หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ สารเคมี และสูตรอาหาร

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	บริษัท
Acetone	BDH
Acetonitrile	Fluka
Aflatoxin B_1 &B_2	Sigma
Ammonium sulphate	Merck
Benzene	BDH
Caffeine	Sigma
Celite	Merck
Chloroform	Merck
Copper sulphate	May&Baker
Cyclohexane	Merck
Disodium sulphate	Merck
Diethyl ether	Merck
Dinitrosalicylic acid (DNSA)	Merck
Ferrous sulphate	May&Baker
Glucose	Merck
Hydrochloric acid	May&Baker
Isopropanol	BDH
Magnesium sulphate	May&Baker
Manganese sulphate	May&Baker

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	บริษัท
Methanol	BDH
n-Hexane	May&Baker
Potassium chloride	BDH
Potassium dihydrogen phosphate	Fluka
Silica gel G60 for TLC	Merck
Silica gel for column chromatography	Merck
Sodium benzoate	May&Baker
Sodium hydroxide	Merck
Sodium molydate	May&Baker
Sodium potassium tartrate	May&Baker
Sodium tetraborate	May&Baker
Zinc sulphate	May&Baker

2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

Autoclave Model HA-3D บริษัท Hirayama Manufacturing Coration
Column Chromatography ขนาด 30x1 ซม.
Controlled Environment Incubator Shaker บริษัท New Brunswick Scientific
Dryer Model UL-80 บริษัท Memmert
Haemacytometer บริษัท Boeco
High Performance Liquid Chromatograph Model LC-3A บริษัท Shimadzu
Refrigerater centrifuge Model L2-21 บริษัท Beckman
Rotary Vacuum Evaporator Model N. บริษัท Tokyo Rikakikai Co.Ltd.
Spectrophotometer Model Spectronic 21 บริษัท Bosch & Lomb
TLC silica gel plate ขนาด 20x20 นิ้ว
UV. Lamp Model UVSL-25 บริษัท Ultra-Violet Products Inc.(U.S.A.)

3. อาหารชนิดต่างๆที่ใช้ในการทดลอง

3.1 สูตรอาหารสำหรับการแยกเชื้อรา

3.1.1. อาหารสูตรที่ 1 Rose bengal agar (RBA.)

อาหารสูตรนี้ใช้สำหรับเพื่อแยกเชื้อราออกจากตัวอย่างที่สุ่มมา มีส่วนประกอบดังนี้

Dextrose	10.0	ก.
Yeast extract	0.5	ก.
KH_2PO_4	0.5	ก.
K_2HPO_4	0.5	ก.
$MgSO_4 .7H_2O$	0.5	ก.
Peptone	0.5	ก.
Rose bengal	0.05	ก.
agar	17.0	ก.
น้ำกลั่น	1.0	ล.

เติมสารยาปฏิชีวนะ Streptomycin 30.0 มค.ก.ต่อมล. เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงที่อุณหภูมิ 50-55°C

3.1.2. อาหารสูตรที่ 2 อาหารวุ้น PDA (Potato dextrose agar)

อาหารชนิดนี้ใช้เพื่อแยกเชื้อราออกจากตัวอย่าง ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ใช้ทดลองควบคู่กับอาหารสูตรที่ 1 มีส่วนประกอบดังนี้

น้ำต้มมันฝรั่งเตรียมโดยใช้มันฝรั่ง 200 ก. ต้มกับน้ำกลั่น 1 ล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอาแต่สารละลายในปริมาตร 1 ล. มาผสมกับส่วนประกอบดังนี้

Dextrose	20.0	ก.
agar	15.0	ก.

3.2 อาหารสูตรที่ 3 อาหารเหลวมาตรฐาน ที่ใช้เลี้ยงเชื้อราเพื่อสร้างแอฟลาทอกซิน

เป็นสูตรอาหารสังเคราะห์ที่มีความเหมาะสม เพื่อศึกษาการสร้างแอฟลาทอกซิน ซึ่งเตรียมโดยวิธีของ Pitt และคณะ(1983) มีส่วนประกอบคือ

Glucose	60.0	ก.
$(NH_4)_2SO_4$	4.0	ก.
KH_2PO_4	5.0	ก.

$MgSO_4 .7H_2O$	0.5	ก.
KCL	0.5	ก.
สารละลายแร่ธาตุผสม(Metal mix.)	1.0	มล.
น้ำกลั่น	1.0	ล.

ปรับระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5
มีการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110°C 10 นาที

การเตรียมสารละลายแร่ธาตุผสม (Metal mix.)

$Na_2B_4O_7 .10H_2O$	700.0	มก.
$Na_2MoO_4 .2H_2O$	680.0	มก.
$Fe_2(SO_4) .6H_2O$	10.0	ก.
$CuSO_4 .4H_2O$	300.0	มก.
$ZnSO_4 .7H_2O$	1.76	ก.
$MnSO_4$	110.0	มก.
น้ำกลั่น	1.0	ล.

