บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์, สารอาหาร และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์ทดลอง

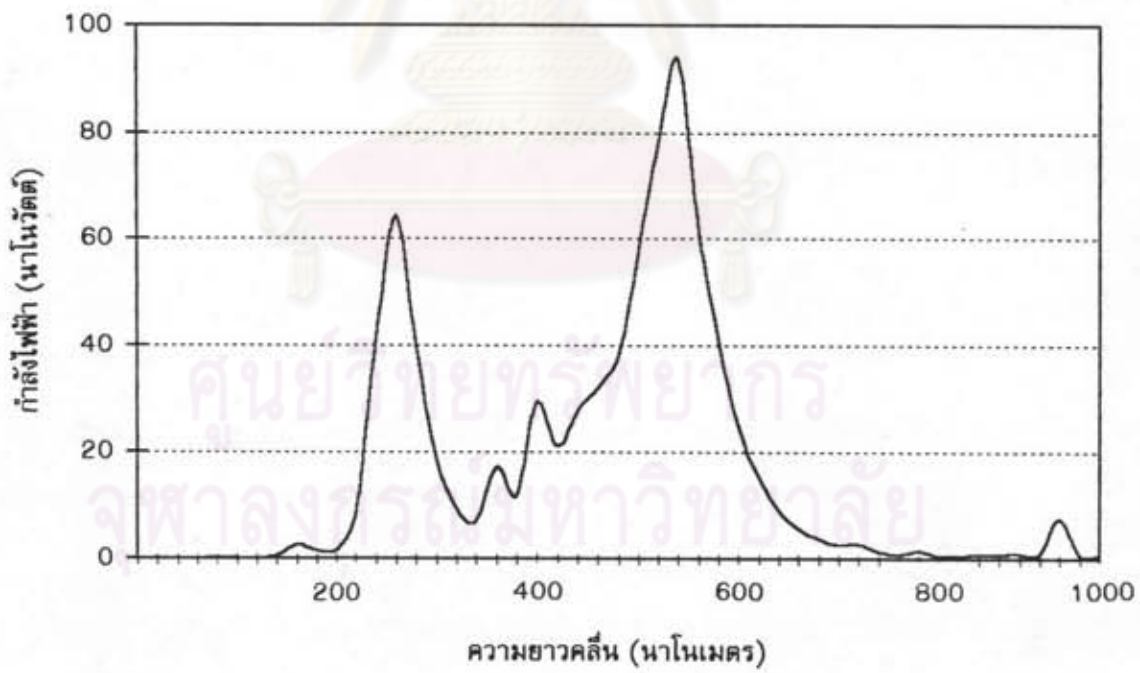
อุปกรณ์ทดลอง	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	PHM82	Radiometer, Copenhagen, Denmark
เครื่องวัดความส่องสว่าง (Lux meter)	LX-50	แสงชัยมิเตอร์, กรุงเทพฯ
เครื่องวัดสเปกตรัมของแสง (Spectoscope) ประกอบด้วย		
เครื่องแยกสเปกตรัม (Monochrom meter)	H25	ISA Instruments SA, France
เครื่องวัดพลังงาน (Optical power meter)	ML93B	Anritsa, Japan
เครื่องบันทึกอุณหภูมิ (Recorder)	AR Series	Chino Corporation, Tokyo, Japan
เครื่องบด (Blender)	MX-110PN	Matsushita electric, Japan

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์ทดลอง	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องเขย่า (Vortex)	K-550-GE	Scientific Industries,New York, U.S.A.
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	Z230	Berthold Hermle AG, Gosheim, F.R.Germany
เครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave)	KT-30SD	ALP, Tokyo, Japan
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	TE-8D	Techne, Cambridge, England
ผ้าสำหรับกรองสปอร์	ผ้าสาลู82	ซื้อจากตลาดผ้าสำเพ็ง, กรุงเทพฯ
แผ่นสไลด์สำหรับนับจำนวนเซลล์ (Haemacytometer)	Improved Neubauer	Boeco, W-Germany
กล้องจุลทรรศน์ (Compound microscope) สำหรับตรวจนับสปอร์	YS2-H	Nikon, Tokyo, Japan
กล้องจุลทรรศน์ (Compound microscope) สำหรับถ่ายภาพสปอร์	Optiphot	Nikon, Tokyo, Japan
ตู้อบความร้อนแห้ง (Hot air oven)		สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรม-พันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) สำหรับบ่มเชื้อในที่มืด	IN-81	Yamato Scientific, Tokyo, Japan

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) สำหรับศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการสร้างสปอร์ ดัดแปลงจากเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaking cabinet) รุ่น KF-4 ของบริษัท Infors, Switzerland โดยการถอดชิ้นส่วนที่ใช้สำหรับใส่ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ออกจากถาดของเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ เพื่อใช้ถาดเหล่านั้นเป็นชั้นสำหรับวางหลอดทดลอง และติดตั้งหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ชนิดคูลไวท์ (Cool white fluorescent lamp) รหัส TLD18W/33◆2K ของบริษัทฟิลิปส์, ประเทศไทย ซึ่งให้เส้นสเปกตรัมดังแสดงในภาพที่ 7 จำนวน 8 หลอด/ชั้น โดยปรับความส่องสว่างของแต่ละชั้นให้เท่ากับ 14,000 ลักซ์



