected	0 (0%)
	Total	56	Not detected - 4.37	0 (0%)	56	Not detected	0 (0%)

* Maximum level limited of OTA and AFB_1 contamination not more than 20 microgram/kilogram (ppb)

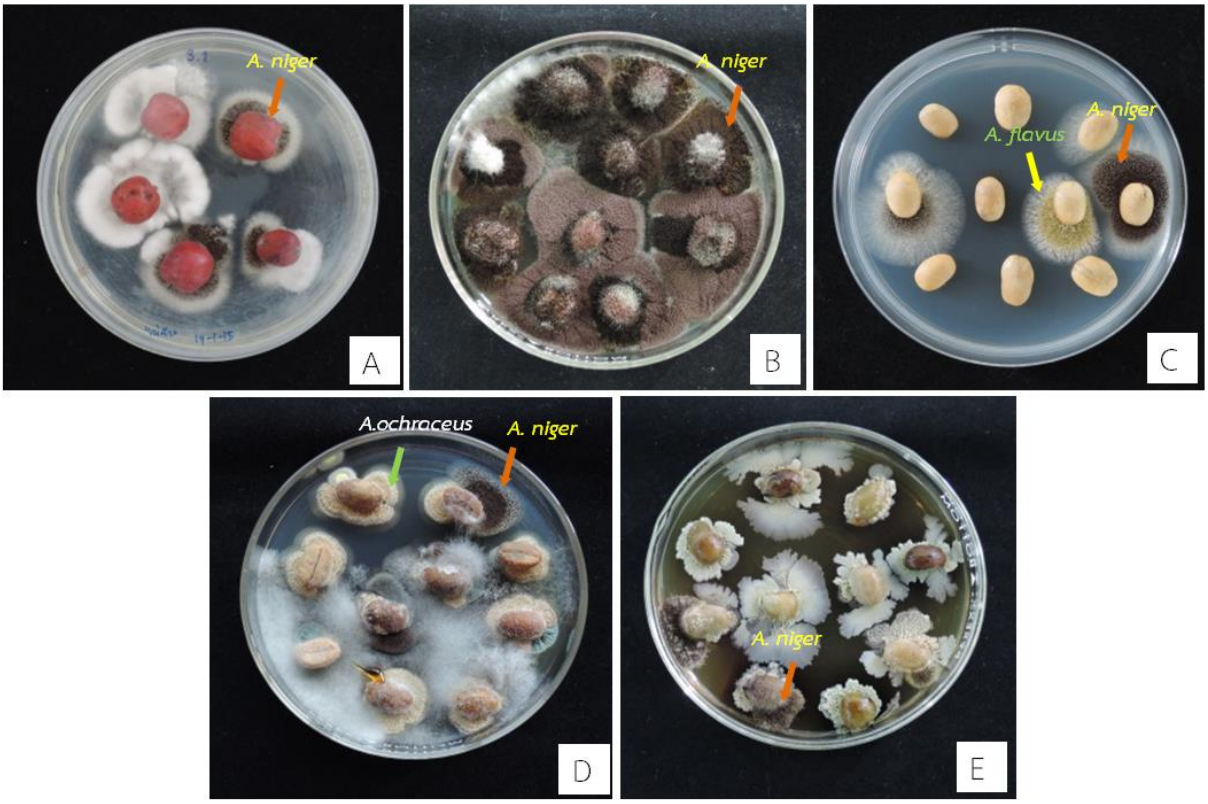


Figure 1 *Aspergillus niger* (dark colony color), ***A. ochraceus***(yellow colony color) and *A. flavus* (green colony color) contamination in coffee seeds, A) Arabica cherries B) Robusta dried cherries C) Arabica parchment D) Typicaparchment E) Robusta green bean

การทดลองที่ 2.5 ศึกษาควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลองุ่นบริโภคสดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากองุ่น

1. ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อรา และสารพิษจากเชื้อราในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากองุ่น

1.1 การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในลูกเกดด้วยวิธี Direct plate count

การปนเปื้อนของเชื้อราในลูกเกด (ชนิดบรรจุแบบกล่องและตักแบ่งขาย) ที่วางจำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานคร จากซุปเปอร์มาร์เก็ตและตลาดทั่วไป จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นลูกเกดสีดำ 15 ตัวอย่าง และลูกเกดสีเหลือง 9 ตัวอย่าง พบว่า ลูกเกดสีดำนำเข้าจากต่างประเทศแต่นำมาบรรจุลงกล่องในประเทศไทย แบ่งขายตามซุปเปอร์มาร์เก็ต และ ลูกเกดสีดำนำเข้าจากต่างประเทศตักแบ่งขายตามท้องตลาด พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A.niger* 100% ทั้งสองแบบ รองลงมามีการปนเปื้อนเชื้อรา *Eurotium* sp. 60

และ 50% นอกจากนี้ยังพบเชื้อรา *Rhizopus* sp. ในลูกเกดสีดำที่ตักแบ่งขายตามท้องตลาด แต่ไม่พบในลูกเกดสีดำที่ชนิดบรรจุแบบกล่อง ส่วนลูกเกดสีดำที่ผลิตและบรรจุในต่างประเทศแบบกล่อง ขายที่ซุปเปอร์มาร์เก็ต พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Eurotium* sp. มากที่สุด 50% รองลงมาพบเชื้อรา *A.niger* และ *Penicillium* sp. 25% (Table1, Figure 1) จากการทดลองเห็นได้ว่าลูกเกดที่นำเข้าจากต่างประเทศแต่นำมาบรรจุลงกล่องในประเทศไทย ขายตามซุปเปอร์มาร์เก็ต กับชนิดตักแบ่งขายตามท้องตลาดพบการปนเปื้อนของเชื้อราสูง อาจเนื่องมาจากมีการปนเปื้อนของเชื้อราระหว่างการเก็บรักษาและการขนส่งก่อนที่จะนำมาบรรจุ สภาพแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงทำให้ลูกเกดมีความชื้นเพิ่มขึ้น เหมาะกับการเจิญของเชื้อรา จากการศึกษาพบว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. เจริญเติบโตได้ดี ในอาหารหรือผลิตผลเกษตรที่มีความชื้นประมาณ 10-17 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อรา *Penicillium* sp. ต้องการความชื้นประมาณ 16-21 เปอร์เซ็นต์ (กรมวิชาการเกษตร, 2560)

ลูกเกดชนิดสีเหลืองไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อรา เนื่องจากขั้นตอนการผลิตมีการแช่ลูกเกดในสารละลายซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เพื่อช่วยในการรักษาสีของผลไม้อบแห้ง โดยสารกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลในผลไม้ สารประกอบที่ใช้ได้แก่ เกลือซัลไฟต์และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ จัดเป็นสารกันบูด ที่สามารถยับยั้งและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2560)

ลักษณะของเชื้อราที่ปนเปื้อนบนลูกเกด

1) เชื้อรา *Aspergillus niger*

ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา*Aspergillus niger*บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีน้ำตาลเข่มจนถึงสีดำ เส้นใยสีขาวใสมีผนังกั้นตามขวาง เจริญบนอาหารบาง ๆ ด่านใตโคโลนีมีสีขาว หรือเหลืองออนลักษณะโคนิเดียล เฮด (conidial head) สีดำหรือสีน้ำตาลเขม รูปรางคอนขางกลม ขนาดใหญ เมื่อแกแตกเปนหลายแฉกในแนวรัศมี

โคนิดิโอฟอร ใส ไมมีสี ตรง เกิดเดี่ยว ๆ ผนังเรียบ สวนปลายพองออกเปนรูปวงกลมเรียกวา เวสซิเคิล มีเมตูเล และ ไฟอะลายด(biserial Aspergilla) โคนิเดีย เซลลเดียว รูปรางกลม สีน้ำตาลออนจนถึงสีน้ำตาลเขม สวนใหญผนังมีหนามขรุขระโคนิเดียมีหนึ่งเซลล กลมสีน้ำตาลดำ (Figure 1)

2) เชื้อรา *Aspergillus ochraceus*

ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. ochraceus*บนอาหาร PDA เจริญคอนข่างช่า ระยะแรกเส่นใยจะมีสีขาวตอมาจะเปลี่ยนเปนสีเหลืองลักษณะของโคนิดิโอฟอรมีหนาม เกิดรวมกันเปนชอ หรือเปนกลุม ที่ปลายสรางโคนิเดียลเฮด แบบกลม ด่านใต่อาหารไมเปลี่ยนสี เส่นใยมีลักษณะบางไมฟู เวสซิเคิลมีรูปรางกลม (globose) เชื้อราสรางเมตูเลไมมีสี และโคนิเดียมีลักษณะกลม ไมมีสี ผนังขรุขระ (Figure 1)

3)เชื้อรา *Aspergillus flavus*

ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus*บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีเขียว หรือเขียวอมเหลือง เส่นใยละเอียดสีขาวเสนใยเจริญแผบาง ๆ สรางโคนิเดียล เปนชอคลายดอกกระถินมีสีเขียวอมเหลือง เมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเปนสีเหลืองอมน้ำตาลและแตกออกเปนแทงหลวม ๆโคนิดิโอฟอรผนังหนาและมีหนาม เวสซิเคิล

รูปรางคอนขางกลม ไฟอะลายดเกิดโดยตรงบนเวสซิเคิล หรือบนเมตูเล โคนิเดียรูปรางทรงกลมถึงรูปไข ผิวไมเรียบ โคนิเดียตอกันเปนสายยาว (Figure 1)

4) เชื้อรา *Eurotium* sp.

ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา*Eurotium* sp.บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โคโลนีมีสีเหลืองจนถึงเหลืองน้ำตาล ซึ่งเป็นสีของแอสโคมาตา(ascomata) รูปร่างกลมไม่มีช่องเปิด เรียกว่า คลิสโททีเซียม (cleistothecium) มีสีเหลืองขนาดเล็ก จำนวนมาก รูปร่างกลมหรือเกือบกลม ภายในมี 8 แอสโคสปอร์ (ascospores) รูปร่างคล้ายเลนส์ ไม่มีสี บริเวณกึ่งกลางมีปีก ยื่นออกมาโดยรอบ (Figure 1) *Eurotium*เป็น perfect stage (Teleomorphic stage) ของเชื้อรา *Aspergillus* พบปนเปื้อนในอาหาร เมล็ดพืช กระดาษ สร้างสารทติยภูมิหลายชนิด (Li และคณะ, 2009)

5) เชื้อรา *Penicillium* sp.

ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา*Penicillium* sp.บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โคโลนีมีสีเขียว เส้นใยฝงอยูในอาหาร บนอาหารมีเฉพาะโคนิดิโอฟอรเกิดขึ้นอยางหนาแนน ทำให้ผิวหน้าโคโลนี มีลักษณะคล้ายกำมะหยี ลักษณะโคนิดิโอฟอรเปนแบบแตกกิ่งก้านเปน 1-3 ชั้น ไฟอะลายดมีลักษณะเปนลูกชมพูสวนปลายก้านโคนิดิโอฟอรแตกแขนงเปนไฟอะลายด หรือ เมตูเล ให้กำเนิดโคนิเดีย เรียกวาไฟอะโลสปอร (phialospore) รูปรางกลม เกิดตอกันเปนโซยาว (Figure 1)

6) เชื้อรา *Rhizopus* sp.

ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Rhizopus* sp. บนอาหาร PDA เจริญได้เร็วเต็มจานเลี้ยงเชื้อ เมื่อมีอายุได้ 3 วัน เส้นใยสีขาวและเปลี่ยนเป็นสีเทาเมื่อมีการสร้างสปอร์ และเส้นใยจะยุบตัวลงเมื่อมีอายุมากขึ้น สปอร์แรงจิโอสปอร์ (sporangiospore) สีน้ำตาล รูปร่างเรียวยาว ตั้งตรง ผิวเรียบ เกิดเป็นกลุ่ม ๆละ1-5 ก้าน บนสโตลอน สีน้ำตาลผนังเรียบ สร้างอยู่ภายในถุงสปอร์แรงเจียม (sporangium) ผนังของสปอร์แรงเจียม จะยุบตัวลงเมื่อมีการปล่อยสปอร์แรงจิโอสปอร์โดยสปอร์แรงเจียม จะมีรูปร่างกลม สีน้ำตาล และ columella รูปร่างเกือบกลมสีน้ำตาลอ่อน มีการสร้างไรซอยด์ (rhizoid) เจริญดี แตกแขนงคล้ายราก (Figure 1)

1.2 การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในน้ำองุ่นและไวน์ ด้วยวิธี dilution plate count

จากการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในน้ำองุ่นและไวน์ ด้วยวิธี dilution plate count ทุกตัวอย่างไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อราในผลิตภัณฑ์น้ำองุ่นและไวน์ อาจเนื่องมาจากกรรมวิธีในการผลิตน้ำองุ่นหรือไวน์ เช่น ในขั้นตอนการเก็บรักษาน้ำองุ่น ปกติจะนำน้ำองุ่นมาทำให้ร้อนจนมีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ก่อนแล้วนำไปบรรจุขวดปิดฝาขณะร้อนเพื่อลดความดันในช่องว่างเหนือระดับน้ำองุ่น จากนั้นนำไปพาสเจอร์ไรซ์ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 76-85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25-30 วินาที (Linsdell, 1983) หรือในบางโรงงานมีการใช้เครื่องถ่ายเทความร้อน ที่มีลักษณะเป็นท่อหรือแผ่นช่วย โดยการใช้น้ำร้อนเป็นตัวให้ความร้อนแก่น้ำองุ่น จนน้ำองุ่นมีอุณหภูมิถึง 77-85 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงบรรจุลงขวดด้วยเครื่องบรรจุอัตโนมัติต่อไป หรือในขั้นตอนการบรรจุขวดของไวน์ หลังจากบรรจุขวดแล้วก็จะทำการฆ่าเชื้อหรือป้องกันแบคทีเรีย โดยวิธีใช้ความร้อนอบ หรือ

ผ่านความร้อนประมาณ 60 องศาเซลเซียสหลังจากนั้นนำเข้าแช่เย็นทันที เก็บไว้จนได้อุณหภูมิคงที่แล้วจึงนำออกจำหน่ายได้

2.ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากองุ่น โดยวิธี Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

จากตัวอย่างลูกเกด (ชนิดบรรจุแบบแพ็คและตักแบ่งขาย) น้ำองุ่น และ ไวน์ ที่วางจำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานคร จากซุปเปอร์มาร์เก็ตและตลาดทั่วไป ทั้งหมด 45 ตัวอย่าง แบ่งเป็น ลูกเกด 24 ตัวอย่าง (ชนิดสีดำและสีเหลือง) น้ำองุ่น 7 ตัวอย่าง และไวน์ 14 ตัวอย่าง นำมาตรวจการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ พบว่ามีลูกเกดดำ 3 ตัวอย่าง จาก 15 ตัวอย่าง มีค่าโอคราทอกซิน เอ สูงเกินมาตรฐาน 10 ไมโครกรัม/กิโลกรัม คือ ตัวอย่างที่ 7 9 และ 5 มีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ เฉลี่ยในผลิตผลสูงถึง 23.33 11.83 และ 11.40 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ (Table 2) จากการทดลองเห็นได้ว่า ตัวอย่างที่ 7 ไม่พบเชื้อรา แต่มีการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ สูง อาจเนื่องมาจากในกระบวนการผลิตมีการใช้สารเคมีบางชนิด ทำให้สามารถยับยั้งและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี ดังนั้นการที่ไม่พบเชื้อราปนเปื้อนไม่สามารถบอกได้ว่าจะไม่พบสารพิษที่เชื้อราสร้างขึ้น เนื่องจากสารโอคราทอกซินสามารถทนความร้อนได้สูงสุดถึง 250 องศาเซลเซียส จึงไม่ได้ถูกทำลายในระหว่างกระบวนการผลิต (กรมวิชาการเกษตร, 2560) สรุปได้ว่าปริมาณการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราไม่มีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อราที่พบ แต่กรณีที่พบเชื้อรา เช่น ตัวอย่างที่ 9 พบการปนเปื้อนของเชื้อราในกลุ่ม *A. niger* 2% และ *Penicillium* sp. 0.67% ตัวอย่างที่ 5 พบการปนเปื้อนของเชื้อราในกลุ่ม *A. niger* 62.33% มีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ เฉลี่ยในผลิตผลสูงถึง 11.83 และ 11.40 ตามลำดับ (Table 2, Figure 1) สามารถบอกได้ว่าเมื่อพบการปนเปื้อนของเชื้อราในกลุ่ม *A. niger*, และ *Penicillium* sp. มีแนวโน้มที่ผลิตผลชนิดนั้นจะมีการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ จากการรายงานของ JECFA (2001) เชื้อราที่พบวามีความสามารถผลิตโอคราทอกซิน เอ ได้แก่ *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* และ *Aspergillus* section *Nigri* คือ *Aspergillus carbonarius* และ *Aspergillus niger*

ลูกเกดสีเหลือง จำนวน 9 ตัวอย่าง ไม่พบตัวอย่างที่มีค่าโอคราทอกซิน เอ สูงเกินมาตรฐาน 10 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ปริมาณของสารโอคราทอกซิน เอ อยู่ระหว่าง 3.07-9.93 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ในน้ำองุ่น 7 ตัวอย่าง พบตัวอย่างที่มีค่าโอคราทอกซิน เอ สูงเกินมาตรฐาน 2 ไมโครกรัม/กิโลกรัม อยู่ 4 ตัวอย่าง จาก 7 ตัวอย่าง ปริมาณของสารโอคราทอกซิน เอ อยู่ระหว่าง 1.53-4.63ไมโครกรัม/กิโลกรัม และไวน์ พบตัวอย่างที่มีค่าโอคราทอกซิน เอ สูงเกินมาตรฐาน 2 ไมโครกรัม/กิโลกรัมอยู่ 12 ตัวอย่าง จาก 14 ตัวอย่าง ปริมาณของสารโอคราทอกซิน เอ อยู่ระหว่าง 1.87-4.83 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อรา (Table 2) ดังนั้นการปนเปื้อนของเชื้อราจนมีการสร้างสารพิษโอคราทอกซิน เอ น่าจะเกิดตั้งแต่ก่อนกระบวนการผลิต ในประเทศบราซิล มีการศึกษาการปนเปื้อนของโอคราทอกซิน เอ ในผลิตภัณฑ์แปรรูปชนิดต่าง ๆจากองุ่น ได้แก่ น้ำองุ่น เนื้อองุ่นแช่แข็ง และไวน์ พบว่าร้อยละ 29.2 ของตัวอย่างน้ำองุ่น ร้อยละ 12.5 ของตัวอย่างเนื้อ

องุ่นแช่แข็ง และร้อยละ 24 ของตัวอย่างไวน์ (ไวน์แดง ไวน์ขาว และไวน์ชมพู) มีการปนเปื้อนโอคราทอกซิน เอ โดยมีปริมาณเฉลี่ยอยู่ที่ 38 28.30 และ 33.10 นาโนกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Rosa *et al.,*2004)

3. ทดสอบการสร้างสารโอคราทอกซิน เอ ของเชื้อราที่ปนเปื้อนในลูกเกด บนอาหารเหลว yeast extract sucrose (YES medium)

นำเชื้อราที่ปนเปื้อนจากข้อ 1.1 มาทดสอบการสร้างสารโอคราทอกซิน เอ ในอาหาร YES medium พบว่าเชื้อราที่แยกได้จากลูกเกดสามารถสร้างสารโอคราทอกซิน เอ ได้ คือ *A. niger*, *A. ochraceus, A. flavus*, *Eurotium* sp. และ *Penicillium* sp. ส่วนเชื้อราที่ไม่สร้างสารโอคราทอกซิน เอ คือเชื้อรา *Rhizopus* sp. ซึ่งเชื้อรา *A. ochraceus* มีการสร้างสารโอคราทอกซิน เอ สูงสุด ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 12.40 และ 5.30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม จากตัวอย่างที่ 4 และตัวอย่างที่ 12 (Table 3) ซึ่งเมื่อตรวจในลูกเกด ก็พบว่ามีการสร้างสารโอคราทอกซิน เอ สูงเช่นกัน คือ 9.57 และ 5.53 ไมโครกรัม/กิโลกรัม (Table 2) รองลงมาคือ เชื้อรา *Penicillium* sp. สร้างสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 2.60-6.20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และเชื้อรา *A. niger*และ *Eurotium* sp. สามารถสร้างสารโอคราทอกซิน เอ ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน โดย *A. niger* สร้างสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.80-5.20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม เชื้อรา *Eurotium* sp. สร้างสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.35 -4.10ไมโครกรัม/กิโลกรัม (Table 3) แต่อย่างไรก็ตามแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อรามีความสามารถในการสร้างสารโอคราทอกซิน เอ แตกต่างกัน จากการทดลองจะเห็นได้ว่า เชื้อราในกลุ่ม *A. ochraceus*, *Penicillium* sp. และ *A. niger* สร้างสารโอคราทอกซินสูงน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญของการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในลูกเกด

4. ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อรา และสารพิษจากเชื้อราจากองุ่นผลสดในแปลงปลูก

ตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในผลองุ่นสายพันธุ์แบล็คโอปอล ณ แปลงปลูก จำนวน 3 สวน และองุ่นสายพันธุ์ชีราส จำนวน 1 สวน โดยเก็บผลองุ่น 4 ระยะการเจริญเติบโต ด้วยวิธี Direct plate count พบว่า

สวนที่ 1 พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Alternaria* sp. ในองุ่นระยะ 1 และ 2 มากที่สุดคือ 44 และ 44% รองลงมาเป็นเชื้อรา *Nigrospora* sp. และ *Curvularia* sp. อีกทั้งยังพบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. aculeatus* 6และ 15% ซึ่งมีรายงานว่าเชื้อรา *A. aculeatus* สร้างสารโอคราทอกซิน (Leong และคณะ, 2006) เมื่อนำองุ่นระยะ 1 และ 2 มาตรวจปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 15.10 และ 7.95 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ส่วนองุ่นระยะ 3 และ 4 มีการปนเปื้อนเชื้อรา *A. aculeatus* มากที่สุดคือ 68 และ 20% และพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในองุ่นระยะ 4 เมื่อนำองุ่นระยะ 3 และ 4 มาตรวจปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 8.45 และ 4.80 ไมโครกรัม/กิโลกรัม (Table 4, Figure 2,3)

สวนที่ 2 พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Cladosporium* sp. ในองุ่นระยะ1 และ 2 มากที่สุดคือ 41 และ 74 % รองลงมาเป็นเชื้อรา *Curvularia* sp. และ *Alternaria* sp. อีกทั้งยังพบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. aculeatus* 15 และ 18 % เมื่อนำองุ่นระยะ 1 และ 2 มาตรวจปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 113.7 และ 39.4 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ส่วนองุ่นระยะ3 มีการปนเปื้อนของเชื้อรา *Penicillium* sp. มากที่สุดคือ 54% รองลงมาคือ *A. aculeatus* 31% มีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ที่20.3 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และองุ่นระยะ 4 พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. aculeatus*มากที่สุดคือ 66% รองลงมาคือ *Penicillium* sp. 8% และมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในองุ่นระยะ 4 มีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ที่13.9 ไมโครกรัม/กิโลกรัม (Table 4, Figure 2,3)

สวนที่ 3 การปนเปื้อนของเชื้อราในองุ่นระยะ 1 2 3 และ 4 พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. aculeatus* มากที่สุดคือ 84 91 100 และ 21% ตามลำดับ รองลงมาคือ *Penicillium* sp. 30 41 25 และ 20% ตามลำดับ และพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในองุ่นระยะ 4 เมื่อตรวจปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 92.72 119.0 8.9 และ 2.9 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ (Table 4, Figure 2,3)

สวนที่ 4 การปนเปื้อนของเชื้อราในองุ่นระยะ 1 2 3 และ 4 พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Alternaria* sp. มากที่สุด รองลงมาคือ *Fusarium* sp. และยังพบเชื้อรา *Penicillium* sp. ในองุ่นทุกระยะการเจริญเติบโต คือ 16 19 11 11% ตามลำดับ เมื่อตรวจปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 31.86 48.65 14 และ 8.39 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ (Table 4, Figure 2,3)

จากผลการทดลองนี้พบว่าในองุ่นระยะ 1 และ 2 ของทุกสวน มีค่าปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ เฉลี่ยในผลผลิตสูง เมื่อเทียบกับระยะ 3 และ 4 ซึ่งสอดคล้องกับ Serra (2006) ศึกษาสารโอคราทอกซินในผลองุ่นที่ระยะ pea berry, early verasion และ ripe berry พบว่าปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ เฉลี่ยในผลิตผลองุ่นระยะ pea berry สูงสุดคือ 263 นาโนกรัม/กิโลกรัมรองลงมาคือระยะ early verasion และ ripe berry มีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ เฉลี่ยในผลิตผลองุ่น 149 และ 35 นาโนกรัม/กิโลกรัมซึ่งระยะ pea berry นั้นจะ

