บทที่ 3
วิธีการวิจัย

1. วัสดุที่ใช้ทดลอง

1.1 เชื้อเห็ดยานางิ (*Agrocybe cylindracea* (Dc. ex Fr.) Maire.) และเชื้อเห็ดนางรมดอย (*Pleurotus ostreatus* cv. "Doi".) จาก ศูนย์วิจัยเห็ดเขตหนาว ฝ่ายเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ตั้งอยู่ภายในสถานีวิจัยดอยปุย อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพปุย จังหวัดเชียงใหม่

1.2 วัสดุเพาะ(ขี้เลื่อยไม้ยางพารา) และอาหารเสริม(รากมอลต์ รำมอลต์ เมล็ดข้าวฟ่างปั่นละเอียด กากน้ำตาล ปูนขาว และดีเกลือ) ที่การทำให้ปลอดเชื้อจากแหล่งผลิต พีเจฟาร์มเห็ด ตั้งอยู่ตำบลยุหว่า อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 มีดผ่าตัด
2.1.2 ขวด duran ขนาด 500 ml
2.1.3 กระบอกตวง
2.1.4 บีกเกอร์
2.1.5 ช้อนตักสาร
2.1.6 ถุงมือกันร้อน
2.1.7 ถ้วยชั่งสาร
2.1.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์
2.1.9 ไม้พาย
2.1.10 เข็มเขี่ยเชื้อ
2.1.11 แผ่นสไลด์
2.1.12 แผ่นปิดสไลด์
2.1.13 คีมคีบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.14 ช้อนตักสารเคมี

2.1.15 กระดาษชั่งสาร

2.1.16 แท่งแก้วคนสารละลาย

2.1.17 ถุงมือทนร้อน

2.1.18 ฟ๊อกกี้

2.1.19 ขวดรูปชมพู่

2.1.20 บีกเกอร์

2.1.21 กล่องพลาสติกใส (Polypropyrine) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางปากกล่อง 11.2 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางก้นกล่อง 10.3 เซนติเมตร ความลึก 3.5 เซนติเมตร

2.1.22 ฟิล์มโพลีไวนิลคลอไรด์ (PVC)

2.1.23 เครื่องมือวัดขนาดแบบ vernier

2.2 อุปกรณ์ทั่วไป

2.2.1 ตะกร้า

2.2.2 เตาแก๊ส

2.2.3 หม้อหุงต้ม

2.2.4 กรวยพลาสติก

2.2.5 หนังสือพิมพ์

2.2.6 ยางรัด

2.2.7 กระบะ

2.3 เครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย

2.3.1 หม้อต้มน้ำ (boiler)

2.3.2 หม้อนึ่งความดันไอ (Auto clave)

2.3.3 ตู้อบไอร้อน (Hot air oven)

2.3.4 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Compound microscope)

2.3.5 กล้องจุลทรรศน์แบบสามมิติ (Stereo microscope)

2.3.6 ตู้เขี่ยเชื้อระบบดูดอากาศ

2.3.7 ตู้แช่ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator ยี่ห้อ SANYO รุ่น MIR - 553)

2.3.8 เครื่องวัดสี (Color meter “Hunterlab” รุ่น Color Quest XE)

2.3.9 เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (Texture analyser รุ่น TA-Xii / 50)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.10 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Digital Balance ยี่ห้อ Mettler – Toledo รุ่น PB3002 - S)

3. สารเคมี

Calcium chloride ($CaCl_2$)

$CaCl_2*2H_2O$

M = 147.02 g/mol

Assay(complexometric)	99.0-102.0%
Identity	passes test
Clarity of solution	passes test
Insoluble maller	≤ 0.01%
Acidity or alkalinity	passes test
pH-value (5% water)	4.5-8.5
sulphate (SO_4)	≤ 0.005%
Heavy metals (as Pb)	≤ 0.0005%
Al (Aluminium)	≤ 0.0001%
Ba (Barium)	≤ 0.003%
Cu (Copper)	≤ 0.0005%
Fe (Iron)	≤ 0.00003%
Mg (Magnesium)	≤ 0.005%
K (Potassium)	≤ 0.01%
Na (Sodium)	≤ 0.01%
NH_5 (Ammonium)	≤ 0.005%
Sr (Strontium)	≤ 0.05%
Magnesium and alkalimetals	≤ 0.5%
Oxidizing substance (as NO_3)	≤ 0.003%

Calciumchlorid-Dinydrate

Merck KGaA

64271 Darmstadt Germany

Tel.+49(0)6151 72-2440

www.merck.do

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. อุปกรณ์ในการทำวัสดุเพาะ

4.1 **หัวเชื้อวุ้น Potato Dextrose Agar** (ภาพ 3.1)

4.1.1 มันฝรั่ง

4.1.2 น้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลทรายขาว

4.1.3 วุ้นผง

4.1.4 น้ำสะอาด(น้ำกลั่น)

(ก) **(ข)**

ภาพ 3.1 อาหารเลี้ยงหัวเชื้อวุ้น Potato Dextrose Agar
ก) แบบขวดแบน ข) แบบจานเพาะเชื้อ

4.2 **หัวเชื้อเมล็ดธัญพืช** (ภาพ 3.2)

4.2.1 เมล็ดข้าวฟ่าง

4.2.2 รำละเอียด รำป่น

4.2.3 กากน้ำตาล

4.2.4 ปูนขาว

4.2.5 ดีเกลือ (แมกนีเซียมซัลเฟต)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.2 อาหารเลี้ยงหัวเชื้อข้าวฟ่าง ภายในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 cm

4.3 **อาหารเลี้ยงหัวเชื้อจากขี้เลื่อยและก้อนวัสดุเพาะ** (ภาพ 3.3)

4.3.1 ขี้เลื่อยไม้ยางพารา

4.3.2 รากมอลต์

4.3.3 รำมอลต์

4.3.4 เมล็ดข้าวฟ่างปั่นละเอียด

4.3.5 กากน้ำตาล

4.3.6 ปูนขาว

4.3.7 ดีเกลือ (แมกนีเซียมซัลเฟต)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.3 อาหารเลี้ยงหัวเชื้อขี้เลื่อยและก้อนเชื้อวัสดุเพาะ

ก) หัวเชื้อขี้เลื่อยบรรจุในขวดพลาสติกทนร้อนแสดงสภาพการบ่มเชื้อ

ข) ก้อนเชื้อวัสดุเพาะเชื้อในอ่างเพื่อนึ่งฆ่าเชื้อ

5. สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการแขนงวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. ศูนย์วิจัยเห็ดเขตหนาว สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

3. สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4. ศูนย์เรียนรู้การเพาะเห็ด ศูนย์อำนวยการโครงการตามพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่

6. วิธีการวิจัย

6.1 การศึกษาและเก็บรวบรวมข้อมูลของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนตลอดกระบวนการผลิตเห็ดยานางิและเห็ดนางรมดอย

6.1.1 สำรวจเชื้อราปนเปื้อนในกระบวนการผลิตเห็ดยานางิและเห็ดนางรมดอย (ตาราง 3.1) ที่ศูนย์วิจัยเห็ดเขตหนาว สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาพ 3.4) จากเชื้อราที่ปนเปื้อนบนหัวเชื้ออาหารวุ้น PDA หัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่าง และก้อนเชื้อเห็ด ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ.2551 และรวบรวมเชื้อราโดยวิธี direct isolation (Madigan etal., 1997; Murray etal., 1994; มยุรี และ สุภาภรณ์, 2551; เลขาและจินตนา, 2539)

ตาราง 3.1 จำนวนวัสดุแต่ละชนิดที่การสำรวจในกระบวนการผลิตเห็ดยานางิและเห็ดนางรมดอย

ชนิดของวัสดุ	จำนวนที่สำรวจ	จำนวนที่สูญเสีย	จำนวนที่สุ่มเลือก
หัวเชื้อวุ้น	1,360	355	30
หัวเชื้อข้าวฟ่าง	6,120	729	30
หัวเชื้อขี้เลื่อย	4,140	480	30
ก้อนเชื้อ	27,600	7,655	60
รวม	**39,220**	**9,219**	**150**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.1.1.1 รวบรวมเชื้อปนเปื้อนจากหัวเชื้อวุ้น PDA นับจากวันที่เขี่ยเชื้อและบ่มหัวเชื้อเห็ด (25 – 27 องศาเซลเซียส ช่วงเวลา 15 วัน) และหลังจากการบ่มเชื้อ (3 – 5 องศาเซลเซียส ช่วงเวลา 3 เดือน) จากนั้นคัดเลือกเชื้อแต่ละชนิดที่เกิดขึ้นปนเปื้อนจำนวน 30 ลักษณะ บันทึกปริมาณและร้อยละของการพบและแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์เลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดบนอาหาร PDA

6.1.1.2 รวบรวมเชื้อปนเปื้อนจากหัวเชื้อข้าวฟ่าง (สมศรี, 2553) นับจากวันที่เขี่ยเชื้อและบ่มหัวเชื้อเห็ด (25 – 27 องศาเซลเซียส ช่วงเวลา 30 วัน) และหลังจากการบ่มเชื้อ (3 – 5 องศาเซลเซียส ช่วงเวลา 6 เดือน) จากนั้นคัดเลือกเชื้อแต่ละชนิดที่เกิดขึ้นปนเปื้อนจำนวน 30 ลักษณะ บันทึกปริมาณและร้อยละของการพบและแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์เลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดในหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่าง

6.1.1.3 รวบรวมเชื้อปนเปื้อนจากหัวเชื้อขี้เลื่อย (ปวีณา, 2553) นับจากวันที่เขี่ยเชื้อและบ่มหัวเชื้อเห็ด (25 – 27 องศาเซลเซียส ช่วงเวลา 30 วัน) และหลังจากการบ่มเชื้อ (3 – 5 องศาเซลเซียส ช่วงเวลา 6 เดือน) จากนั้นคัดเลือกเชื้อแต่ละชนิดที่เกิดขึ้นปนเปื้อนจำนวน 30 ลักษณะ บันทึกปริมาณและร้อยละของการพบและแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์เลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดในหัวเชื้อขี้เลื่อย

6.1.1.4 รวบรวมเชื้อปนเปื้อนจากก้อนเชื้อเห็ด (ปรารถนา, 2553) นับจากวันที่เขี่ยเชื้อและบ่มก้อนเชื้อเห็ด (25 – 27 องศาเซลเซียส ช่วงเวลา 45 วัน) จากนั้นคัดเลือกเชื้อแต่ละชนิดที่เกิดขึ้นปนเปื้อนจำนวน 60 ลักษณะ บันทึกปริมาณและร้อยละของการพบและแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์เลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดในก้อนเชื้อขี้เลื่อย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.4 ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในวัสดุผลิตเห็ดยานางิและเห็ดนางรมดอย

ก) เชื้อปนเปื้อนในก้อนเชื้อเห็ด
ข) เชื้อปนเปื้อนในหัวเชื้อข้าวฟ่าง
ค) เชื้อปนเปื้อนในหัวเชื้อขี้เลื่อย
ง) เชื้อปนเปื้อนในหัวเชื้อวุ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.1.2 นำเชื้อที่แยกได้จากการปนเปื้อนในแต่ละขั้นตอนมาทำการจัดจำแนกเชื้อที่มีความสำคัญ คัดเฉพาะพบที่ตรวจพบโดยส่วนใหญ่ และสร้างความเสียหายเป็นอันมาก มีวิธีการดังนี้

6.1.2.1 การแยกเชื้อปนเปื้อนจากหัวเชื้อวุ้น PDA จะตัดชิ้นวุ้นส่วนที่ปนเปื้อน ชิ้นวุ้นเชื้อเห็ดบริสุทธิ์และชิ้นวุ้นอาหารปกติเป็นตัวควบคุม วางเลี้ยงบนอาหารวุ้น PDA เมื่อเชื้อสร้างโครงสร้างต่างๆขึ้นจะศึกษาลักษณะของของปนเปื้อนและทำการจัดจำแนกชนิด

6.1.2.2 การแยกเชื้อปนเปื้อนจากหัวเชื้อเมล็ดธัญพืช(ข้าวฟ่าง) (สมศรี, 2553) จะคีบเอากลุ่มของเมล็ดข้าวฟ่างที่ปนเปื้อน กลุ่มเมล็ดข้าวฟ่างที่เป็นเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ และกลุ่มของเมล็ดที่ยังไม่มีเชื้อเจริญเป็นตัวควบคุม วางเลี้ยงบนอาหารวุ้น PDA เมื่อเชื้อสร้างโครงสร้างต่างๆขึ้นจะศึกษาลักษณะของปนเปื้อนและทำการจัดจำแนกชนิด

6.1.2.3 การแยกเชื้อปนเปื้อนจากหัวเชื้อขี้เลื่อย (ปวีณา, 2553) จะคีบเอากลุ่มของขี้เลื่อยที่ปนเปื้อน กลุ่มขี้เลื่อยที่เป็นเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ และกลุ่มขี้เลื่อยที่ยังไม่มีเชื้อเจริญเป็นตัวควบคุม วางเลี้ยงบนอาหารวุ้น PDA เมื่อเชื้อสร้างโครงสร้างต่างๆขึ้นจะศึกษาลักษณะของปนเปื้อนและทำการจัดจำแนกชนิด

6.1.2.4 การแยกเชื้อปนเปื้อนจากก้อนเชื้อเห็ด (ปรารถนา, 2553) จะคีบเอากลุ่มของขี้เลื่อยที่ปนเปื้อน กลุ่มขี้เลื่อยที่เป็นเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ และกลุ่มขี้เลื่อยที่ยังไม่มีเชื้อเจริญเป็นตัวควบคุม วางเลี้ยงบนอาหารวุ้น PDA เมื่อเชื้อสร้างโครงสร้างต่างๆขึ้นจะศึกษาลักษณะของปนเปื้อนและทำการจัดจำแนกชนิด

ศึกษาชนิดของเชื้อปนเปื้อนที่พบมากจากการจัดจำแนก และรวบรวมปริมาณความเสียหายที่เกิดขึ้นโดยแสดงเป็นร้อยละของเชื้อที่ปนเปื้อนในแต่ละขั้นตอนในกระบวนการผลิตเห็ด

6.1.3 คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในขั้นตอนการผลิตเห็ดยานางิและเห็ดนางรมดอยโดยการใช้เทคนิควิธีการตามแบบข้อ 5.1.2 แบ่งออกเป็น

6.1.3.1 หัวเชื้อเห็ดยานางิและเห็ดนางรมดอยที่พบการปนเปื้อนหัวเชื้ออาหารวุ้น ชนิดละ 15 ขวด

6.1.3.2 หัวเชื้อเห็ดยานางิและเห็ดนางรมดอยที่พบการปนเปื้อนหัวเชื้อ ข้าวฟ่าง ชนิดละ 15 ขวด

6.1.3.3 หัวเชื้อเห็ดยานางิและเห็ดนางรมดอยที่พบการปนเปื้อนหัวเชื้อขี้เลื่อย ชนิดละ 15 ขวด

6.1.3.4 ก้อนเชื้อเห็ดยานางิและเห็ดนางรมดอยที่พบการปนเปื้อนก้อนเชื้อ ชนิดละ 30 ถุง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.1.4 เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) นำเชื้อที่แยกได้ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 3-5 °C และใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนแผ่นสไลด์ (slide culture technic) (Riddle, 1950; บงกชวรรณ, 2550) (Samerpitak *et al.*, 2007; สมบัติ, 2550) จัดจำแนกและระบุชื่อวิทยาศาสตร์ ตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยา (Ellis, 1971, 1976) และ(Kirk *et al.*, 2001) และเก็บรักษาเชื้อที่พบไว้ใน PDA Slants เพื่อการศึกษาวิจัยขั้นตอนต่อไปที่3 – 5 °C คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา (2544)

โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถตรวจพบได้บ่อยและสร้างความเสียหายเป็นจำนวนมากนั้น หลังจากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วจะส่งเชื้อดังกล่าวตรวจอีกครั้งเพื่อเป็นการยืนยันที่หน่วยงานของ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

6.2 การศึกษาผลของการปนเปื้อนในหัวเชื้อเห็ด

6.2.1 เมื่อได้คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ตามเทคนิคและวิธีการ (5.1.3) แล้ว เตรียมเชื้อตั้งต้น (mycelial plug) ที่เก็บรักษาไว้จากการรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเห็ดยานางิและเห็ดนางรมดอยตามวิธีการข้อ 5.1.4 มาขยายเพิ่มปริมาณและให้เชื้อปนเปื้อนแข็งแรงพร้อมที่จะเจริญ บนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้น PDA Plates

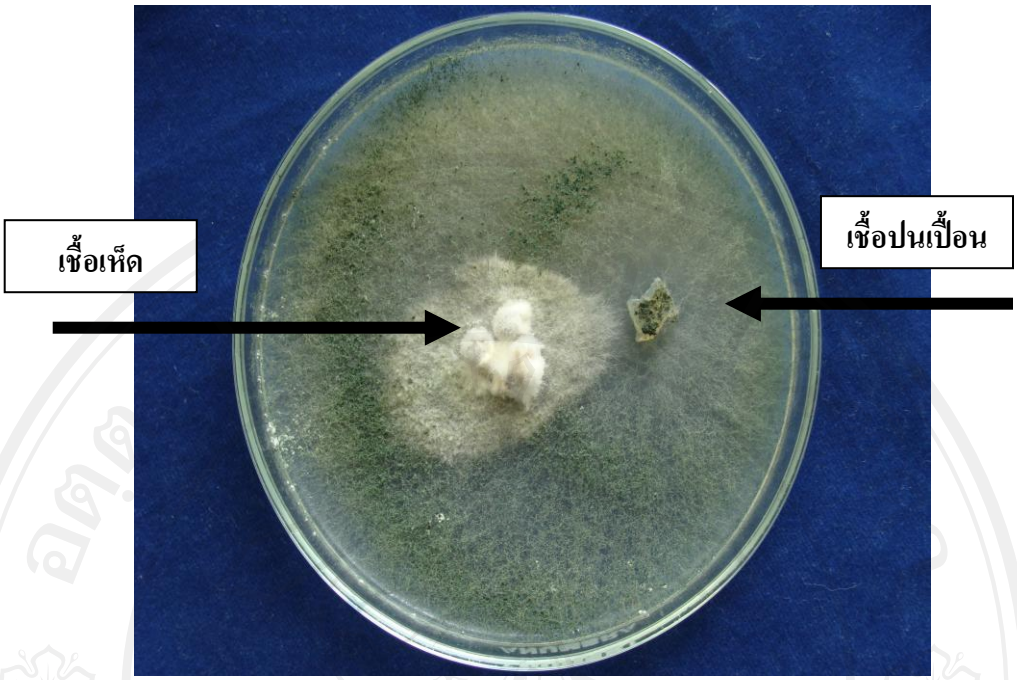
เตรียม mycelium plug ของเชื้อ (ภาคผนวก ก) (บทปฏิบัติการโรคพืชเบื้องต้น, 2551)

6.2.2 ปลูกเชื้อตั้งต้นที่แยกได้แต่ละชนิด ลงบนหัวเชื้ออาหารวุ้น PDA หัวเชื้อเมล็ดธัญพืช หัวเชื้อขี้เลื่อย และก้อนเชื้อ ด้วยวิธี Dual Culture (Morton and Stroube, 1955) และบันทึกสิ่งที่เกิดขึ้นบนโคโลนี (บงกชวรรณ, 2550) ดังนี้

6.2.2.1 หัวเชื้ออาหารวุ้น PDA (ภาคผนวก ข)

- ใน PDA Plates วางเชื้อคู่ทดสอบตรงกลาง Plates มีระยะห่าง ห่างจากขอบ Plates และเชื้อคู่ทดสอบประมาณ 2 cm (ภาพ 3.5) ได้แก่ เห็ดยานางิคู่กับเชื้อปนเปื้อนแต่ละชนิด และชุดควบคุม หลังจากนั้นบันทึกสิ่งที่เกิดขึ้นบนโคโลนีของเห็ด เป็นเวลา 7 วันทำอย่างละ 5 ซ้ำ
- ใน PDA Plates วางเชื้อคู่ทดสอบตรงกลาง Plates มีระยะห่าง ห่างจากขอบ Plates และเชื้อคู่ทดสอบประมาณ 2 cm ได้แก่ เห็ดนางรมดอยคู่กับเชื้อปนเปื้อนแต่ละชนิด และชุดควบคุม หลังจากนั้น บันทึกสิ่งที่เกิดขึ้นบนโคโลนีของเห็ด เป็นเวลา 7 วันทำอย่างละ 5 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3.5 การทดสอบด้วยวิธี Dual Culture ในหัวเชื้อวุ้น

6.2.2.2 หัวเชื้อเมล็ดธัญพืช(ข้าวฟ่าง) (ภาคผนวก ค)

- ในขวดเมล็ดธัญพืช วางเชื้อบนเมล็ดธัญพืช แล้ววางเชื้อเห็ดลงไปให้ห่างกันประมาณ 2 cm (ภาพ 3.6) ได้แก่ เห็ดยานางิคู่กับเชื้อปนเปื้อนแต่ละชนิด และชุดควบคุม หลังจากนั้นบันทึกสิ่งที่เกิดขึ้นบนโคโลนีของเห็ด เป็นเวลา 7 วันทำอย่างละ 5 ซ้ำ

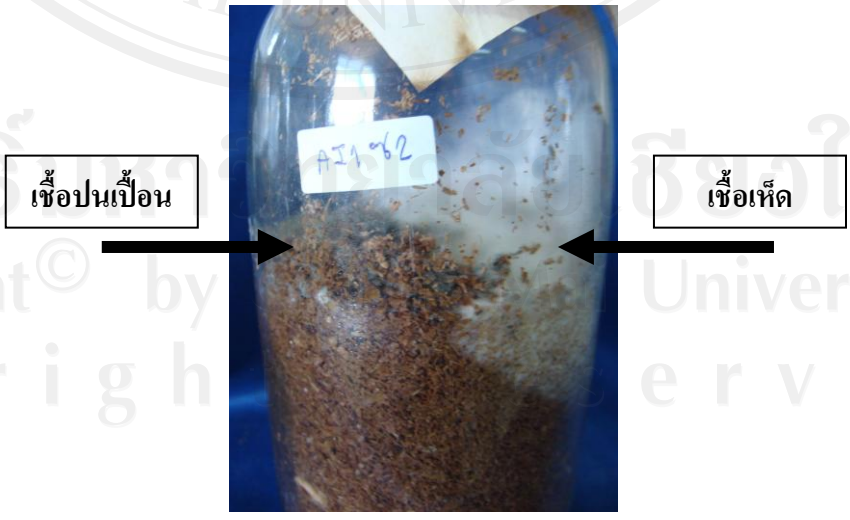
- ในขวดเมล็ดธัญพืชวางเชื้อบนเมล็ดธัญพืช แล้ววางเชื้อเห็ดลงไปให้ห่างกันประมาณ 2 cm ได้แก่ เห็ดนางรมดอยคู่กับเชื้อปนเปื้อนแต่ละชนิด และชุดควบคุม หลังจากนั้นบันทึกสิ่งที่เกิดขึ้นบนโคโลนีของเห็ด เป็นเวลา 7 วันทำอย่างละ 5 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.6 การทดสอบด้วยวิธี Dual Culture ในหัวเชื้อเมล็ดธัญพืช(ข้าวฟ่าง)

6.2.2.3 หัวเชื้อขี้เลื่อย(ขี้เลื่อยไม้ยางพาราผสมกับอาหารเสริมเห็ด) (ภาคผนวก ง)

- ในขวดขี้เลื่อย วางเชื้อบนขี้เลื่อย แล้ววางเชื้อเห็ดลงไปให้ห่างกันประมาณ 2 cm (ภาพ 3.7) ได้แก่ เห็ดยานางิคู่กับเชื้อปนเปื้อนแต่ละชนิด และชุดควบคุม หลังจากนั้นบันทึกสิ่งที่เกิดขึ้นบนโคโลนีของเห็ด เป็นเวลา 7 วันทำอย่างละ 5 ซ้ำ
- ในขวดขี้เลื่อย ให้วางเชื้อติดกับขวดบนขี้เลื่อย แล้ววางเชื้อเห็ดลงไปให้ห่างกันประมาณ 2 cm ได้แก่ เห็ดนางรมดอยคู่กับเชื้อปนเปื้อนแต่ละชนิด และชุดควบคุม หลังจากนั้นบันทึกสิ่งที่เกิดขึ้นบนโคโลนีของเห็ด เป็นเวลา 7 วันทำอย่างละ 5 ซ้ำ

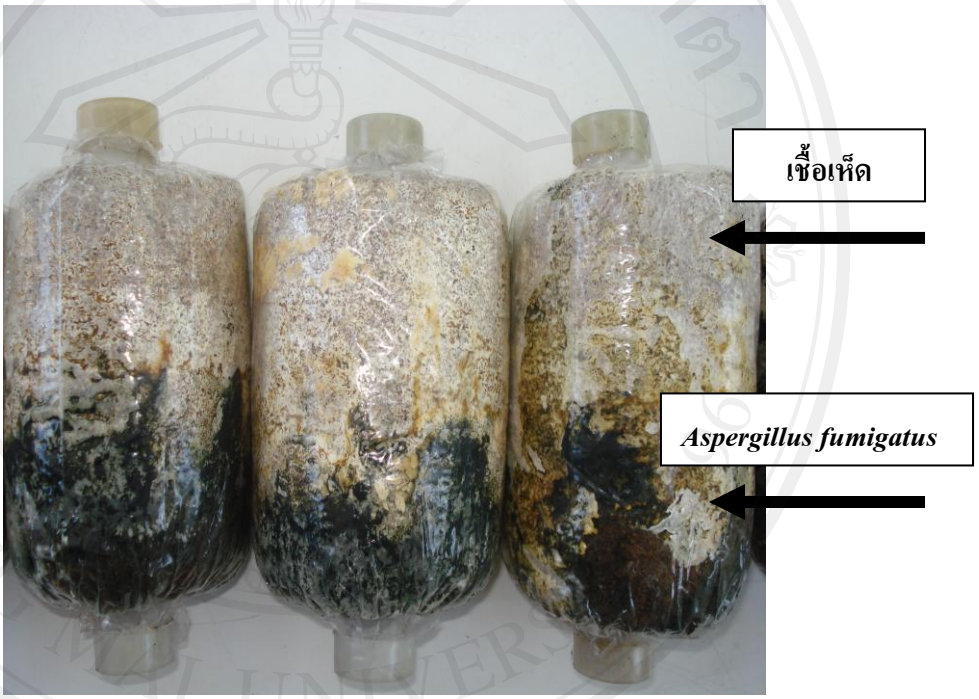


ภาพ 3.7 การทดสอบด้วยวิธี Dual Culture ในหัวเชื้อขี้เลื่อย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.3 การศึกษาผลของการปนเปื้อนต่อการให้ผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวและการป้องกันการเสียสภาพโดยใช้แคลเซียมคลอไรด์

6.3.1 (Seung *et al.*, 2004) เตรียมก้อนเชื้อเห็ดนางรมดอยระยะเจริญครึ่งก้อน นำมาปลูกด้วยเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* ด้วยวิธี point inoculation ลงบริเวณก้นถุงก้อนเชื้อด้านในด้วย mycelial plug จากนั้นนำไปบ่มที่ 24 องศาเซลเซียส (ภาพ 3.8)



ภาพ 3.8 ก้อนเชื้อเห็ดนางรมดอย และปลูกด้วยเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* ด้วยวิธี point inoculation

6.3.2 เตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ซ)

6.3.3 เมื่อเชื้อเห็ดนางรมดอยและเชื้อปนเปื้อนเจริญมาพบกัน และเชื้อเห็ดนางรมดอยเริ่มสร้างตุ่มของดอกเห็ด จะเริ่มทำการฉีดพ่นด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ระยะ 1, 2 และ 3 วัน ก่อนการเก็บเกี่ยวนำมาฉีดพ่นด้วยแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0% (ชุดควบคุมของแคลเซียมคลอไรด์ คือ น้ำ), 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% และ2.5% เป็นปริมาณ 25 มิลลิลิตรและฉีดพ่นหลังจากนั้นทุก 12 ชั่วโมง จากนั้นปฏิบัติดูแลก้อนเชื้อตามปกติควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(RH) ในบริเวณที่วางก้อนเชื้อไว้ที่ 85% แสง 14 lux และอุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส จนถึงระยะเก็บเกี่ยว

6.3.4 เก็บดอกเห็ดนางรมดอยจากก้อนเชื้อที่ทำการทดสอบ (ศราวุฒิ, 2552) และผลการเจริญของดอกเห็ดในแต่ละวิธีการตั้งแต่เริ่มทำการฉีดพ่น และหลังจากนั้นทุก 12 ชั่วโมง เมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยวดอกเห็ดที่อายุ 4 วัน นำมาชั่งน้ำหนัก เก็บดอกเห็ดโดยการจับที่โคนก้านใกล้กับปากถุง บริเวณคอถุง บิดเล็กน้อยแล้วดึงขึ้นมา ตัดแต่งเอาขี้เลื่อยหรือเศษวัสดุเพาะที่โคนก้านเห็ด แล้วทำการชั่งน้ำหนักช่อดอกเห็ด และดอกเห็ดขนาดต่างๆ โดยใช้ balance meter และวัดขนาดดอกเห็ดโดยใช้ vernier เพื่อแยกขนาดดอกเห็ด (ตาราง 3.2)

ตาราง 3.2 การวัดขนาดดอกเห็ด

ขนาดดอกเห็ด	น้ำหนัก (g)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางหมวก (cm)	ความยาวก้าน (cm)
เล็ก	1.50 - 2.00	2.00 - 2.50	3.00 - 4.00
กลาง	2.01 - 5.00	2.50 - 3.00	4.00 - 5.00
ใหญ่	5.01 - 6.00	3.00 - 4.00	5.00 - 6.00

บรรจุดอกเห็ดที่ทำการคัดเลือกดอกเห็ดนางรมดอย ขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ อย่างละ 1 ดอก ลงในกล่องพลาสติกใส แล้วหุ้มด้วยฟิล์มโพลีไวนิลคลอไรด์ (PVC) (ภาพ 3.9)โดยทำกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ เก็บรักษาดอกเห็ดนางรมดอยไว้ที่อุณหภูมิ 4, 10 และ 15 องศาเซลเซียส จนหมดอายุการเก็บรักษา (นัฐวุฒิ, 2545) (นันทิยา, 2544)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.9 การบรรจุดอกเห็ด

6.4 การวิเคราะห์ความสว่าง การเปลี่ยนแปลงสีของเห็ดนางรมดอย โดยใช้เครื่องวัดสี (Color meter “Hunterlab” รุ่น Color Quest XE) (ภาพ 3.10) ใช้แหล่งกำเนิดแสง D 65 วัดการเปลี่ยนแปลงสี 3 ตำแหน่ง คือ บริเวณหมวกเห็ด ครีบและบริเวณก้านดอก ก่อนใช้เครื่องทุกครั้งปรับมาตรฐานของเครื่องวัดสีด้วยแผ่นเทียบสีมาตรฐานสีขาว ใช้หัววัดทาบให้สนิทกับดอกเห็ดนางรมดอย แสดงค่าออกมาเป็นค่า L* ซึ่งแสดงความสว่างเมื่อค่าใกล้ 100 และแสดงความมืดเมื่อค่าใกล้ 0 (ภาคผนวก ซ)

ภาพ 3.10 เครื่องวัดสี (Color meter “Hunterlab” รุ่น Color Quest XE)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.5 การวิเคราะห์ความแน่นเนื้อ การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อของเห็ดนางรมดอย โดยใช้เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (Texture analyser รุ่น TA-Xii / 50) (ภาพ 3.11) หัววัดแบบ knife วัด 2 ตำแหน่ง คือ บริเวณหมวกเห็ด และบริเวณก้านดอก (ภาคผนวก ฌ)

ภาพ 3.11 เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (Texture analyser รุ่น TA-Xii / 50) (ศราวุฒิ, 2552)

ศึกษาเปรียบเทียบน้ำหนักของช่อดอกเห็ดนางรมดอยในแต่ละกรรมวิธี ทำการตรวจคุณภาพของดอกเห็ด โดยดัดแปลงจากวิธีการของสุเมธีและคณะ (2548) เปรียบเทียบน้ำหนักของช่อดอกเห็ด สี และ ความแน่นเนื้อของดอกเห็ด ทุก 4 วัน จนหมดสภาพการเก็บรักษา ทุกการทดลองวางแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ทำการทดลองวิธีการละ 3 ซ้ำ

6.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

1.การศึกษาและเก็บสำรวจรวบรวมข้อมูลของเชื้อราปนเปื้อนตลอดกระบวนการผลิตเห็ดยานางิและเห็ดนางรมดอย

2. การศึกษาผลของการปนเปื้อนในหัวเชื้อเห็ด

3.การศึกษาผลของการปนเปื้อนต่อการให้ผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวและการป้องกันการเสียสภาพโดยใช้แคลเซียมคลอไรด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved