บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บรวบรวมลูกแป้ง

การรวบรวมตัวอย่างลูกแป้งจากภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ได้รับความร่วมมือจากกรมสรรพสามิต ได้ลูกแป้งรวมทั้งหมด 52 ตัวอย่าง เป็นลูกแป้งข้าวหมัก 30 ตัวอย่าง ลูกแป้งเหล้า 20 ตัวอย่าง และสาน้ำส้ม 2 ตัวอย่าง โดยเป็นลูกแป้งจากภาคเหนือ 9 ตัวอย่าง ภาคกลาง 23 ตัวอย่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 12 ตัวอย่าง และภาคใต้ 8 ตัวอย่าง เก็บรักษาลูกแป้งไว้ในขวดแก้วมีฝาปิดสนิท และเก็บไว้ในห้องอุณหภูมิต่ำประมาณ 4° ซ.

การแยกเชื้อจุลินทรีย์ในลูกแป้ง และการจำแนกเชื้อรา

ได้ทดลองใช้สูตรอาหารต่าง ๆ จำนวน 5 ชนิดในการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากลูกแป้ง สูตรอาหารดังกล่าวนี้ได้แก่ อาหาร B-agar (BA) Coconut agar (CA) Corn meal agar (CM) Yeast extract potassium soluble starch (YPSS) และ Potato dextrose agar PDA) สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง ส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ของ Difco

สูตรอาหาร BA ประกอบด้วย corn meal agar 17 กรัม กลูโคส 2 กรัม ซูโครส 3 กรัม ยีสต์เอกซ์แตรค 1 กรัม น้ำกลั่น 1 ลิตร

สูตรอาหาร CA ประกอบด้วย น้ำมะพร้าว 1 ลิตร และวุ้นอาหาร 20 กรัม

สูตรอาหาร CM ประกอบด้วย corn meal 50 กรัม วุ้นอาหาร 20 กรัม น้ำกลั่น 1 ลิตร

สูตรอาหาร YPSS ประกอบด้วยยีสต์เอกซ์แตรค 4 กรัม แป้ง 15 กรัม โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม วุ้นอาหาร 20 กรัม น้ำกลั่น 1 ลิตร

สูตรอาหาร PDA ประกอบด้วย มันฝรั่ง 200 กรัม เด็กซ์โตรส 200 กรัม วุ้นอาหาร 20 กรัม น้ำกลั่น 1 ลิตร

สูตรอาหารทั้ง 5 ชนิดนี้ ให้การเจริญเติบโตของเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์มากน้อยต่างกัน แต่จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ดังกล่าวสามารถขึ้นได้ในอาหารทั้ง 5 ชนิด ดังนั้นในการทดลอง จึงเลือกใช้สูตรอาหาร PDA ในการแยกเชื้อราจากลูกแป้ง เพราะราคาถูก วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรดังกล่าว เมื่อชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ครบแล้ว นำส่วนประกอบทั้งหมดต้มให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นานประมาณ 30 นาที แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งในหม้อนึ่งความดัน (auto-clave) ที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที หลังจากนี้ปล่อยให้เย็นอุณหภูมิประมาณ 45° ซ. เทอาหารลงในจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 17 มล. ทิ้งให้แข็ง

วิธีแยกเชื้อจากลูกแป้ง ทำโดย บดลูกแป้งให้เป็นผงละเอียด ด้วยโกร่งบดผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ชั่งน้ำหนักผงที่บดละเอียดแล้ว 1 กรัม โรยผงนี้ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารสูตร PDA บ่มเชื้อไว้ในห้องทดลอง ที่มีอุณหภูมิ 30 ± 2°ซ. เป็นเวลา 96 ชม. ตรวจดูลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในจานเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชม. จนสังเกตเห็นว่า ราสร้างซ่อสปอร์และอับสปอร์เจริญดี จึงแยกเชื้อราที่สร้างสายใยแต่ละชนิด โดยใช้เข็มแตะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใส่ในหลอดเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ บ่มเชื้อไว้ในหลอดเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ± 2° ซ. ถ้ายังไม่ได้เชื้อบริสุทธิ์ ได้ทำการแยกเชื้อใหม่อีก เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้ว เก็บรักษาเชื้อไว้ในห้อง