3.3 สูตรอาหารมาตรฐานปรับปรุง(modified)ส่วนประกอบอาหารของ Pitt(1983)

3.3.1 อาหารสูตรที่ 4ก. อาหารมาตรฐานปรับปรุง โดยใช้น้ำสกัดจากวัสดุการเกษตรแทนการใช้น้ำตาลกลูโคส

อาหารนี้ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อรา เพื่อการเจริญและสร้างแอฟลาทอกซิน แล้วตรวจสอบแอฟลาทอกซินด้วยการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต ที่ช่วงคลื่น 365 นาโนเมตร มีส่วนประกอบดังนี้

น้ำต้มจากวัสดุการเกษตร 6 ชนิดคือ ถั่วลิสง ข้าวโพด มะพร้าว ปลายข้าว ถั่วเหลือง และปลาป่น เตรียมโดยใช้วัสดุการเกษตรแต่ละชนิด 60 ก. ต้มกับน้ำกลั่น 1 ล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองเอาแต่สารละลายปริมาตร 1 ล. มาผสมกับส่วนประกอบดังนี้

$(NH_4)_2SO_4$	4.0	ก.
KH_2PO_4	5.0	ก.
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	ก.
KCL	0.5	ก.
สารละลายแร่ธาตุผสม (สูตรอยู่ในข้อ 3.2)	1.0	มล.
agar	20.0	ก.

ปรับระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5

016794

3.3.2 สูตรอาหารที่ 4ข. **อาหารเหลวมาตรฐานปรับปรุง** ซึ่งมีวิธีการเตรียมและวัสดุการเกษตรชนิดต่างๆเหมือนกับการเตรียมอาหารสูตรที่ 4ก. แต่ไม่มีการเติมวุ้น

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสารอาหารเริ่มต้น

3.4 อาหารที่เตรียมจากวัสดุการเกษตร

3.4.1 อาหารสูตรที่ 5ก. **อาหารนึ่งเตรียมจากวัสดุการเกษตร** ที่มีการเติมแร่ธาตุบางชนิด ใช้สำหรับศึกษาเปรียบเทียบการสร้างแอฟลาทอกซิน บนวัสดุการเกษตรชนิดต่างๆซึ่งวัสดุการเกษตรที่ใช้จะเป็นชนิดเดียวกับสูตรอาหารที่ 4ก.

การเตรียมโดยใช้วัสดุการเกษตรแต่ละชนิดจำนวน 100 ก. เติมสารละลายแร่ธาตุผสม(สูตรอยู่ในข้อ 3.2)ปริมาตร 1 มล.ต่อนน.อาหาร 1 กก. แล้วมีการนึ่งฆ่าเชื้อ

3.4.2 อาหารสูตรที่ 5ข. **เตรียมจากวัสดุการเกษตร** ซึ่งวิธีการเตรียมและวัสดุการเกษตรที่ใช้จะเหมือนกับอาหารสูตรที่ 5ก. แต่ไม่มีการเติมสารละลายแร่ธาตุผสม และไม่มีการนึ่งฆ่าเชื้อ

3.5 อาหารสูตรที่ 6 **อาหารที่เตรียมจากเมล็ดถั่วลิสง** ที่นึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเตรียมโดยใช้เมล็ดถั่วลิสงเพียงอย่างเดียว เพื่อการสร้างแอฟลาทอกซินเมื่อมีการเติมสารคาเฟอินและโซเดียมเบนโซเอท การเตรียมโดยใช้เมล็ดถั่วลิสงจำนวน 100 ก. แล้วมีการเติมสารละลายแร่ธาตุผสม(สูตรอยู่ในข้อ 3.2)ปริมาตร 1 มล.ต่อนน.อาหาร 1 กก. แล้วมีการนึ่งฆ่าเชื้อ

วิธีสกัด และวิเคราะห์

1. วิธีสกัดแอฟลาทอกซินออก

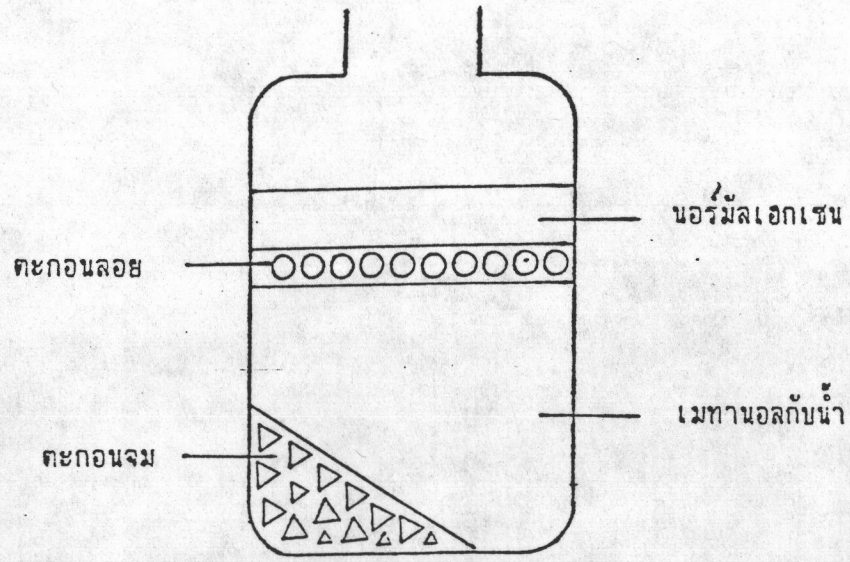
1.1. วิธีสกัดแอฟลาทอกซินจากอาหารเหลวด้วยคลอโรฟอร์ม(chloroform) ตามวิธีของ Abdollahi(1981)

นำอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อราปริมาตร 100 มล. ซึ่งได้กรองเอาเส้นใยออกแล้วใส่ลงในขวดกรวยแยกสาร (Separating funnel) เติม 100 มล. ของคลอโรฟอร์ม

เขย่าโดยแรง 5 นาที ตั้งทิ้งให้แยกชั้น เก็บส่วนของคลอโรฟอร์มไว้ นำส่วนที่เหลือมาสกัดซ้ำอีกครั้ง เก็บเอาส่วนของคลอโรฟอร์มมารวมกับครั้งแรก ซึ่งจะได้ปริมาตรทั้งหมด 200 มล. จากนั้นนำสารละลายนี้ไปผ่านการสกัดด้วยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟี(Column Chromatography) ในข้อ 1.3 ต่อไป

1.2. วิธีสกัดแอฟลาทอกซินจากอาหารแข็งวัสดุการเกษตรโดยตามวิธีของ Seitz(1974)

จากตัวอย่างที่ใช้ทดลอง 100 กก. ซึ่งจะนำมาสกัดแอฟลาทอกซิน ถ้าตัวอย่างนั้นมีลักษณะเปียกชื้น ให้นำมาทำให้แห้งโดยการนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C จนกระทั่งนน.แห้งคงที่ จากนั้นใช้ตัวอย่างที่แห้งจำนวน 50 ก. ใส่ใน เครื่องบด(blender) เติม 250 มล.ของสารผสมระหว่าง เมทานอล(Methanol) กับ น้ำกลั่น ที่มีอัตราส่วน 55 ต่อ 45 และเติม 100 มล.ของนอร์มัลเอกเซน(n-Hexane) ปั่น 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ตัวอย่างจะมีการแยกชั้นออก 4 ชั้นคือชั้นบนเป็นนอร์มัลเอกเซน ชั้นที่สองคือ ตะกอนลอย ชั้นที่สามคือ สารผสมระหว่างเมทานอลกับน้ำกลั่น และชั้นล่างเป็น ตะกอนจม ดังรูป

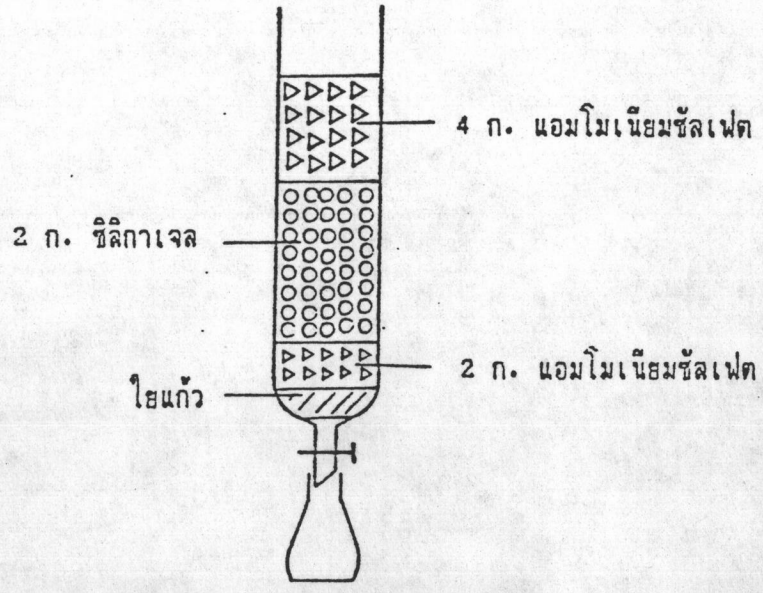


รูปแสดงการแยกชั้นของตัวอย่างหลังจากนำไปตกตะกอน
ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เวลา 15 นาที

แล้วเก็บสารละลายชั้นที่เป็นส่วนของสารผสมระหว่าง เมทานอล กับ น้ำกลั่น ในปริมาตร 50 มล. มาใส่ในขวดกรวยแยกสาร และเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 50 มล. เขย่าโดยแรง 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้สารแยกชั้น เก็บส่วนของคลอโรฟอร์มไว้ แล้วสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตรเท่าเดิม จากนั้นนำสารละลายคลอโรฟอร์มปริมาตร 100 มล. ที่เก็บได้ทั้งหมดไปผ่านการสกัดด้วยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟีในข้อ 1.3 ต่อไป

1.3. วิธีสกัดแอฟลาทอกซินให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟี(Column Chromatography)ตามวิธีของ Seitz(1974)

การเตรียมคอลัมน์โครมาโทกราฟีจะประกอบด้วยคอลัมน์ขนาด 30 X 1 ซม. ซิลิกาเจล (Silica gel for Column Chromatography) สารแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate)และใยแก้ว ซึ่งอุปกรณ์ทั้งหมดได้รับการอบแห้ง การจัดทำคอลัมน์จะทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบเปียก ซึ่งอิ่มตัวในคลอโรฟอร์ม คือชั้นล่างเป็นใยแก้วก้อนเล็กๆสำหรับรองรับสารชั้นบน ถัดขึ้นไปเป็นชั้นแอมโมเนียมซัลเฟตจำนวน 2 ก.จากนั้นเป็นชั้นของซิลิกาเจลจำนวน 2 ก. และชั้นบนสุดเป็นแอมโมเนียมซัลเฟตจำนวน 4 ก. ดังรูป



