หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์เครื่องมือและการทดลอง

3.1 วัสดุภัณฑ์

ฟางข้าว : จากสถานีทดลองข้าว คลองหลวง อำเภอรังสิต จังหวัดปทุมธานี, สถานีวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร, ชมรมเห็ด มหาวิทยาลัยเกษตร-ศาสตร์, อำเภอวังน้อย จังหวัดอยุธยา

กระดาษกรอง : Whatman เบอร์ 1; Whatman Ltd., Springfield Mill, Maidstone Kent, England

โหลแก้ว : ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 14 เซนติเมตร สูง 24 เซนติเมตร

ถังปีเมนต์ : ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร สูง 70 เซนติเมตร

ท่อเอสลอน : ขนาดเล็ก มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร ยาว 27.5 เซนติเมตร ขนาดใหญ่ มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร ยาว 100 เซนติเมตร

ไม้อัด : ขนาด 4 x 8 ฟุต หนา 4 มิลลิเมตร

3.2 เคมีภัณฑ์

3.2.1 substrate : Alpha cellulose fiber 99.5 เปอร์เซ็นต์ (บริสุทธิ์), บริษัท Sigma St. Louis, U.S.A.

: Carboxymethyl cellulose (sodium salt) บริษัท Tokyo Kasei, Japan

: Xylan บริษัท Sigma St. Louis, U.S.A. และบริษัท Tokyo Kasei, Japan

: O-Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside บริษัท Sigma st. Louis, U.S.A.

3.2.2 สารเคมีที่ใช้เป็นมาตรฐาน

: Glucose และ Xylose (analytical grade) บริษัท Sigma St. Louis, U.S.A.

: Potassium dichromate (analytical grade) บริษัท E. Merck Ag. Darmstadt, Germany.

: Orthonitrophenol (analytical grade) บริษัท BDH Laboratory Chemicals Division, England

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ทั่วไป

: Ammonium molybdate (laboratory reagent) บริษัท Sigma St. Louis, U.S.A.

: Potassium Sodium Tartrate (laboratory reagent) บริษัท BDH Laboratory Chemicals Division, England

: Sodium Sulfate (laboratory reagent) บริษัท Riedel-De Haen Seelze-Hannover, Germany

: Sodium Acetate anhydrous (laboratory reagent) บริษัท Fluka AG. Buchs, Switzerland

: Copper Sulfate, Ferrous Sulfate, Sodium Arsenate (laboratory reagent) บริษัท E. Merck. Ag. Darmstadt, Germany และสารเคมีอื่น ๆ ซึ่งเป็นชนิด laboratory reagent จากบริษัท May & Baker Ltd., England, บริษัท BDH Laboratory Chemicals Division, England, บริษัท Sigma St. Louis, บริษัท E. Merck. Ag. Darmstadt, Germany และบริษัท Fluka AG. Buchs, Switzerland

3.3 เครื่องมือ

: Autoclave, model HA-3D บริษัท Hirayama Manufacturing Co., Tokyo, Japan

: Blender, model Solid State Culture, National Co., Ltd.

: Electrothermal, model MS 9506 บริษัท Electrothermal London, England

: Incubator, model 2736 บริษัท Kottermann, Hänignsen/w-Germany.

: Incubator, model 048 B บริษัท Rudolf-Diesel-Stauf, West Germany

: Infrared couple plasma

: Microscope, model EC บริษัท Olympus, Tokyo, Japan

: Micro-Kjadahl, model FT-1250

: Sonicator, Braunsonic 1510 B. Braun Melsengen AG U.S.A.

: Spectrophotometer, model 200-20 Double Beam บริษัท Hitachi, Ltd.-Tokyo, Japan

: Sorvall® Refrigerated Superspeed Centrifuge, model RC-5B บริษัท Du Point, Instrument Products, Biomedical Division, Newton, Connecticut, U.S.A.

: Water Bath, model SB-24 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Tokyo, Osaka, Japan

: Water Bath, model 3043 บริษัท Kottermann, Hänignsen/w-Germany

: Water Bath Shaker, model G-76, New Brunswick scientific Co., Ltd. Edision, N.Y., U.S.A.

: pH meter, model 3560 digital meter บริษัท Beckman Instrument Inc. Fullerton, California, U.S.A.

: Vortex Genic, model K-550 GE. Scientific, Inc., Bohemia, N.Y. 11716

: เครื่องชั่งหยาบ, model P 115 บริษัท Boeckel & Co., (Gmbh & Co.), Scientific equipment, Brandstwiete 4 2000 Hamburg 11, Western Germany

: Thomas-Willey Laboratory mill, model 4 บริษัท Arthur H. Thomas Company, Philladelphia, P.A., U.S.A.

3.4 ตัวเร่งทางการค้าที่ใช้ทำปุ๋ยหมัก (ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมพัฒนาที่ดิน)

3.4.1 ตัวเร่งอะโกรแมกซ์ คอนเซ่นเตรต (Agromax concentrate) และอะโกรแมกซ์ เซลโลส่แตต (Agromax cellostat) จากบริษัท พาราวินเซ่อร์ จำกัด กทม. เป็นส่ารตัวเร่งที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ และส่ารอินทรีย์ที่ส่กัดได้จากจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่พบได้ในส่ารตัวเร่ง ได้แก่ แบคทีเรีย (bacteria) รา (fungi) และแอคติโนมัยซีส่ (actinomyces)

3.4.2 ตัวเร่งบีส่อง (B-2) จากบริษัทคีรีลิงหรา จำกัด กทม. เป็นตัวเร่งที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ รวม 27 ชนิด เป็นจุลินทรีย์ประเภทเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีส่

3.4.3 ตัวเร่งเอฟ (F) จากบริษัทเกรียงพัฒน์ จำกัด อาคารราช่ดำริอาเขต กทม. เป็นส่ารตัวเร่งที่ประกอบด้วยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* Fugita

3.4.4 ตัวเร่งคิโลดอร์ (Kilodor) จากบริษัทเอมโก กทม. เป็นส่ารตัวเร่งที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิดด้วยกัน เช่น แบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีส่

3.4.5 ตัวเร่งไบโอนิค (Bionic) จากห้างหุ้นส่วนจำกัด วี.สุ่รัตน์ ยานนาวา กทม. เป็นส่ารตัวเร่งที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิด

3.5 จุลินทรีย์มาตรฐาน

3.5.1 *Trichoderma viridae* (QM 9414) เชื้อราส่ายพันธุ์มาตรฐานที่มีความส่ามารถในการย่อยส่ลายเซลลูโลส่สูง ได้มาจาก Professor H. Taguchi, Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University, Osaka, Japan.

