

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วิธีการทดลอง ในการศึกษาค้างนี้ประกอบด้วย 5 การทดลอง ดังนี้

1. การศึกษาสภาพโดยทั่วไปของโรงงานกะเทาะเปลือกถั่วลิสงในเขตจังหวัดกาฬสินธุ์ ซึ่งเป็นตัวแทนของการตลาดถั่วลิสงกะเทาะเปลือก โดยการสอบถามถึงสัมภาระเพื่อให้ทราบถึงบทบาทของโรงงานที่เป็นตัวกลางในการกระจายผลผลิตถั่วลิสงหลังการเก็บเกี่ยวจากเกษตรกรไปสู่โรงงานที่แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ตามคุณภาพของผลผลิตถั่วลิสง และเพื่อศึกษาถึงสภาพการเก็บรักษาของโรงงานกะเทาะเปลือกถั่วลิสงที่อาจจะสภาพแวดล้อมที่สนับสนุนการเจริญเติบโตและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อราที่ติดมากับฝักถั่วลิสง รวมทั้งการปฏิบัติในขั้นตอนต่าง ๆ ของโรงงานที่จะมีผลต่อการสะสมอะฟลาทอกซิน โดยมีการบันทึกข้อมูลที่สอบถามตั้งแต่การรับซื้อถั่วลิสงของเกษตรกร การคัดขนาดฝัก การกะเทาะเปลือก การคัดขนาดเมล็ดถั่วลิสง เพื่อส่งขายให้กับโรงงานแปรรูป แล้วนำผลการศึกษานี้ไปกำหนดรูปแบบการเก็บรักษา อายุการเก็บรักษา การกะเทาะเปลือก และการคัดขนาดเมล็ดของถั่วลิสงในการทดลองที่ 2 ต่อไป

2. การศึกษาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในสภาพการเก็บรักษาของโรงงานก่อนการกะเทาะเปลือกและในถั่วลิสงเกรดต่าง ๆ หลังการกะเทาะเปลือก โดยศึกษาถึงผลของระยะเวลาการเก็บรักษาในสภาพการเก็บของโรงงานกะเทาะเปลือกที่มีผลต่อการสะสมอะฟลาทอกซิน ซึ่งตามปกติแล้วโรงงานต่าง ๆ มักจะเก็บรักษาถั่วลิสงไว้ระยะเวลาหนึ่งเพื่อให้ถั่วลิสงมีปริมาณมากพอที่จะกะเทาะขายส่งตามคำสั่งซื้อของโรงงานแปรรูป โดยการทดลองนี้ได้นำถั่วลิสงทั้งเปลือกจำนวน 200 กิโลกรัม ที่โรงงานรับซื้อไว้มาเก็บรักษา ตามลักษณะและสภาพแวดล้อมการเก็บรักษาของโรงงานโดยการเก็บแบบบรรจุกระสอบวางเรียงไว้ในโรงเรือนที่มีการถ่ายเทอากาศดีในอุณหภูมิของอากาศปกติ วันแรกที่โรงงานรับซื้อถั่วลิสงและได้นำถั่วลิสงมาเก็บรักษาในการทดลองนี้ถือว่าเป็นวันเก็บเกี่ยวที่ 0 วัน เก็บรักษาถั่วไว้ 28 วัน เนื่องจากเจ้าของโรงงานให้ข้อมูลว่าในการรับซื้อถั่วลิสงไว้กะเทาะเปลือกนั้นจะกะเทาะขายส่งภายใน 1 เดือน และในช่วงที่ผลผลิตถั่วลิสงออกมามากหลังจากรับซื้อ

แล้วไม่เกิน 7 วัน ก็จะเริ่มกะเทาะเปลือก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการกะเทาะเปลือกถั่วในวันที่ 12 ของการเก็บรักษา เนื่องจากการกะเทาะในวันที่ 7 ของการเก็บรักษานั้นเป็นระยะเวลาการเก็บรักษาที่สั้นเกินไปในสภาพการเก็บรักษาของโรงงาน ซึ่งไม่น่าจะกะเทาะได้ทันในวันเก็บรักษาที่ 7 การสุ่มเก็บตัวอย่างในระหว่างการเก็บรักษามีการสุ่มตัวอย่างถั่วลิสงก่อนและหลังกะเทาะเปลือกมาวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในวันเก็บรักษาที่ 0 , 3 , 6 , 9 , 12 และ 28 วัน เพื่อศึกษาการสะสมอะฟลาทอกซินก่อนกะเทาะในวันที่ 0 , 3 , 6 , 9 และ 12 ซึ่งถ้าโรงงานสามารถกะเทาะถั่วขายส่งได้เร็ว การเก็บรักษาในโรงงานจะสั้นลง อาจจะมีระยะเวลาการสะสมอะฟลาทอกซินน้อยลง สำหรับการวิเคราะห์อะฟลาทอกซินในวันเก็บรักษาที่ 28 เพื่อศึกษาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในสภาพเมล็ดหลังการกะเทาะที่เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิห้องปกติ โดยถั่วลิสงที่กะเทาะแล้วในวันเก็บรักษาที่ 12 จะถูกนำไปคัดแยกขนาดตามแบบของโรงงานโดยการร่อนถั่วลิสงผ่านตะแกรงที่มีความกว้างของช่องตะแกรง 6/16 นิ้ว , 5/16 นิ้ว และ 4/16 นิ้ว ตามลำดับ ซึ่งจะได้ถั่วทั้งหมด 4 เกรด คือ ถั่วเกรด 1 เป็นถั่วที่มีขนาดเมล็ดใหญ่พิเศษ ถั่วเกรด 2 เป็นถั่วที่มีขนาดเมล็ดปานกลาง ถั่วเกรด 3 เป็นถั่วเมล็ดเล็ก และถั่วเกรด 4 เป็นถั่วที่ลอดผ่านตะแกรงทุกขนาด ส่วนใหญ่จะถูกนำไปทิ้งสำหรับการตรวจวัดปริมาณอะฟลาทอกซินในถั่วเกรดต่าง ๆ นั้น เพื่อศึกษาผลของการคัดขนาดต่อปริมาณอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง

การสุ่มเก็บตัวอย่าง

เนื่องจากถั่วลิสงฝักแห้งที่นำมาเก็บรักษามีปริมาณเพียง 200 กิโลกรัม จึงได้ดัดแปลงวิธีการเก็บตัวอย่างของ International Association of Seed Crushers (IASC) โดยสุ่มตัวอย่างครั้งละ 4 จุด ๆ ละ 1.5 กิโลกรัม และไม่ได้นำตัวอย่างทั้ง 4 จุดมารวมกัน เนื่องจากต้องการศึกษาถึงความแตกต่างในการสุ่มเก็บตัวอย่าง ยกเว้นในวันเก็บรักษาที่ 28 มีการเก็บตัวอย่างเพียง 2 จุด เนื่องจากปริมาณถั่วลิสงมีน้อย สำหรับตัวอย่างที่ได้นำไปเก็บรักษาเพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในห้องเย็นอุณหภูมิต่ำกว่า 0 °C เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ติดมากับฝักถั่วลิสง

กลุ่มตัวอย่างถั่วลิสง ใช้ถั่วลิสงจากโรงงานกะเทาะเปลือก จังหวัดกาฬสินธุ์ โดยทำการทดลองใน 2 ฤดูปลูก ตามปริมาณของผลผลิตที่เข้าสู่โรงงานดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างถั่วลิสงที่ปลูกช่วงฤดูฝน ผลผลิตถั่วลิสงจะเข้าสู่โรงงานประมาณเดือนตุลาคม - พฤศจิกายน

กลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างถั่วลิสงที่ปลูกในฤดูแล้ง ผลผลิตถั่วลิสงจะเข้าสู่โรงงานประมาณเดือนมีนาคม - เมษายน

ทั้ง 2 กลุ่มจะมีขั้นตอนและระยะเวลาการสุ่มตัวอย่างเหมือนกัน

การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินโดยวิธี ELISA

นำตัวอย่างถั่วลิสงทั้งเปลือกที่สุ่มได้มากะเทาะเปลือกแล้วนำเมล็ดทั้งหมดไปบดด้วยเครื่องบด (blender) จนละเอียดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 1 mm คลุกตัวอย่างที่ผ่านตะแกรงให้เข้ากัน สุ่มตัวอย่างที่บดแล้วประมาณ 500 กรัม บรรจุลงในถุงพลาสติก นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -10°C เพื่อรอการวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน โดยวิธี Modified Direct Competitive ELISA จากวิธีการของ Chu, 1984 ; Chu *et.al.*, 1987 ; Chu, 1989 ซึ่งพัฒนาและดัดแปลงวิธีการโดย อ.โสภณ วงศ์แก้ว ภาควิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น (2539) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

การสกัดสารอะฟลาทอกซินและการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์

อะฟลาทอกซินในตัวอย่างถั่วลิสงที่บดร่อนผ่านตะแกรงแล้วยังอยู่ในรูปที่ไม่สามารถนำไปวิเคราะห์ได้เนื่องจากอะฟลาทอกซินยังติดอยู่กับอนุภาคของถั่วลิสง จึงต้องมีการสกัดออกมาให้อยู่ในรูปสารละลาย โดยใช้ methanol ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่สามารถละลายอะฟลาทอกซิน สำหรับวิธีการสกัดทำได้โดยการสุ่มตัวอย่างที่บดและผ่านตะแกรงละเอียดแล้ว 20 กรัม จำนวน 2 ตัวอย่างย่อย (subsample) จากตัวอย่างรวม 500 กรัม นำมาสกัดอะฟลาทอกซิน โดยนำเข้าปั่นใน blender พร้อม extraction buffer (methanol 70% ผสม dimethyl formamide 1% ส่วนผสมแสดงในภาคผนวก) จำนวน 100 มล. ใช้เวลาปั่นนาน 2 นาที เพื่อให้ extraction buffer เข้าไปละลายอะฟลาทอกซินในตัวอย่างออกมาให้มากที่สุด แล้วเทใส่ขวดแก้วปากกว้างเพื่อปล่อยให้ตะกอนนอนกัน 10 นาที จากนั้นทำให้เจือจาง 1:80 ด้วย conjugate buffer (0.01 M PO_4 buffer pH 7.4 ผสม 0.2% egg albumin และ 0.2% polyvinyl pyrrolidone) ก่อนนำมาวิเคราะห์ การวิเคราะห์กระทำ 2 subsample ต่อ 1 ตัวอย่าง

การวิเคราะห์ด้วยวิธี Modified Direct Competitive ELISA

นำ BSA - Aflatoxin B1 (Sigma No. A 6655) ซึ่งทำเจือจางใน carbonate coating buffer pH 9.5 (ส่วนผสมแสดงในภาคผนวก) ความเข้มข้น $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ ไป coat plate หลุมละ $100\text{ }\mu\text{l}$ แล้วนำไปป้อนในกล่องขึ้นนาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อให้ BSA - Aflatoxin B1

จับกับ solid phase ในหลุมของ plate ได้ดีขึ้น จากนั้นล้าง plate ด้วย phosphate buffer-Tween (PBS-T) 3 ครั้ง (ส่วนผสมแสดงในภาคผนวก) เพื่อแยก BSA - Aflatoxin B1 ส่วนเกินที่ไม่ได้ติดอยู่กับ solid phase ออก แล้วเติมตัวอย่าง (subsample) ที่เจือจางแล้วจำนวน 50 μ l : หลุม ทำตัวอย่างละ 2 หลุมตามด้วย horse radish peroxidase conjugated anti BSA-Aflatoxin B1 (Sigma No. A 2681) ทำเจือจางใน conjugate buffer (1:500) จำนวน 50 μ l บ่มในกล่องขึ้นนาน 1 ชั่วโมงที่ 37°C จากนั้นล้างส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออกด้วย PBS-T 3 ครั้ง แล้วเติม substrate solution ที่มีความเข้มข้นของ O - phenylenediamine (Sigma No. P 9029) 40 mg ต่อ substrate buffer 100 μ l pH 5.0 (ส่วนผสมแสดงในภาคผนวก) จำนวนหลุมละ 100 μ l บ่มในกล่องขึ้นในที่มืดนาน 15-20 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย 0.5 N HCl หลุมละ 25 μ l วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นโดยวัดค่า absorbance ที่ความยาวช่วงคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง ELISA reader (Uniskan)

การเตรียม standard aflatoxin B1 sample เพื่อสร้าง standard curve

standard aflatoxin B1 sample เป็นตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นของ BSA-Aflatoxin B1 ที่แน่นอน เมื่อนำไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นจะเกิดสีที่มีความเข้มของสีมากขึ้นตามความเข้มข้นของ standard aflatoxin B1 ซึ่งค่า absorbance ของ standard aflatoxin B1 เมื่อนำไป plot บนกระดาษ semi-log แล้วจะได้ standard curve สำหรับใช้อ่านค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน บี 1 ในตัวอย่าง การเตรียม standard aflatoxin B1 ทำโดยเตรียม standard aflatoxin B1 ที่ความเข้มข้นระดับ 25,000 ppb ก่อนโดยผสม BSA - Aflatoxin B1 2,500 μ g ลงในเมล็ดถั่วลิสงที่ไม่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินที่บดละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงแล้วจำนวน 100 gm แล้ว blend ใน extraction buffer 500 ml นาน 2 นาที ปล่อยให้ตกตะกอน 10 นาที นำน้ำใสที่ได้จากส่วนบนไปเจือจางใน conjugate buffer 1:80 ซึ่งสารละลายที่ได้จากการเจือจางถือว่าเป็นระดับความเข้มข้นของ aflatoxin B1 เท่ากับ 25,000 ppb ต่อจากนั้นเตรียม standard 0 ppb โดยนำถั่วลิสงที่ไม่มีอะฟลาทอกซินที่บดและร่อนผ่านตะแกรงแล้วปริมาณ 20 gm ไปสกัดด้วย extraction buffer 100 ml ปล่อยให้ตกตะกอน แล้วเจือจางน้ำใสที่ได้ด้วย conjugate buffer 1:80 ซึ่งจะได้ standard ที่มีความเข้มข้นของ aflatoxin 0 ppb นำ standard 0 ไป dilute standard ที่มีความเข้มข้น 25,000 ppb จะได้ระดับความเข้มข้นของ standard aflatoxin B1 เท่ากับ 12,500, 6,250, 3,125, 1,562.5, 781.25, 390.62, 195.31,

97.66, 48.83, 24.41, 12.21, 6.10, 3.05, และ 1.5 ppb ตามลำดับ นำไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง ซึ่งจะได้ standard curve จากการ plot ค่า absorbance บนกระดาษ semi-log (standard curve แสดงในภาคผนวก)

3. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการตรวจวัดอะฟลาทอกซิน

กระทำโดยนำสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่างเดียวกันในการทดลองที่ 2 มาทำการวิเคราะห์ ปริมาณอะฟลาทอกซิน ซ้ำ 2 ครั้ง ห่างกัน 7 วัน โดยวิธี Modified Direct Competitive ELISA โดยเลือกตัวอย่างจากการวิเคราะห์ครั้งแรกที่เก็บไว้ในหลอดพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 - 5 °C จำนวน 25 ตัวอย่าง ซึ่งมีปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในระดับต่ำ ปานกลาง และสูง คือมีการปนเปื้อนตั้งแต่ 1.98 ถึง 2392.5 ppb มาตรวจสอบผลการวิเคราะห์ซ้ำเป็นครั้งที่ 2 โดยใช้วิธีการและขั้นตอนเหมือนเดิม เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าที่วิเคราะห์ได้ทั้งสองครั้ง โดยใช้การทดสอบความแตกต่างแบบ t - test และหาค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์

4. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินกับปริมาณการติดเชื้อรา *A.flavus* *A.parasiticus* และ *A.niger*

การศึกษานี้ได้นำตัวอย่างถั่วลิสงบดที่วัดปริมาณอะฟลาทอกซิน ปี 1 จากการทดลองที่ 2. แล้วมาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอะฟลาทอกซิน ปี 1 กับปริมาณเชื้อรา *Aspergillus spp.* ที่ติดมากับเมล็ดถั่วลิสง โดยเลือกตัวอย่างทั้งฤดูฝนและฤดูแล้งที่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในระดับต่าง ๆ ทั้งระดับสูง ปานกลาง และต่ำ ที่มีการปนเปื้อนตั้งแต่ 2.4 ppb จนถึง 2,392.5 ppb นำมาตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* *A. parasiticus* และ *A. niger* โดยซังตัวอย่างถั่วลิสงที่บดและร่อนผ่านตะแกรงปริมาณ 50 กรัม เติลงในน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อ 125 ml ปิดปากขวด เขย่าประมาณ 10 นาที แล้วปล่อยให้ตกตะกอนนาน 15 นาที นำน้ำใสส่วนบนมาทำเจือจางในน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อแล้วในอัตรา 1 : 10 แล้วใช้ micropipette ดูดสารละลายเชื้อที่เจือจางแล้วประมาณ 100 μ l หยดลงบน Rose bengal agar medium แต่ละ plate โดยทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละ dilution (สูตรของ media แสดงในภาคผนวก) แล้วนำไป incubate ให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 - 3 วัน แล้วนับจำนวนโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและคำนวณกลับไปหาปริมาณเชื้อในตัวอย่างถั่วลิสง 1 กรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณการติดเชื้อ } Aspergillus \text{ spp. ทั้ง 3 ชนิด} = \frac{ExBxC}{AxD}$$