005099

อุณหภูมิต่ำประมาณ 4° ซ. ตลอดเวลาที่ทำการวิจัย ส่วนยีสต์และแบคทีเรียนั้น ในการวิจัยนี้ไม่ได้นำมาจำแนกถึงสกุล เก็บเฉพาะเชื้อราพวกที่มีสายใยมาจำแนกถึงสกุล และเฉพาะสกุลของ Rhizopus sp. ได้แยกถึงชนิด (species)

การจำแนกลักษณะของราที่สร้างสายใย แยกออกเป็น 2 ชนิด ชนิดที่หนึ่งคือพวกที่สายใยมีผนังกั้น กับชนิดที่สองสายใยไม่มีผนังกั้น ทั้งสองพวกได้จำแนกถึงสกุล โดยอาศัยลักษณะหลายประการ เช่น สายใย ซ่อสปอร์ อับสปอร์ ชนิดและสีของสปอร์ ในการจำแนกชนิดของราที่แยกได้ เพื่อให้ศึกษาลักษณะดังกล่าวได้ชัดจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ ได้นำเทคนิคของ Riddell (Riddell, 1950) มาใช้ ซึ่งมีวิธีการดังนี้ เทวุ้นอาหารที่มีวุ้น 2% ซึ่งกำลังหลอมเหลวในจานเลี้ยงเชื้อซึ่งปราศจากเชื้อ หลังจากที่วุ้นอาหารแข็ง ใช้เข็มเขี่ย หรือมีด และแท่งแก้วเผาไฟ ตัดชิ้นวุ้นอาหารให้เป็นสี่เหลี่ยมกว้างและยาวด้านละ 1 ซม. ด้วยความรวดเร็ว วางแท่งแก้วโค้งงอ ซึ่งเผาไฟแล้ว ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ซึ่งบรรจุน้ำที่ปราศจากเชื้อ 7 - 8 มล. (อาจเติม 10% กลีเซอรีนซึ่งปราศจากเชื้อลงไปด้วย) ใช้เทคนิคที่ปราศจากเชื้อ วางสไลด์ซึ่งเผาไฟหลายครั้งแล้วลงบนแท่งแก้วงอ ยกชิ้นวุ้นอาหารซึ่งเป็นสี่เหลี่ยมวางลงบนสไลด์ ปลูกเชื้อลงบนด้านข้างทั้งสี่ด้านของชิ้นวุ้นอาหาร ด้วยการใช้สปอร์หรือใช้สายใยของรา วางแผ่นปิดสไลด์ซึ่งผ่านเปลวไฟแล้วลงตรงกลางของชิ้นวุ้นอาหาร ตรวจดูการเจริญเติบโต และการให้สปอร์เป็นระยะ ๆ หลังจากเกิดสปอร์แล้วทำสไลด์แบบย้อมถึงถาวรได้ โดยการยกแผ่นปิดสไลด์ขึ้น หยดสีย้อมแลคโตฟีนอลคอททอนบลูลงบนสไลด์สะอาด แล้ววางแผ่นปิดสไลด์ และโดยวิธีการเดียวกัน วางแผ่นปิดสไลด์สะอาดลงบนแผ่นสไลด์ที่มีเชื้อเจริญอยู่ เมื่อสีย้อมซึมไปทั่วส่วนที่ต้องการย้อมแล้ว ซับสีย้อมส่วนที่เกินออก แล้วทำให้แผ่นปิดสไลด์ติดแน่นกับสไลด์ด้วยการใช้ยาทาเล็บทารอบแผ่นปิดสไลด์ แล้วศึกษาลักษณะต่าง ๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ คือ ลักษณะของสปอร์ ก้านชูอับสปอร์ และลักษณะของสายใย ในการศึกษา ได้เก็บจานเลี้ยงเชื้อไว้ในห้องทดลอง

i 17572723

ตรวจดูการเจริญของราทุก 24 ชม. และศึกษาลักษณะโคโลนีโดยละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตริโอ

การตรวจหาปริมาณรีดิวซิงชูการ์ทั้งหมดเพื่อใช้คัดสายพันธุ์

หลังจากแยกและจำแนกราในลูกแป้งแล้วได้รวบรวมรา Rhizopus sp. 11 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากลูกแป้งมาทำการตรวจหาความสามารถเฉพาะตัวในการย่อยสลายแป้งข้าวเหนียว โดยใส่เชื้อบริสุทธิ์ของ Rhizopus sp. ในรูปของสปอร์ เตรียมสปอร์ได้จากการใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 10 มล. ใส่ลงในหลอดเลี้ยงรา Rhizopus sp. อายุ 4 วัน ใช้เข็มเขี่ยลากไปมาเพื่อทำให้สปอร์หลุดออกจากอับสปอร์ นับสปอร์ได้ประมาณ 250 x 10^4 สปอร์ใน 1 มล. แล้วใส่สปอร์ 2 มล. ลงบนข้าวเหนียวที่นึ่งสุกแล้ว ชั่งหนัก 20 กรัม ซึ่งบรรจุอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ บ่มเชื้อไว้ในห้องทดลองที่อุณหภูมิ 30 ± 2° ซ. แล้วทำการตรวจหาปริมาณรีดิวซิงชูการ์ทั้งหมดทุก 2 วัน คือ ในวันที่ 2 4 6 8 และ 10 การตรวจหาปริมาณรีดิวซิงชูการ์ใช้วิธีของ Bernfeld (Bernfeld, 1951) ซึ่งมีวิธีการดังนี้ ใส่น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อจำนวน 10 มล. ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีรา Rhizopus sp. เจริญอยู่ ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที กรองส่วนของเหลวด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนของเหลวที่กรองได้ 0.5 มล. เติม 3, 5 Dinitro salicylic acid 0.5 มล. (สารละลาย 3, 5 Dinitro salicylic acid นี้เตรียมโดยละลาย 3, 5 Dinitro salicylic acid 1 กรัม ใน 2 N. NaOH 20 มล. และน้ำ 50 มล. เติม Sodium potassium tartrate 30 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นให้เป็น 100 มล.) ไปต้มนาน 5 นาที เพื่อให้รีดิวซิงชูการ์ที่มีอยู่ในของเหลวทำปฏิกริยากับ 3, 5 Dinitrosalicylic acid ในนาทีที่ 0 แล้วทำให้เย็นโดยนำหลอดที่มีส่วนผสมดังกล่าวไปผ่านน้ำเย็น เติมน้ำกลั่น 19 มล. ลงในของผสมในหลอดทดลองนี้ เขย่าหลอดทดลองเพื่อให้ของเหลวผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำของเหลวนี้ไปวัด absorbance ด้วยเครื่อง Spectronic

20 ของ Bausch & Lomb ที่ช่วงแสง 540 nm โดยใช้ของเหลวจากจานเลี้ยงเชื้อที่มีข้าวเหนียวนึ่งสุก แต่ไม่ได้ใส่เชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ แล้วคัด 6 สายพันธุ์ที่ให้ปริมาณรีดิวซิงชูการ์สูง ไปใช้ทดลองขั้นต่อไป

การศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเติบโต ช่วงระยะเวลาในการสร้างอับสปอร์ และการเปลี่ยนแปลงสีของอับสปอร์ของรา Rhizopus sp. 11 สายพันธุ์

รา Rhizopus sp. ทั้ง 11 สายพันธุ์ คือ R_1 R_2 R_3 R_4 R_5 R_6 R_7 R_8 R_9 R_{10} และ R_{11} ได้ถูกนำมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งแป้งข้าวจ้าว 5% ปริมาณของเชื้อที่ใส่เท่า ๆ กัน คือ 1 อับสปอร์ จากเชื้ออายุ 2 วัน โดยเขี่ยอับสปอร์ด้วยเข็มเขี่ยภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตริโอ ใส่เชื้อลงตรงกลางของจานเลี้ยงเชื้อซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว เก็บจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 30 ± 2° ซ. แล้วสังเกตและวัดการเจริญเติบโตของสายใย และการเกิดอับสปอร์ทุก ๆ 3 ชม. โดยวัดความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี จนราเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ สังเกตการสร้างอับสปอร์โดยดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และสังเกตการเปลี่ยนสีของอับสปอร์ตั้งแต่เริ่มเกิด ซึ่งเป็นสีขาวจนกระทั่งแก่ เปลี่ยนเป็นสีเทา และสีดำ โดยบันทึกการเปลี่ยนแปลงทุก 3 ชั่วโมง

การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณรีดิวซิงชูการ์ที่สร้างโดย R. oryzae สายพันธุ์ R_3 และ R_8 เมื่อใส่เชื้อด้วยจำนวนสปอร์แตกต่างกัน

ใส่เชื้อหนักจำนวนมาก สายใยที่งอกจากสปอร์จะมีการเจริญเติบโตได้จำนวนมากกว่า เมื่อใส่เชื้อหนักที่มีจำนวนสปอร์น้อย (Cochrane, 1958) ดังนั้น เมื่อรามีการเจริญเติบโต สร้างจำนวนสายใยได้มาก ปริมาณของเอนซายม์ที่ปล่อยออกมาต่อจำนวนเนื้อที่ของสายใยน่าจะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของสายใย และความสามารถของแต่ละ

สายพันธุ์ ถ้าสายใยมาก ควรจะให้ปริมาณเอนซายม์มาก เอนซายม์แอมีเลสที่ได้ จะย่อยแป้งซึ่งเป็นสารตั้งต้น แล้วให้ผลิตผล คือน้ำตาล ดังนั้นก็น่าจะเป็นไปได้ว่า เมื่อมีแอมีเลสปริมาณมาก ก็ย่อมได้น้ำตาลปริมาณมากด้วย การทดลองนี้ ต้องการศึกษาเปรียบเทียบจำนวนสปอร์ กับปริมาณรีดิวซิงชูการ์ทั้งหมดที่ได้จากการหมัก โดยใช้จำนวนสปอร์ต่างกันของรา 2 สายพันธุ์ คือ R_3 และ R_8

ชุดแรก ใช้เชื้อ R. oryzae สายพันธุ์ R_3 ซึ่งเป็นสปอร์ผสมอยู่ในน้ำ 1 มล. ซึ่งมีจำนวนสปอร์เท่ากับ 25×10^5 สปอร์ต่อ มล. ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีข้าวเหนียวนึ่งสุก 20 กรัม ชุดที่ 2 และชุดที่ 3 ใส่เชื้อซึ่งมีสปอร์จำนวน 7.5×10^5 สปอร์ต่อ มล. และ 2.5×10^5 สปอร์ต่อ มล. ตามลำดับ ลงบนจานเลี้ยงเชื้อซึ่งมีข้าวเหนียวนึ่งสุก ปริมาณเท่ากัน วิธีการเตรียมเชื้อซึ่งเป็นสปอร์ผสมอยู่ในน้ำ เช่นเดียวกันกับที่กล่าวมาแล้วในตอนต้น สำหรับสายพันธุ์ R_8 ทำวิธีการเดียวกันกับสายพันธุ์ R_3 ต่างกันที่จำนวนสปอร์คือ มีจำนวนสปอร์เท่ากับ 25×10^5 สปอร์ต่อ มล. 5×10^5 สปอร์ต่อ มล. และ 2.5×10^5 สปอร์ต่อ มล. ในชุดที่ 1 ชุดที่ 2 และชุดที่ 3 ตามลำดับ บ่มเชื้อไว้ในห้องทดลองที่อุณหภูมิเท่ากับ $30 \pm 2^\circ$ ซ. แล้วทำการตรวจหาปริมาณรีดิวซิงชูการ์ ในเวลา 2 4 6 8 และ 10 วัน วิธีตรวจหาปริมาณรีดิวซิงชูการ์ ทำเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวมาแล้ว

การตรวจหาปริมาณรีดิวซิงชูการ์ที่เปลี่ยนแปลง หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อในหม้ออบความดัน

เตรียมสารผสมที่มีแป้งข้าวจ้าว 5% แป้งข้าวเหนียว 3% ซูโครส 1% ซูโครส 3% และกลูโคส 2% บรรจุใส่หลอดทดลองอย่างละ 4 หลอด แล้วต้มให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน สำหรับน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด ละลายได้หมด ได้เป็นสารละลาย ส่วนแป้งทั้ง 2 ชนิด ต้มให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำสารทั้ง 5 ชนิด ๆ ละ 2 หลอด นึ่งฆ่าเชื้อในหม้ออบความดัน อุณหภูมิ 121° ซ ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15