รูปแสดงลักษณะชั้นต่างๆของสารในคอลัมน์โครมาโทกราฟี

จากนั้นนำสารละลายคลอโรฟอร์มที่มีแอฟลาทอกซินละลายอยู่จากข้อ 1.1 และ 1.2 มาทำการผ่านคอลัมน์ และชะล้างด้วย 40 มล.ของนอร์มัลเฮกเซน แล้วชะล้างต่อด้วย 40 มล. ของสารไดเอธิลอีเทอร์(Diethyl ether) จากนั้นใช้ 60 มล. ของสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม กับ เมทานอล ในอัตราส่วน 97 ต่อ 3 เป็นตัวชะล้างแอฟลาทอกซินออกจากคอลัมน์ แล้วนำส่วนของสารละลายปริมาตร 60 มล. ที่เก็บได้ไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง Evaporator จากนั้นใช้คลอโรฟอร์มประมาณ 3 ถึง 5 มล. ละลายแอฟลาทอกซินที่แห้ง ถ่ายใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60°C เมื่อสารแห้งสนิทแล้ว ทำการปิดจุกให้แน่นสนิท และห่อหลอดทดลองเพื่อไม่ให้ถูกแสง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0°C เพื่อรอไว้ทำการทดสอบขั้นต่อไป

2. <u>วิธีตรวจหาแอฟลาทอกซินด้วยวิธี TLC</u> (Thin Layer Chromatography) โดยวิธีของ Gimeno(1979)

การเตรียมแผ่นกระจกซิลิกาเจล TLC (TLC silica gel plate)ในการเตรียมจะใช้ซิลิกาเจล จี60 (silica gel G60) จำนวน 25 ก. ผสมกับน้ำกลั่น 100 มล. เขย่าโดยแรง ให้ผสมกันดีในขวดแก้วทดลองนาน 1 นาที จากนั้นเทลงในแคร่สำหรับใส่ซิลิกาเจล ที่วางอยู่บนแผ่นกระจกลากแคร่ผ่านแผ่นกระจกขนาด 20x20 ซม. ที่สะอาดและแห้ง โดยปรับความห่างของแคร่กับกระจก ให้ได้ความหนาของซิลิกาเจลบนแผ่นกระจกประมาณ 250 มค.ม. วางแผ่นกระจกที่ฉาบด้วยซิลิกาเจลให้แห้ง ในอุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 110°C 30 นาที จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ที่มีสารดูดความชื้นเพื่อรอการใช้งานต่อไป

วิธีการตรวจหาแอฟลาทอกซิน โดยนำสารแอฟลาทอกซินที่สกัดและเก็บแช่เย็นไว้ มาละลายด้วยสารผสมระหว่าง เบนซีน (Benzene) กับ อะซีโตนไนทริล (Acetonitrile) อัตราส่วน 98 ต่อ 2 ปริมาตรที่ใช้ละลายตั้งแต่ 0.3 มล.ถึง 1.0 มล.ตามความเหมาะสม จากนั้นนำมาหยดบนแผ่นกระจกซิลิกา ปริมาตรที่ใช้คือ 5.0, 8.0 หรือ 10.0 มค.ล. ด้วยไมโครไปเปต หรือ capillary tube ขึ้นกับความเหมาะสมคือ ปริมาณสารที่ใช้ละลายตัวอย่าง และหยดบนแผ่นกระจกซิลิกาเจล จะใช้จำนวนมากน้อยเท่าไร ขึ้นอยู่กับว่าปริมาณแอฟลาทอกซินว่ามีมากหรือน้อย โดยสังเกตจากสีของตัวอย่างเข้มหรือจาง

สารละลายตัวพา (mobile phase) ที่ใช้คือ สารผสมระหว่าง คลอโรฟอร์ม กับไดเอธิลอีเทอร์ อัตราส่วน 7 ต่อ 3 ปริมาตร 50 มล. ซึ่งเตรียมให้อิ่มตัวอยู่ในถังโครมาโทกราฟี(Chromatography tank)เมื่อปล่อยให้สารละลายตัวพาแพร่ขึ้นจนมีความสูงประมาณ 14 ซม. และไม่ต่ำกว่า 10 ซม. จึงนำแผ่นกระจกซิลิกาเจลออกมาอบให้แห้ง จากนั้นนำไปตรวจหาแอฟลาทอกซิน ด้วยการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต ที่ช่วงคลื่น 365

นาโนเมตร เทียบกับค่า Rf ของแอฟลาทอกซินมาตรฐาน

3. <u>การตรวจหาปริมาณแอฟลาทอกซินด้วยวิธี HPLC</u> (High Performane Liquid Chromatography) โดยวิธีของ Ru-dong Wei(1980), Siraij และคณะ(1981) และ Xu และ Jin(1984)