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 ศึกษาการย่อยสลายฟางข้าวในโหลหมัก โดยใช้ตัวเร่งที่ผลิตเป็นการค้า

นำฟางข้าวแห้งซึ่งมีความยาวประมาณ 3 - 5 เซนติเมตร มาแช่น้ำเป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นนำฟางข้าวไปสะเด็ดน้ำออก จะมีความชื้นเหลือประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการคลุกฟางข้าวหนัก 100 กรัม กับตัวเร่งชนิดต่าง ๆ พร้อมทั้งมีการเติมปุ๋ยแอมโมเนียม-ซัลเฟต 25 กรัม และแคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัม โดยเติมตัวเร่งตามสูตรต่าง ๆ กันดังนี้ อะโกรแมกซ์ 0.09 กรัม, บีล่อง 0.30 กรัม, เอฟ 1 กรัม, ไบโอนิค 0.03 กรัม, คิโลตอร์ 0.2 กรัม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่ตัวเร่งเลย เมื่อทำการคลุกเคล้าส่วนผสมอย่างดีแล้ว จึงนำไปใส่ในโหลแก้วหมัก ซึ่งใส่ท่อเอสลอนที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร เพื่อช่วยในการระบายอากาศ และมีแผ่นโฟมปิดเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ (รูปที่ 3.1) การทดลองทำสามซ้ำ หลังจากนั้นนำโหลหมักฟางข้าวไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 ถึง 35 องศาเซลเซียส) ทำการเก็บตัวอย่างฟางข้าวทุก ๆ 7 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หา

3.6.1.1 ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)

นำตัวอย่างฟางข้าวที่หมักมาใส่น้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ (homogenizer) เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงนำสารละลายที่ได้มาวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH-meter)

3.6.1.2 ความชื้น (moisture)

นำตัวอย่างฟางข้าวที่หมักมาจำนวนหนึ่ง ชั่งหาน้ำหนักเปียก แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งอีกครั้งหนึ่ง แล้วนำมาแทนค่าในสูตรหาความชื้น

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักฟางข้าวเปียก} - \text{น้ำหนักฟางข้าวแห้ง}}{\text{น้ำหนักฟางข้าวเปียก}} \times 100$$

3.6.1.3 อุณหภูมิ (temperature)

ใช้เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิภายในโหลหมักฟางข้าว 3 ตำแหน่ง ด้วยกัน คือ บริเวณที่ลึกจากผิวหน้า 2 ถึง 3 นิ้ว บริเวณตรงกลาง และบริเวณที่ลึกที่สุด แล้วหา

ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิในโหลหมักฟางข้าว

3.6.1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บอน (ตามวิธี Walkley และ Black, 1934)

นำตัวอย่างฟางข้าวมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาบดให้ละเอียดโดยเครื่องบดมูลิเนกซ์ คลุกเคล้าให้ส่ำเสมอ ชั่งตัวอย่างมา 0.05 กรัม ใส่ในขวด flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่สารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต 1 นอร์มอล (กรัมสมมูลย์ต่อลิตร) จำนวน 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดซัลฟูริคเข้มข้นจำนวน 8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งค้างคืน เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เขย่าแล้วปล่อยไว้ให้เย็น ใส่สารละลายออร์โธฟีนานโทรินเฟอรัสคอมเพล็ก (orthophenanthrorin ferrous complex) จำนวน 2 มิลลิลิตร นำไปไตเตรต (titrate) กับสารละลายมาตรฐานเฟอรัสซัลเฟต 0.5 นอร์มอล จนกระทั่งถึงจุดยุติ (end point) โดยสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีแดง นำจำนวนปริมาตรของสารละลายเฟอรัสซัลเฟตที่ใช้กับตัวอย่าง และ blank แทนค่าในสูตร

$$\text{ร้อยละของปริมาณคาร์บอน} = \frac{(B-S) \times N \times 0.39}{W}$$

B = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายเฟอรัสซัลเฟตที่ใช้กับ blank

S = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายเฟอรัสซัลเฟตที่ใช้กับตัวอย่าง

N = ความเข้มข้นของสารละลายเฟอรัสซัลเฟต มีหน่วยเป็นนอร์มอล

W = น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

3.6.1.5 การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน (ตามวิธี Yoshida, Forno และ Cock, 1971)

ชั่งตัวอย่างที่ได้อบให้แห้งแล้ว 0.5 - 1.0 กรัม ใส่ลงใน Kjeldahl flask เติม digestion mixture ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) ชนิด A.R. grade 250 กรัม ซีเลเนียม (Se) 2.5 กรัม และกรดซัลฟูริคเข้มข้น (H_2SO_4 conc.) ชนิด A.R. grade 2,500 มิลลิลิตร ในปริมาณ 25 มิลลิลิตร นำไปตั้งบนเตาที่ใช้สำหรับย่อย (digest) โดยใช้อุณหภูมิต่ำ ๆ ก่อน แล้วค่อย ๆ ปรับให้สูงขึ้น จนกระทั่งได้

สารละลายใส ทิ้งไว้อีก 10 นาที จึงยกลง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำลงไปเจือจางให้ได้สารละลายมีปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารละลายมา 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดกันกลม (ขวดหมายเลข 6) ในชุดกลั่นด้วยไอน้ำ (รูปที่ 3.1) เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงไป แล้วทำการกลั่นด้วยไอน้ำ เก็บก๊าซแอมโมเนีย ที่เกิดขึ้นโดยผ่านลงไปในสารละลายกรดโบริค 4 เปอร์เซ็นต์ (อยู่ในขวดหมายเลข 3) ที่มีอินดิเคเตอร์ผสมของ bromocresol green กับ methyl red อยู่ด้วย ใช้สารละลายกรดบอริค 20 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่กลั่นได้จนมีปริมาตร 100 ถึง 150 มิลลิลิตร นำสารละลายนี้ไปไตเตรตกับสารละลายกรดเกลือมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง นำค่าต่าง ๆ ไปคำนวณในสูตร

$$\text{ร้อยละของปริมาณไนโตรเจน} = \frac{(S-B) \times N \times 14}{W}$$

W = น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

S = จำนวนมิลลิลิตรของกรดเกลือ (HCl)

B = จำนวนมิลลิลิตรของกรดเกลือที่ใช้

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือที่มีหน่วยเป็นนอร์มอล

3.6.1.6 การหาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio)

กระทำโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน} = \frac{\text{ร้อยละของปริมาณคาร์บอน}}{\text{ร้อยละของปริมาณไนโตรเจน}}$$

3.6.1.7 การวิเคราะห์หาปริมาณธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับพืช

3.6.1.7.1 หาปริมาณฟอสฟอรัสเพนตาออกไซด์ (P_2O_5)

นำสารละลายที่ได้จากการย่อยฟางข้าวแล้วทำให้เจือจางจากข้อ 3.6.1.5 มาวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสเพนตาออกไซด์ โดยใช้เครื่อง Inductivity Coupled Plasma Emission Spectrometer Shimadzu ICPS-50 ใช้สารละลาย Potassium-dihydrogen phosphate (KH_2HPO_4) เป็นสารละลายมาตรฐาน

3.6.1.7.2 หาปริมาณโปตัสเซียมออกไซด์ (K_2O)

นำสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าวแล้วทำให้เจือจางจากข้อ 3.6.1.5 มาวิเคราะห์หาปริมาณโปตัสเซียมออกไซด์ (K_2O) โดยใช้เครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometer Shimadzu ICPS-50 ใช้สารละลาย Potassium Choride (KCl) เป็นสารละลายมาตรฐาน