ตรงกับระยะที่ 1 และ 2 ของการทดลองนี้ คือระยะที่ผลองุ่นจะมีการสร้างช่อ และการเปลี่ยนแปลงขนาดและน้ำหนักผลอย่างรวดเร็วสังเกตลักษณะภายนอกขององุ่นระยะนี้จะมีสีเขียว และผลองุ่นค่อนข้างแข็ง (Bisson, 2001) ระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆขององุ่นมีอิทธิพลต่อการสร้างสารโอคราทอกซิน เอ เนื่องจากสารโอคราทอกซิน เอ จะสร้างได้สูงเมื่อมีปริมาณกรดอินทรีย์ (organic acid) สูง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ต่ำ (Serra *et al*.,2006) ซึ่งการสะสมของกรดในระยะการเจริญเติบโตของผลองุ่น จะพบว่าความเข้มข้นของกรดจะลดลงหลังจากองุ่นเริ่มเปลี่ยนสีจนกระทั่งองุ่นสุกเต็มที่ (Terrier และ Romieu, 2001) และเมื่อองุ่นเริ่มสุกความเข้มของน้ำตาลจะมีมากขึ้น ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการสร้างสารโอคราทอกซิน เอ ซึ่งอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่บอกได้ว่าทำไมจึงพบการสร้างสารโอคราทอกซิน เอ ในระยะ 1 และ 2 มากกว่า ระยะ 3 และ 4ทั้ง ๆ ที่ระยะ 3 และ 4 พบเชื้อราในกลุ่มที่มีรายงานว่ามีการสร้างสารพิษสูงกว่า นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเจริญและสร้างสารพิษจากรา เช่น สารอาหาร ปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิ และปริมาณน้ำอิสระ (อนงค์, 2546)

5. การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในสภาพแวดล้อม ณ แปลงปลูก

5.1 การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในดิน บริเวณแปลงปลูก ด้วยวิธี dilution plate count

ตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในดิน จากสวนองุ่นสายพันธุ์แบล็คโอปอล จำนวน 3 สวน และองุ่นสายพันธุ์ชีราส จำนวน 1 สวน ด้วยวิธี dilution plate count พบว่า

สวนที่ 1 องุ่นระยะ 1 2 3 และ 4 พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. aculeatus*ในดินมากที่สุด 4.7×10^3,1.9×10^3, 3.3×10^3 และ 2.0×10^3cfu/g และในองุ่นระยะ 1 และ 3 เชื้อราที่มีการปนเปื้อนในดินรองลงมาคือ *A. niger* 1.1×10^3 และ 1.1×10^3cfu/g ส่วนองุ่นระยะ ที่ 2 และ 4 เชื้อราที่มีการปนเปื้อนรองลงมาคือ *Alternaria* sp.8.5×10^2 และ 6.8×10^2 cfu/g (Table 5, Figure 4)

สวนที่ 2 องุ่นระยะ 1 และ 3 พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Penicillium* sp. ในดินมากที่สุด 3.7×10^3 และ 3.1×10^3 cfu/g รองลงมาคือ*A. aculeatus* 6.3×10^2และ 2.3×10^3cfu/g ขณะที่องุ่นระยะ 2 และ 4 พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. aculeatus*ในดินมากที่สุด2.3×10^3 และ 3.0×10^3cfu/g รองลงมาคือ *Penicillium* sp.3.7×10^2 และ 4.0×10^2cfu/g (Table 5, Figure 4)

สวนที่ 3องุ่นระยะ 1 พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. aculeatus* ในดินมากที่สุด 1.7×10^4 cfu/g รองลงมาคือ *A. niger* 7.7×10^3 cfu/g และ *Penicillium* sp. 6.8×10^3 cfu/g ขณะที่องุ่นระยะ 2 3 และ 4 พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Penicillium* sp. ในดินมากที่สุด 4.3×10^4, 2.2×10^4 และ 4.2×10^4 cfu/g ตามลำดับ และในองุ่นระยะ 2 และ 4 เชื้อราที่มีการปนเปื้อนในดินรองลงมาคือ *A. aculeatus* 8.5×10^3 และ5.0×10^3 cfu/g (Table 5, Figure 4)

สวนที่ 4 องุ่นระยะ 1 และ 2 พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Penicillium* sp. ในดินมากที่สุด 3.6×10^3 และ 4.3×10^3 cfu/g รองลงมาคือ *A. ochraceus* 1.1×10^3 และ 1.3×10^3 cfu/g ขณะที่องุ่นระยะ 3 และ 4 พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Fusarium* sp. ในดินมากที่สุด 2.8×10^3 และ 3.4×10^3 cfu/g รองลงมา คือ เชื้อรา *Penicillium* sp. 4.8×10^2 และ 4.8×10^2 cfu/g (Table 5, Figure 4)

จากผลการทดลองนี้พบว่าในองุ่นระยะ 1 2 3 และ 4 ของทุกสวน มีการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. aculeatus* และ *Penicillium* sp. ในปริมาณที่สูง และเมื่อเปรียบเทียบกัน 4 สวน พบว่าองุ่นสวนที่ 3 มีการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. aculeatus* และ *Penicillium* sp. มากที่สุด อยู่ระหว่าง 5.0×10^3 - 1.7×10^4 cfu/g และ 6.8×10^3 - 4.3×10^4 cfu/g ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ขององุ่นทุกระยะในแต่ละสวน พบว่าสวนที่ 3 มีการสร้างสารโอคราทอกซิน เอ สูงกว่าสวนอื่น คือ ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 2.9-119.0 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และในดินยังพบเชื้อราตัวอื่น ๆ ที่ปนเปื้อน เช่น *Fusarium* sp. *Alternaria* sp. *Cladosporium* sp. และ*Curvularia* sp. อีกด้วย ซึ่งตรงกับผลการทดลองของเชื้อราที่ปนเปื้อนในผลองุ่น คือ เมื่อพบเชื้อราในดิน ก็พบเชื้อราในผลองุ่นเช่นเดียวกัน

5.2 การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในอากาศ บริเวณแปลงปลูก

เมื่อตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในอากาศ จากสวนองุ่นสายพันธุ์แบล็คโอปอล จำนวน 3 สวน และองุ่นสายพันธุ์ชีราส จำนวน 1 สวน พบว่า

สวนที่ 1 มีการปนเปื้อนของเชื้อรากลุ่ม *Penicillium* sp., *A. aculeatus*, *Fusarium* sp., *A. niger*, *Alternaria* sp., *Curvularia* sp และ *Rhizopus* sp. (Table 6)

สวนที่ 2 พบการปนเปื้อนของเชื้อรากลุ่ม*Penicillium* sp., *A. aculeatus*, *A. niger*, *Alternaria* sp., *Curvularia* sp, *Cladosporium* sp. และ *Rhizopus* sp. (Table 6)

สวนที่ 3 พบการปนเปื้อนของเชื้อรากลุ่ม*Penicillium* sp., *A. aculeatus*, *A. niger*, *Alternaria* sp., *A. flavus*, *Cladosporium* sp. และ *Rhizopus* sp.(Table 6)

สวนที่ 4 พบการปนเปื้อนของเชื้อรากลุ่ม *Penicillium* sp., *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. (Table 6)

จากผลการทดลองนี้พบว่าในองุ่นระยะ 1 2 3 และ 4 ของทุกสวน มีการปนเปื้อนเชื้อรา *A. aculeatus* และ *Penicillium* sp. ซึ่งสอดคล้องกับการปนเปื้อนของเชื้อราในผลองุ่น และในดินว่าพบเชื้อรา *A. aculeatus* และ *Penicillium* sp. มากเช่นกัน

6. ประเมินเข้าทำลายของเชื้อราปนเปื้อน และปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในแต่ละขั้นตอนการผลิต

6.1 วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารโอคราทอกซินในขั้นตอนการผลิต

ตั้งแต่การเตรียมดินเมื่อเริ่มการปลูกองุ่นไม่มีการทำความสะอาดแปลงปลูก เก็บเศษซากวัชพืชและสวนตาง ๆ ของวัชพืชออกจากแปลง เพื่อทำลายพืชอาศัย (host plant) ของเชื้อราวัชพืชเหล่านี้จะกลายเป็นแหล่งสะสมเชื้อโรค กระจายและแพร่เชื้อโรคได้เป็นอย่างดี การทำลายพืชเหล่านี้เช่นการขุดทิ้ง การเผาไฟจึงเป็นป้องกันการปนเปื้อนและการแพร่กระจายของเชื้อได้ดีมากวิธีการหนึ่ง (Figure 5)

ระยะเลี้ยงช่อดอกผลพวงองุ่นและระยะเก็บเกี่ยวผลผลิตไม่มีการตัดผลองุ่นที่เป็นโรคออกจากแปลงเพื่อเผาทำลาย ยังคงปล่อยให้เน่าคาต้นเป็นแหล่งแพร่กระจายของโรค และเมื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตไปแล้ว องุ่นที่เน่าคาต้นก็ทำการตัดทิ้งลงมาที่พื้น และไม่มีการนำเก็บออกนอกแปลงปล่อยทิ้งไว้ทำให้เกิดการสะสมเชื้อราในดิน จึงเป็นสาเหตุที่ว่าเมื่อทำการตรวจปริมาณเชื้อราที่ปนเปื้อนในดินและอากาศจึงพบปริมาณเชื้อรามาก (Figure 6)

6.2 หาแนวทางการแก้ไขการปนเปื้อนของเชื้อราและสารโอคราทอกซินเอ ในขั้นตอนการผลิต

1. การนำเอาวิธีเขตกรรมมาปรับใช้ในการปลูกองุ่น ต้นองุ่นต้นใดแสดงอาการผิดปกติซึ่งอาจจะเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดโรคก็ให้รีบกำจัดต้นพืชหรือส่วนของพืชที่เป็นโรคทิ้งก่อนที่จะลุกลามแพร่กระจาย ซึ่งทำ

ได้โดยถอนทำลายต้นพืช นำมาเผาไฟหรือนำไปทิ้งให้ไกลจากแหล่งปลูกพืช ขณะเดียวกันก็หมั่นดูแลทำความสะอาดแปลงปลูก อย่าให้มีวัชพืชขึ้นรกรุงเพื่อป้องกันการสะสมโรคและแมลง

2. การปรับสภาพแวดล้อมไม่ให้เหมาะสมกับการเกิดโรค เพื่อไม่ให้เป็นสิ่งช่วยส่งเสริมการเกิดและระบาดของโรค เช่น การตัดแต่งกิ่งองุ่นไม่ให้ทึบจนเกินไป เพื่อให้อากาศระบายถ่ายเท การลดความชื้นสามารถทำได้โดยให้น้ำระบบน้ำหยด เป็นต้น จะช่วยป้องกันและลดการปนเปื้อนเชื้อราบนต้นองุ่นและผลองุ่น

Table 1 Percentage of fungi contamination on raisins

Kind of products	Location		No.of analyzed samples	Contaminated fungi (%)					
				A. niger	*A.ochraceus.*	*A. flavus*	*Eurotium* sp.	*Penicillium* sp.	*Rhizopus* sp.
black raisin	supermarket	POPT	5	100.00	20.00	20.00	60.00	20.00	0.00
black raisin	supermarket	PPO	4	25.00	0.00	0.00	50.00	25.00	0.00
black raisin	market	POPT	6	100.00	16.67	16.67	50.00	50.00	50.00
golden raisin	market	POPT	6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
golden raisin	supermarket	PPO	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Average from 300 fruit samples

POPT = produced in oversea and packed in thailand

PPO = produced and packed in oversea

Table 2 Contamination of fungi and ochratoxin from grape product.

Kind of products	Location		sample	Contaminated fungi (%)						Average amount of OTA (µg/kg)
				A. niger	*A. ochraceus.*	*A. flavus*	*Eurotium* sp.	*Penicillium* sp.	*Rhizopus* sp.	
black raisin	supermarket	POPT	1	58.67	0.00	0.67	0.33	0.00	0.00	9.27
			2	85.00	0.00	0.00	2.00	0.67	0.00	7.00
			3	49.00	0.00	0.00	3.00	0.00	0.00	4.97
			4	54.33	2.67	0.00	0.33	0.00	0.00	9.57
			5	62.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	11.40
black raisin	supermarket	PPO	6	0.00	0.00	0.00	10.00	0.00	0.00	6.53
			7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	23.33
			8	0.00	0.00	0.00	0.33	0.00	0.00	7.07
			9	2.00	0.00	0.00	0.00	0.67	0.00	11.83
black raisin	market	POPT	10	8.00	0.00	0.00	0.00	42.33	3.33	5.57
			11	13.33	0.00	0.00	3.00	2.67	0.00	2.63
			12	2.67	0.33	3.00	0.33	0.67	0.00	5.53
			13	30.00	0.00	0.00	0.67	0.00	0.00	2.13
			14	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	2.27
			15	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	3.10
golden raisins	supermarket	POPT	16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.13
			17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.40
golden raisins	supermarket	PPO	18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.17
golden raisins	market	POPT	19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.07
			20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.70
			21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.07
			22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.47
			23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.93
			24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.63
grape juice	supermarket	PT	25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.30
			26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.17
			27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.13
			28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.53
			29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.80
			30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.67
			31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.63
wine	supermarket	PPO	32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.17
			33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.23
			34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00
			35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.57
			36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.27
			37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.63
			38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.57
			39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.53
			40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.87
wine	market	PT	41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.40
			42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.83
			43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.27

		44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.33
		45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.20

Average from 300 fruit samples in raisins

POPT = produced in oversea and packed in thailand

PPO = produced and packed in oversea

PT = produced in thailand

Maximum level limited of ochratoxin contamination in raisins not more than 10 microgram/kilogram (ppb)

Maximum level limited of ochratoxin contamination in grape juice and wine not more than 2 microgram/kilogram (ppb)

Table 3 Ochratoxin A levels producd by different fungi in yeast extract sucrose broth

Kind of products	Location		samples	Average amount of OTA (µg/kg)					
				A. niger	*A. ochraceus.*	*A. flavus*	*Eurotium* sp.	*Penicillium* sp.	*Rhizopus* sp.
black raisin	supermarket	POPT	1	5.20	-	1.10	2.70	-	-
			2	3.00	-	-	2.40	3.10	-
			3	4.10	-	-	1.75	-	-
			4	2.63	12.40	-	2.20	-	-
			5	2.60	-	-	-	-	-
black raisin	supermarket	PPO	6	-	-	-	2.55	-	-
			7	-	-	-	-	-	-
			8	-	-	-	4.10	-	-
			9	3.33	-	-	-	6.20	-
black raisin	market	POPT	10	2.03	-	-	-	4.80	0.00
			11	1.80	-	-	2.23	2.60	-
			12	3.33	5.30	0.80	1.80	4.13	-
			13	1.90	-	-	1.35	-	-
			14	2.16	-	-	-	-	0.00
			15	2.50	-	-	-	-	0.00

POPT = produced in oversea and packed in thailand

PPO = produced and packed in oversea

Table 4 Contamination of fungi and ochratoxin a from grape fruit at various stages of growth

Orchard	stage	Contaminated fungi (%)											Average amount of OTA (µg/kg)
		A. niger	*A.aculeatus*	*A. flavus*	*Penicillium* sp.	*Rhizopus* sp.	*Curvularia* sp.	*Fusarium* sp.	*Alternaria* sp.	*Nigrospora* sp.	*Cladosporium* sp.	*bacteria*	
1	1	0	6	0	4	0	15	5	44	28	3	0	15.10
	2	0	15	0	0	0	18	6	44	9	3	0	7.95
	3	5	68	0	3	0	1	4	2	0	0	0	8.45
	4	0	20	0	0	1	0	1	3	0	0	bac	4.80
2	1	3	15	0	6	0	22	2	18	10	41	0	113.7
	2	0	18	0	1	0	26	0	25	3	74	0	39.4

	3	1	31	0	54	0	15	2	2	1	19	0	20.3
	4	0	66	0	8	0	1	0	0	0	0	bac	13.9
3	1	14	84	0	30	1	3	1	3	1	0	0	92.72
	2	1	91	3	41	0	0	18	9	2	0	0	119.0
	3	0	100	0	35	2	1	0	1	0	0	0	8.9
	4	18	21	0	20	2	2	0	0	1	0	bac	2.9
4	1	0	0	0	16	0	5	39	41	7	10	0	31.86
	2	0	0	0	19	0	7	41	49	11	11	0	48.65
	3	0	0	0	11	0	0	42	43	13	10	0	14
	4	0	0	0	11	0	3	57	56	9	13	0	8.3

Average from 100 fruits samples

stage 1 30-40 day after fruit set stage 2 60-70 day after fruit set

stage 3 90-100 day after fruit set stage 4 120 day after fruit set

Table 5 Quantitative of contaminated fungi in soil surface from grape orchard

		Fungi colonies (cfus/g)									
orchard	stage	*Penicillium* sp.	*A. aculeatus*	*Alternaria* sp.	*A. ochraceus.*	*Curvularia* sp.	*Fusarium* sp.	*A. niger*	*A. flavus*	*Trichoderma* sp.	*Cladosporium* sp.
1	1	2.5×10^{2}	4.7×10^{3}	6.7×10^{1}	0	0	3.3×10^{1}	1.1×10^{3}	3.3×10^{1}	0	0
	2	1.0×10^{2}	1.9×10^{3}	8.5×10^{2}	0	0	3.8×10^{2}	0	0	0	0
	3	8.3×10^{1}	3.3×10^{3}	8.3×10^{1}	0	0	4.8×10^{2}	1.1×10^{3}	0	0	0
	4	1.0×10^{2}	2.0×10^{3}	6.8×10^{2}	0	0	4.0×10^{2}	0	0	0	0
2	1	3.7×10^{3}	6.3×10^{2}	0	0	0	1.7×10^{2}	0	0	8.3×10^{1}	0
	2	3.7×10^{2}	2.3×10^{3}	3.7×10^{2}	0	0	2.0×10^{2}	0	0	0	0
	3	3.1×10^{3}	2.3×10^{3}	1.5×10^{2}	0	0	3.2×10^{2}	0	0	0	0
	4	4.0×10^{2}	3.0×10^{3}	3.7×10^{2}	0	0	2.0×10^{2}	0	0	0	0
3	1	6.8×10^{3}	1.7×10^{4}	1.0×10^{3}	0	1.2×10^{3}	1.5×10^{3}	7.7×10^{3}	0	3.3×10^{2}	0
	2	4.3×10^{4}	8.5×10^{3}	2.8×10^{3}	1.3×10^{3}	1.7×10^{3}	3.3×10^{2}	0	0	0	0
	3	2.2×10^{4}	1.2×10^{4}	1.3×10^{4}	0	1.5×10^{3}	4.3×10^{3}	0	0	0	0
	4	4.2×10^{4}	5.0×10^{3}	0	0	0	3.3×10^{2}	3.3×10^{2}	0	8.3×10^{2}	0
4	1	3.6×10^{3}	3.7×10^{2}	0	1.1×10^{3}	0	5.0×10^{2}	0	0	0	2.7×10^{2}
	2	4.3×10^{3}	3.8×10^{2}	0	1.3×10^{3}	0	3.3×10^{2}	0	0	0	1.8×10^{2}
	3	4.8×10^{2}	0	4.8×10^{2}	0	0	2.8×10^{3}	0	0	5.0×10^{1}	3.5×10^{2}
	4	4.8×10^{2}	0	5.2×10^{2}	0	0	3.4×10^{3}	0	0	6.7×10^{1}	4.2×10^{2}

Table 6 Contamination of fungi in air from grape orchard

orchard	stage	Contaminated fungi (%)										
		A. niger	*A. ochraceus*	*A. flavus*	*Penicillium* sp.	*Rhizopus* sp.	*A.aculeatus*	*Curvularia* sp.	*Fusarium* sp.	*Alternaria* sp.	*Nigrospora* sp.	*Cladosporium* sp.
1	1	-	-	-	√	-	√	-	√	√	-	-
	2	-	-	-	√	-	√	√	√	-	-	-
	3	√	-	-	√	-	√	-	-	√	-	-
	4	-	-	-	√	√	√	-	-	-	-	-
2	1	√	-	-	√	-	√	-	-	-	-	√
	2	-	-	-	√	-	√	√	-	√	-	-
	3	-	-	-	√	-	√	√	-	-	-	√
	4	-	-	-	√	√	√	-	-	-	-	√
3	1	√	-	-	√	-	√	-	-	√	-	-
	2	-	-	-	√	-	√	-	√	√	-	-
	3	-	-	-	√	√	√	-	√	√	-	-
	4	-	-	√	√	-	√	-	-	-	-	-
4	1	√	√	-	√	-	√	-	√	-	-	√
	2	-	√	-	√	-	√	-	-	√	-	-
	3	-	-	-	√	-	√	-	√	√	-	-
	4	√	-	-	√	-	√	-	-	-	-	√

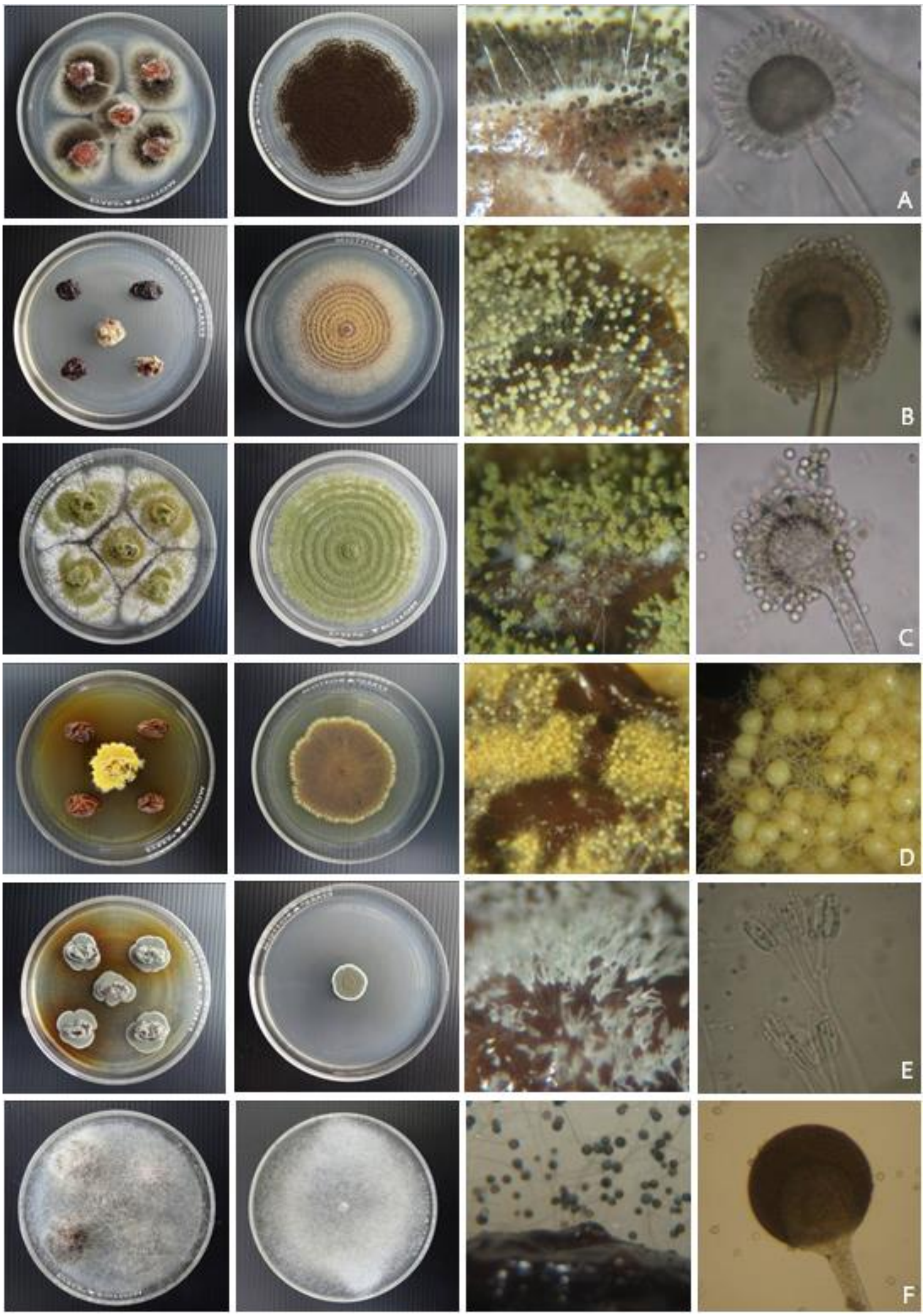


Figure 1 Colony and morphology of contaminated fungi on raisins

A) *Aspergillus niger* B) *Aspergillus ochraceus* C) *Aspergillus flavus*

D) *Eurotium* sp. E) *Penicillium* sp. F) *Rhizopus* sp.

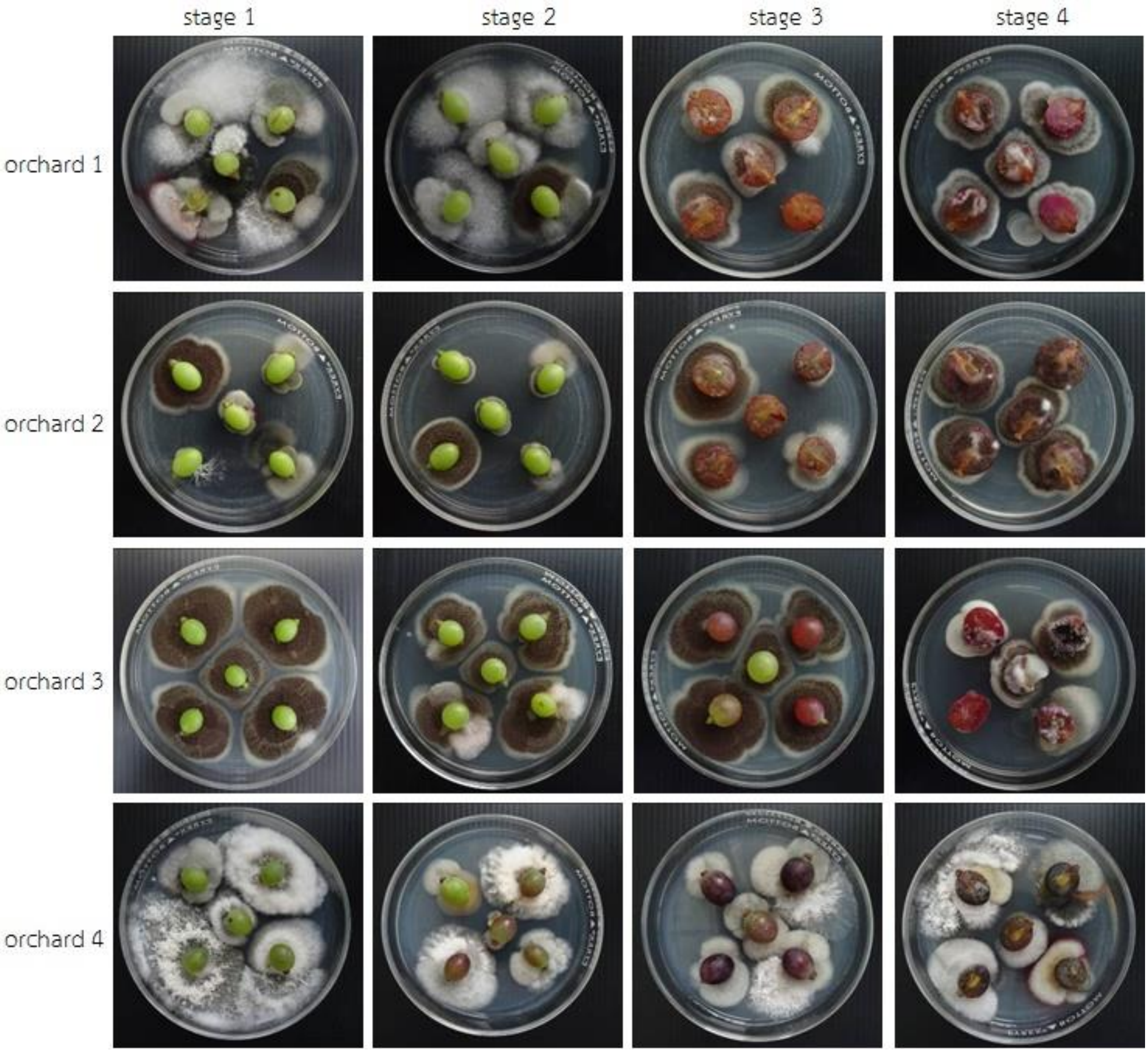

stage 1
stage 2
stage 3
stage 4
orchard 1
orchard 2
orchard 3
orchard 4

Figure 2 Contamination of fungi from grape fruit at various stages of growth

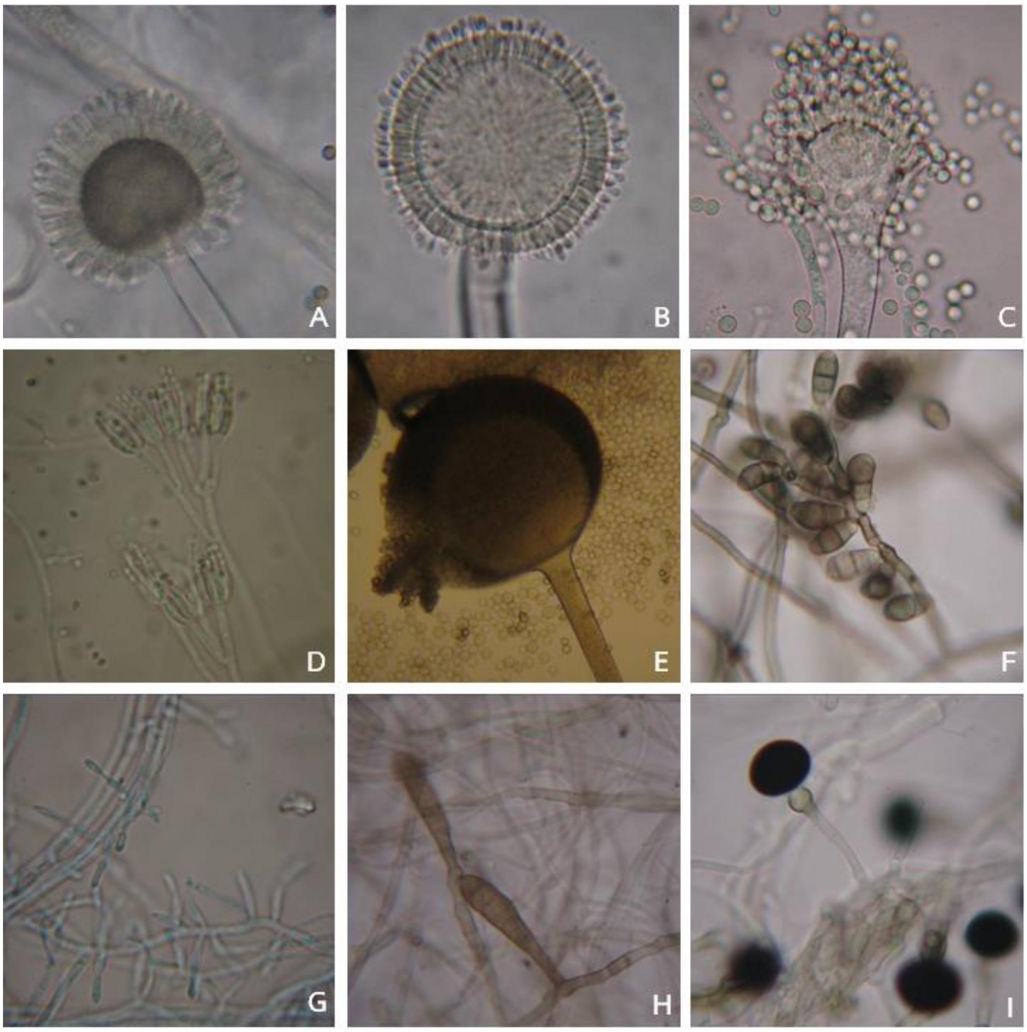


Figure 3 Colony and morphology of contaminated fungi on grape fruit

A) *Aspergillus niger*	B)*Aspergillusaculeatus*
C) *Aspergillus flavus*	D*)* *Penicillium* sp.
E) *Rhizopus* sp.	F) *Curvularia*sp.
G) *Fusarium* sp.	H) *Alternaria* sp.
I) *Nigrospora* sp.	