นาที หลังจากนั้น นำสารผสมทั้ง 5 ชนิดดังกล่าว มาตรวจหาปริมาณเรีดิวซิงชูการ์ โดยใช้สารผสมแต่ละชนิดที่ไม่ได้นึ่งในหม้ออบความดัน เป็นตัวเปรียบเทียบ โดยวิธีการเช่นเดียวกับที่กล่าวมาในตอนต้น

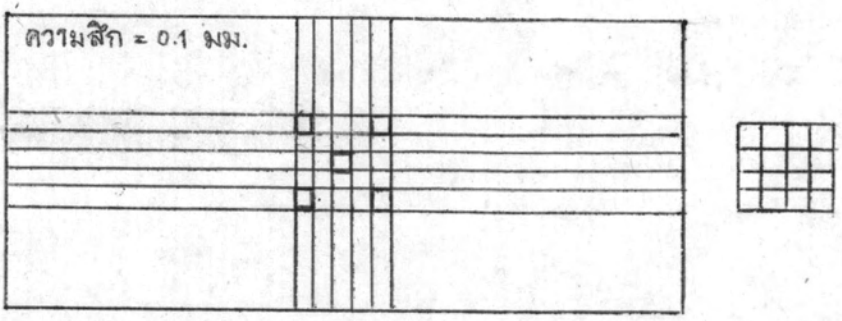
ศึกษาสูตรอาหารที่กระตุ้นให้เพิ่มการสร้างจำนวนสปอร์

สูตรอาหารที่ศึกษาประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งแร่ธาตุที่สำคัญ และแหล่งเครื่องเทส วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ใช้หลอดทดลองของ Pyrex โดยขนาดของหลอดเท่ากันทุกหลอด คือ 16 X 150 มม. บรรจุอาหารสูตรต่าง ๆ ที่จะกล่าวต่อไป มีปริมาณของอาหาร 5 มล. เท่ากันทุกหลอด ปรับ pH เริ่มต้นให้เท่ากับ 6.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริค 0.5 N และด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N นำหลอดทดลองที่บรรจุอาหารแล้วนี้ ไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้ออบความดัน อุณหภูมิ 121° ซ ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วนำหลอดทดลองออกมาวางหลอดเอียงไว้ให้ได้พื้นที่หน้าตัดในแนวราบเท่ากันทุกหลอด ในการใส่เชื้อนั้น ใส่เชื้อด้วยอับ-สปอร์ของ 6 สายพันธุ์ ซึ่งคัดมาจาก 11 สายพันธุ์ ที่ให้แอมีเลสสูง ได้แก่ สายพันธุ์ R_2 R_3 R_5 R_7 R_8 R_9 จำนวน 1 อับสปอร์ จากเชื้อที่มีอายุ 2 วัน โดยปลูกเชื้อลงตรงกลางพื้นที่หน้าตัดของอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง ทุกการทดลองได้ทำซ้ำอย่างละ 2 ชุด ทุกการทดลองบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 ± 2°ซ แล้วนำเชื้อที่เลี้ยงไว้ในหลอดนี้มาทำการนับจำนวนสปอร์ที่สร้างขึ้น ในเวลา 2 3 4 5 และ 6 วัน ของการบ่มเชื้อ แล้วบันทึกผลเก็บไว้

วิธีนับจำนวนสปอร์

ใส่น้ำกลั่นจำนวน 5 มล. ลงในหลอดทดลองที่มีเชื้อรา เจริญเติบโตอยู่ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อลากไปมาให้สปอร์หลุดออกจากอับสปอร์ และผสมอยู่ในน้ำ เติมสาร Tween 80 (1 : 10) จำนวน 10 หยด ลงในน้ำที่มีสปอร์ผสมอยู่ เพื่อช่วยให้สปอร์กระจาย เขย่าหลอดทดลองให้ส่วนผสมของน้ำกับสปอร์สม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน หยดน้ำที่มีสปอร์ผสมอยู่นี้จำนวน 1 หยด ลงบนเครื่องนับเม็ดเลือด (Counting chamber หรือ Haemacytometer) แต่ละตัวอย่างนับจำนวนสปอร์ 4 ครั้ง ในการนับจำนวนสปอร์แต่ละครั้ง นับในพื้นที่ 5 แห่งคือ มุมทั้งสี่ และตรงกลาง ของเครื่องนับ ฉนั้นแต่ละตัวอย่างจะได้จำนวนข้อมูล 20 ค่า แล้วหาค่าเฉลี่ยได้ค่าตัวกลาง (mean) ในการเปรียบเทียบจำนวนสปอร์ ใช้ค่าตัวกลาง แล้วคำนวณหาจำนวนสปอร์ที่ควรมีอยู่ในของผสมจำนวน 1 มล.

<u>การคำนวณจำนวนสปอร์ที่มีในน้ำที่มีสปอร์แขวนลอยปริมาณ 1 มล.</u>



พ.ท. 1 ช่อง (มี 16 ช่องเล็ก) $= \frac{1}{5} \times \frac{1}{5}$ มม.^{2}

ปริมาตร $= \frac{1}{5} \times \frac{1}{5} \times 0.1$ มม.^{3}

$= \frac{1}{5} \times \frac{1}{5} \times \frac{1}{10}$ มม.^{3}

$= \frac{1}{250}$ มม.^{3}

ใน $\frac{1}{250}$ มม.^{3} มีจำนวน = x สปอร์

" 1 มล. " = x X 2.5 X 10^5 สปอร์

ค่า 2.5 x 10^5 เป็นค่าคงที่ เมื่อนับจำนวนสปอร์เฉลี่ยใน 16 ช่องได้เท่าไร ก็นำจำนวน 2.5 x 10^5 สปอร์ต่อ มล. ไปคูณทุกค่า

ในการศึกษาสูตรอาหาร ทำการเลี้ยงเชื้อ และนับจำนวนสปอร์ตามวิธีที่กล่าวมานี้ทุกสูตรอาหาร

สูตรอาหารชนิดต่าง ๆ ที่ทำการศึกษามีดังนี้

ก. <u>แหล่งคาร์บอน</u>

สูตรอาหารที่ศึกษา มีดังนี้ สูตรที่ 1 มีแป้งข้าวจ้าว 5% สูตรที่ 2 มีแป้งข้าวจ้าว 3% ผสมกับแป้งข้าวเหนียว 2% สูตรที่ 3 มีแป้งข้าวจ้าว 5% ผสมกับกลูโคส 2% สูตรที่ 4 มีแป้งข้าวจ้าว 5% ผสมกับซูโครส 1% สูตรที่ 5 มีแป้งข้าวจ้าว 5% ผสมกับซูโครส 3 %

ข. <u>แหล่งไนโตรเจน</u>

1. แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน 2 ชนิด คือ

1.1 แอมโมเนียมซัลเฟต ใช้ความเข้มข้นต่างกันเป็น 4 ชนิด โดยใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่ให้จำนวนสปอร์สูงที่สุดเป็นหลัก และเพิ่มแหล่งไนโตรเจนดังกล่าวด้วยความเข้มข้นต่างกัน ดังนี้ สูตรที่ 1 แป้งข้าวจ้าว 5% ซูโครส

3 % สูตรที่ 2 แป้งข้าวจ้าว 5%. ซูโครส 3 % แอมโมเนียมซัลเฟต 0.03 % สูตรที่ 3 มี แป้งข้าวจ้าว 5 % ซูโครส 3% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% สูตรที่ 4 มีแป้งข้าวจ้าว 5 % ซูโครส 3% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.10% สูตรที่ 5 มี แป้ง-ข้าวจ้าว 5% ซูโครส 3% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.15 % ได้ทำการทดลองและเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองนี้ ไปใช้ในการศึกษาแหล่งเกลือแร่

1.2 แอมโมเนียมไนเตรต ใช้ความเข้มข้นต่างกัน 4 ชนิด โดยใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่ให้จำนวนสปอร์สูงที่สุดเป็นหลัก และเพิ่มแหล่งไนโตรเจนดังกล่าวด้วยความเข้มข้นต่างกัน ดังนี้ สูตรที่1 แป้งข้าวจ้าว5% ซูโครส3% สูตรที่ 2 แป้ง-ข้าวจ้าว 5% ซูโครส 3% แอมโมเนียมไนเตรต 0.03% สูตรที่ 3 แป้งข้าวจ้าว 5% ซูโครส 3% แอมโมเนียมไนเตรต 0.05% สูตรที่4 แป้งข้าวจ้าว 5% ซูโครส 3% แอมโมเนียม-ไนเตรต 0.10% สูตรที่ 5 แป้งข้าวจ้าว 5% ซูโครส 3% แอมโมเนียมไนเตรต 0.15%

2. แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ได้ใช้แคซามิโนแอซิด ความเข้มข้นต่างกัน 4 ชนิด โดยใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่ให้จำนวนสปอร์สูงสุดเป็นหลัก และเพิ่มแหล่งไนโตรเจนดังกล่าวด้วยความเข้มข้นต่างกัน ดังนี้ สูตรที่1 แป้งข้าวจ้าว 5% ซูโครส 3% สูตรที่ 2 แป้งข้าวจ้าว 5% ซูโครส 3% แคซามิโนแอซิด0.05% สูตรที่ 3 แป้งข้าวจ้าว 5% ซูโครส3% แคซามิโนแอซิด 0.10 สูตรที่4 แป้ง-ข้าวจ้าว 5% ซูโครส 3% แคซามิโนแอซิด 0.15% สูตรที่5 แป้งข้าวจ้าว 5% ซูโครส3% แคซามิโนแอซิด 0.20 %

ค. <u>แร่ธาตุโปตัสเซียมและฟอสฟอรัส</u>

โดยถือหลักในการทำลูกแป้งซึ่งทำกันในโรงงานอุตสาหกรรม และพื้นบ้านที่ไม่เติมแร่ธาตุมากนัก Tane koji ของญี่ปุ่น เติมเถ้าซึ่งได้จากใบไม้ และต้นไม้บางชนิดลงไป เพื่อเป็นแหล่งเกลือของโปตัสเซียม และฟอสฟอรัสสำเร็จรูป (Shibasaki และ

Hesseltine, 1962) ในการวิจัยนี้ จึงเติมแร่ธาตุที่สำคัญ โดยมีโปตัสเซียม และฟอสฟอรัสอยู่ด้วยกัน จึงได้เลือกใช้โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) และใช้ความเข้มข้นต่างกัน 3 ช่วง โดยใช้สูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่ให้จำนวนสปอร์สูงรวมกับ สูตรอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม (เลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟต) ที่ให้จำนวนสปอร์สูง และเพิ่มโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ด้วยความเข้มข้น ดังนี้ สูตรที่ 1 แป้งข้าวจ้าว 5% ซูโครส 3% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.03% สูตรที่ 2 แป้งข้าวจ้าว 5% ซูโครส 3% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.03% โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03% สูตรที่ 3 แป้งข้าวจ้าว 5% ซูโครส 3% แอมโมเนียมซัล-เฟต 0.03 % โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05% สูตรที่ 4 แป้งข้าวจ้าว 5% ซูโครส 3% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.03 % โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.10 %

ง. <u>แหล่งเครื่องเทศ</u>

เครื่องเทศที่นำมาศึกษาทั้งหมด 15 ชนิด คือ ชะเอม ลูกจันทร์ ดอกจันทร์ ผักชี ยี่หร่า อบเชย กระเทียม ชายิ้น ดีปลี พริกขี้หนู ข่า พริกไทย กระวาน ขิง โป๊ยกั๊ก บดเครื่องเทศจนละเอียดเป็นผงด้วยเครื่องบดไฟฟ้า แล้วแบ่งเป็น 4 สูตร ดังนี้

เครื่องเทศสูตรที่	1	อบเชย 2%	พริกไทย 2%	ชะเอม 2%	ชายิ้น 2%
"	2	ดอกจันทร์ 2%	ยี่หร่า 2%	ผักชี 2%	กระวาน 2%
"	3	ลูกจันทร์ 2%	พริกขี้หนู 2%	กระเทียม 2%	ขิง 2%
"	4	ดีปลี 2%	ข่า 2%	ชะเอม 2%	โป๊ยกั๊ก 2%

สูตรอาหารแบ่งเป็น 5 สูตร โดยที่ทุกสูตรประกอบด้วย อาหารที่เหมาะสม ซึ่งมี แป้งข้าวจ้าว 5% ซูโครส 3% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.03% โปตัสเซียมไดไฮ-โดรเจนฟอสเฟต 0.05 %

อาหารสูตรที่	1	อาหารที่เหมาะสม	และ	ไม่มีเครื่องเทศ	
"	2	"	และ	เครื่องเทศสูตรที่	1
"	3	"	และ	"	2
"	4	"	และ	"	3
"	5	"	และ	"	4