โดยที่ A = ปริมาณของตัวอย่างถั่วลิสงบดที่ใช้ตรวจวัดการติดเชื้อ (g)

B = ปริมาตรน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อที่ใช้ละลายตัวอย่างถั่วลิสง (ml)

C = อัตราส่วนของการเจือจางสารละลายตัวอย่างถั่วลิสง

(สารละลายตัวอย่าง : น้ำกลั่น = 1: 10)

D = ปริมาตรของ dilution ที่ให้ spread บน agar media (ml)

E = จำนวน colony ของเชื้อแต่ละชนิดที่นับได้ใน 1 plate (colony)

5. การศึกษาการสร้างอะฟลาทอกซิน โดยเชื้อ *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *A. niger* จาก isolate ที่แยกได้จากตัวอย่างถั่วลิสง

นำไอโซเลตของเชื้อ *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *A. niger* มาทดสอบการสร้างอะฟลาทอกซิน โดยการปลูก (inoculate) spore spension ของเชื้อลงบนถั่วลิสงที่เก็บเกี่ยวใหม่ ๆ และไม่มีปัญหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน โดยวัดปริมาณอะฟลาทอกซินก่อนปลูกเชื้อ แยกถั่วลิสงออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ไม่ทำแผล และกลุ่มที่ถูกทำให้เกิดแผล โดยการนำเมล็ดถั่วลิสงใส่ในโหลแล้วเขย่าแรง ๆ ประมาณ 1-2 นาที แล้วนำถั่วลิสงทั้ง 2 กลุ่มไปเพิ่มความชื้นของเมล็ด โดยการแช่เมล็ดถั่วลิสงที่มีความชื้นเมล็ด 8.55% ในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อพอท่วมเป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปผึ่งให้แห้ง วัดความชื้นของเมล็ดก่อนการปลูกเชื้อได้ 27 % ซึ่งเป็นความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อ ดังนั้นปัจจัยในการสร้างอะฟลาทอกซินของการทดลองนี้จะประกอบด้วย ถั่วลิสงที่เก็บเกี่ยวใหม่ที่มีความชื้นต่ำ (8.55%) กับความชื้นสูง (27%) การทำแผลกับไม่ทำแผล การปลูกเชื้อและไม่ปลูกเชื้อ โดยเชื้อที่ใช้ปลูก คือเชื้อ 3 ชนิดดังกล่าว แล้วนำไปหมัก (incubate) ไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 วัน วัดปริมาณอะฟลาทอกซินก่อนและหลังปลูก ทำการเปรียบเทียบปริมาณอะฟลาทอกซินก่อนและหลัง inoculate โดยมีปริมาณอะฟลาทอกซินของถั่วลิสงที่เก็บเกี่ยวใหม่ ที่ไม่ได้เพิ่มความชื้นเป็นทริทเมนต์เปรียบเทียบ (control)

การปลูกเชื้อ (inoculation)

แยกเชื้อ *A. flavus* (ไอโซเลตที่สร้างเส้นใย หรือ cleistothecium), *A. parasiticus* และ *A. niger* จากอาหารในการทดลองที่ 4 ไปเลี้ยงบน potato dextrose agar (PDA) ในหลอดทดลอง พอเชื้อเจริญเต็มที่จะได้ isolate ของเชื้อแต่ละชนิด ทำการเพิ่มปริมาณของเชื้อโดยแยกเชื้อจาก slant agar มาเลี้ยงบน PDA ใน plate โดยเพิ่มปริมาณเชื้อละ 2 plate บ่ม 7 วัน เชื้อจะเจริญจนเต็ม plate แล้วทำ suspension โดยนำน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อผสม Tween 20 2 $\mu\text{l/ml}$ เติลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ plate ละ 10 ml แล้วใช้ loop ลนไฟเขี่ยบริเวณผิวหน้าให้เชื้อหลุดออกมาในน้ำกลั่น ซึ่งจะได้ suspension ของเชื้อที่เข้มข้นมาก ทำให้เชื้อเจือจางและมีปริมาตรพอดีกับปริมาณเมล็ดถั่วลิสง 100 g โดยการเติมน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อแล้วเทให้ท่วมตัวอย่างถั่วลิสง ทั้งไว้ประมาณ 2 นาที เท suspension ออก แล้วนำเมล็ดถั่วลิสงไปฝังบนกระดาษให้แห้ง incubate ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วันแล้วนำไปวิเคราะห์ อะฟลาทอกซิน บี 1 ตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น