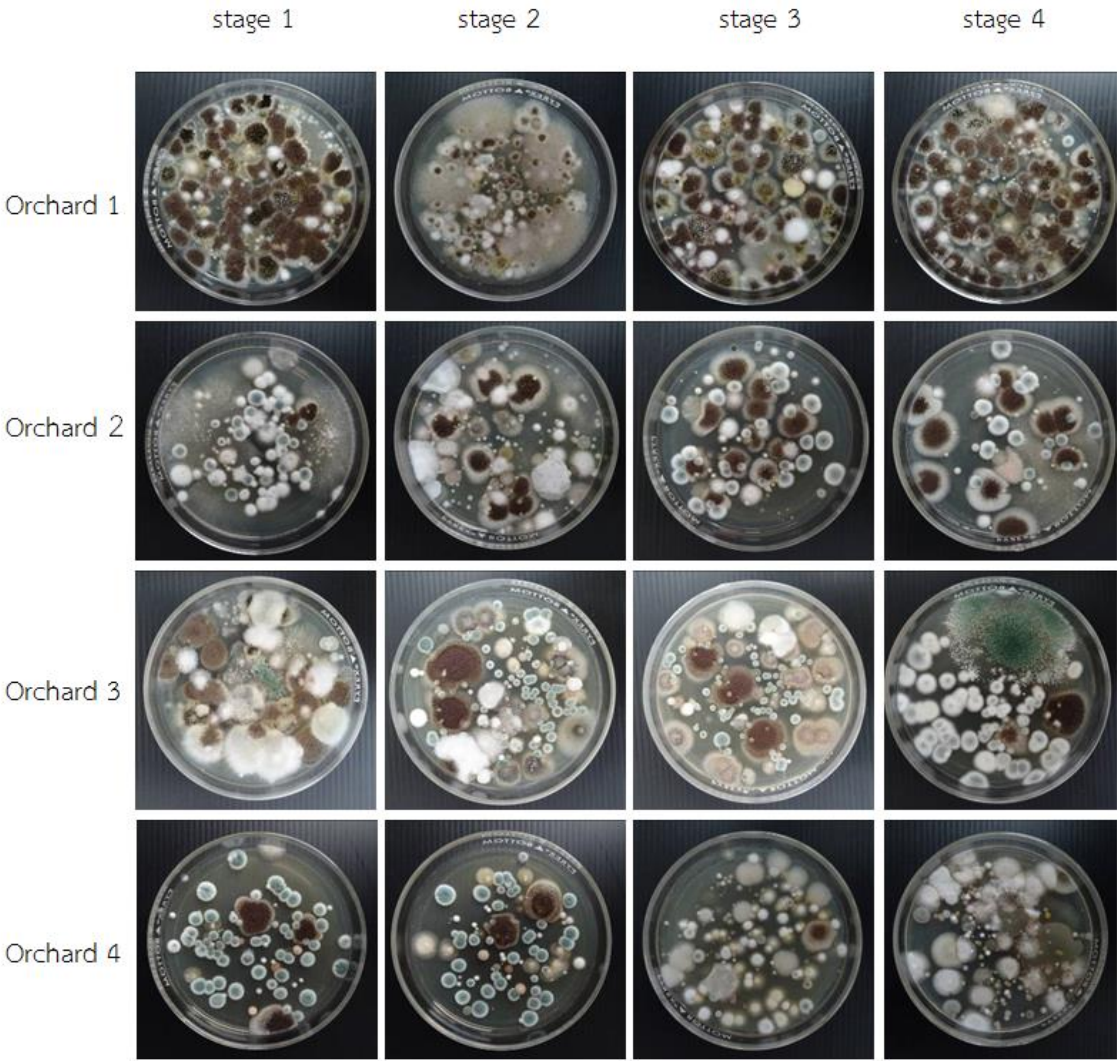

stage 1
stage 2
stage 3
stage 4
Orchard 1
Orchard 2
Orchard 3
Orchard 4

Figure 4 Contamination of fungi in soil from grape orchard

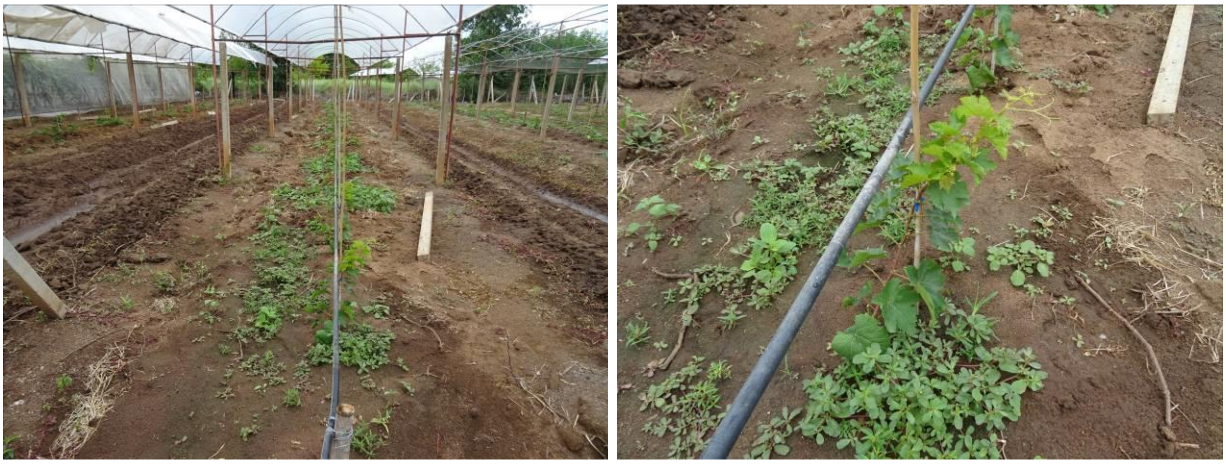


Figure 5 Soil without weed control

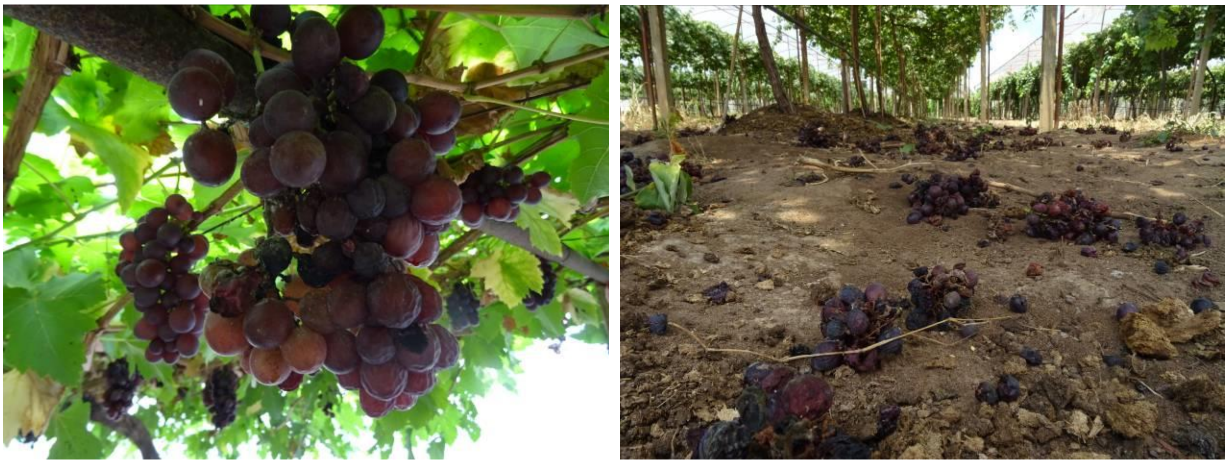


Figure 6 Removal of defectd fruits on trhe ground

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การทดลองที่ 2.1 แนวทางการควบคุมการปนเปื้อนและการลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในพริก

Aspergillus flavus และ *A. niger* เป็นเชื้อรา 2 สายพันธุ์หลักที่พบปนเปื้อนในตัวอย่างพริกแห้งทั้ง 3 พื้นที่ ซึ่งเป็นเชื้อราที่สามารถสร้างสารพิษแอฟลาทอกซิน และโอคราทอกซิน เอ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบเชื้อรา *A. ochraceus* ที่สร้างสารโอคราทอกซิน เอ โดยพริกแห้งจาก จ.ชัยภูมิ มีตัวอย่างที่มีปริมาณน้ำอิสระสูง มีการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ 70.27% รวมทั้งมีการปนเปื้อนเชื้อรา *A. niger* มากที่สุด รองลงมาคือเชื้อรา *A. flavus* และ *A. ochraceus* ตัวอย่างพริกแห้งทั้งหมดมีเพียง 1 ตัวอย่างที่พบสารโอคราทอกซิน เอ สูง 65.0 μg/kg เกินมาตรฐานที่สหภาพยุโรปกำหนด ซึ่งมีสาเหตุมาจากการเก็บรักษาที่ไม่ถูกวิธี ส่วนพริกป่นที่ทดสอบพบว่ามีการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ไม่เกินค่ามาตรฐานที่กำหนด วิธีการลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ โดยการให้ความร้อนพริกแห้งด้วยตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 30, 45 และ 60 นาที มีปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ทำให้สารพิษโอคราทอกซินลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (พริกแห้งที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน) ซึ่งการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ จากชุดควบคุมได้มากที่สุด 77.71% แนวทางในการควบคุมการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ควรดูแลตั้งแต่การจัดการหลังการเก็บเกี่ยวจนถึงการเก็บรักษาก่อนถึงมือผู้บริโภค

การทดลองที่ 2.2 ศึกษาแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนสารพิษ patulin ในผลิตผลและผลิตภัณฑ์เกษตร

1. การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราในผลไม้แปรรูป 12 ชนิดผลิตภัณฑ์ รวม 338 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อรา 41 ตัวอย่าง คิดเป็น 12.13 % โดยพบว่ามะตูมแห้งมีการปนเปื้อนเชื้อรามากที่สุด คือพบ 28 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่าง 28 ตัวอย่าง คิดเป็น 100 % แม้ว่าจะไม่พบการปนเปื้อนสารพิษ patulin แต่อาจมีความเสี่ยงที่จะปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราชนิดอื่น

2. การเก็บตัวอย่างผลไม้สดนำเข้าจากด่านตรวจพืชเชียงแสน จังหวัดเชียงราย รวม 15 ชนิด จำนวน 192 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อราในทุกตัวอย่าง แต่ไม่พบเชื้อราที่สร้างสารพิษ patulin

3. การตรวจสอบการปนเปื้อนสารพิษ patulin ตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้และผลไม้แปรรูปรวมทั้งหมด 28 ตัวอย่าง โดยห้องปฏิบัติการ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) พบว่าไม่มีการปนเปื้อนสารพิษ patulin

4. ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อรา patulin ในแต่ละตัวอย่างผลิตผลสด แห้ง แปรรูปชนิดต่าง ๆ เป็นผลจากการสุ่มตรวจในช่วงเวลาหนึ่ง ๆ จากแหล่งหนึ่ง ๆ เท่านั้น ไม่ได้เป็นการรับรองว่าผลิตผลชนิดนั้นหรือแหล่งการผลิตนั้นทั้งหมดมีความปลอดภัยและจะปลอดภัยในทุกรุ่นการผลิต เนื่องจากการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อรามีปัจจัยที่เข้ามามีส่วนร่วมมากมาย จึงมีความจำเป็นที่จะต้องจัดให้มีการตรวจติดตามเป็นระยะ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นปัจจุบันและทันต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมของการผลิตที่อาจเปลี่ยนไป

การทดลองที่ 2.3 การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษแอฟลาทอกซิน บี1 ในผลผลิตพริกไทย

1. พบการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินในพริกไทยขาว พริกไทยขาวป่น พริกไทยดำ และพริกไทยดำป่น สูงสุด 16.2, 12.4, 18.5 และ 59.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นพริกไทยที่ได้จากร้านค้าและมีการจำหน่ายข้ามปี ในขณะที่พริกไทยจากแปลงเกษตรกรที่ผลิตภายในปีพบการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินในปริมาณที่ต่ำกว่า

2. การผลิตพริกไทยดำพบโอกาสในการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินมากกว่าการผลิตพริกไทยขาว โดยพบการปนเปื้อนในพริกไทยดำระหว่างขั้นตอนการตากสูงที่สุด และพบการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* ในพริกไทยขาวในขั้นตอนการหมักจนถึงการล้างและขัดเอาเปลือกออก

3. การผลิตพริกไทยขาว ไม่ควรทำการหมักนานจนเกินไป หรืออาจใช้วิธีการแช่น้ำ และควรตากให้แห้งทันทีหลังขั้นตอนการล้างเพื่อเอาส่วนเปลือกออก

4. การผลิตพริกไทยดำ ควรตากทันทีหลังการเก็บเกี่ยว มีวัสดุรองตากที่สะอาด ตากบนพื้นที่ยกสูงจากพื้นดิน ไม่ควรตากบนพื้นดินโดยตรง และหมั่นเกลี่ยผลพริกไทยให้ได้รับแสงแดดอย่างทั่วถึง

การทดลองที่ 2.4 ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในกาแฟและผลิตภัณฑ์

จากการศึกษาการผลิตเมล็ดกาแฟดิบของไทยพบข้อบกพร่องจากการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษ AFB_1 และ OTA ในกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟดิบที่ต้องแก้ไข คือ กระบวนการผลิตแบบแห้งพบข้อบกพร่องในขั้นตอนการแปรรูปของกาแฟโรบัสต้าของเกษตรกรทางภาคใต้ ในขั้นตอนการแปรรูปในระยะหมักและตากผลแห้งเชอรี่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษสูง เนื่องจากช่วงเก็บเกี่ยวและการตากแห้งในลานของเกษตรกรทางภาคใต้เป็นฤดูมรสุม รวมทั้งการตากทั้งผลกาแฟสุกและยังไม่สุกรวมกัน และเกษตรกรมีความเข้าใจผิดเกี่ยวกับกระบวนการผลิตหลังการเก็บเกี่ยวว่าการหมักผลกาแฟในถุงกระสอบต่ออีกเป็นเวลานานจะทำให้สีเปลือกได้ง่ายขึ้น แต่กลับทำให้มีความชื้นในกาแฟดิบสูงขึ้น มีผลทำให้เกิดเชื้อราในตัวอย่างในผลแห้ง ซึ่งเก็บไว้ในกระสอบต่อเป็นเวลานาน โดยผลการตรวจพบเชื้อราที่สร้างสารพิษ ได้แก่ *A. niger*, *A. ochraceus* และ *A. flavus* ปนเปื้อนสูงสุด ถึงแม้พบเชื้อราในปริมาณน้อยแต่สามารถสร้างสารพิษ AFB_1 และ OTA ได้สูง ในขณะที่ผลการตรวจการปนเปื้อนสารพิษทั้งสองชนิดในผลิตภัณฑ์กาแฟคั่วไม่พบการปนเปื้อนสารพิษ

ในขั้นตอนการแปรรูปกาแฟอาราบิก้าและทริปิก้าของเกษตรกรทางภาคเหนือ ที่มีกระบวนการผลิตแบบเปียก พบข้อบกพร่องจากการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษในระดับต่ำ เนื่องจากเกษตรกรมีการตากกาแฟกะลาให้แห้งได้เร็วกว่าการผลิตแบบแห้งของเกษตรกรทางภาคใต้ การผลิตกาแฟของเกษตรกรทางภาคเหนือมีการตากบนตาข่าย และมีหลังคาพลาสติกคลุม เพื่อป้องกันฝนและน้ำค้าง ในระยะการเก็บรักษาในโรงเก็บ มีการคัดเมล็ดดี เมล็ดกาแฟดิบเก็บใส่ในภาชนะบรรจุที่สะอาด มีการเก็บรักษาในโรงเก็บถ่ายเทอากาศสะดวก เมล็ดมีความชื้นต่ำกว่า 12% ซึ่งพบข้อบกพร่องของเมล็ดกาแฟดิบจากเชื้อราน้อยและการปนเปื้อนสารพิษในระดับต่ำ เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานสินค้าเกษตร ส่วนผลการตรวจกาแฟคั่วและผลิตภัณฑ์กาแฟที่วางจำหน่ายทุก

ตัวอย่างตรวจไม่พบการปนเปื้อนสารพิษ OTA และพบการปนเปื้อนสารพิษ AFB$_1$ ที่ระดับต่ำอยู่ในช่วง 0.00-4.37 พีพีบี แสดงว่ากาแฟคั่วและผลิตภัณฑ์กาแฟที่วางจำหน่ายมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

การทดลองที่ 2.5 ศึกษาควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลองุ่นบริโภคสดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากองุ่น

1. ลูกเกดสีดำนำเข้าจากต่างประเทศนำมาบรรจุลงกล่องในประเทศไทย และลูกเกดสีดำนำเข้าจากต่างประเทศตักแบ่งขาย พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A.niger* 100% ทั้งสองแบบ รองลงมามีการปนเปื้อนเชื้อรา *Eurotium* sp. 60 และ 50% นอกจากนี้ยังพบเชื้อรา *Rhizopus* sp. ในลูกเกดสีดำที่ตักแบ่งขายตามตลาด แต่ไม่พบในลูกเกดสีดำชนิดบรรจุแบบกล่อง ส่วนลูกเกดสีดำที่ผลิตและบรรจุในต่างประเทศแบบกล่อง ขายที่ซุปเปอร์มาร์เก็ต พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Eurotium* sp. มากที่สุด 50% รองลงมาพบเชื้อรา *A.niger* และ *Penicillium* sp. 25% และลูกเกดชนิดสีเหลือง น้ำองุ่น และไวน์ ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อรา

2. ลูกเกดสีดำ ลูกเกดสีเหลือง น้ำองุ่น และไวน์ มีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 2.13-23.33, 3.07-9.93, 1.53-4.63 และ 1.87-4.83 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ

3. องุ่นระยะที่ 1 และ ระยะที่ 2 ของทุกสวน มีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 7.95-119.0 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ซึ่งสูงกว่าองุ่นระยะที่ 3 และระยะที่ 4 ของทุกสวน ที่มีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 2.90-20.3 ไมโครกรัม/กิโลกรัม พบการปนเปื้อนของเชื้อรากลุ่มที่สร้างสารโอคราทอกซิน เอ แต่ละสวน คือ *Penicillium* sp. และ *A. aculeatus* และกลุ่มเชื้อรากลุ่มที่ไม่สร้างสารโอคราทอกซิน เอ คือ *Alternaria sp. Curvularia sp.* และ *Cladosporium* sp. เมื่อทำการตรวจดินและอากาศในแปลงปลูกแต่ละสวน พบการปนเปื้อนเชื้อรา *Penicillium* sp. และ *A. aculeatus* ปริมาณสูง ซึ่งสอดคล้องกับผลองุ่นที่พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Penicillium* sp. และ *A. aculeatus* เช่นกัน

4. เชื้อราที่สารสร้างโอคราทอกซินมีการปนเปื้อนใน ดิน อากาศ และผลองุ่น ดังนั้นควรมีระบบการจัดการที่ดีตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงเก็บเกี่ยว เช่น การตัดแต่งผลองุ่นที่เน่าเสีย ไม่ควรทิ้งไว้ในแปลงปลูก เพื่อเป็นการลดปริมาณเชื้อราและป้องกันมิให้เชื้อราแพร่กระจาย

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาวิธีควบคุมความเสียหายที่เกิดจากเชื้อ *Penicillium* spp. หลังการเก็บเกี่ยวในพืชตระกูลส้ม พบว่าความเสียหายในแปลงปลูกส่วนใหญ่เกิดจากการกระแทกของผล ภัยธรรมชาติในแปลง การปฏิบัติการเก็บเกี่ยวและการขนส่งผลผลิต ส่วนการควบคุมโรคในแปลง ได้แก่ โรคกรีนนิ่ง ความเสียหายในกระบวนการผลิตในโรงคัดบรรจุส่วนใหญ่ เป็นความเสียหายทางกายภาพ ได้แก่ การช้ำ การเกิดบาดแผล เป็นผลมาจากความเสียหายจากแปลงปลูก ส่งผลให้เกิดการเข้าเกิดการเน่าเสีย และเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายทางบาดแผลหรือรอยช้ำที่เกิดขึ้น อาการจะรุนแรงเพิ่มมากขึ้นหลังการเก็บรักษาเป็นเวลานาน เชื้อที่เข้าทำลายผลส้มสายน้ำผึ้งในกระบวนการผลิตในโรงคัดบรรจุ ได้แก่ เชื้อ *Fusarium* spp. พบมากกว่า 90% การควบคุมโรคในแปลง ได้แก่ โรคกรีนนิ่ง เกษตรกรผู้ปลูกบรรเทาอาการและรักษาต้นส้มด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาผลตกค้างของการใช้ยาปฏิชีวนะในผลส้มเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ความเสียหายในกระบวนการผลิตในโรง ควรมีการคัดแยกผลิตผลที่เกิดบาดแผลและรอยช้ำ เพื่อป้องกันการเสียหายจากเชื้อสาเหตุโรคระหว่างการเก็บรักษาผลิตผลเพื่อรอจำหน่าย

2. การศึกษาการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อรา *Curvalaria* sp. สาเหตุโรคดอกจุดสนิมกล้วยไม้สกุลหวายหลังการเก็บเกี่ยว พบว่าการระบาดของเชื้อสาเหตุของโรคดอกจุดสนิม และปัจจัยที่ส่งเสริมการแพร่ระบาดในแหล่งปลูกกล้วยไม้เพื่อการส่งออก 5 จังหวัด จำนวน 21 แปลง เชื้อรา *C. eragrostidis* ไม่พบเชื้อราสาเหตุในน้ำและดินทุกตัวอย่าง พบเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด ใบไหม้ 8 ไอโซเลท ได้แก่เชื้อรา *Nigrospora* sp., *Fusarium* sp., *Scytalidium* sp., *Fusarium solani*, *Bipolaris* sp., *Nodulissporium* sp., *Drechshera holmii* และ *Colletotrichum* sp. และพบเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. พบวัชพืช จำนวน 15 ชนิด หญ้ารังนก หญ้าตีนกา หญ้านกเขา หญ้าตีนนก หญ้าตีนตุ๊กแก กระเม็ง ตำลึง ผักปลัง เฟิร์น กระสัง บังบก ผักชีฝรั่ง ปอเทือง น้ำนมราชสีห์ และมะระขี้นก ขณะที่แหล่งจำหน่ายปากคลองตลาด ไม่พบเชื้อราสาเหตุโรคดอกจุดสนิม *C. eragrostidis* แต่พบเชื้อราสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp.ไอโซเลท T03 ควบคุมโรคดอกจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้สกุลหวายได้ดีกว่าชุดควบคุมขณะที่สารเคมี iprodione 50%WP ที่อุณหภูมิ 5 ℃ มีประสิทธิภาพดีที่สุด

3. การศึกษาแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนและการลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในพริก พบว่าในตัวอย่างพริกแห้งที่มีปริมาณน้ำอิสระสูง มีการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ 70.27% รวมทั้งมีการปนเปื้อนเชื้อรา *A. niger* มากที่สุด รองลงมาคือเชื้อรา *A. flavus* และ *A. ochraceus* ตัวอย่างพริกแห้งทั้งหมดมีเพียง 1 ตัวอย่างที่พบสารโอคราทอกซิน เอ สูง 65.0 μg/kg เกินมาตรฐานที่สหภาพยุโรปกำหนด ซึ่ง

มีสาเหตุมาจากการเก็บรักษาที่ไม่ถูกวิธี วิธีการลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ โดยการให้ความร้อนพริกแห้งด้วยตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 30, 45 และ 60 นาที มีปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ทำให้สารพิษโอคราทอกซินลดลงเมื่อเทียบกับพริกแห้งที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ลดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ จากชุดควบคุมได้มากที่สุด 77.71%

4. การศึกษาแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนสารพิษ patulin ในผลิตผลและผลิตภัณฑ์เกษตร พบว่าผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราในผลไม้แปรรูป 12 ชนิดผลิตภัณฑ์ รวม 338 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อรา 41 ตัวอย่าง คิดเป็น 12.13 % โดยพบว่ามะตูมแห้งมีการปนเปื้อนเชื้อรามากที่สุด คือพบ 28 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่าง 28 ตัวอย่าง ตัวอย่างผลไม้สดนำเข้าจากด่านตรวจพืชเชียงแสน จังหวัดเชียงราย รวม 15 ชนิด จำนวน 192 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อราในทุกตัวอย่าง แต่ไม่พบเชื้อราที่สร้างสารพิษ patulin ตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้และผลไม้แปรรูปรวมทั้งหมด 28 ตัวอย่าง พบว่าไม่มีการปนเปื้อนสารพิษ patulin

5. การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษแอฟลาทอกซิน บี1 ในผลผลิตพริกไทย พบการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินในพริกไทยขาว พริกไทยขาวป่น พริกไทยดำ และพริกไทยดำป่น สูงสุด 16.2, 12.4, 18.5 และ 59.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นพริกไทยที่ได้จากร้านค้าและมีการจำหน่ายข้ามปี ในขณะที่พริกไทยจากแปลงเกษตรกรที่ผลิตภายในปีพบการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินในปริมาณที่ต่ำกว่า การผลิตพริกไทยดำพบโอกาสในการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินมากกว่าการผลิตพริกไทยขาว โดยพบการปนเปื้อนในพริกไทยดำระหว่างขั้นตอนการตากสูงที่สุด จึงควรตากทันทีหลังการเก็บเกี่ยว มีวัสดุรองตากที่สะอาด ตากบนพื้นที่ยกสูงจากพื้นดิน ไม่ควรตากบนพื้นดินโดยตรง และหมั่นเกลี่ยผลพริกไทยให้ได้รับแสงแดดอย่างทั่วถึง และพบการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* ในพริกไทยขาวในขั้นตอนการหมักจนถึงการล้างและขัดเอาเปลือกออก จึงไม่ควรทำการหมักนานจนเกินไป หรืออาจใช้วิธีการแช่น้ำ และควรตากให้แห้งทันทีหลังขั้นตอนการล้างเพื่อเอาส่วนเปลือกออก

6. การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในกาแฟและผลิตภัณฑ์ พบว่ากระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟดิบของไทยมีข้อบกพร่องทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษแอฟลาทอกซิน (AFB_1) และโอคราทอกซิน (OTA) คือ กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟดิบแบบแห้งของกาแฟโรบัสต้าของเกษตรกรทางภาคใต้ ในขั้นตอนการแปรรูปในระยะหมักและตากผลแห้งเชอรี่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราได้แก่ *A. niger*, *A. ochraceus* และ *A. flavus* และสารพิษ AFB_1 และ OTA เนื่องจากช่วงเก็บเกี่ยวและการตากแห้งในลาน

ของเกษตรกรทางภาคใต้ตรงกับฤดูมรสุม รวมทั้งมีการตากผลกาแฟสุกและยังไม่สุกรวมกัน และเกษตรกรมีความเข้าใจผิดเกี่ยวกับกระบวนการผลิตหลังการเก็บเกี่ยวว่าการหมักผลกาแฟในถุงกระสอบต่ออีกเป็นเวลานานจะทำให้สีเปลือกได้ง่ายขึ้น แต่กลับทำให้มีการสะสมความชื้นส่งผลทำให้เกิดเชื้อราในตัวอย่างในผลแห้งที่เก็บไว้ในกระสอบต่อเป็นเวลานาน ขณะที่การแปรรูปกาแฟอาราบิก้าและทริปิก้าของเกษตรกรทางภาคเหนือพบการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษในระดับต่ำ เนื่องจากมีการตากกาแฟกะลาให้แห้งได้เร็วกว่าการผลิตแบบแห้งของเกษตรกรทางภาคใต้ การผลิตกาแฟของเกษตรกรทางภาคเหนือมีการตากบนตาข่าย และมีหลังคาพลาสติกคลุมเพื่อป้องกันฝนและน้ำค้าง ในระยะการเก็บรักษาในโรงเก็บ มีการคัดเมล็ดดี เมล็ดกาแฟดิบเก็บใส่ในภาชนะบรรจุที่สะอาด มีการเก็บรักษาในโรงเก็บถ่ายเทอากาศสะดวก เมล็ดมีความชื้นต่ำกว่า 12% ส่วนผลการตรวจกาแฟคั่วและผลิตภัณฑ์กาแฟที่วางจำหน่ายในท้องตลาดทุกตัวอย่างไม่พบการปนเปื้อนสารพิษ OTA และพบการปนเปื้อนสารพิษ AFB_1 ที่ระดับต่ำอยู่ในช่วง 0.00-4.37 พีพีบี แสดงว่ากาแฟคั่วและผลิตภัณฑ์กาแฟที่วางจำหน่ายมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

7. การศึกษาควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลองุ่นบริโภคสดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากองุ่น พบว่าลูกเกดสีดำนำเข้าจากต่างประเทศทั้งที่นำมาบรรจุลงกล่องในประเทศไทยและตักแบ่งขายตามน้ำหนัก พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A.niger* 100% รองลงมาคือเชื้อรา *Eurotium* sp. 60 และ 50% ตามลำดับ ส่วนลูกเกดสีดำ ลูกเกดสีเหลือง น้ำองุ่น และไวน์ มีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 2.13 - 23.33, 3.07 - 9.93, 1.53 - 4.63 และ 1.87 - 4.83 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบในสวนองุ่นพบการปนเปื้อนของเชื้อรากลุ่มที่สร้างสารโอคราทอกซิน เอ (*Penicillium* sp. และ *A. aculeatus*) ในผลิตผลของทุกสวนที่ทำการสำรวจ และพบมีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 2.90-20.3 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ซึ่งสอดคล้องกันกับผลการตรวจดินและอากาศในแปลงปลูกแต่ละสวนก็พบเชื้อรา *Penicillium* sp. และ *A. aculeatus* ปริมาณสูงเช่นกัน ส่วนแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนคือสวนควรมีระบบการจัดการที่ดีตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงเก็บเกี่ยว เช่น การตัดแต่งผลองุ่นที่เน่าเสีย ไม่ควรทิ้งไว้ในแปลงปลูก เพื่อเป็นการลดปริมาณเชื้อราและป้องกันมิให้เชื้อราแพร่กระจาย

บรรณานุกรม

กิจกรรมที่ 1 การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว

จริงแท้ ศิริพานิช. 2549. ชีววิทยาหลังการเก็บเกี่ยวและการวายของพืช. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 453 หน้า

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2543. โรคของกล้วยไม้และการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 61 หน้า.