การเปรียบเทียบการเจริญเติบโต ช่วงระยะเวลาในการสร้างอับสปอร์ และการเปลี่ยนแปลงสีของอับสปอร์ ของ R. oryzae สายพันธุ์ R_3 และ R_8 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่างกัน

นำรา R. oryzae สายพันธุ์ R_3 และ R_8 ซึ่งให้ปริมาณรีดิวซิงชูการ์สูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ มาเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง 4 ชนิด คือ ชนิดที่ 1 แป้งข้าวจ้าว 5% ชนิดที่ 2 อาหารที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลอง ชนิดที่ 3 อาหารที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลอง ผสมกับเครื่องเทศ สูตรที่ 1 ชนิดที่ 4 อาหารที่เหมาะสมจากการทดลอง ผสมกับเครื่องเทศ สูตรที่ 3 ใส่เชื้อปริมาณเท่ากัน คือ 1 อับสปอร์จากเชื้ออายุ 2 วัน โดยเขี่ยอับสปอร์ด้วยเข็มเขี่ยภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตริโอ ใส่เชื้อลงตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว เก็บจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิประมาณ $30 \pm 2^{\circ}$ ซ แล้วสังเกตดูการเจริญเติบโตของสายใย และการสร้างอับสปอร์ทุก 3 ชม. โดยการวัดความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี จนราเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ สังเกตการสร้างอับสปอร์ โดยดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และสังเกตการเปลี่ยนสีของอับสปอร์ ตั้งแต่เริ่มเกิดซึ่งเป็นสีขาว จนกระทั่งแก่ เปลี่ยนเป็นสีเทา และสีดำ แล้วจดบันทึกผลไว้

การศึกษาเปรียบเทียบอายุการงอกของสปอร์ของ R. oryzae สายพันธุ์ R_8 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ กัน

ปลูกรา R. oryzae สายพันธุ์ R_8 อายุ 2 วัน ลงบนอาหารแข็งแป้งข้าวจ้าว 5 % ซึ่งบรรจุอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ เมื่อรามีอายุ 21 ชม. ใช้เข็มเขี่ยอับสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ขึ้นมา 1 อับสปอร์ ใส่เชื้อลงบนอาหารแข็ง 4 สูตร ซึ่งอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ คือ อาหารแป้งข้าวจ้าว 5% อาหารสูตรที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองอาหารสูตรที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองผสมกับเครื่องเทสสูตรที่ 1 และอาหารสูตรที่ได้จากการทดลอง ผสมกับเครื่องเทสสูตรที่ 3 แล้วบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 ± 2° ซ และปลูกเชื้อจำนวน 1 อับสปอร์ ลงในอาหารทั้ง 4 ชนิดดังกล่าว ด้วยอับสปอร์ที่มีอายุ 21 22 23 24 25 26 27 ชม. ตามลำดับ ด้วยวิธีการเช่นเดียวกัน แล้วสังเกตดูการงอกของสปอร์ ทุก ๆ ชม. ตั้งแต่ ชม. ที่ 1 จนถึง ชม.ที่ 15

การเปรียบเทียบจำนวนสปอร์ที่สร้างขึ้นในสูตรอาหารชนิดที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองและสูตรอาหารที่ใช้เป็นพื้นฐานที่ทำในอุตสาหกรรมย่อย

ปลูกเชื้อ R. oryzae สายพันธุ์ R_3 และ R_8 ด้วยอับสปอร์จำนวน 1 อับสปอร์ จากเชื้ออายุ 2 วัน ลงบนอาหารแข็งที่บรรจุอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ อาหารที่เหมาะสมจากการทดลอง อาหารปลายข้าวจ้าว อาหารปลายข้าวจ้าวผสมปลายข้าวเหนียว และรำในอัตราส่วน 2 : 1 : 0.5โดยน้ำหนัก แล้วบ่มเชื้อไว้ในห้องทดลองที่อุณหภูมิ 30 ± 2 ° ซ นับจำนวนสปอร์ที่สร้างขึ้นในเวลาที่ 2 3 4 5 และ 6 วัน ของการบ่มเชื้อ ด้วยวิธีการดังที่กล่าวมาแล้วในตอนต้น แล้วจดผลการทดลองไว้