วิธีการทดลอง

1. การใช้แหล่งของไนโตรเจนเพื่อหมักฟางข้าว

เปรียบเทียบการหมักฟางข้าวโดยเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท น้ำกากส่า กากมันสำปะหลัง และฟางข้าวหมักโดยไม่ใส่แหล่งไนโตรเจน นำฟางข้าวมาแช่น้ำประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้ฟางข้าวอ่อนตัวและชุ่มน้ำ แล้วนำฟางข้าวมาสะเด็ดน้ำ จากนั้นนำฟางข้าวมาคลุกกับวัสดุที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท น้ำกากส่า กากมันสำปะหลัง ตามลำดับ ในปริมาณที่มีไนโตรเจนเท่ากับ 49.05 กรัม และฟางข้าวหมักที่ไม่ได้เติมแหล่งไนโตรเจนบรรจุลงในโหลแก้วหมักขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 22 เซ็นติเมตร ปิดโหลหมักด้วยแผ่นพลาสติกเพื่อรักษาความชื้น และเจาะรูเพื่อให้มีการระบายอากาศได้บ้าง วางโหลหมักไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 ถึง 35 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างฟางข้าวหมักที่ระยะเวลา 0, 3, 7, 12, 21, 28, 35, 63, 78, 99 และ 128 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หาอัตราย่อยสลายโดยวัดหาค่าของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของฟางข้าว (ภาคผนวกที่ 3 ข้อ 3.1, 3.2, 3.3)

2. การหมักฟางข้าวและน้ำกากส่าปริมาณต่าง ๆ กัน

นำฟางข้าว 1500 กรัม มาคลุกกับน้ำกากส่าในปริมาณ 4500, 3000, 1500 กรัม และไม่เติมน้ำกากส่าแต่ให้น้ำประปาแทน ปรับความชื้นให้เหมาะสม นำมาหมักในโหลเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 1 เก็บตัวอย่างที่ 0, 7, 15, 20, 30, 50, 70 และ 110 วัน ตามลำดับ เพื่อวิเคราะห์หาอัตราการย่อยสลาย การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อจุลินทรีย์และแยกเก็บเชื้อจุลินทรีย์

2.1 หาอัตราการย่อยสลายโดยวิเคราะห์หาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ตามภาคผนวกที่ 3 ข้อ 3.1, 3.2, 3.3)

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในฟางข้าวหมัก

นำตัวอย่างฟางข้าวหมัก 10 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่อง Homoginizer ความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที นำมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีส์ โดยวิธี dilution plate count โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Nutrient agar ราในอาหาร Streptomycin Röse-bengal agar แอคติโนมัยซีส์ในอาหาร Arginine glycerol salt agar การทดลองสามซ้ำ บ่ม (Incubate) เชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อหา thermophilic

organism และ 45 องศาเซลเซียส เพื่อหา thermophilic organism นับปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้นทุก ๆ 24 ชั่วโมง จนเชื้อที่นับมีปริมาณคงที่

2.3 แยกและเก็บรักษาเชื้อรา

แยกโคโลนีของเชื้อราที่พบมากที่สุด (dominant) ซึ่งเกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Streptomycin Rose-bengal agar จากข้อ 2.2 มาเก็บรักษาไว้ศึกษาต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar slant ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสต่อไป

3. การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสเมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

นำเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 2.3 จำนวน 73 เชื้อ ที่เจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และจำนวน 47 เชื้อ ที่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มาคัดเลือกเบื้องต้นเพื่อหาเชื้อราที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยนำสปอร์ของเชื้อรามากระจายใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ทวีน 80 นับจำนวนสปอร์ให้ได้ประมาณ 2×10^8 สปอร์/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายสปอร์จำนวน 1 ลูป ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอกซีเมทธิล-เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30, 45 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน หลังจากนั้นเทสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์เฮกซาเดคซิลไตรแอมโมเนียมโบรไมด์จนท่วมจานเพาะเชื้อ วัดความกว้างบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีของเชื้อรา แสดงถึงความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสคัดเลือกเชื้อราที่สามารถสร้างบริเวณใสได้กว้างกว่าเชื้อรามาตรฐาน Trichoderma viridae QM 9414 ซึ่งบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน การทดลองทำ 3 ซ้ำ

4. การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสเมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีแอลฟาเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

นำเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 3 จำนวน 10 เชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มาคัดเลือกขั้นที่สอง เพื่อหาประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลส โดยการนำสปอร์ของเชื้อรามา

กระจายใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ทวีน 80 นับจำนวนสปอร์ให้ได้ประมาณ $5x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mandels & Weber's medium (ภาคผนวก 1 ข้อ 1.3) ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์แอลฟาเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนใส่ในฟลาสขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงจึงเติม 1 มิลลิลิตร ($5.0x10^7$ สปอร์) ของสารละลายสปอร์ดังกล่าว เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วเท่ากับ 250 rpm นาน 10 วัน กรองส่วนที่ใสโดยเอาเซลล์ออกด้วย Glass microfiber filter นำส่วนที่กรองได้ไปหาแอคติวิตีของเอนไซม์

4.1 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธี Mandels & Sternberg, 1976

0.5 มิลลิลิตรของเอนไซม์ที่สกัดได้ผสมกับ 0.5 มิลลิลิตรของ 0.1 โมลาร์อะซีเตตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ซึ่งมีชิ้นกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาด 1x6 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) แช่อยู่ บ่มหลอดทดลองไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่ 50 องศาเซลเซียส นำส่วนใสไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi - Nelson (ภาคผนวกที่ 3 ข้อ 3.4)

หน่วยของเซลลูเลสแอคติวิตีคือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครโมลของกลูโคสในเวลา 1 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดลอง

4.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยวิธี Shin & Kitagawa & Ichikawa, 1978

0.5 มิลลิลิตรของเอนไซม์ที่สกัดได้ผสมกับ 0.5 มิลลิลิตร ของ 1 เปอร์เซ็นต์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส ใน 0.1 โมลาร์อะซีเตตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำส่วนใสไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson

หน่วยของคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลสคือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครโมลของกลูโคสภายใต้สภาวะที่ใช้ทดลอง

4.3 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส โดยวิธีของ Wood และ McCrae (1977)

1 มิลลิลิตร ของเอนไซม์ที่สกัดได้ผสมกับ 0.5 มิลลิลิตรของ 5.0 มิลลิโมลต่อลิตร ของออร์โธไนโตรเฟนิล-เบตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ (o-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside) 0.5 มิลลิลิตรของ 0.2 โมลาร์ อะซิเตตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.0 บ่มที่ 50 องศา เซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติม 2.0 มิลลิลิตร ของ 0.4 โมลาร์ไกลซีนบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 10.8 นำมาวัดการดูดแสง ออร์โธไนโตรฟีนอล (o-nitrophenol) ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตราฐานออร์โธไนโตรฟีนอล

หน่วยของเบตากลูโคซิเดสแอคติวิตี คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครโมล ของออร์โธไนโตรฟีนอล ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดลอง

5. การทดลองใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส, คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลสและเบตากลูโคซิเดสของเชื้อราที่คัดเลือกได้

นำเชื้อราหมายเลข 10 ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 ว่ามีแอคติวิตีสูงสุด มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการข้อ 4 ให้มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ฟางข้าวแทนแอลฟาเซลลูโลสทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส และปริมาณออร์โธไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยา เอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส

6. ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส และเบตา-กลูโคซิเดส ของเชื้อราที่คัดเลือกได้ โดยใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

นำเชื้อราหมายเลข 10 ซึ่งเป็นเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการข้อ 4 โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศา เซลเซียส ความเร็ว 250 rpm เป็นระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 วัน กรองเซลล์ออกด้วย Glass microfibre filter นำส่วนใสไปหาประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลส ส่วนที่เป็นตะกอนและเซลล์นำไปอบแห้งที่ 80 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นในขวดโหลดูดความชื้น นำไป

วัดการเจริญของเชื้อราตามวิธีของ Cochran และ Vercellotti, 1978 โดยการวัดปริมาณกลูโคซามีน

ชั่งตัวอย่างที่อบแห้งมา 0.2 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง (test tube) เติม 5 มิลลิลิตร ของกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น แล้วนำไปต้มให้เดือดบนอ่างน้ำเดือด นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปปั่นให้ตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นำส่วนที่ใสมาปรับความเป็นกรดด่างให้เป็นกลางด้วย 30 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมน้ำให้ครบ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปหาปริมาณกลูโคซามีน (ภาคผนวกที่ 3 ข้อ 3.5)

7. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่คัดเลือกได้หมายเลข 10 เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนและซับสเตรท

7.1 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราหมายเลข 10

นำเชื้อราหมายเลข 10 ซึ่งเป็นเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการทดลองข้อ 4 โดยมีฟางข้าว 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อบ่มเชื้อไว้เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 วัน

7.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

นำเชื้อราหมายเลข 10 ซึ่งเป็นเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนบ่มเชื้อตามวิธีการทดลองข้อ 4 เป็นระยะเวลานานเท่ากับผลการทดลองข้อ 7.1 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันดังนี้คือ 25, 30, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

7.3 ศึกษาความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม

นำเชื้อราหมายเลข 10 ซึ่งเป็นเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ปรับความเป็นกรดด่างในอาหารเท่ากับ 2, 3, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 7, 8 บ่มเชื้อตามวิธีการข้อ 4 ที่อุณหภูมิตามผลการทดลองข้อ 7.2 เป็นระยะเวลานานเท่ากับผลการทดลองข้อ 7.1 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

7.4 ศึกษาปริมาณฟางข้าวที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

นำเชื้อราหมายเลข 10 ซึ่งเป็นเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัม ปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเท่ากับผลการทดลองข้อ 7.3 บ่มเชื้อตามวิธีการข้อ 4 ที่อุณหภูมิตามผลการทดลองข้อ 7.2 เป็นระยะเวลานานเท่ากับผลการทดลองข้อ 7.1 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส

7.5 ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

นำเชื้อราหมายเลข 10 ซึ่งเป็นเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณตามผลการทดลองข้อ 7.4 ใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ดังนี้คือ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต โพลีเปปโตน และน้ำกากส่า โดยให้มีปริมาณไนโตรเจนแต่ละชนิดเท่ากับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้น ของอาหารเท่ากับผลการทดลองข้อ 7.3 บ่มเชื้อตามวิธีการข้อ 4 ที่อุณหภูมิตามผลการทดลองข้อ 7.2 เป็นระยะเวลานานเท่ากับผลการทดลองข้อ 7.1 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส

7.6 เปรียบเทียบการใช้น้ำกากส่าและโพลีเปปโตนในปริมาณต่าง ๆ กันเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

นำเชื้อราหมายเลข 10 ซึ่งเป็นเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน และน้ำกากส่าเป็นแหล่งไนโตรเจนให้มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.03, 0.05, 0.137, 0.191, 0.246 และ 0.247 กรัม ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้น ของอาหารตามผลการทดลองข้อ 7.3 บ่มเชื้อตามวิธีการข้อ 4 ที่อุณหภูมิตามผลการทดลองข้อ 7.2 เป็นระยะเวลานานเท่ากับผลการทดลองข้อ 7.1 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส เปรียบเทียบกับเมื่อเลี้ยงเชื้อราหมายเลข 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโพลีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ในปริมาณและสภาวะแวดล้อมเดียวกัน

8. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลสของเชื้อรา หมายเลข 10 ซึ่งเป็นเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนและซับสเตรท

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 7.1 ถึง 7.6 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส

9. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดสของเชื้อราหมายเลข 10 ซึ่งเป็นเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งของคาร์บอนและซับสเตรท

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 7.1 ถึง 7.6 วัดปริมาณออร์โธไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส

10. การจำแนกเชื้อราหมายเลข 10 ซึ่งเป็นเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 4

นำเชื้อราหมายเลข 10 ซึ่งเป็นเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 มาจำแนกจีนัสโดยวิธี Slide culture technique ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยทำการเปรียบเทียบรูปร่างและลักษณะในหนังสือ The Saccardo system of Classification ของ H.L Barnett & Barry B. Hunter, 1972 หน้า 90

11. การทดลองเพื่อเปรียบเทียบการหมักฟางข้าวในโหลหมักที่เติมน้ำกากส่า และใส่เชื้อราที่คัดเลือกได้ กับที่ไม่ได้ใส่เชื้อรา

นำฟางข้าวจำนวน 1,000 กรัม มาหมักกับวัสดุต่อไปนี้

ก. ใส่น้ำกากส่าให้มีปริมาณไนโตรเจน 5.48 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเชื้อราที่คัดเลือกได้ปริมาณ $2x10^7$ สปอร์ต่อกรัมฟางข้าว คลุกเคล้าให้เข้ากัน

ข. ใส่แอมโมเนียมไนเตรทให้มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับข้อ ก. และใส่เชื้อราที่คัดเลือกได้ปริมาณ $2x10^7$ สปอร์ต่อกรัมฟางข้าว คลุกเคล้าให้เข้ากัน

ค. น้ำกากส่าในปริมาณเท่ากับข้อ ก. โดยไม่ใส่เชื้อรา คลุกเคล้าให้เข้ากัน

ง. แอมโมเนียมไนเตรท ให้มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับข้อ ก. ไม่ใส่เชื้อรา.

จ. ใส่เชื้อราในปริมาณ $2x10^7$ สปอร์ต่อกรัมฟางข้าว

ฉ. ไม่ใส่ทั้งแหล่งไนโตรเจน และเชื้อราที่คัดเลือกได้

ปรับความชื้นของฟางข้าวให้เหมาะสม และปรับความเป็นกรดด่างของฟางข้าวเท่ากับ 5.0 จากนั้นนำไปหมักในโหลแก้วเส้นผ่าศูนย์กลาง 22 เซนติเมตร สูง 34 เซนติเมตร ซึ่งมีท่อเอสล่อนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง $2\frac{1}{2}$ เซนติเมตร เจาะรูแบบสลับฟันปลา เพื่อช่วยระบายอากาศ ปิดโหลหมักด้วยผ้ายางบางที่มีสำลีด้านในเพื่อรักษาความชื้นในโหลหมัก การทดลองทำ 2 ซ้ำ นำโหลหมักไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างที่ 0, 5, 10, 20, 25 และ 40 วัน นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา

11.1 อัตราการย่อยสลายโดยวัดอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ตามวิธีข้อ 1.3

11.2 ตรวจสอบหาเชื้อราที่เติมลงไปตามวิธีข้อ 2.1