เนตรนภิส เขียวขำ. 2554. สารพิษจากเชื้อราในผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว. (วันที่ 12 มิ.ย.56) เข้าถึงได้จาก อินเตอร์เน็ต http://www.phtnet.org/article/view-article.asp?aID=5344.

พิบูลย์ มงคลสุข. 2549. ลักษณะอาการของโรคดอกจุดสนิมของหวายมาดาม ปอมปาดัวร์และหวายลูกผสม. วารสารรามคำแหง 23(2): 85-94.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตร. เอกสารสถิติการเกษตรเลขที่ 416. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 93 หน้า

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2554. สถิติการค้าสินค้าเกษตรไทยกับต่างประเทศ ปี 2554. ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 135 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตร. เอกสารสถิติการเกษตรเลขที่ 416. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 93 หน้า

อารีรัตน์ เทียนขาว 2550. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* และควบคุมโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวาย.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 85 หน้า.

Barkai-Golan, R.and N. Paster. 2008. Mycotoxins in Fruits and Vegetables. San Diego, USA. 395 p.

Suprasert, D. and Yurayart, V. 2003. Survey of patulin contamination in fruit juice in Thailand. Journal of Kasetsart Veterinarians (Thailand), vol. 16(Special volume) page 26.

กิจกรรมที่ 2 การปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว

กรมวิชาการเกษตร. 2552. ระบบข้อมูลทางวิชาการ: พริกไทย. แหล่งที่มา http://it.doa.go.th/vichakan/news.php?newsid=27

กรมวิชาการเกษตร. 2560. สารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตร. โรงพิมพ์เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น กรุงเทพฯ.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2554. พริกขี้หนู. กลุ่มสื่อส่งเสริมการเกษตร ศูนย์วิทยบริการเพื่อส่งเสริมการเกษตร สำนักพัฒนาการถ่ายทอดเทคโนโลยี กรมส่งเสริมการเกษตร. 5 หน้า.

กระทรวงสาธารณสุข. 2529. มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. ราชกิจจานุเบกษาฉบับพิเศษ เล่มที่ 103 ฉบับที่ 98 ตอนที่ 23 ลงวันที่ 16 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2529.

ดวงจันทร์ สุขประเสริฐ และ วนิดา ยุรญาติ. 2545. สารพิษอฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในเครื่องเทศ. กองอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. วารสารสุขาภิบาลอาหาร 4(2): 33-37.

ปานหทัย นพชินวงศ์ สุรีรัตน์ ปัญญาโตนะ ทิพยา ไกรทอง และเสรี อยู่สถิตย์. 2554. การป้องกันการเกิดเชื้อราที่สร้างสารพิษออคราทอกซินเอในกาแฟโรบัสตาโดยการใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์. รายงานเรื่องเต็มผลการทดลองสิ้นสุดปีงบประมาณ 2553. 13 หน้า.

วีระ ภาคอุทัย และเยาวรัตน์ ศรีวรานันท์. 2557. พริก: ปลูกอย่างไรในภาวะโลกกำลังร้อน. โครงการ “การพัฒนาระบบการตัดสินใจและการจัดการโซ่อุปทานพริกปลอดภัย จังหวัดแพร่ น่าน และชัยภูมิ”. สถานการณ์และความเสี่ยงของสินค้าเกษตรไทย (agriculture@risk) เล่มที่ 4. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย กรุงเทพฯ. 28 หน้า.

ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว. 2546. Water Activity กับการควบคุมอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร. วารสารจาร์พา ปีที่ 9 ฉบับที่ 68 เดือนกันยายน/ตุลาคม 2545. แหล่งที่มา: http://www.phtnet.org/2003/09/26/, 25 ธันวาคม 2560.

ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว. 2552. ข่าวเกษตรประจำวัน. แหล่งที่มา: http://www.phtnet.org/news52/view-news.asp?nID=531, 25 ธันวาคม 2560.

สถาบันอาหาร. 2556. สารพิษในพริกขี้หนูป่น. คอลัมน์: มัน!มากับอาหาร. หนังสือพิมพ์ไทยรัฐ ฉบับวันศุกร์ที่ 8 มีนาคม 2556 ปีที่ 64 ฉบับที่: 20135. หน้า 7. แหล่งที่มา: http://www.iqnewsclip.com/selection/nfi.htm, 25 ธันวาคม 2560.

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร. 2560. กระบวนการแปรรูปผลไม้ [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.arda.or.th/kasetinfo/north/processing/process_fruit_dry.html, 18 กุมภาพันธ์ 2560.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2548. มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ มกอช. 2502-2548: การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับพริก. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 122 ตอนพิเศษ 117 ง วันที่ 20 ตุลาคม พุทธศักราช 2548. 25 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปี ๒๕๕๕. ชุมนุมสหกรณ์ การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. นนทบุรี. 174 หน้า.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. แนะเกษตรกรพริกไทยพร้อมรับผลกระทบระยะยาวตลาดเสรี อาเซียน. ข่าวประชาสัมพันธ์ 96/2555.

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

อนงค์ บิณฑวิหค, 2546. สารพิษจากรา : อะฟลาทอกซิน. กรุงเทพ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. Anli, E., and Alkis, I.M. 2010. Ochratoxin A and brewing technology: A review. Journal of the Institute of Brewing. 116: 23-32.

อนงค์ บิณฑวิหค. 2546. สารพิษจากเชื้อรา: แอฟลาทอกซิน. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 322 หน้า.

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

อรุณศรี วงศ์อุไร ศุภรา อัคคะสาระกุล และอมรา ชินภูติ. 2552.ศึกษาการปนเปื้อนเชื้อราและสารโอคราทอกซิน เอ ในกาแฟอราบิก้า. รายงานเรื่องเต็มผลการทดลองสิ้นสุดปีงบประมาณ 2552. 7 หน้า.

Anon. 2005. Commission regulation (EC) no 123/2005 of 26 January 2005. Amending regulation (CE) no 466/2001 as regards ochratoxin A. Journal of the European Union: L25/3-25/5.

Barkai-Golan, R. and N. Paster. 2008. Mycotoxins in Fruits and Vegetables. San Diego, USA. 395 p.

Barkai-Golan, R. and N. Paster. 2008. Mycotoxins in Fruits and Vegetables. San Diego, USA. 395 p.

Bisson, L., 2001."Optimail grape maturity. Department of Enology and Viticalture", AOAC Davis, Vol. 1: 11.

Boudra, H., P. Le Bars and J. Le Bars. 1995. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. Applied and Environmental Microbiology 61: 1156–1158.

Codex Alimentarius Commission. (2009). Codex General Standard for Contaminants and Toxins in Foods (CODEX STAN 193-1995).

EU Regulation Commission. 2003. Foodstuffs-Determination of Ochratoxin A in Barley and Roasted Coffee-HPLC Method with Immunoaffinity Column Cleanup. European Standard EN 14132. BSI, London.

European Commission. 2015. Commission Regulation (EU) 2015/1137 of 13 July 2015 amending regulation (EC) No 1881/2006 as regards the maximum level of ochratoxin A in *Capsicum* spp. spices. Official Journal of the European Union. p. L185/11-12.

Frisvad, J.C., Thrane, U., and Samson, R.A. 2007. Mycotoxin producers. *Food Mycology*. 28: 135-159.

IARC. 1993. Evalution of Carcinogenic Risk of Chemical to Humans. Some Naturally- Occurring Substances. Food Item and Constituents. Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Monographs, 56: 359- 362.

IARC. 1993. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Some naturally occurring substance: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines, and mycotoxins. *Internatonal Agency for Research on Cancer*. 56: 489.

International Agency for Research on Cancer. 1993. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; Some Naturally Occurring Substances : Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxine. Lyon, France: IARC; 56: 245-395.

Iqbal, S.Z., M.R. Asi, M. Zuber, J. Akhtar and M.J. Saif. 2013. Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial chilli and chilli sauce samples. Food control 30: 621-625.

Jalili, M. and S. Jinap. 2012. Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial dried chili. Food Control 24(1-2): 160-164.

Jeswal P. and D. Kumar. 2015. Mycobiota and natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and citrinin in Indian spices confirmed by LC-MS/MS. International Journal of Microbiology. p. 1-8.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2001. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. Available Source: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm, November 25, 2004.Leong S.L., Hocking A.D., Pitt J.I., Kazi B.A., Emmett R.W., Scott E.S. (2006). Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. *International Journal of Food Microbiology*, 111: S10–S17.

Li, D.L., X.M. Li and B.G. Wang. 2009. Natural Anthraquinone Derivatives from a Marine Mangrove Plant-Derived Endophytic Fungus Eurotium rubrum: Structural Elucidation and DPPH Radical Scavenging Activity. *J. Microbiol.Biotechnol* 19(7): 675-680.

Line, J. E., R. E. Brackett. 1995. Factors affecting aflatoxin B_1 removal by *Flavobacterium aurantiacum*. Journal of Food Protection 58(1): 91-94.

Linsdell, R.H.1983. Long life fruit juices and fruit drinks. *Food Technology in Australia*. 35: 180-182.

Meca, G., Blaiotta, G.,& Ritieni, A. (2010). Reduction of ochratoxin A duringg the fermentation of Italian red wine Moscato. *Food Control*, 21(4): 579-583.

Moss, M.O. 1996. Mycotoxin. *Mycological Research* 100: 513-523.

Nakajima, M., H. Tsubouchi, M. Miyabe and Y. Ueno. 1997. Survey of aflatoxin B_1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. J. Food and Agricultural Immunology. 9: 77-83.

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. **Eur J Plant Pathol.** 113: 159-171.

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

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

Rosa, C. A, Magnoli, C. E., Fraga, M. E., Dalcero, A. M., & Santana, D. M. (2004). Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Additives and Contaminants*. 21(4): 358-364.

Serra, R., Mendonca, C. and Venancio, A., 2006. Ochratoxin A occurrence and formation in Portuguese wine grapes at various stages of maturation. *Int J Food Microbiol*. 111: 35-39.

Terrier, N., Sauvage, F.X., Ageorges, A, Romieu, C. 2001. Changes in acidity and in proton transport at the tonoplast of grape berries during development. *Planta An International Journal of Plant Biology*. 213: 20–28.

Thompson, M., S.L.R. Ellison and R. Wood. 2006. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. Pure and Apply Chemistry 78(1): 145–196.

Varga, J., S. Kocsubé, Z. Péteri, C. Vágvölgyi and B. Tóth. 2010. Chemical, physical and biological approaches to prevent ochratoxin induced toxicoses in humans and animals. Toxins 2010(2): 1718-1750.

Varga,J., Rigo, K., Toth, B., Teren, J., and Kozakiewicz, Z. 2003. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology Biotechnology*. 41: 29-46.

Wang, Y., L. Wang, F. Liu, Q. Wang, J.N. Selvaraj, F. Xing, Y. Zhao and Y Liu. 2016. Review ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. Toxins 8(83): 1-15.

Zivkovic, S., Veljko G., Stefan S., Dusica D. and Nenad D. 2013. Control of Penicillium Expansum by Combining *Bacillus subtilis* and Sodium Bicarbonate. *In*. Proceeding of IV International Symposium, Agrosym 2013, Jahorina, Hotel Bistrica, October 3-6, 2013. pp. 535-539.