ภาพที่ 7 เส้นสเปกตรัมของหลอดไฟฟลูออเรสเซ็นต์ชนิดคูลไวท์

2.1.2 สารอาหาร

ชนิดของสารอาหาร	แหล่งที่มา
1. ราข้าวเจ้าชนิดละเอียดตัวอย่างที่ 1	- โรงสีข้าว อ.เมือง จ.สุรินทร์
2. ราข้าวเจ้าชนิดละเอียดตัวอย่างที่ 2	- โรงสีข้าว อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม
3. ราข้าวเจ้าชนิดละเอียดตัวอย่างที่ 3	- โรงสีข้าว อ.บ้านแหลม จ.เพชรบุรี
4. ฟางข้าวเจ้าพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105	- นาข้าว อ.ปราสาท จ.สุรินทร์
5. ฟางข้าวเจ้าพันธุ์ สุพรรณบุรี 60	- นาข้าว อ.บางเลน จ.นครปฐม
6. ฟางข้าวเจ้าพันธุ์ กข.23	- นาข้าว อ.อู่ทอง จ.สุพรรณบุรี
7. ต้นข้าวโพดไร่ชนิดหัวแข็ง (Flint corn) พันธุ์สุวรรณ 1, สุวรรณ 2 และ สุวรรณ 3 ที่อยู่ในระยะหลังเก็บเกี่ยว	- แปลงปลูกพืชทดลอง ภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

2.1.3 สารเคมี

ใช้เกรดสำหรับงานวิเคราะห์ของบริษัท E.Merck, Germany ส่วนวุ้นผงใช้เกรดการค้า

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เลือกใช้เชื้อรา *G. fujikuroi* จำนวน 4 สายพันธุ์ ที่ได้จากการกลายพันธุ์ โดยพิจารณาประสิทธิภาพในการผลิตจิบเบอเรลลิน, ปัญหาในการสร้างสปอร์ และวิธีการกลายพันธุ์ หรือที่มาของสายพันธุ์นั้นๆ ประกอบการคัดเลือก ซึ่งสายพันธุ์เหล่านี้ ได้แก่

สายพันธุ์ C เป็นสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว ซึ่งสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาฯ นำมาใช้เป็นต้นแบบของการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *G. fujikuroi* และได้มีการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินในระดับขวดเขย่าและในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยวันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (2532) และ อรไท สุขเจริญ (2533) ตามลำดับ

สายพันธุ์ F4W-6(9) เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์สายพันธุ์ C ด้วยวิธีการใช้สารเคมี (จุฬาฯ สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพฯ, 2534) และ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ (2536) ได้ศึกษาถึง สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินในระดับขวดเขย่าและถังหมักขนาด 5 ลิตร

สายพันธุ์ N9-34 และ สายพันธุ์ N7-54 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์สายพันธุ์ C ด้วยวิธีการใช้แสงอัลตราไวโอเลตสลับกับการใช้สารเคมี (จันทร์ธิรา ลัภยพร, 2536) และ ศุภชัย สมัปปิโต (2537) ได้ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินของสายพันธุ์ N9-34 ในระดับขวดเขย่าและถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ 13 ปริมาณจิบเบอเรลลินที่ผลิตโดยเชื้อรา *G. fujikuroi* 4 สายพันธุ์ วัดในวันที่ 13 ของการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า

สายพันธุ์	ปริมาณจิบเบอเรลลิน (มก./ล.)	
C	546-612	(จันทร์ธิรา ลัภยพร, 2536 ; ศุภชัย สมัปปิโต, 2537)
F4W-6(9)	683	(อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ, 2536)
N9-34	884-913	(จันทร์ธิรา ลัภยพร, 2536 ; ศุภชัย สมัปปิโต, 2537)
N7-54	852-879	(จันทร์ธิรา ลัภยพร, 2536 ; ศุภชัย สมัปปิโต, 2537)

2.3 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

ในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อรา *G. fujikuroi* ใช้เข็มเขี่ย (needle) เขี่ยเส้นใย แล้วลาก (streak) ลงบนผิวหน้าของอาหารวุ้นเอียง (agar slant) โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์ (Potato Dextrose Agar, ภาคผนวกที่ 1.1) ที่อยู่ในหลอดทดลองจุกฝาเกลียว บ่มเชื้อในที่มืด อุณหภูมิ 24 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน เชื้อราจะเจริญปกคลุมจนเต็มผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ.