วิธีการเตรียมแอฟลาทอกซินมาตรฐาน แอฟลาทอกซินมาตรฐานที่ใช้ทั่วๆ ไปจะอยู่ในลักษณะเป็นผงแห้งบรรจุหลอดที่ปิดสนิทมีปริมาตร 1 มก. ดังนั้นในการเตรียมแอฟลาทอกซินมาตรฐาน ที่ใช้ในการทดลอง และทำกราฟมาตรฐาน จะทำสารละลายตั้งต้น (stock solution) ที่เก็บไว้ใช้ให้มีความเข้มข้น 0.01 มก.ต่อมล. โดยใช้ 100 มล.ของสารผสมระหว่าง เบนซิน กับ อะซิโตนไนทริล ที่มีอัตราส่วน 98 ต่อ 2 ละลายแอฟลาทอกซินโดยนำหลอดที่บรรจุ 1 มก. ของแอฟลาทอกซินมาตรฐานแล้ว ใช้เข็มฉีดยาฉีดสารละลายเข้า และเข็มอันใหม่ใช้ดูดเอาสารละลายกลับออกมา การละลายจะเริ่มใช้สารอะซิโตนไนทริล จำนวน 2 มล.ละลายสารก่อนดูดใส่ใน Volumatic flask ขนาด 100 มล. แล้วใช้สาร เบนซีน ละลายสารต่อ ในการละลายจะแบ่งสารละลายทั้งสองชนิดออกละลายหลายๆครั้ง จากนั้นทำการปรับปริมาตรใน Volumatic flask ให้ได้ 100 มล. พอดีด้วยสารเบนซีน ก็จะได้แอฟลาทอกซินมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 0.01 มก.ต่อมล. (10 มค.ก.ต่อมล.) ไว้ใช้ในการทดลอง

วิธีการตรวจหาปริมาณแอฟลาทอกซิน โดยใช้เครื่อง HPLC Model LC-3A บริษัท Shimadzu ประกอบด้วยคอลัมน์ชนิด Zorbax Silica gel ขนาด 4.6 มม. x 25 ซม. สารละลายตัวพา(mobile phase)ที่ใช้ชะสารคือ water-saturated Chloroform : Cyclohexane : Acetonitrile : Isopropanol ที่มีอัตราส่วน 75: 25: 3: 2 โดยมี Detector : Fluorescence, Exit: 360 นาโนเมตร, Emission: 406 นาโนเมตร, Flow rate : 1 มล.ต่อนาที, Injection volume : 100 มค.ล. ตัวทำละลายที่ใช้ละลายตัวอย่างคือ สารผสมของสารละลายตัวพาปริมาตร 1 มล.

4. <u>การหาปริมาณน้ำตาลด้วยวิธีของ Bernfeld</u> (Miller, 1959.)

การเตรียมสาร Dinitrosalicylic acid(DNSA) reagent โดยละลาย 5 ก. ของสาร DNSA ใน 100 มล.ของ 2M. NaOH จากนั้นเติมน้ำกลั่น 250 มล. แล้วเติม 150 ก.ของสาร Sodium potassium tartate และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ล.

วิธีการหาปริมาณน้ำตาล เติม 1 มล.ของ DNSA reagent ลงใน 1 มล.ของตัวอย่างที่กรองเอาเส้นใยออกแล้ว นำส่วนผสมมาใส่ในน้ำเดือดและต้มเป็นเวลา 10 นาที

ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่น 10 มล. เขย่าให้ผสมกัน แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Spectrophotometer

กราฟมาตรฐาน ใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มก.ต่อมล. และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ (blank) เขียนกราฟระหว่างปริมาตรน้ำตาลกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกเชื้อราออกจากตัวอย่างวัสดุการเกษตร

ตัวอย่างวัสดุที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้เก็บตัวอย่างจาก โรงพยาบาลสัตว์ประจำจังหวัดนครปฐม 3 ชนิดได้แก่ ปลายข้าว 1 ตัวอย่าง รำละเอียด 1 ตัวอย่าง และข้าวโพดป่นละเอียด 2 ตัวอย่าง จากร้านขายอาหารสัตว์ 3 ชนิดได้แก่ กากถั่วเหลือง 1 ตัวอย่าง ถั่วลิสง 1 ตัวอย่าง และข้าวโพดป่นละเอียด 2 ตัวอย่าง ในเขตจังหวัดนครปฐม และจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์ 3 ชนิดคือ ถั่วเหลือง 1 ตัวอย่าง มะพร้าวแห้ง 1 ตัวอย่าง และข้าวโพดป่นละเอียด 3 ตัวอย่าง จากร้านขายอาหารสัตว์ 4 ชนิดคือ กระถินป่น 1 ตัวอย่าง ข้าวโพดป่นหยาบ 1 ตัวอย่าง ปลาป่น 1 ตัวอย่าง และข้าวโพดป่นละเอียด 2 ตัวอย่าง ในเขตจังหวัดกรุงเทพฯ

นำตัวอย่างวัสดุการเกษตรที่สุ่มมาอย่างละ 1 ก.ใส่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 มล. เขย่าให้ผสมกันตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำน้ำที่แช่มาแยกเชื้อ หยดน้ำ 0.5 มล.ลงในอาหารวุ้นสูตรที่ 1 และ 2 กระจายเชื้อโดยแท่งแก้วงอ ให้ทั่วจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน แยกเชื้อราบริสุทธิ์ไว้ทดลองต่อไป

2. ความสัมพันธ์ระหว่างความชื้นกับการงอกของสปอร์ที่ปนเปื้อนบนวัสดุการเกษตร

นำตัวอย่างวัสดการเกษตรที่สุ่มชนิดต่างๆ มาอบให้แห้งที่ 40°C เวลา 12 ชั่วโมง จน นน.แห้งคงที่ มาใส่ในขวดแก้วทดลองที่นึ่งฆ่าเชื้อขวดละ 50 ก. เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อในปริมาตร 5%, 10%, 12%, 15% และ20% (ป.ต่อนน.) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบการงอกของเชื้อราชนิดต่างๆที่ปนเปื้อน ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

3. การคัดแยก(screening)เชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างแอฟลาทอกซิน

3.1. การคัดแยกเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างแอฟลาทอกซิน โดยใช้การเรืองแสงอัลตราไวโอเลตที่ช่วงคลื่น 365 นาโนเมตร บนอาหารมาตรฐานปรับปรุง(สูตรที่ 4ก.)

นำราสายพันธุ์ที่แยกได้บริสุทธิ์ทั้งหมด 98 สายพันธุ์ จากตัวอย่างวัสดุการเกษตรที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ก่อนผสม มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรที่ 4ก. บ่มอุณหภูมิห้อง เวลา 7 วัน แล้วตรวจการสร้างแอฟลาทอกซินด้วยการนำ หลอดเลี้ยงเชื้อมาตรวจสอบ การเรืองแสงด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในที่มืด เก็บเชื้อราที่ให้การเรืองแสงไว้ทดลองต่อไป

3.2. การคัดแยกราสายพันธุ์ที่สร้างแอฟลาทอกซินครั้งที่ 2 โดยการเลี้ยงในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3) และตรวจสอบแอฟลาทอกซิน ด้วยวิธี TLC (Thin Layer Chromatography) เทียบค่า Rf กับแอฟลาทอกซิน บี$_1$ มาตรฐาน

นำราสายพันธุ์ที่ตรวจพบว่า ให้การเรืองแสงต่อแสงอัลตราไวโอเลตในข้อ ก.ซึ่งให้การเรืองแสงบนอาหารวุ้นสูตรที่ 4ก. ตั้งแต่ 3 ชนิดขึ้นไป คัดเลือกตามลักษณะดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารวุ้น PDA เป็นเวลา 7 วัน เมื่อได้สปอร์แล้วจึงนำสปอร์มาเพาะในอาหารเหลวสูตรที่ 3 ซึ่งมีปริมาตร 98 มล. แล้วใส่ 2 มล. ของสปอร์ที่มีจำนวนสปอร์ $8x10^6$ สปอร์ต่อมล.เลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ที่ $30^{\circ}C$ บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที แล้วกรองนำเลี้ยงเชื้อของแต่ละสายพันธุ์มาสกัดแอฟลาทอกซินออกตามวิธีการสกัดข้อ ก.1.1และ1.3 แล้วตรวจสอบแอฟลาทอกซินด้วยวิธี TLC ด้วยวิธีการวิเคราะห์ในข้อ ก.2. เปรียบเทียบค่า Rf กับแอฟลาทอกซิน บี$_1$ มาตรฐาน

4. เปรียบเทียบการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อราแต่ละชนิดที่คัดแยกได้ ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3) ในเวลา 15 วัน

จากการคัดแยกเชื้อราในข้อ 3 พบเชื้อรา 9 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างแอฟลาทอกซินได้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาเปรียบเทียบ การสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ โดยเติม 2 มล. ของสปอร์ที่มีจำนวนสปอร์ $8x10^6$ สปอร์ต่อมล.ในอาหารเหลวสูตรที่ 3 ปริมาตร 98 มล. บ่มเลี้ยงที่ $30^{\circ}C$ ที่ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างมาทดสอบในช่วงเวลา 2, 3, 5, 7, 10, 13 และ 15 วันตามลำดับ และกรองนำเลี้ยงเชื้อของแต่ละสายพันธุ์นำมาสกัดแอฟลาทอกซินออกตามวิธีการสกัดข้อ ก.1.1และ1.3 แล้วตรวจหาปริมาณแอฟลาทอกซินด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ ก.3.แล้วคัดเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างแอฟลาทอกซินได้สูงสุด มาใช้ทดลองต่อขั้นต่อไป ซึ่งจากการทดลองพบว่าเชื้อที่สร้างแอฟลาทอกซินได้สูงสุด และจำแนกตามหลักการจำแนกเชื้อราของ Raper และ

Thom(1949) เป็นเชื้อรา *Aspergillus* W83 ที่จะใช้ในการทดลองต่อไป

5. ศึกษาสภาวะการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3)

การทดลองใช้ 2 มล. ของสปอร์ที่มีจำนวนสปอร์ $8x10^6$ ต่อมล.ลงในอาหารเหลวสูตรที่ 3 ปริมาตร 98 มล. เพาะเลี้ยงที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างมาทดสอบทุกวัน เป็นเวลา 15 วันตามลำดับ เพื่อตรวจหาค่า นน.แห้งของเส้นใย ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ ความเป็นกรดด่าง และการสร้างแอฟลาทอกซิน โดยการสกัดตามข้อ ก.1.1และ1.3 แล้วตรวจหาปริมาณแอฟลาทอกซินด้วยเครื่อง HPLC ด้วยวิธีการในข้อ ก.3

6. วิธีการศึกษาเปรียบเทียบการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* W83 เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสารอาหารเริ่มต้นจากวัสดุการเกษตรชนิดต่างๆ และสภาวะของการเลี้ยงเชื้อรา

6.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวมาตรฐานปรับปรุง(สูตรที่ 4ข.)เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการสร้างแอฟลาทอกซิน

โดยเติม 2 มล. ของสปอร์ที่มีจำนวนสปอร์ $8x10^6$ สปอร์ต่อมล. ในอาหารเหลวสูตรที่ 4ข. ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงสารอาหารเริ่มต้น 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวโพด ถั่วลิสง ถั่วเหลือง มะพร้าว และปลายข้าว ลงในอาหารเหลวสกัดที่มีปริมาตร 98 มล. บ่มเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน ที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที แล้วตรวจหาการสร้างแอฟลาทอกด้วยการสกัดตามข้อ ก.1.1และ1.3 และหาปริมาณแอฟลาทอกซิน ด้วยเครื่อง HPLC โดยวิธีในข้อ ก.3. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณการสร้างแอฟลาทอกซิน

6.2 ศึกษาเปรียบเทียบการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* W83 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมจากวัสดุการเกษตร

6.2.1. นำอาหารสูตรที่ 5ก. ทั้ง 5 ชนิดได้แก่ ข้าวโพด ถั่วลิสง ถั่วเหลือง มะพร้าว และปลายข้าว จำนวน 100 ก. ใส่ในขวดทดลองขนาด 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เติม 2 มล.ของสปอร์ที่มีจำนวนสปอร์ $8x10^6$ สปอร์ต่อมล. แล้วเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไปขวดละ 18 มล.เขย่าคลุกให้ผสมกันทั่ว เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน ที่ 30°C แล้วตรวจหาแอฟลาทอกซิน ด้วยวิธีการสกัดในข้อ ก.1.2 และ 1.3 และหาปริมาณ

แอฟลาทอกซินด้วยเครื่อง HPLC ด้วยวิธีการตามข้อ ก.3.

6.2.2. วิธีการทดลองและอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในข้อ 6.2.2 นี้จะเหมือนกับข้อ 6.2.1 ทุกประการ แต่เปลี่ยนมาใช้อาหารสูตรที่ 5ข. แทนอาหารสูตรที่ 5ก.

7. วิธีการศึกษาผลของสารคาเฟอีน และโซเดียมเบนโซเอท ต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3)

7.1 ผลของสารคาเฟอีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวสูตรที่ 3

ในการทดลองจะเติม 5 มล. ของสปอร์ที่มีจำนวนสปอร์ $8x10^8$ สปอร์ต่อมล. ลงในอาหารเหลวสูตรที่ 3 ปริมาตร 95 มล. จากนั้นเติมสารคาเฟอีนที่ฆ่าเชื้อแล้ว ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.5, 1.6, 2.0, 2.1, 2.2 และ 2.4 มก.ต่อมล. ลงในแต่ละขวดเพาะเลี้ยงที่ $30^{\circ}C$ ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที ทำการตรวจสอบการงอกสปอร์ทุกชั่วโมงตั้งแต่ 0 ถึง 72 ชั่วโมงด้วยเครื่องนับ Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

7.2 ผลของสารโซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวสูตรที่ 3

วิธีการทดลองในข้อ 7.2 นี้จะมีวิธีการทดลอง อุปกรณ์การทดลอง และวิธีการตรวจสอบผลการทดลองเหมือนกับการทดลองในข้อ 7.1 ทุกประการ แต่เปลี่ยนจากการใช้สารคาเฟอีนมาเป็นการใช้สารโซเดียมเบนโซเอทที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.1, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75 และ 1.0 มก.ต่อมล. แทนการใช้สารคาเฟอีน

7.3 ผลการงอกของสปอร์เชื้อรา *Aspergillus* W83 ในสารผสมระหว่างคาเฟอีนและโซเดียมเบนโซเอท ในอาหารเหลวสูตรที่ 3

การทดลองในข้อ 7.3 นี้ก็เช่นเดียวกับข้อ 7.2 คือมีวิธีการทดลอง อุปกรณ์การทดลอง และวิธีการตรวจสอบผลการทดลองเหมือนกับ การทดลองในข้อ 7.1 ทุกประการ แต่จะมีการเปลี่ยนมาใช้สารผสมระหว่าง คาเฟอีนกับโซเดียมเบนโซเอททดลองแทน โดยมีการทดลองแบ่งเป็นสองการทดลองคือ

7.3.1. การทดลองที่ให้สารคาเฟอีนคงที่ที่ 2.2 มก.ต่อมล.ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการทดลองจากข้อ 7.1 และแปรผันปริมาณของสารโซเดียมเบนโซเอทความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75 และ 1.0 มก.ต่อมล.

7.3.2. เมื่อให้สารโซเดียมเบนโซเอทคงที่ที่ 0.5 มก.ต่อมล. ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการทดลองจากข้อที่ 7.2 และแปรผันปริมาณของสารคาเฟอีนความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5, 1.0, 1.5, 1.7, 2.0 และ 2.2 มก.ต่อมล.

8. วิธีการศึกษาผลของสารคาเฟอีนและโซเดียมเบนโซเอท ต่อการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวมาตรฐาน (สูตรที่ 3)

8.1 ผลของสารคาเฟอีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวสูตรที่ 3

การทดลองจะใช้ 2 มล. ของสปอร์ที่มีจำนวนสปอร์ 8×10^6 สปอร์ต่อมล. ลงในอาหารเหลวสูตรที่ 3 ปริมาตร 98 มล. เพาะเลี้ยงที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นเติมสารคาเฟอีนที่ฆ่าเชื้อแล้วที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.2 มก.ต่อมล. ลงแต่ละขวดและทำการเพาะเลี้ยงต่อไปแล้วเก็บตัวอย่างมาทดสอบ ในช่วงเวลาที่ 2, 3, 5, 7, 10, 13, 15 และ 20 วัน ตามลำดับ ทำการชั่งหาค่าน้ำหนักแห้งเส้นใย และตรวจหาการสร้างแอฟลาทอกซินตามวิธีการสกัดตามข้อ ก.1.1และ1.3 แล้วหาปริมาณแอฟลาทอกซินด้วยเครื่อง HPLC ตามข้อ ก.3.

8.2 ผลของสารโซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวสูตรที่ 3

วิธีการทดลองในข้อ 8.2 นี้จะมีวิธีการทดลอง อุปกรณ์การทดลอง และวิธีการตรวจสอบผลการทดลองเหมือนกับการทดลองในข้อ 8.1 แต่มีการเปลี่ยนจากสารคาเฟอีนมาใช้สารโซเดียมเบนโซเอทที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.02, 0.05, 0.075, 0.1, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 0.75, 1.0 และ 2.0 มก.ต่อมล.

8.3 ศึกษาผลการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* W83 เมื่อมีสารผสมคาเฟอินกับโซเดียมเบนโซเอท ในอาหารเหลวสูตรที่ 3

วิธีการทดลองในข้อ 8.3 นี้ก็เช่นเดียวกับข้อ 8.2 คือมีวิธีการทดลอง อุปกรณ์การทดลอง และวิธีการตรวจสอบผลการทดลองเหมือนกับการทดลองในข้อ 8.1 แต่จะเปลี่ยนมาใช้สารผสมระหว่าง คาเฟอินกับโซเดียมเบนโซเอท โดยในการทดลองจะมีการกำหนดให้สารคาเฟอีนคงที่ที่ 0.5 มก.ต่อมล. ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการทดลองจากข้อที่ 8.1 และแปรผันปริมาณของสารโซเดียมเบนโซเอท ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.02, 0.05, 0.075, 0.1 และ 0.25 มก.ต่อมล.

9. วิธีการศึกษาผลของสารคาเฟอีน และโซเดียมเบนโซเอท ต่อการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อราสายพันธุ์คัด *Aspergillus* W83 ในอาหารแข็งเมล็ดถั่วลิสง(สูตรที่ 8)

9.1 ผลของสารคาเฟอินที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารสูตรที่ 6

ชั่งอาหารสูตรที่ 6 จำนวน 100 ก. ใส่ลงในขวดทดลองขนาด 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เติม 2 มล.ของสปอร์ที่มีจำนวนสปอร์ $8x10^6$ สปอร์ต่อมล. และเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไปขวดละ 13 มล. บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นเติมคาเฟอินที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.2 และ 2.4 มก.ต่อมก. ลงแต่ละขวด และเติมน้ำกลั่นลงไปอีกขวดละ 5 มล.เขย่าคลุกให้ผสมกันดี แล้วเพาะเลี้ยงต่อไป เก็บตัวอย่างมาทดสอบในช่วงเวลา 2, 3, 5, 7, 10, 13, 15 และ 20 วันตามลำดับ และตรวจหาการสร้างแอฟลาทอกซิน ตามวิธีการสกัดในข้อ ก.1.2และ1.3 แล้วตรวจหาปริมาณแอฟลาทอกซินด้วยเครื่อง HPLC ด้วยวิธีตามข้อ ก.3.

9.2 ผลของสารโซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารสูตรที่ 6

วิธีการทดลองในข้อ 9.2 นี้จะมีวิธีการทดลอง อุปกรณ์การทดลอง และวิธีการตรวจสอบผลการทดลองเหมือนกับการทดลองในข้อ 9.1 แต่จะมีการเปลี่ยนจากสารคาเฟอินมาใช้สารโซเดียมเบนโซเอท ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 0.75, 1.0 และ 2.0 มก.ต่อมก. ลงไปทดลองแทน

9.3 ผลการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* W83 เมื่อมีสารผสมระหว่างคาเฟอีนกับโซเดียมเบนโซเอท ในอาหารสูตรที่ 6

วิธีการทดลองในข้อ 9.3 นี้ก็เช่นกับการทดลองในข้อ 9.2 คือวิธีการทดลอง อุปกรณ์การทดลอง และวิธีการตรวจสอบผลการทดลองจะเหมือนกับการทดลองในข้อ 9.1 โดยจะเปลี่ยนมาใช้สารผสมระหว่าง คาเฟอีนกับโซเดียมเบนโซเอทแทน ในการทดลองจะมีการกำหนดให้สารคาเฟอีนคงที่ที่ 0.5 มก.ต่อมก. ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการทดลองจากข้อ 9.1 และแปรผันปริมาณสารโซเดียมเบนโซเอทที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5, 0.7, 0.75, 1.0 และ 2.0 มก.ต่อมก.