บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 รูปแบบการเจริญของเชื้อ A. flavus ATCC 15546

3.1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อใน Sabouraud Dextrose Agar

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อราที่ปลอดเชื้อเขี่ยสปอร์ของเชื้อ A. flavus ATCC 15546 ที่เก็บรักษาไว้ในคลัง เชื้อมาขนาดประมาณหัวเข็มหมุด ไปวางลงบนผิวหน้าของ Sabouraud Dextrose Agar slant โดยเทคนิคปลอดเชื้อ เพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิห้องรอเวลาใช้ต่อไป

ทำการถ่ายเทสปอร์ของเชื้อที่เจริญแล้วไปยังอาหารหลอดใหม่ด้วยวิธีการดังกล่าวทุก 7 วัน

3.1.2 การเตรียม spore suspension

เติม Potato Dextrose Broth ที่ปลอดเชื้อประมาณ 5 มิลลิลิตรลงไปในหลอดอาหาร Sabouraud Dextrose Agar ที่มีเชื้อ A. flavus ATCC 15546 ขึ้นเป็นเวลา 7 วันแล้ว เขย่าให้สปอร์ของเชื้อหลุดจากผิวอาหารมาแขวนลอยอยู่ใน broth ใช้ capillary pipette ดูดเฉพาะส่วนที่เป็น spore suspension ไปใส่ในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ ทำการปรับความขุ่นของ spore suspension ที่ได้ด้วย Potato Dextrose Broth ที่ปลอดเชื้อจนได้ประมาณ 3×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเท่ากับ McFarland Nephelometer Standard No. 2 (Bailey/Scott, 1974)

3.1.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อใน Potato Dextrose Broth

นำ spore suspension ที่เตรียมตามวิธีในข้อ 3.1.2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรไปเติมลงในหลอดจุกเกลียวที่บรรจุ PDB ที่ปราศจาก

เชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน เพาะเลี้ยงเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิห้อง โดยคลายเกลียวที่จุกหลอดเล็กน้อย เพื่อให้มีการถ่ายเทอากาศได้ ทำการเขย่าเชื้อทุกวันโดยใช้ Vortex-Genie mixer นานครั้งละ 5 วินาที เพื่อให้เส้นใยไมซีเลียมของเชื้อจมอยู่ใต้ผิวของอาหาร เป็นการป้องกันไม่ให้เชื้อสร้างสปอร์ในอาหารชนิดนี้

3.1.4 <u>การหาน้ำหนักไมซีเลียมแห้ง</u>

เมื่อเชื้อเจริญได้นานตามความต้องการแล้ว ทำการกรองแยกเส้นใยไมซีเลียมออกจาก Potato Dextrose Broth โดยใช้กระดาษกรองวัตแมนหมายเลข 2 ที่รู้น้ำหนักแล้ว นำเส้นใยไมซีเลียมไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121° ซ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที และอบให้แห้งโดยใช้ตู้อบอุณหภูมิ 50° ซ นาน 3 ชั่วโมง นำเส้นใยไมซีเลียมที่อบแห้งแล้วนี้ไปชั่งหาน้ำหนักโดยใช้เครื่องชั่งละเอียด

3.1.5 <u>การหาปริมาณกลูโคซามีนในไมซีเลียม</u>(หลักการของ Elson - Morgan)

กลูโคซามีน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไคติน ในผนังไมซีเลียม เมื่อถูกไฮโดรไลซ์โดยกรดให้เป็นกลูโคซามีนอิสระจะทำปฏิกิริยากับอะเซทิลอะซีโตนในสารละลายด่างที่ร้อนได้สารประกอบไพร์โรล(pyrrole) สารประกอบนี้เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย Ehrlich (p-dimethylaminobenzaldehyde) จะได้สารประกอบเชิงซ้อนสีชมพูซึ่งมี maximum optical density ที่ช่วงคลื่น 530 nm(Gottschalk, 1966) การหาปริมาณกลูโคซามีนจากไมซีเลียมในงานวิจัยนี้ ใช้วิธีของ Morgan-Elson (ที่ปรับปรุง)(Van de Loo , 1976) โดยใช้กรดเกลือเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมลงไปในหลอดจุกเกลียวขนาด 16 X 125 มิลลิเมตร ที่บรรจุไมซีเลียมซึ่งรู้น้ำหนักแล้ว ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 20 ชั่วโมง บั่นแยกส่วนใสออกจากตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสมา 2 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดจุกเกลียวขนาด 16 X 125 มิลลิเมตร หลอดใหม่ที่มีน้ำกลั่นอยู่แล้วหลอดละ 1 มิลลิลิตร ทำการไฮโดรไลซ์ในอ่างน้ำเดือด อุณหภูมิ 100° ซ นาน 2 ชั่วโมง นำ hydrolysate ปริมาตร 3 มิลลิลิตรมาทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 30 % เติมน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วบั่นแยกส่วนใสออกจากตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปหาปริมาณกลูโคซามีนโดยให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายอะเซทิลอะซีโตน ปริมาตร

1 มิลลิลิตร ในอ่างน้ำเดือดนาน 20 นาที ทำให้เย็นแล้ว เติม 95 % เอธิลอัลกอฮอล์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี เติมสารละลาย Ehrlich ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที นำสารผสมที่ได้ไปวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้น โดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร อ่านปริมาณกลูโคซามีนที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

3.1.5.1 การเตรียมสารละลายอะเซทิลอะซีโตน

ผสมอะเซทิลอะซีโตนเข้ากับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (ความเข้มข้น 1.25 โมลต่อลิตร) ให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายอะเซทิลอะซีโตนเป็น 4 %

สารละลายนี้เก็บไว้นานไม่ได้ ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะใช้

3.1.5.2 การเตรียม สารละลาย Ehrlich

ละลายพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์หนัก 1.6 กรัม ในส่วนผสมของกรดเกลือเข้มข้น 30 มิลลิลิตรและเอธิลอัลกอฮอล์ 30 มิลลิลิตร

สารละลายนี้ถ้าเก็บไว้ในตู้เย็น (4° ซ) จะใช้ได้ภายใน 2–3 วันหลังจากเตรียม

3.1.5.3 การเตรียมสารละลายกลูโคซามีนมาตรฐาน

ละลายกลูโคซามีน ไฮโดรคลอไรด์ 50 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ให้เป็นสารละลายเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น (4° ซ)

3.1.5.4 การทำกราฟมาตรฐาน

ผสมสารละลายกลูโคซามีนมาตรฐานที่ได้จากข้อ 3.1.5.3 ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณ 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ อะเซทิลอะซีโตนและสารละลาย Ehrlich ตามวิธีในข้อ 3.1.5

เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคซามีนและออพติคัล เดนสิตีที่วัดได้

3.2 รูปแบบการผลิตแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ของเชื้อ A. flavus ATCC 15546

3.2.1 การสกัดแอฟลาทอกซิน

นำ Potato Dextrose Broth ที่กรองแยกเส้นใยไมซีเลียม

ออกไปตามข้อ 3.1.4 แล้ว ไปใส่ลงใน Erlenmeyer flask แบบมีจุกเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงไป ปิดจุกเกลียวให้แน่น นำ flask ไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบ wrist-action ความเร็วประมาณ 500 ครั้งต่อนาที นาน 10 นาที ใช้ capillary pipette ดูดชั้นคลอโรฟอร์มเก็บไว้ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้คลอโรฟอร์มสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง แต่ละครั้งใช้คลอโรฟอร์ม 10 มิลลิลิตร นำส่วนสกัดทั้งหมดมารวมกัน

กรณีสกัดแอฟลาทอกซินจากไมซีเลียมทำโดยใช้ไมซีเลียมที่อบแห้งตามข้อ 3.1.4 แล้วไปสกัดด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตร 10 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ในทำนองเดียวกันกับการสกัดจาก broth

3.2.2 <u>การระเหยแห้งและเก็บรักษาแอฟลาทอกซิน</u>

นำคลอโรฟอร์มที่ใช้สกัดแอฟลาทอกซินจากข้อ 3.2.1 ไประเหยให้แห้งในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 70° ซ ใช้เวลาประมาณ 30 นาที เสร็จแล้วนำส่วนที่ติดกับก้น flask ไปวิเคราะห์หาแอฟลาทอกซินต่อไป

ในกรณีที่ยังไม่วิเคราะห์หาแอฟลาทอกซินต่อไปในทันที ต้องนำ flask ที่ใช้บรรจุส่วนสกัดที่ระเหยแห้งแล้วนั้นไปเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ −20° ซ รอการวิเคราะห์ต่อไป

3.2.3 <u>การวิเคราะห์โดยคุณภาพเพื่อหาแอฟลาทอกซิน</u>

นำส่วนสกัดที่ระเหยแห้งแล้วตามข้อ 3.2.2 มาละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วใช้คลอโรฟอร์มส่วนนี้ทั้งหมดไปวิเคราะห์หาแอฟลาทอกซินโดย thin layer chromatography

3.2.3.1 <u>การเตรียม TLC plates</u>

ใช้ซิลิกาเจล เอช 35 กรัมผสมกับน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตรให้เข้ากันดีโดยการเขย่าอย่างแรงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร นาน 1 นาที เทลงไปในถาดสำหรับเตรียม TLC plate ลากถาดผ่านแผ่นกระจกขนาด 20 × 20 เซนติเมตรที่สะอาดและแห้งโดยปรับปริมาณให้ได้ความหนาของซิลิกาเจล เอช บนแผ่นกระจกเป็น 250 ไมโครเมตร ทิ้งแผ่นกระจกที่ฉาบด้วยซิลิกาเจล เอช แล้วไว้ในอุณหภูมิห้องนานประมาณ 10 นาที แล้วนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 110° ซ นาน 30 นาที เก็บไว้ในตู้ที่มีสารดูดความชื้นรอการใช้งานต่อไป

009148

3.2.3.2 การเตรียมตัวทำละลายสำหรับ TLC

ผสมคลอโรฟอร์ม : ไดรคลอโรเอธีลีน : เอ็น–เอมิลอัลกอฮอล์ : กรดฟอร์มิค ในสัดส่วน 80 : 15 : 4 : 1 โดยปริมาตร เข้าด้วยกันแล้วเทลงในโถแก้วสำหรับทำ TLC ปิดฝาโถแก้วให้สนิททิ้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมงก่อนเริ่มแยกสารโดย TLC

3.2.3.3 การวิเคราะห์หาแอฟลาทอกซิน

นำคลอโรฟอร์มที่ได้จากการละลายส่วนสกัดตามข้อ 3.2.3 มาหยดลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมตามข้อ 3.2.3.1 ให้แต่ละตัวอย่างห่างกันประมาณ 2.5 เซนติเมตรและห่างจากขอบแผ่นกระจกด้านล่างประมาณ 2 เซนติเมตร นำแผ่นกระจกที่หยดสารที่ต้องการวิเคราะห์เสร็จแล้วนี้ไปวางในโถแก้วบรรจุตัวทำละลายที่เตรียมไว้ตามข้อ 3.2.3.2 ทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปตามซิลิกา เจล จนระดับของตัวทำละลายห่างจากจุดเริ่มต้นประมาณ 15 เซนติเมตร จึงนำแผ่นซิลิกา เจลออกจากโถแก้วทิ้งให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้งสนิท นำแผ่นซิลิกา เจลไปส่องใต้แสง เหนือม่วง (ที่มีช่วงคลื่นยาว 365 นาโนเมตร) เปรียบเทียบสีและ Rf กับแอฟลาทอกซินมาตรฐานที่ใช้ในการทำ TLC ในแต่ละ plate

3.2.3.4 การเตรียมแอฟลาทอกซินมาตรฐาน

ผสมแอฟลาทอกซิน บี$_1$, บี$_2$, จี$_1$, และ จี$_2$, ซึ่งละลายอยู่ในสารผสมเบนซิน : อะซีโตไนไตรล์ (98 : 2 โดยปริมาตร) เป็นความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ชนิดละ 2 ไมโครกรัม (20 ไมโครลิตร) เข้าด้วยกัน นำส่วนผสมนี้ไปหยดบนแผ่นซิลิกา เจลแล้วดำเนินขั้นตอนต่อไป เช่นเดียวกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ตามข้อ 3.2.3.3

3.2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณแอฟลาทอกซิน

ขูดซิลิกา เจลบริเวณที่เรืองแสงโดยมีสีและ Rf ตรงกับแอฟลาทอกซิน บี$_1$ มาตรฐานจากแผ่นซิลิกา เจลในข้อ 3.2.3.3 มาสกัดแอฟลาทอกซินโดยใช้แอบโซลูทเมธิลอัลกอฮอล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าหลอดทดลองด้วย Vortex-Genie mixer นาน 90 วินาที นำไปปั่นใช้ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที เก็บชั้นเมธิลอัลกอฮอล์ไว้ ใช้แอบโซลูทเมธิลอัลกอฮอล์อีก 5 มิลลิลิตรสกัดแอฟลาทอกซินซ้ำจากซิลิกา

เจลที่แยกจากการสกัดครั้งแรกด้วยวิธีการ เดียวกัน รวม เมธิลอัลกอฮอล์ที่ใช้สกัดแอฟลาทอกซินทั้งสองครั้ง เข้าด้วยกัน นำไปวัดปริมาณแสง เรืองสัมพัทธ์ด้วย photofluorometer ซึ่งใช้ excitation wavelength 365 นาโน เมตร และ emission wavelength 450 นาโน เมตร ใช้สารละลายควินินซัล เฟต ข. เป็นตัวปรับค่าการ เรืองแสงสัมพัทธ์สูงสุดและแอบโซลูท เมธิลอัลกอฮอล์เป็นตัวปรับค่าการ เรืองแสงสัมพัทธ์ต่ำสุด หาปริมาณแอฟลาทอกซินจากกราฟมาตรฐาน

3.2.4.1 <u>การ เตรียมสารละลายควินินซัล เฟต</u>

สารละลาย ก. ละลายควินินซัล เฟต 200 มิลลิกรัมในกรดซัลฟูริค เข้มข้น 0.1 นอร์มัลปริมาตร 1 ลิตร (สารละลายนี้เก็บไว้ใช้ได้นาน 1 ปี)

สารละลาย ข. นำสารละลาย ก. มา 0.1 มิลลิลิตร ทำให้ เจือจางด้วยกรดซัลฟูริค เข้มข้น 0.1 นอร์มัลจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะใช้)

3.2.4.2 <u>การ เตรียมกราฟมาตรฐานของแอฟลาทอกซิน บี$_1$</u>

นำแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ปริมาณ 2 ถึง 10 ไมโครกรัมมาใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุแอบโซลูท เมธิลอัลกอฮอล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้ เข้ากันดี แล้วนำไปวัดค่าการ เรืองแสงสัมพัทธ์ดังข้อ 3.2.4 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอฟลาทอกซิน บี$_1$ และค่าการ เรืองแสงสัมพัทธ์

3.3 <u>ผลของ เบนโซ เอทและโพรพิออน เนทต่อการ เจริญของ เชื้อA. flavus ATCC 15546 ในอาหาร เลี้ยง เชื้อสัง เคราะห์</u>

เตรียม Potato Dextrose Broth ที่ปลอด เชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วจุก เกลียวขนาด 20 × 150 มิลลิ เมตร เติมกรด เบนโซอิคที่มีความ เข้มข้นระหว่าง 4 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือกรดโพรพิออนนิคที่มีความ เข้มข้นระหว่าง 5 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรในแต่ละความ เข้มข้นลงในหลอดที่บรรจุ Potato Dextrose Broth อยู่แล้วด้วย เทคนิคปลอด เชื้อ ผสมให้ เข้ากันดี เติม spore suspension ของ เชื้อ A. flavus ATCC 15546ตามที่ เตรียม

ในข้อ 3.1.2 ลงไปหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันดี เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิห้องตามวิธีในข้อ 3.1.3 เมื่อครบ 14 วัน แยกเส้นใยไมซีเลียมจาก Potato Dextrose Broth นำไปอบและชั่งน้ำหนักตามวิธีในข้อ 3.1.4 และหาปริมาณกลูโคซามีนตามวิธีในข้อ 3.1.5

กรณีที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ นำ Potato Dextrose Broth ในแต่ละหลอดทดลองไปทดสอบการเจริญของเชื้อโดยนำไปเพาะเลี้ยงใน Sabouraud Dextrose Agar เพื่อพิสูจน์ว่าในความเข้มข้นของเบนโซเอตหรือโพรพิออนเนตที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อใน Potato Dextrose Broth ได้นั้นเป็นการยับยั้งแบบระงับการเจริญ (static) หรือแบบฆ่าให้สปอร์ของเชื้อตาย (cidal)

3.4 <u>ผลของเบนโซเอตและโพรพิออนเนตต่อการผลิตแอฟลาทอกซิน B_1 ของเชื้อ A. flavus ATCC 15546 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์</u>

นำ Potato Dextrose Broth ที่แยกเส้นใยไมซีเลียมออกไปแล้วจากข้อ 3.3 ไปสกัดแอฟลาทอกซินตามวิธีในข้อ 3.2.1 และนำส่วนของคลอโรฟอร์มที่สกัดได้ไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของแอฟลาทอกซิน B_1 ตามวิธีในข้อ 3.2.3 และ 3.2.4 ตามลำดับ

3.5 <u>ผลของส่วนผสมระหว่างเบนโซเอตและโพรพิออนเนตต่อการเจริญของเชื้อ A. flavus ATCC 15546 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์</u>

ใช้กรดเบนโซอิคในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 2.5 ถึง 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกรดโพรพิออนนิคในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 2.5 ถึง 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดแก้วจุกเกลียวที่บรรจุ Potato Dextrose Broth ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตรด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ให้แต่ละหลอดมีกรดเบนโซอิคและกรดโพรพิออนนิคชนิดละหนึ่งความเข้มข้น ผสมให้กรดทั้งสองและ Potato Dextrose Broth เข้ากันดี เติม spore suspension ของเชื้อ A. flavus ATCC 15546 ที่เตรียมตามวิธีในข้อ 3.1.2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากัน แล้วเพาะเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 3.1.3 เมื่อครบ 14 วันแล้ว แยกเส้นใยไมซีเลียมออกไปทดสอบการเจริญตามวิธีในข้อ 3.1.4 และ 3.1.5

กรณีที่ไม่พบการเจริญของเชื้อดังกล่าวใน Potato Dextrose Broth ที่มีส่วนผสมของกรดเบนโซอิคและกรดโพรพิออนนิคคู่ใดอยู่ นำ broth จากหลอดนั้น ๆ ไป

เพาะเลี้ยงต่อไปใน Sabouraud Dextrose Agar เพื่อพิสูจน์การออกฤทธิ์ของกรดทั้งสองต่อเชื้อตามวิธีในข้อ 3.3

3.6 ผลของส่วนผสมระหว่าง เบนโซ เอทและโพรพิออน เนตต่อการผลิตแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ของ เชื้อ A. flavus ATCC 15546 ในอาหาร เลี้ยง เชื้อสัง เคราะห์

นำ Potato Dextrose Broth ที่แยก เส้นใยไมซี เลียมออกไปแล้วตามข้อ 3.5 ไปสกัดและวิ เคราะห์หาแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ตามวิธีในข้อ 3.2

3.7 ผลของ เบนโซ เอทและโพรพิออน เนตต่อการ เจริญของ เชื้อ A. flavus ATCC 15546 ในถั่วลิสง

นำถั่วลิสงที่แกะ เปลือกนอกออกแล้วมาคัด เลือกไว้แต่ เมล็ดที่สมบูรณ์ ชั่งน้ำหนักให้ได้ชุดละ 10 กรัม ใส่ในจานแก้ว เพาะ เชื้อ 1 ชุด ต่อ 1 จาน วางกอนสำลีขนาดพอประมาณไว้ทางด้านหนึ่งของจานแก้ว นำทั้งหมดไปนึ่งฆ่า เชื้อที่ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เติมกรด เบนโซอิคหรือกรดโพรพิออนนิค หรือส่วนผสมของกรดทั้งสอง (ความ เข้มข้นของกรดทั้งสองชนิดเป็น 10 ถึง 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งในกรณี ใช้ เพียงชนิด เดียวและในกรณี ใช้ผสมกัน) ปริมาตรชนิดละ 1 มิลลิลิตร ด้วย เทคนิคปลอด เชื้อคลุกให้กรดที่เติมลงไป เคลือบผิว เมล็ดถั่วลิสงจนทั่วดี เติม spore suspension ของ เชื้อ A. flavus ATCC 15546ตามที่เตรียมในข้อ 3.1.2 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (เท่ากับ เชื้อ 3×10^6 สปอร์) ลงไป เขย่าจานแก้วให้ เชื้อคลุกกับ เมล็ดถั่วลิสงในจานแก้วจนทั่วดี เติมน้ำกลั่นที่ปราศจาก เชื้อลงไปโดยหยดลงบนก้อนสำลีที่เตรียมไว้ในจานแก้ว ปริมาตร 5–7 มิลลิลิตรต่อจาน เพาะ เชื้อในจานแก้วลักษณะคว่ำกลับในอุณหภูมิห้อง นาน 1 เดือน ติดตามการ เจริญของ เชื้อทุกสัปดาห์ เมื่อครบ 1 เดือน นึ่งฆ่า เชื้อในจานแก้ว ที่พบการ เจริญของ เชื้อบน เมล็ดถั่วลิสงที่ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วชั่งน้ำหนักของ เมล็ดถั่วลิสงในแต่ละกรณี เทียบกับ negative control ซึ่งไม่มีการ เจริญของ เชื้อ

ในกรณีที่ไม่พบการ เจริญของ เชื้อในจานแก้วชุดใด จะนำตัวอย่างถั่วลิสงจากจานแก้วนั้นไปทดสอบการ เจริญของ เชื้อใน Potato Dextrose Broth ที่ปลอด เชื้อบรรจุอยู่ในหลอดแก้วจุก เกลียวขนาด 20×150 มิลลิ เมตร ทำการ เพาะ เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน หากไม่พบการ เจริญของ เชื้อ A. flavus ATCC 15546 แสดงว่ากรดที่ใช้ในจานแก้วชุดนั้นมีฤทธิ์ฆ่าสปอร์ของ เชื้อให้ตาย(cidal effect) แต่ถ้า เชื้อ เจริญได้แสดงว่าความ เข้มข้นของกรดที่ใช้ เพียงแต่ยับยั้งการ เจริญ เติบโตของ เชื้อ(static effect) เท่านั้น

3.8 ผลของ เบนโซ เอตและโพรพิออน เนตต่อการ เจริญของ เชื้อ A. flavus ATCC 15546 ในข้าวโพด

คัด เลือก เมล็ดข้าวโพดที่สมบูรณ์ ชั่งใส่จานแก้ว เพาะ เชื้อจานละ 10 กรัม แล้วดำ เนินการทดลองตามวิธีในข้อ 3.7 ทุกประการ

3.9 ผลกระทบของ เบนโซ เอตและโพรพิออน เนตต่อการผลิตแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ของ เชื้อ A. flavus ATCC 15546 โดยการใช้สารกัมมันตรังสี

ใช้ spore suspension ที่เตรียมตามวิธีในข้อ 3.1.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุ Potato Dextrose Broth ที่ปลอด เชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตรด้วย เทคนิคปลอด เชื้อ เพาะ เลี้ยงให้ เชื้อ เจริญในอุณหภูมิห้องโดย เขย่า flask เป็นครั้งคราว เพื่อป้องกันไม่ให้ เชื้อสร้างสปอร์ เมื่อครบ 4 วัน กรองแยก เส้นใยไมซี เลียมโดยใช้กระดาษกรองวัทแมนหมายเลข 2 ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปลอด เชื้อ 3 ครั้ง แบ่ง เส้นใยไมซี เลียมออก เป็น 2 ส่วน นำแต่ละส่วนไปใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุฟอส เฟตบัฟ เฟอร์ ความ เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 5.8 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรซึ่งมี $[1\text{-}^{14}C]$ อะซี เตทขนาด 10 ไมโครคูรี (specific activity เป็น 57 มิลลิคูรีต่อมิลลิโมล) และกรด เบนโซอิคหรือกรดโพรพิออนนิคหรือส่วนผสมของกรดทั้งสองอยู่ด้วย ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในแต่ละกรณี จากนั้น เก็บ flask ทั้งหมดไว้ในอุณหภูมิห้องโดย เขย่า เป็นครั้งคราว เมื่อครบ 48 ชั่วโมงกรองแยก เส้นใยไมซี เลียมด้วยกระดาษกรองวัทแมนหมายเลข 2 ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำไมซี เลียมไปนึ่งฆ่า เชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที อบในตู้อบอุณหภูมิ 50°ซ จนแห้งสนิท ชั่งน้ำหนักแล้วนำไปสกัดหาแอฟลาทอกซินโดยใช้คลอโรฟอร์ม 3 ครั้ง ๆ ละ 10 มิลลิลิตร และดำ เนินขั้นตอนวิ เคราะห์หาแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ต่อไปตามวิธีในข้อ 3.2.1 , 3.2.2 และ 3.2.3 เมื่อได้ซิลิกา เจลที่ เรืองแสงตรงกับแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ทั้งสีและตำแหน่งจากวิธีในข้อ 3.2.3 แล้ว ขูดซิลิกา เจลบริ เวณนั้นมาชะล้างด้วยแอบโซลูท เมธิลอัลกอฮอล์ตามวิธีในข้อ 3.2.4 นำ เมธิลอัลกอฮอล์ที่ได้จากการชะล้างทั้งสองครั้งมารวมกันและใส่ลงใน scintillation vial เติม PPO/POPOP scintillant ลงไป vial ละ 5 มิลลิลิตร นำไปวัดปริมาณกัมมันตภาพรังสี เทียบกับ control ที่ไม่ได้ เติมกรด เบนโซอิคหรือโพรพิออนนิคลงไป