

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างเห็ดที่บริโภคได้ 8 ชนิด ได้มาจาก สต็อกเชื้อเห็ดของอาจารย์ ดร.วัชร หาญเมืองใจ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ได้แก่

1. เห็ดบด (*Lentinus polychrous* Berk.)
2. เห็ดขอนดำ (*Lentinus Squarrosulus* Mont.)
3. เห็ดจิ้ง (*Termitomyces* sp.)
4. เห็ดโคนน้อย (*Coprinus* sp.)
5. เห็ดตีนตุ๊กแก หรือเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*)
6. เห็ดนางรมดำ (*Pleurotus ostreatus*)
7. เห็ดมิลล์กี้ หรือเห็ดตีนแรด (*Calocybe Indica*)
8. เห็ดหลินจือ สายพันธุ์ MG5 (*Ganoderma lucidum*) จากโครงการพิเศษ สวนเกษตรเมืองงาย อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่

3.1.2 เมล็ดธัญพืช 4 ชนิด

1. เมล็ดข้าวฟ่าง ได้มาจาก โครงการพิเศษสวนเกษตรเมืองงาย อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่
2. เมล็ดข้าวเปลือกข้าวเหนียว พันธุ์ กข.10 ได้มาจาก อำเภอบัว จังหวัดน่าน
3. ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ได้มาจาก ร้านเอเชียปศุสัตว์ ตำบลช้างเผือก อำเภอเมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่
4. เมล็ดถั่วเขียว ได้มาจาก อำเภอวังเหนือ จังหวัดลำปาง

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อทดแทนมันฝรั่ง

1. มันฝรั่ง ได้มาจาก ตลาดวโรรส ตำบลช้างม่อ อำเภอมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่
2. เมล็ดขนุน ได้มาจาก ตลาดศิริวัฒนา ตำบลศรีภูมิ อำเภอมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่
3. รำข้าว ได้มาจาก ร้านเอเชียปศุสัตว์ ตำบลศรีภูมิ อำเภอมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 1) อาหารเลี้ยงแข็งเชื้อ 3 สูตร
- 2) อาหารเลี้ยงเหลวเชื้อ 3 สูตร
- 3) อาหารเลี้ยงเชื้อเมล็ดธัญพืช 4 ชนิด
- 4) อาหารแข็งชนิดก้อน

3.1.5 สารเคมี

1. ผงวุ้น (Agar)
2. น้ำกลั่น (Distilled water)
3. สารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Ethyl Alcohol)
4. น้ำตาลทรายขาว (Sugar)

3.1.6 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัย

1. ปีกเกอร์แก้ว (Beaker) ขนาด 250, 500, 1,000 มิลลิลิตร
2. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
3. กระบอกตวง (Graduated cylinder) ขนาด 250, 600, 1,000 มิลลิลิตร
4. กล่องใส่จานเพาะเชื้อสแตนเลส (Petri Dish Box)
5. แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
6. ช้อนตักสาร (Spatula)
7. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
8. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
9. มีดปลอก (Knife)
10. เขียง (Chopping Block)
11. เข็มเย็บผ้า (Needle)
12. ถุงพลาสติก (Plastic bag)
13. ขวดโซดา (Soda bottle)
14. ฝ้ายสำลี (Cotton wool)
15. ปีกเกอร์สแตนเลส (Beaker Stainless)
16. กระดาษเลเบล (Label)
17. กระดาษกรอง (Filter paper)
18. ยางรัด (Elastic band)

3.1.7 เครื่องมือ

1. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
2. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Incubator)
3. ตู้อบลมร้อน (Hot air Oven)
4. เครื่องชั่งดิจิตอล ความละเอียดสูงทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Digital Balance)

5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)
6. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar Air Flow)
7. เครื่องเขย่าสารแนวราบ (Shaker Orbital)
8. ปั๊มสุญญากาศกรองสารแบบแรงดันสูง (High Output Pump)
9. ไม้บรรทัด (Ruler)
10. ตู้เย็น (Refrigerator)
11. สายวัด (measuring tape)
12. ที่เจาะหลุม (Cork borer)

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

ลงพื้นที่ชุมชนซอแล อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ เพื่อสำรวจปัญหาในการเพาะเห็ด และความต้องการของกลุ่มวิสาหกิจที่ทำการเพาะเห็ด เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาวางแผนในการทดลองขั้นต่อไป

1. การเตรียมเส้นใยเห็ด 8 ชนิด ได้แก่ เห็ดบด เห็ดขอนดำ เห็ดจิ้ง เห็ดโคนน้อย เห็ดตีนตุ๊กแก หรือเห็ดแครง เห็ดนางรมดำ เห็ดมิลล์กี้ หรือเห็ดตีนแรด และเห็ดหลินจือ สายพันธุ์ MG5 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ

ใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยเห็ดจากสต็อกเชื้อเห็ดจากงานวิจัยของอาจารย์ ดร.วัชร หาญเมืองใจ จากนั้นใช้เข็มเย็บเย็บย้ายเส้นใยเห็ดไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) เลือกวางกลางจานเลี้ยงเชื้อ และนำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน เพื่อให้เส้นใยบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเชื้อเห็ดที่เจริญเต็มที่ โดยทุกขั้นตอนทำด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (Aseptic technique)

2. การย้ายเส้นใยเห็ดลงบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร

การศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดโคนน้อยบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง 3 สูตร คือ สูตรที่ 1 : มันฝรั่ง สูตรที่ 2 : เมล็ดขนุน และสูตรที่ 3 : รำข้าว โดยมีขั้นตอนดังนี้

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง 3 สูตร จากนั้นนำเส้นใยเห็ด 4 ชนิด จากการเตรียมเส้นใยจากงานวิจัยของอาจารย์ ดร.วัชร หาญเมืองใจ ที่มีอายุ 10 วัน ใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยเห็ด แล้วใช้เข็มเย็บเย็บย้ายเส้นใยเห็ดวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งทั้ง 3 สูตร เลือกวางบริเวณกลางจานเพาะเชื้อ 1 ชิ้นต่อ 1 จานอาหาร ซึ่งทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อ 1 สูตรอาหาร และนำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดของเห็ดทั้ง 8 ชนิด บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร บันทึกผลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเส้นใยเห็ดทุก 2 วัน จนเส้นใยเห็ดเจริญครบ 10 วัน โดยทุกขั้นตอนทำด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (Aseptic technique)

3. ศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ด 8 ชนิด บนอาหารเลี้ยงเชื้อเมล็ดธัญพืช 4 ชนิด

การศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ด 8 ชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมล็ดธัญพืช 4 ชนิด คือ ข้าวฟ่างหวาน ข้าวโพด ข้าวเปลือกพันธุ์ กข.10 และถั่วเขียว โดยมีขั้นตอนดังนี้

การศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ด 8 ชนิด บนอาหารเลี้ยงเชื้อเมล็ดธัญพืช โดยมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมอาหารเมล็ดธัญพืช 8 ชนิด โดยการคัดเลือกใช้เส้นใยเห็ดที่เจริญดีที่สุดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตรต่อ เห็ด 1 ชนิด โดยใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยเห็ด แล้วใช้เข็มเย็บเย็บย้ายเส้นใยจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเมล็ดธัญพืช โดยที่เอียงขวดก่อน เพื่อให้มีพื้นที่ในการใส่ชิ้นวัสดุ เลือกวางบริเวณตรงกลางของผิวข้างขวด โดยใส่ 1 ชิ้น วัสดุต่อ 1 ขวด จากนั้นปิดฝาขวดด้วยจุกสำลี และหุ้มด้วยกระดาษ ซึ่งทำการทดลอง 5 ซ้ำต่อ 1 สูตรอาหาร โดยทุกขั้นตอนทำโดยวิธีการปลอดเชื้อ (Aseptic technique) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 26 ± 2 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิตามระยะเวลาในการทำงานวิจัย) เพื่อศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ด 4 ชนิด บนอาหารเมล็ดธัญพืช บันทึกการของการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด ทุก 2 วัน จนเส้นใยเห็ดเจริญครบ 10 วัน

4. ศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ด 8 ชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 3 สูตร

การศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ด 8 ชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 3 สูตร คือสูตรที่ 1: มันฝรั่ง สูตรที่ 2 : เมล็ดขนุน และสูตรที่ 3 : รำข้าว โดยมีขั้นตอนดังนี้

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 3 สูตร จากนั้นนำเส้นใยเห็ดที่มีอายุ 10 วันจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง จากการเตรียมเส้นใยจากงานวิจัยของอาจารย์ ดร.วัชร หาดเมืองใจ โดยใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยเห็ดแล้วใช้เข็มเย็บเย็บย้ายเส้นใยจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 3 สูตร โดยใส่ 5 ชิ้นวัสดุต่อ 1 ขวดรูปชมพู่ (บุญสนอง แก้วช่วย และ อุมารณ์ แก้วถาวร. 2553.) ปิดฝาขวดด้วยจุกสำลีและหุ้มด้วยกระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อ 1 สูตรอาหาร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง 26 ± 2 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิตามระยะเวลาในการทำงานวิจัย) ทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 10 วัน โดยนำมารองเซลล์จากปั๊มสุญญากาศกรองสารแบบแรงดันสูง (High Output Pump) ซึ่งน้ำหนักสดโดยเครื่องชั่งดิจิตอล ความละเอียดสูง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Digital Balance) แล้วบันทึกผล น้ำหนักสด จากนั้นนำเส้นใยเห็ดโคนน้อยไปอบที่ตู้อบรมร้อน (Hot air Oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำเส้นใยที่ผ่านการอบมาชั่งน้ำหนักแห้ง ซึ่งโดยเครื่องชั่งดิจิตอลความละเอียดสูง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Digital Balance) แล้วบันทึกผลน้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)

5. การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดในอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อเชื้อทดแทน 3 สูตร ทำการวัดการเจริญของเส้นใยเห็ด โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 10 วัน ในแต่ละตัวอย่างหาค่าเฉลี่ยจากการเก็บข้อมูล 3 ซ้ำ

2. การศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดบนอาหารเลี้ยงเชื้อเมล็ดธัญพืช 4 ชนิด ทำการวัดการเจริญของเส้นใยเห็ด โดยวัดระยะการเจริญของเส้นใยเห็ด ทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 10 วัน ในแต่ละตัวอย่างหาค่าเฉลี่ยจากการเก็บข้อมูล 5 ซ้ำ

3. การศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อเชื้อทดแทน 3 สูตร โดยการหาน้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร) โดยการเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วันเป็นเวลา 10 วัน ในแต่ละตัวอย่างหาค่าเฉลี่ยจากการเก็บข้อมูล 3 ซ้ำ

4. วิเคราะห์ข้อมูล ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ แบบ One – way ANOVA ใช้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญของเส้นใยเห็ดในอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อเชื้อทดแทน อาหารเมล็ดธัญพืช น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร) ของเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อเชื้อทดแทน และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

6. การนำข้อมูลจากงานวิจัยกลับคืนสู่ชุมชน โดยการร่วมแลกเปลี่ยนเรียนรู้ระหว่างกลุ่มผู้เพาะเห็ดในตำบลซ้อแล อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ กับทีมนักวิจัยและนักศึกษา เพื่อแก้ปัญหาของกระบวนการผลิตเห็ด โดยถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตหัวเชื้อบริสุทธิ์เพื่อให้สามารถทำได้ด้วยตนเอง เทคนิคและขั้นตอนการเตรียมอาหารวุ้น (อาหาร PDA) เทคนิคและขั้นตอนการคัดเลือกดอกเห็ด การย้ายเนื้อเยื่อดอกเห็ดลงบนอาหารวุ้น เพื่อให้ได้เส้นใยที่บริสุทธิ์ใช้ในขั้นตอนต่อไป การเพิ่มปริมาณเส้นใยบนอาหารเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสม เทคนิคและขั้นตอนในการเตรียมอาหารเมล็ดธัญพืช เทคนิคและขั้นตอนการย้ายเส้นใยบริสุทธิ์ลงบนอาหารเมล็ดธัญพืช เพื่อเป็นหัวเชื้อในการลงเชื้อในก้อนเห็ดต่อไป เทคนิคและขั้นตอนในการบรรจุอาหารเพาะเห็ด โดยเน้นวัสดุที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นอยู่แล้ว การถ่ายเชื้อลงในเห็ดถุง การบ่มก้อนเชื้อ และการเปิดดอกเห็ดแต่ละชนิด