3.6.2 ศึกษาเปรียบเทียบการแพร่กระจายของเชื้อราในฟางข้าว

เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่อาจจะอยู่ภายในวัสดุที่ใช้แยก ดังนั้นในการที่จะแยกและหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์จากเศษวัสดุเหล่านี้ อาจจะทำได้โดยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

3.6.2.1 วิธีการเขย่า (shaker)

นำฟางข้าวหมัก 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 99 มิลลิลิตร นำมาเขย่าด้วยเครื่อง shaker ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1, 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ ทำการเก็บตัวอย่างและนับปริมาณเชื้อราจากสารละลายที่ได้จากการเขย่าเมื่อใช้ระยะเวลาต่าง ๆ กัน โดยวิธี dilution plate ใช้ Streptomycin Rose-bengal Agar (ภาคผนวก ก ข้อ 8) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส นับปริมาณเชื้อราทุก ๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งจำนวนเชื้อราที่นับได้มีค่าคงที่ การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.2.2 วิธีปั่น (blender)

นำฟางข้าวหมัก 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 99 มิลลิลิตร นำมาปั่นด้วยเครื่อง blender ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1, 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ ทำการเก็บตัวอย่างและนับปริมาณเชื้อราจากสารละลายที่ได้จากการปั่นเมื่อใช้ระยะเวลาต่าง ๆ กัน โดยวิธี dilution plate ใช้ Streptomycin Rose-bengal Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส นับปริมาณเชื้อราทุก ๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งจำนวนเชื้อราที่นับได้มีค่าคงที่ การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.2.3 วิธีใช้คลื่นเสียง (sonicator)

นำฟางข้าวหมัก 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 99 มิลลิลิตร นำมา sonicate ด้วยเครื่อง sonicator ที่ 40 วัตต์ และ 50 วัตต์ เป็นเวลา 1, 3

และ 5 นาที ตามลำดับ ทำการเก็บตัวอย่าง และนับปริมาณเชื้อราโดยวิธี dilution plate ใช้ Streptomycin Rose-bengal Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส นับปริมาณเชื้อราทุก ๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งจำนวนเชื้อราที่นับได้มีค่าคงที่ การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.2.4 วิธีการเขย่าร่วมกับการใช้คลื่นเสียง

นำฟางข้าวหนัก 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 99 มิลลิลิตร นำมาเขย่าด้วยเครื่อง shaker ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลาตามผลในข้อ 3.6.2.1 หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไป sonicate ด้วยเครื่อง sonicator ที่ 40 วัตต์ เป็นเวลาตามผลในข้อ 3.6.2.3 แล้วทำการเก็บตัวอย่างและนับปริมาณเชื้อราโดยวิธี dilution plate ใช้ Streptomycin Rose-bengal Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส นับปริมาณเชื้อราทุก ๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งจำนวนเชื้อราที่นับได้มีค่าคงที่ การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.2.5 วิธีการปั่นร่วมกับการใช้คลื่นเสียง

นำฟางข้าวหนัก 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 99 มิลลิลิตร นำมาปั่นด้วยเครื่อง blender ความเร็วสูงสุดเป็นเวลาตามผลในข้อ 3.6.2.2 หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไป sonicate ที่ 40 วัตต์ เป็นเวลาตามผลในข้อ 3.6.2.3 แล้วทำการเก็บตัวอย่างและนับปริมาณเชื้อราโดยวิธี dilution plate ใช้ Streptomycin Rose-bengal Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส นับปริมาณเชื้อราทุก ๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งจำนวนเชื้อราที่นับได้มีค่าคงที่ การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.2.6 วิธีการเขย่าร่วมกับวิธีการปั่น และการใช้คลื่นเสียง

นำฟางข้าวหนัก 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 99 มิลลิลิตร นำมาเขย่าด้วยเครื่อง shaker ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลาตามผลในข้อ 3.6.2.1 แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็วสูงสุด เป็นเวลาตามผลในข้อ 3.6.2.2 หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไป sonicate ที่ 40 วัตต์ เป็นเวลาตามผลในข้อ 3.6.2.3 ทำการเก็บตัวอย่างและนับปริมาณเชื้อราโดยวิธี dilution plate ใช้ Streptomycin Rose-bengal Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส นับปริมาณเชื้อราทุก ๆ

i 17396761

24 ชั่วโมง จนกระทั่งจำนวนเชื้อราที่นับได้มีค่าคงที่ การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.3 ศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อราจากฟางข้าวแหล่งต่าง ๆ โดยวิธีใช้คลื่นเสียง (sonicate)

นำฟางข้าวหมักจำนวน 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 99 มิลลิลิตร นำมา sonicate ที่ 40 วัตต์ เป็นเวลาตามผลในข้อ 3.6.2.3 ทำการเก็บตัวอย่าง และนับปริมาณเชื้อราโดยวิธี dilution plate ใช้ Streptomycin Rose-bengal Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส นับปริมาณเชื้อราทุก ๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งจำนวนเชื้อราที่นับได้มีค่าคงที่ การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.4 การแยกตัวอย่างเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟางข้าว

เนื่องจากฟางข้าวประกอบด้วยเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นการแยกเชื้อราที่ย่อยสลายฟางข้าวได้ต้องคำนึงถึงความสามารถของเชื้อราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสได้

3.6.4.1 การแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส ได้ทำการแยกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

3.6.4.1.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีคาร์บอกซีเมทธิล-เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

นำเชื้อราที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวก ก ข้อ 1) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แยกหาโคโลนีเชื้อราที่มีบริเวณใสเกิดขึ้น หลังจากนั้นเทสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์เฮกซาเดคซิลไตรแอมโมเนียมโบรไมด์ จนท่วมจานเพาะเชื้อ ทำการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถสร้างบริเวณใสได้กว้างกว่าเชื้อรามาตรฐาน *Trichoderma viridae* QM 9414 หลังจากบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ทำการบันทึกความกว้างของบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อรา การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.4.1.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีแอลฟาเซลลูโลส์เป็นแหล่งคาร์บอน

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้หลังจากเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส์เป็นแหล่งคาร์บอนมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีแอลฟาเซลลูโลส์เป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวก ก ข้อ 2) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส์ เป็นเวลา 10 วัน ทำการคัดเลือกเชื้อราที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีมากกว่าเชื้อรามาตรฐาน *Trichoderma viridae* QM 9414 ซึ่งบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส์ เป็นเวลา 10 วัน ทำการบันทึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อราที่เกิดขึ้น การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.4.1.3 เมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ Czapek's Dox medium ซึ่งมีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอน

นำเชื้อราที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลฟา-เซลลูโลส์เป็นแหล่งคาร์บอนมาเลี้ยงใน Czapek's Dox medium (ภาคผนวก ก ข้อ 3) ซึ่งมีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส์ เป็นเวลา 5 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อรา และลักษณะการเปื่อยยุ่ยของกระดาษกรองที่เกิดขึ้น การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.4.2 การแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยสลายไซแลน

นำเชื้อราที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวก ก ข้อ 10) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส์ เป็นเวลา 5 วัน ทำการวัดขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้นหลังจากเทสารละลายไอโอดีนจนท่วมจานเพาะเชื้อ ทำการคัดเลือกเฉพาะเชื้อราที่ทำให้เกิดบริเวณใสกว้างกว่า 1.52 มิลลิเมตร

3.6.5 การจำแนกเชื้อรา

3.6.5.1 การจำแนกเชื้อราในระดับยีนัส์ (Genus)

ทำโดยวิธี Slide culture technique โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) ซึ่งปลอดเชื้อเขี่ยเส้นใยหรือสปอร์ของเชื้อราที่คัดเลือกได้ลงบนชิ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ซึ่งถูกตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็ก ๆ และวางอยู่บนแผ่นสไลด์ในจานเพาะเชื้อ หลังจากนั้นนำ cover glass ปิดทับลงบนชิ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใส่สำลีชุบน้ำ

ลงในจานเพาะเชื้อ ปิดฝาจานเพาะเชื้อโดยแต่ละขั้นตอนที่กล่าวมาทำในสภาพที่ปลอดเชื้อ (aseptic technique) หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราเจริญและแผ่เส้นใยไปบนแผ่น cover glass ดีแล้ว จึงดึงออกมา หยดแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ลงไปเพื่อไล่ฟองอากาศ เมื่อแอลกอฮอล์ระเหยหมดแล้ว จึงหยดแลคโตฟีนอล (lactophenol) ลงไป 1 หยดบนสไลด์เปล่า นำ cover glass ที่มีเส้นใยเชื้อราติดอยู่ปิดทับลงไป ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ซับแลคโตฟีนอลที่มีมากออกไป ทาขอบ cover glass ด้วยน้ำยาเคลือบเล็บ ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของแต่ละเชื้อด้วยกล้องจุลทัศน์ แล้วนำไปเปรียบเทียบลักษณะการจำแนกเชื้อราในระดับยีนัส (Raper และ Thom, 1949; White และ Downing, 1953; Barnett, 1965; Barron, 1968; Raper และ Fennell, 1977)

3.6.5.2 การจำแนกเชื้อราในระดับสายพันธุ์ (Species)

นำเชื้อราที่จำแนกยีนัสมาศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ พร้อมทั้งศึกษาลักษณะโครงสร้างของเส้นใยและสปอร์อย่างละเอียดด้วยกล้องจุลทัศน์สเตอริโอและกล้องจุลทัศน์ธรรมดา แล้วนำไปเปรียบเทียบลักษณะการจำแนกเชื้อราในระดับสายพันธุ์ (Bunce, 1961; Cooney และ Emerson, 1964; Smith, 1969; Ellis, 1971; Raper และ Fennell, 1977)

3.6.6 การเก็บรักษาเชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้จากการเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีเซลลูโลส หรือไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน เก็บไว้บน PDA slant ซึ่งมีจุกสำลีปิดอยู่ และปิดทับด้วยกระดาษ parafilm เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นานประมาณ 1 ปี เมื่อต้องการใช้ในการทดลอง ให้นำเชื้อมาเลี้ยงบน PDA slant ใหม่

3.6.7 การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่คัดเลือกได้ เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

นำฟางข้าวบด (ขนาด 1 มิลลิลิตร) 2.5 กรัม ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ลึก 2 เซนติเมตร เติมสารละลายเกลือแร่ของ Saunders (ภาคผนวก ก. ข้อ 11) จำนวน 4 มิลลิลิตร คลุกเคล้าให้ทั่ว นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความ

ดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจาก ฟางข้าวในจานเพาะเชื้อเย็นแล้ว ทำการเติมสารละลายสปอร์ของเชื้อราที่แยกได้ 1 มิลลิลิตร (5×10^8 สปอร์) คลุกเคล้าให้ทั่วโดยใช้แท่งแก้วที่ปราศจากเชื้อ ฟางข้าวจะมีความชื้นเริ่มต้นประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำฟางข้าวไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ทำการสกัดเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (โมลต่อลิตร) pH 5.0 ประมาณ 50 มิลลิลิตร คลุกเคล้าให้ทั่ว แล้วทิ้งไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิประมาณ 8 ถึง 10 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองด้วยผ้าก็อซ นำ crude enzyme ที่ได้มาเซ็นตริฟิวส์ (centrifuge) ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนที่เป็นสปอร์ของเชื้อราจะตกตะกอน นำส่วนใสไปหาแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟางข้าว และเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่สกัด (extract) ได้จากเชื้อรามาตรฐาน *Trichoderma viridae* QM 9414 ซึ่งได้ทำการทดลองเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.8 การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนส โดยใช้สารละลายเกลือแอมโมเนียมไนเตรต 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก. ข้อ 12) แทนการใช้สารละลายเกลือแร่ Saunders (Saunders และคณะ, 1948)

3.6.9 การนำเอนไซม์ที่สกัดได้มาหาแอคติวิตี ดังนี้

3.6.9.1 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส โดยวิธีของ Wood และ McCrae (1977)

ผสมและบ่มเอนไซม์ที่สกัดได้ 0.2 มิลลิลิตร กับ 0.4 มิลลิลิตร 5 เปอร์เซ็นต์ แอลฟาเซลลูโลส ใน 0.1 โมลาร์ของอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 5.0 และ 1.4 มิลลิลิตรของ 0.1 โมลต่อลิตร อะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 5.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยต้มที่ 100 องศาเซลเซียส 5 นาที ทำการกรองหรือเซ็นตริฟิวส์เอาเซลลูโลสออกมา แล้วนำมาวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สมมูลย์กับกลูโคสมาตรฐาน โดยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1945) การทดลองทำสามซ้ำ

หน่วยของเซลลูเลส์แอคติวิตี คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครกรัมส่มมูลย์ของกลูโคส์ (glucose equivalent) ในเวลา 1 ชั่วโมง ภายใต้ส์ภาวะที่ใช้ทดลอง

3.6.9.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส์ โดยวิธีของ Wood และ McCrae (1977)

ผส์มและบ่มเอนไซม์ที่ส์กัดได้ 0.25 มิลลิลิตร กับ 0.5 มิลลิลิตรของ 1 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส์ ใน 0.25 มิลลิลิตรของ 0.2 โมลาร์ อะซีเตตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 5.4 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส์ เป็นเวลา 5 นาที นำมาวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ส์มมูลย์กับกลูโคส์มาตรฐาน โดยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1945) การทดลองทำส์ามซ้ำ

หน่วยของคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส์แอคติวิตีคือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 20 ไมโครกรัมส์มมูลย์ของกลูโคส์ (glucose equivalent) ภายใต้ส์ภาวะที่ใช้ทดลอง

3.6.9.3 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เบตา-กลูโคซีเดส์ โดยวิธีของ Wood และ McCrae (1977)

ผส์มและบ่มเอนไซม์ที่ส์กัดได้ 1 มิลลิลิตร กับ 0.5 มิลลิลิตรของ 5.0 มิลลิโมลต่อลิตร ของออร์โธไนโตรเฟนิล-เบตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ (O-nitrophenyl-β-O-glucopyranoside) 0.5 มิลลิลิตรของ 0.2 โมลาร์ อะซีเตตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.0 และ 1.0 มิลลิลิตร ของส์ารละลายเอนไซม์ หลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 50 องศาเซลเซียส์ เติม 2.0 มิลลิลิตรของ 0.4 โมลาร์ ไกลซีนบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 10.8 นำมาวัดการดูดแส์งของออร์โธไนโตรฟีนอล (O-nitrophenol) ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับส์ารละลายมาตรฐานออร์โธไนโตรฟีนอล การทดลองทำส์ามซ้ำ

หน่วยของเบตากลูโคซีเดส์แอคติวิตีคือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 25 ไมโครกรัมของออร์โธไนโตรฟีนอลภายใต้ส์ภาวะที่ใช้ทดลอง

3.6.9.4 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไซลาเนส โดยวิธีของ Okada และคณะ (1980)

ผสมและบ่มเอนไซม์ที่สกัดได้ 0.5 มิลลิลิตร กับ 1.0 มิลลิลิตรของ 1 เปอร์เซ็นต์ไซแลนใน 0.02 โมลาร์ อะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สมมูลย์กับไซโลสมาตรฐาน โดยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1945)

หน่วยของไซลาเนสแอคติวิตีคือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครกรัมสมมูลย์ไซโลส (xylose equivalent) ใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดลอง

3.6.10 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1945)

ผสมสารละลายน้ำตาลตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (ประมาณว่ามีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ 20 ถึง 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) กับ 1 มิลลิลิตรของสารละลายโซโมกิอัลคาไลคอปเปอร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 1.1) ต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ทำให้เย็น หลังจากนั้นเติม 1 มิลลิลิตรของอาซิโนโมลิบเดต (ภาคผนวก ข ข้อ 1.2) และ 2 มิลลิลิตรของน้ำกลั่น วัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารละลายโดยเปรียบเทียบสีที่เกิดจากสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน และสารละลายน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน

3.6.11 การวัดการเจริญของเชื้อราโดยวัดปริมาณกลูโคซามีน โดยวิธีของ Cochran และ Vercellotti, 1978

นำฟางข้าวจำนวนหนึ่งไปอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้เย็นโดยทิ้งไว้ใน dessicator แล้วชั่งฟางข้าวมา 0.2 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง (test tube) เติม 5 มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น แล้วนำไปต้มให้เดือดบน boiling water bath นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปเซนตริฟิวส์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ทิ้งส่วนที่เป็นตะกอน และนำส่วนใสที่ได้มาปรับให้เป็นกลางด้วย 30 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมน้ำให้ครบ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปหาปริมาณกลูโคซามีน ตามวิธีในข้อ 3.6.11 การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.12 การวัดปริมาณกลูโคซ่ามีน โดยวิธีของ Morgan-Elson ที่ปรับปรุง (Johnson, 1971)

ผสม 1 มิลลิลิตรของสารละลายกลูโคซ่ามีนที่เตรียมได้ตามข้อ 3.6.10 กับ 1 มิลลิลิตรของอะเซทิลอะซิโตน (ภาคผนวก ข ข้อ 2.1) ต้มในน้ำเดือด 20 นาที เติมเอทิล-แอลกอฮอล์ 10 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตรของสารละลายเออร์ลิกรีเอเจนต์ (ภาคผนวก ข ข้อ 2.2) หลังจาก 30 นาที นำไปวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่นแสง 530 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายมาตรฐานดี-กลูโคซ่ามีนไฮโดรคลอไรด์

3.6.13 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่คัดเลือกได้

3.6.13.1 การศึกษาช่วงเวลาที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่คัดเลือกได้

เลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน (ตามวิธีในข้อ 3.6.7) ทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อบ่มเชื้อไว้ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 วัน ตามลำดับ การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.13.2 การศึกษาการเจริญ และผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่คัดเลือกได้

เลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน (ตามวิธีในข้อ 3.6.7) ศึกษาหาการเจริญเติบโตของรา โดยวัดปริมาณกลูโคซ่ามีน (ตามข้อ 3.6.11) ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 วัน ตามลำดับ การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.13.3 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่คัดเลือกได้

เลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน คือ แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$, แอมโมเนียมซีเตรต $(C_6H_{14}N_2O_7)$, แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl), แอมโมเนียมอะซีเตต (CH_3COONH_4), ยูเรีย (N_2H_4CO) และแคลเซียมไซยาไนด์ $(CaCN_2)$ โดยใช้ปริมาณไนโตรเจนแต่ละชนิดเท่ากับ

0.2 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อตามผลการทดลองในข้อ 3.6.12 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.13.4 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่คัดเลือกได้

เลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน (ตามวิธีในข้อ 3.6.7) บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 30, 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.3 และบ่มเชื้อไว้เป็นระยะเวลาตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.1 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.13.5 การศึกษาความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่คัดเลือกได้

เลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน (ตามวิธีในข้อ 3.6.7) โดยปรับสภาพฟางข้าวให้มีความเป็นกรดเป็นด่างต่าง ๆ กันคือ 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.4 ใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.3 และใช้ระยะเวลาในการบ่มเชื้อตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.1 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.13.6 การศึกษาจำนวนสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน (ตามวิธีในข้อ 3.6.7) โดยใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นต่าง ๆ กัน คือ 2×10^2, 2×10^3, 2×10^4, 2×10^5, 2×10^6, 2×10^7 และ 2×10^8 สปอร์ต่อกรัมฟางข้าว ตามลำดับ ใช้ความเป็นกรดเป็นด่างของฟางข้าวเริ่มต้นตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.5 บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.4 ใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.3 และใช้ระยะเวลาการบ่มเชื้อตามผลการทดลอง

ในข้อ 3.6.13.1 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.13.7 การศึกษาความชื้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน (ตามวิธีในข้อ 3.6.7) โดยใช้ปริมาณความชื้นเริ่มต้นต่าง ๆ กัน คือ 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.6 ความเป็นกรดเป็นด่างของฟางข้าว เริ่มต้นตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.5 บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.4 ใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.3 และใช้ระยะเวลาในการบ่มเชื้อตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.1 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.13.8 การศึกษาขนาดของฟางข้าวที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน (ตามวิธีในข้อ 3.6.7) โดยใช้ขนาดของฟางข้าวต่าง ๆ กัน เช่น 1, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใช้ความชื้นตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.7 จำนวนสปอร์เริ่มต้นตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.6 ความเป็นกรดเป็นด่างของฟางข้าวเริ่มต้นตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.5 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.4 ใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.3 และใช้ระยะเวลาในการบ่มเชื้อตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.1 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.13.9 การศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4.1 โดยใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.3 ในปริมาณต่าง ๆ กันคือ 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

ใช้ขนาดของฟางข้าวตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.8 ความชื้นตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.7 จำนวนสปอร์เริ่มต้นตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.6 ความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของฟางข้าวตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.5 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.4 และใช้ระยะเวลาบ่มเชื้อตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.1 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.13.10 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส หลังจากหาสภาวะที่เหมาะสมได้แล้ว

ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อราตามผลการทดลองจากข้อ 3.6.13.1 ถึง 3.6.13.9 โดยมีการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลสทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 20 วัน การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.14 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.6.13.1 ถึง 3.6.13.10 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซลาเนส ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1945) การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.15 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส

ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.6.13.1 ถึง 3.6.13.10 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1945) การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.16 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เบตากลูโคซิเดส

ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.6.13.1 ถึง 3.6.13.10 วัดปริมาณออร์โธไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ตามวิธีของ Wood (1968) การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.17 ศึกษาการเตรียมอินนอคคูลั่มของสปอร์เชื้อราที่คัดเลือกได้

เตรียมอินนอคคูลั่มของสปอร์โดยใช้อาหารเลี้ยง 2 ชนิด คือ ชนิดแรกประกอบด้วยรำข้าวละเอียด และรำข้าวหยาบ ชนิดหลังประกอบด้วยรำข้าวละเอียดและฟางข้าว

(ขนาด 5 มิลลิเมตร) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดจะมีการผันแปรปริมาณรำข้าวหยาบและฟางข้าวตั้งแต่ 10 ถึง 80 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ นำอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ลึก 2 เซนติเมตร เติมชนิดและปริมาณไนโตรเจนตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.3 และ 3.6.13.9 ตามลำดับ คลุกเคล้าให้ทั่ว นำไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่ง ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากฟางข้าวในจานเพาะเลี้ยงเชื้อเย็นแล้ว ทำการอินนอคคูเลทเชื้อราในรูปสปอร์ลงไปในปริมาณตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.6 คลุกเคล้าให้ทั่วโดยใช้แท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แต่ถ้าต้องการทำปริมาณอินนอคคูลัมมาก ๆ ก็อาจจะทำได้ในถาดอลูมิเนียม

3.6.18 ศึกษาการย่อยสลายฟางข้าวในโหลหมัก โดยใช้เชื้อราที่คัดเลือกได้

3.6.18.1 เมื่อใช้ปริมาณแอมโมเนียมไนเตรตตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.9

นำฟางข้าวแห้ง (ความยาวประมาณ 3 - 5 เซนติเมตร) หนัก 250 กรัม มาแช่น้ำซึ่งมีการเจือกรดไฮโดรคลอริก ทำให้ฟางข้าวมีความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.5 หลังจากนั้นนำฟางข้าวไปล้างด้วยน้ำ จนกระทั่งฟางข้าวมีความชื้นประมาณ 80 เปอร์เซนต์ ทำการคลุกฟางข้าวกับเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4.1 ซึ่งอยู่ในรูปสปอร์ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างฟางข้าวต่อเชื้อราเท่ากับ 100 ต่อ 0.5 และมีการเติมชนิดและปริมาณของไนโตรเจนตามผลการทดลองในข้อ 3.6.12.3 และ 3.6.12.9 ตามลำดับ หลังจากคลุกเคล้าส่วนผสมข้างต้นอย่างสม่ำเสมอแล้ว นำมาใส่ในโหลหมัก ซึ่งมีส่วนประกอบดังแสดงในรูป 3.2 นำโหลหมักไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างฟางข้าวทุก ๆ 5 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี เช่น ปริมาณไนโตรเจน โปตัสเซียม และฟอสฟอรัส และสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ของฟางข้าวที่เปลี่ยนแปลงไป การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.18.2 เมื่อใช้ชนิดของไนโตรเจนตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.3 ในปริมาณ 1.5, 2.5 และ 5.0 เปอร์เซนต์

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.6.18.1 โดยใช้

อัตราส่วนระหว่างฟางข้าวต่อเชื้อรา เท่ากับ 100 ต่อ 0.5 และเติมชนิดของไนโตรเจนตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.3 ในปริมาณต่าง ๆ กันคือ 1.5, 2.5 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ทำการคัดเลือกเชื้อราที่มีผลทำให้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของฟางข้าวลดลงมากที่สุด การทดลองทำสามซ้ำ

3.6.19 การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์

นำฟางข้าวแห้ง (ความยาวประมาณ 3 - 5 เซนติเมตร) หนัก 250 กรัม มาแช่น้ำซึ่งมีการเจือกรดไฮโดรลิก ทำให้ฟางข้าวความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.5 หลังจากนั้นนำฟางข้าวไปล่ะเต็ดน้ำ จนกระทั่งฟางข้าวมีความชื้นประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการคลุกฟางข้าวกับเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.18.3 โดยใช้อัตราส่วนระหว่างฟางข้าวต่อเชื้อราเท่ากับ 100 ต่อ 0.5 และเติมชนิดและปริมาณของไนโตรเจนเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.6.18.2 นำส่วนผสมดังกล่าวข้างต้นมาคลุกเคล้ากันอย่างสม่ำเสมอ แล้วใส่ลงในโหลหมัก (รูปที่ 3.3) มีการให้อากาศกับโหลหมัก โดยมีอัตราการไหลของอากาศในโหลหมัก (flow rate) เท่ากับ 1 ลิตร/นาที ทำการเก็บก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในขวดหมายเลข 9 (รูปที่ 3.3) ทุก ๆ 5 วัน นำมาไตเตรตกับกรดเกลือเข้มข้น 1 นอร์มอล คำนวณหาปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นโดยนำโซเดียม-ไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาณ 100 มิลลิลิตร มาดักจับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้จากการหมักฟางข้าว หลังจากนั้นนำมาไตเตรตกับสารละลายกรดเกลือไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล โดยดูดสารละลายมาขวดละ 10 มิลลิลิตร เติมฟีนอฟทาลีน (indicator) 1 เปอร์เซ็นต์ 1 หยด ไตเตรตจนสารละลายเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นไม่มีสีพอดี ที่จุดยุตินี้ทั้งอนุมูลคาร์บอเนต (CO_3^{-2}) และอนุมูลไฮดรอกซิล (OH^-) จะถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) และน้ำ (H_2O) หมด การทดลองทำสามซ้ำ

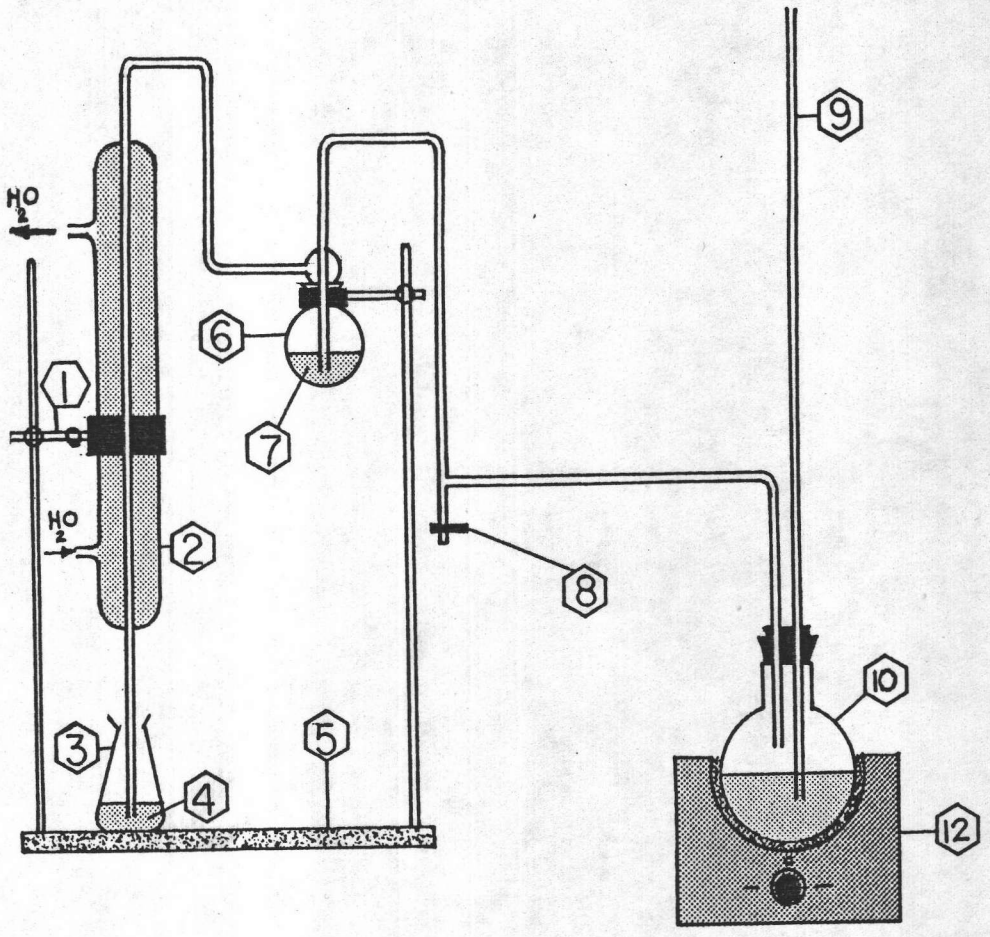
3.6.20 ศึกษาการย่อยสลายของฟางข้าวในถังหมักซีเมนต์ โดยใช้เชื้อราที่คัดเลือกได้

นำฟางข้าวแห้งหนัก 20 กิโลกรัม มาแช่ในน้ำซึ่งมีการเจือกรดไฮโดรคลอริก ทำให้ฟางข้าวมีความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นตามผลการทดลองในข้อ 3.6.13.5 หลังจากนั้นนำฟางข้าวไปล่ะเต็ดน้ำ จนกระทั่งฟางข้าวมีความชื้นประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ทำการคลุกฟางข้าวกับเชื้อราและปุ๋ยไนโตรเจนในอัตราส่วนตามวิธีการทดลองในข้อ 3.6.18.2 สำหรับ

เชื้อราที่ใช้ในการทดลองจะเลือกใช้เชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.18.2 สำหรับชนิดของไนโตรเจนที่ใช้ในการทดลองจะเลือกใช้ตามผลการทดลองในข้อ 3.6.18.3 และปริมาณไนโตรเจนที่ใช้ในการทดลองจะเลือกใช้ปริมาณไนโตรเจนน้อยที่สุดที่ทำให้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของฟางข้าวลดลงต่ำกว่า 20 ต่อ 1 เมื่อคลุกเคล้าส่วนผสมข้างต้นดีแล้ว จึงนำไปใส่ในถังหมักซีเมนต์ดังแสดงในรูปที่ 3.4 ทำการเก็บตัวอย่างฟางข้าวทุก ๆ 5 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของฟางข้าว เช่น ปริมาณคาร์บอน, ไนโตรเจน, โปตัสเซียม, ฟอสฟอรัส และสภาพแวดล้อมในกองปุ๋ยหมักที่เปลี่ยนไป การทดลองทำสามซ้ำ

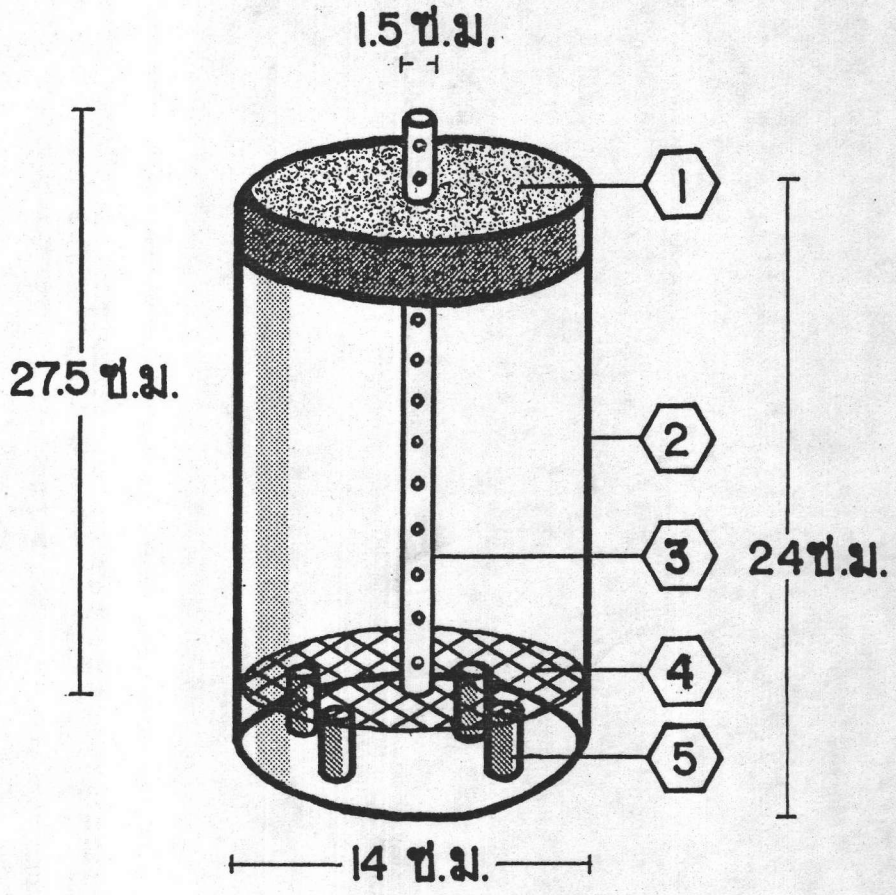
3.6.21 ศึกษาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการหมักฟางข้าว

ทำการเก็บตัวอย่างฟางข้าวหมักทุก ๆ 5 วัน แล้วนำมาหาชนิดและปริมาณของเชื้อรา โดยวิธี dilution plate ใช้ Streptomycin Rose-bengal Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 3.1 แสดงส่วนประกอบของเครื่องกลั่นก๊าซแอมโมเนียด้วยไอน้ำ

(1) clamp
(2) condenser
(3) conical flask 250 ml.
(4) boric acid solution
(5) stand
(6) round bottom flask
(7) sample solution
(8) clamp
(9) safety glass tube
(10) conical flask
(11) water (H_2O)
(12) electrothermal



รูปที่ 3.2 แสดงส่วนประกอบของโหลหมักฟางข้าว

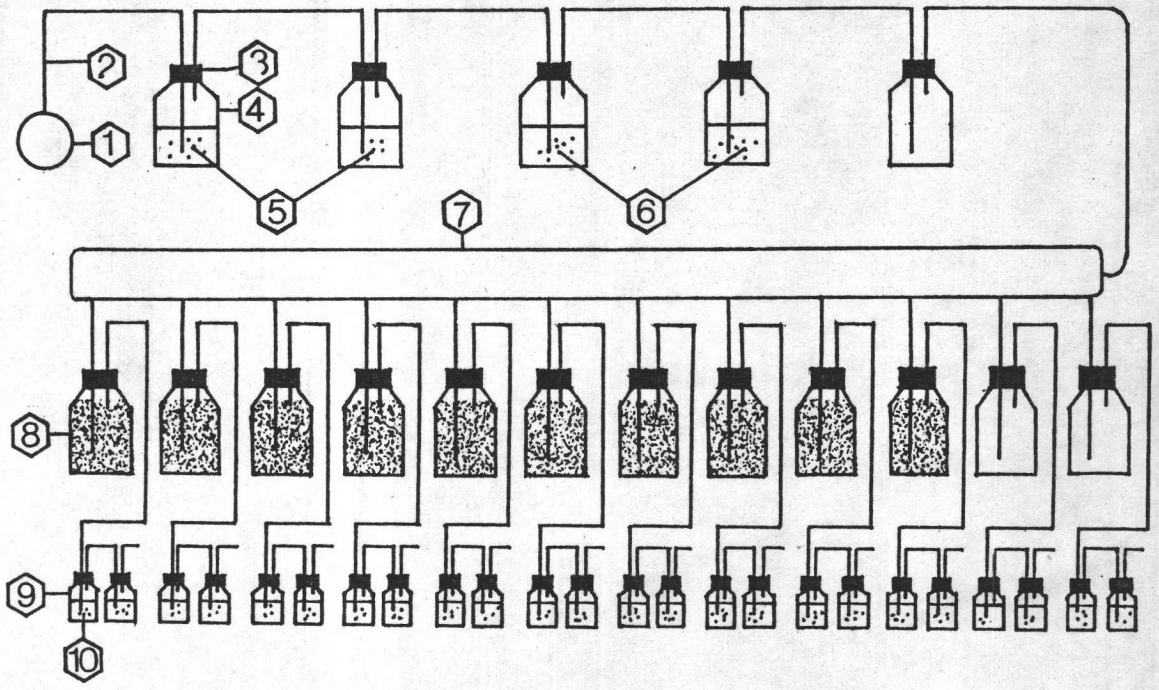
(1) ฝาปิดโหลหมักทำด้วยโฟมหุ้มกระดาษฟรอยด์

(2) โหลแก้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 14 ซ.ม. สูง 24 ซ.ม.

(3) ท่อเอล่อน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซ.ม. ยาว 27.5 ซ.ม.
(ใช้สำหรับระบายอากาศในโหลหมัก)

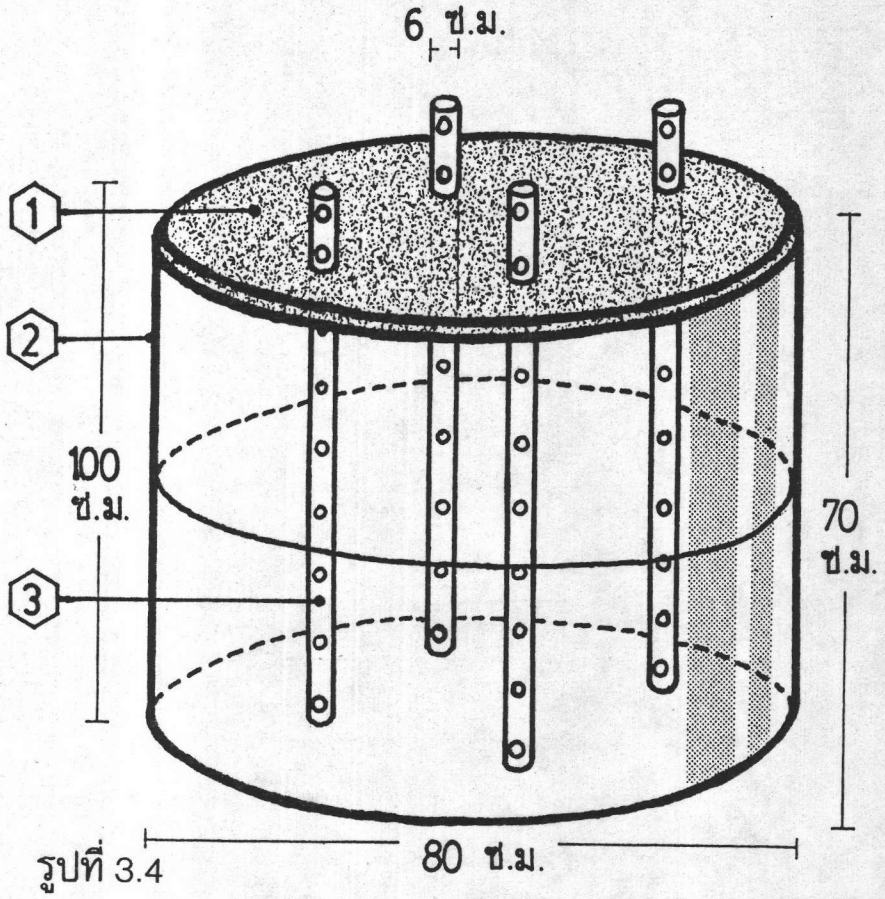
(4) ตะแกรงลวดล่แตนเลล่ (ใช้สำหรับรองฟางข้าวไม่ให้เปียกแฉะ)

(5) จุกยางรองตะแกรงลวดล่แตนเลล่



รูปที่ 3.3 แสดงส่วนประกอบเครื่องมือที่ใช้ศึกษาปริมาณ
ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในการหมักฟางข้าว

(1) เครื่องปั๊มอากาศ
(2) ท่อยางจ่ายอากาศ
(3) จุกยางปิดฝาขวดหมัก
(4) โหลแก้วหมักฟางข้าว
(5) สารละลาย 5 N NaoH
(6) น้ำ
(7) ท่อแก้วจ่ายอากาศ
(8) ฟางข้าว
(9) ขวดเก็บก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)
(10) สารละลาย 1 N NaoH



รูปที่ 3.4
แสดงส่วนประกอบถังซีเมนต์หมักฟางข้าว

(1) ฝาปิดถังซีเมนต์ ทำด้วยไม้อัด หนา 4 ม.ม.

(2) ถังซีเมนต์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 80 ซ.ม. สูง 70 ซ.ม.

(3) ท่อเอสลอน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ซ.ม. ยาว 100 ซ.ม.
(ใช้สำหรับระบายอากาศในถังหมัก)