2.4 การเตรียมอาหารวุ้นเอียง

หลังจากเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการเสร็จแล้ว ขณะกำลังหลอมเหลว นำไปควบคุมให้มีอุณหภูมิ 75 °ซ. ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 4 มล. ลงในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มม. อุดปากหลอดด้วยจุกสำลี หลังจากฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำภายใต้ความดันแล้ว ควบคุมอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ลดลงเหลือ 60 °ซ. แล้วจึงเอียงหลอดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นด้วยมุมที่เท่ากัน ทั้งนี้เพื่อควบคุมผิวหน้าของอาหารวุ้นเอียงในแต่ละหลอดให้มีพื้นที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด จากนั้นทิ้งไว้ 1 วัน ก่อนนำไปปลูกเชื้อ

2.5 การเตรียมสารละลายแขวนลอยของสปอร์ (Spore suspension)

ในแต่ละสายพันธุ์ เขี่ยเส้นใยจากหลอดทดลองจุกฝาเกลียวซึ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. แล้วลากให้ทั่วผิวหน้าของอาหารวุ้นเอียง โมดิฟายด์ อะซีเตต มีเดียม (Modified Acetate Medium, ภาคผนวกที่ 1.2) ที่อยู่ในหลอดทดลองจุกสำลี บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 24 °ซ. ภายใต้ความส่องสว่าง 14,000 ลักซ์ของหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ชนิดคูลไวท์ เป็นเวลา 7 วัน เชื้อราจะสร้างเส้นใยและสปอร์ปกคลุมผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำการล้างสปอร์ด้วยสารละลายทวีน-80 (Tween-80) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ใช้เข็มห่วง (loop) ขูดเชื้อราออกจากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้หมด

เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า (vortex) ใช้ผ้าสาลู82 กรองเอาเส้นใยออก จะได้สารละลายแขวนลอยของสปอร์ นับจำนวนสปอร์โดยใช้แผ่นสไลด์สำหรับนับจำนวนเซลล์ภายใต้กำลังขยาย 400 เท่าของกล้องจุลทรรศน์ เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายแขวนลอยของสปอร์ (สปอร์/มล.) ปรับความเข้มข้นของสารละลายแขวนลอยของสปอร์ของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ให้เท่ากับ 1.0×10^7 สปอร์/มล.

2.6 การปลูกเชื้อ (Inoculation)

ในแต่ละสายพันธุ์ ใช้ไมโครปิเปต (micropipette) ปิเปตสารละลายแขวนลอยของสปอร์ ซึ่งมีความเข้มข้น 1.0×10^7 สปอร์/มล. ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารวุ้นเอียง ใช้เข็มห่วงลากให้สปอร์กระจายทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.7 การบ่มเชื้อ (Incubation)

การทดลองเรื่อง ชนิด, ปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการฆ่าเชื้อนั้น ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 24 °ซ. ภายใต้ความส่องสว่าง 14,000 ลักซ์ของหลอดไฟ"คูลไวท์" เป็นเวลา 7 วัน

สำหรับการทดลองเรื่อง อุณหภูมิ, ความส่องสว่าง และ อิทธิพลร่วม (interaction) ระหว่างปัจจัยทั้งสองที่ใช้ในการบ่มเชื้อนั้น ทำการปรับพื้นที่ซึ่งใช้สำหรับวางหลอดทดลอง 10 จุดภายในตู้บ่มเชื้อ ให้มีความส่องสว่างของหลอดไฟ"คูลไวท์" ในระดับที่แตกต่างกัน ได้แก่ 4000, 6000, 8000, 10000, 12000, 14000, 16000, 18000, 20000 และ 22000 ลักซ์ บ่มเชื้อภายใต้อุณหภูมิเดียวกัน เป็นเวลา 7 วัน โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อจะเปลี่ยนแปลงไปตามช่วงที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ 18, 20, 22, 24, 26, 28 และ 30 °ซ. ตามลำดับ

2.8 การเก็บสปอร์

ปิเปตสารละลายทวีน-80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 2 มล. ลงในหลอดทดลองที่มีเชื้อรา ซึ่งบ่มเชื้อจนครบ 7 วันแล้ว ใช้เข็มห่วงขูดเชื้อรา ให้หลุดออกจากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ เขย่าอย่างแรง ใช้ผ้าสาลู82 กรองเอาเส้นใยออก จะได้สารละลายแขวนลอยของสปอร์ ล้างสปอร์ที่ติดอยู่ในหลอดทดลองและบนผ้ากรองด้วยสารละลายทวีน-80 จำนวน 2 มล., 3 ครั้ง แล้ววัดปริมาตร (มล.) สารละลายแขวนลอยของสปอร์ทั้งหมดที่ได้ และหาความเข้มข้นของสารละลายแขวนลอยของสปอร์ (สปอร์/มล.) แล้วคำนวนหาจำนวนสปอร์/หลอดอาหารวุ้นเอียง (ภาคผนวกที่ 2)

2.9 การวางแผนการทดลอง (Experimental design)

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มโดยตลอด (Completely Ramdomize Design) โดยจัดสิ่งทดลอง (treatment) แบบแฟคทอเรียล (Factorial arrangement) ทำการทดลองละ 3 ซ้ำๆละ 4 ตัวอย่างย่อย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย