

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. วั่น
2. ลูกเต๋อย
3. น้ำสะอาด
4. เอทิลแอลกอฮอล์ 70%
5. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3%
6. น้ำส้มสายชู 5%
7. เครื่องแก้ว
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์
9. ถ้วยพลาสติกทนความร้อน ขนาด 3 และ 8 ออนซ์
10. หม้อหุงข้าว
11. หม้อ
12. เตาแก๊ส
13. สำลี
14. มีด
15. ดอกเห็ดนางรมสีขาวสด
16. เชื้อเห็ดนางรมที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

วิธีดำเนินการทดลอง

การวางแผนการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในวัสดุเลี้ยงเชื้อเห็ดนางรม

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) แบ่งการทดลองออกเป็น 7 กรรมวิธี (Treatments) แต่ละกรรมวิธีทำการทดลอง 5 ซ้ำ (Replications) โดยหนึ่งหน่วยทดลองใช้วัสดุเลี้ยงเชื้อเห็ด 10 ถ้วย รวมจำนวนทั้งหมด 350 ถ้วย

กรรมวิธีที่ 1	อาหารวุ้นพีดีเอ ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (แบบดั้งเดิม)
กรรมวิธีที่ 2	อาหารวุ้นพีดีเอ ฆ่าเชื้อด้วย H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0.15% w/v
กรรมวิธีที่ 3	อาหารวุ้นพีดีเอ ฆ่าเชื้อด้วย H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0.30% w/v
กรรมวิธีที่ 4	อาหารวุ้นพีดีเอ ฆ่าเชื้อด้วย H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0.45% w/v
กรรมวิธีที่ 5	เมล็ดลูกเดือยฆ่าเชื้อด้วย H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0.15% w/v
กรรมวิธีที่ 6	เมล็ดลูกเดือยฆ่าเชื้อด้วย H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0.30% w/v
กรรมวิธีที่ 7	เมล็ดลูกเดือยฆ่าเชื้อด้วย H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0.45% w/v

การทดลองที่ 2 เปรียบเทียบการเจริญและผลผลิตเชื้อที่ผลิตโดยวิธีการผลิตเชื้อเห็ดแบบดั้งเดิมและวิธีการผลิตเชื้อเห็ดที่นักวิจัยพัฒนาขึ้นมา

นำเชื้อเห็ดที่ผลิตโดยวิธีการฆ่าเชื้อโดยใช้ H_2O_2 ที่วิเคราะห์แล้วว่าดีและสะดวกในการเตรียมที่สุด จากผลการทดลองที่ 1 มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดในก้อนขี้เลื่อยเพื่อให้ได้ดอกเห็ด โดยเปรียบเทียบกับเชื้อเห็ดที่ผลิตแบบวิธีดั้งเดิม (อาหารวุ้นพีดีเอ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ) ที่ซื้อมาจากท้องตลาด โดยวางแผนการทดลองแบบ T-test แบ่งการทดลองออกเป็น 2 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีทำการทดลอง 5 ซ้ำ โดยหนึ่งหน่วยทดลองใช้ก้อนขี้เลื่อย 20 ก้อน รวมจำนวนทั้งหมด 200 ก้อน

กรรมวิธีที่ 1	เชื้อเห็ดจากอาหารวุ้นพีดีเอ ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (แบบดั้งเดิม)
กรรมวิธีที่ 2	เชื้อเห็ดจากเมล็ดลูกเดือยฆ่าเชื้อด้วย H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0.45% w/v

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ด

อาหารวุ้นพีดีเอ (PDA : Potato Dextrose Agar) ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (แบบดั้งเดิม)

สำหรับการเตรียมอาหารวุ้นสูตร พีดีเอ จำนวน 1 ลิตร จะมีส่วนประกอบดังนี้

มันฝรั่ง	200 กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	20 กรัม
ผงวุ้น	20 กรัม
น้ำสะอาด	1 ลิตร

วิธีการเตรียมอาหารวุ้นสูตร พีดีเอ มีขั้นตอนดังนี้

1. ใช้มันฝรั่งสดๆ นำมาปอกเปลือกและล้างน้ำให้สะอาดแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดลูกเต๋า (1x1x1 เซนติเมตร) ให้ได้น้ำหนัก 200 กรัม

2. นำมันฝรั่งที่หั่นไว้แล้วมาต้มกับน้ำสะอาด 1 ลิตร ต้มโดยใช้ไฟอ่อนๆ นานประมาณ 15 นาที นับจากน้ำเดือดโดยไม่ต้องคนหรือกวน เพราะถ้าใช้ไฟแรงมันฝรั่งอาจจะเปื่อยยุ่ยและละลายออกมา ทำให้อาหารวุ้นมีลักษณะขุ่นขาว ซึ่งยากต่อการสังเกตการณ์เดินของเส้นใยเห็ด
3. ใช้ผ้าขาวบางกรองเอาเฉพาะน้ำใส เติมน้ำตาล 20 กรัมลงไป คนจนกระทั่งน้ำตาลละลายหมด
4. นำผงวุ้น 20 กรัม ใส่ลงไปในส่วนผสมในข้อ 3 และในขณะที่เทให้คนส่วนผสมไปด้วยตลอดเวลาเพื่อป้องกันไม่ให้อาหารวุ้นบริเวณก้นหม้อไหม้
5. นำอาหารวุ้นที่ละลายเข้ากันดีแล้วมากรอกใส่ขวดแก้วที่เตรียมไว้
6. ใช้สำลี่ปั่นเป็นลูกอุดปากขวดไม่ให้แน่นหรือหลวมมากจนเกินไป
7. ใช้กระดาษหนังสือพิมพ์ห่อหุ้มแล้วรัดด้วยหนังยาง
8. นำขวดอาหารวุ้นลงนั่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารวุ้น โดยใช้ความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
9. จากนั้นนำขวดอาหารวุ้นที่เพิ่งนึ่งเสร็จไปทำการเทใส่ถ้วยพลาสติกขนาด 3 ออนซ์ จากนั้นปิดฝาให้สนิท รอจนวุ้นแข็งตัวจึงใช้ได้ ถ้วยพลาสติกไม่สามารถทนความร้อนสูงจึงไม่สามารถที่จะนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำโดยตรงได้ จึงต้องทำความสะอาดถ้วยพลาสติกด้วยสารละลายฆ่าเชื้อคลอรีน 15% นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนสะอาด แล้วผึ่งให้แห้งในตู้เย็นเนื้อเชื้อก่อนใช้มาบรรจุอาหารวุ้น



ภาพที่ 3.1 การเตรียมอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อเห็ดแบบดั้งเดิม
ที่มา : เดิมพงศ์ แสงปกรณกิจ (2552)

อาหารวุ้นฟิโต หม่าเชื้อด้วย H_2O_2

ทำทุกขั้นตอนเหมือนอาหารวุ้นแบบปกติ เปลี่ยนจากน้ำสะอาดเป็นน้ำที่ผสม H_2O_2 ตามที่กำหนดในงานทดลองที่ 1 โดยถ้าต้องการหม่าเชื้อด้วย H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0.15, 0.30 และ 0.45% w/v ให้ใช้สารละลาย H_2O_2 ความเข้มข้น 3% w/v จำนวน 50, 100 และ 150 มิลลิลิตร (ตามลำดับ) ผสมกับน้ำส้มสายชู 5% ปริมาณ 5, 10 และ 15 มิลลิลิตร (ตามลำดับ) ทิ้งไว้ครึ่งชั่วโมงในขวดพลาสติก จะได้เพอร์ออกไซด์เซติก จากนั้นเติมน้ำลงไปให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปใช้ในการเตรียมอาหารวุ้นโดยไม่ต้องนึ่งหม่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ และสามารถกรอกใส่ถ้วยพลาสติกขนาด 3 ออนซ์ได้โดยตรงเลยโดยไม่ต้องทำในตู้เย็นเชื้อ



ภาพที่ 3.2 การเตรียมอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อวิธีแบบไม่ต้องใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

เมล็ดลูกเดือยหม่าเชื้อด้วย H_2O_2

ขั้นตอนการทำอาหารเมล็ดลูกเดือยมีดังนี้

1. ใส่เมล็ดลูกเดือย 1 กิโลกรัม ลงในหม้อหุงข้าว
2. เตรียมสารละลาย H_2O_2 ให้ได้ความเข้มข้นที่กำหนด โดยที่ H_2O_2 ความเข้มข้น 0.15, 0.30 และ 0.45% w/v ให้ใช้สารละลาย H_2O_2 ความเข้มข้น 3% w/v จำนวน 50, 100 และ 150 มิลลิลิตร (ตามลำดับ) ผสมกับ น้ำส้มสายชู 5, 10 และ 15 มิลลิลิตร (ตามลำดับ) ทิ้งไว้ครึ่งชั่วโมงในขวด

พลาสติก จะได้เพอร์ออกไซด์เซติก จากนั้นเติมน้ำลงไปให้ครบ 1 ลิตร แล้วเทลงไปในหม้อหุงข้าวให้ท่วมเมล็ดลูกเดือย

3. ทำการกดสวิชหุงข้าว จนกระทั่งสัญญาณไฟเปลี่ยนจากหุงเป็นอุ่น
4. จากนั้นใช้ช้อนตักเมล็ดลูกเดือยใส่ลงในถ้วยพลาสติกขนาด 3 ออนซ์ ปิดฝา แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น พอเย็นให้ใช้ทันที



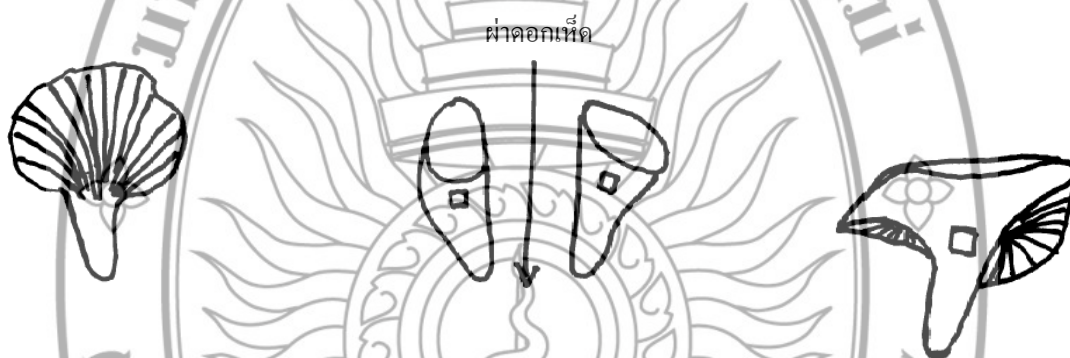
ภาพที่ 3.3 การเตรียมอาหารลูกเดือยเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์โดยใช้หม้อหุงข้าว

วิธีการแยกเนื้อเยื่อเห็ดนางรมสดนอกตู้เย็นเชื้อ

การแยกเนื้อเยื่อเห็ดควรทำภายในห้องที่สะอาด ไม่มีลมพัด ผู้ปฏิบัติงานจะต้องล้างวัสดุอุปกรณ์ทุกอย่าง และล้างมือให้สะอาดก่อนทำการแยกเนื้อเยื่อเห็ด ในกรณีเห็ดนางรมจะทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดบริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อภายในก้านดอก ดังนี้

1. ทำการคัดเลือกดอกเห็ดที่สมบูรณ์ ขนาดใหญ่ ดอกไม่แก่หรืออ่อนเกินไป สะอาด สดใหม่ ดอกเห็ดที่เก็บมาจะต้องไม่เปียกน้ำและห้ามนำมาล้างน้ำเพราะน้ำจะถูกดูดซึมเข้าไปในดอกเห็ด ทำให้มีโอกาที่จะเกิดเชื้อปลอมปนได้ง่าย แต่ถ้าดอกเห็ดชื้นเกินไปก็ให้ผึ่งลมไว้สักครู่ใหญ่จนแห้งก่อน แล้วจึงค่อยนำไปใช้
2. เมื่อคัดเลือกดอกเห็ดได้ตามลักษณะที่ต้องการแล้ว นำมาวางบนกระดาษที่สะอาด ใช้มีดที่ฆ่าเชื้อแล้ว (จุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนไฟ) ตัดแต่งบริเวณที่สกปรกออกให้หมด ควรทำอย่างระมัดระวังอย่าให้ดอกเห็ดกระทบกระเทือนมากนัก

3. จากนั้นเทแอลกอฮอล์ลงในแก้วประมาณครึ่งแก้ว แล้วนำดอกเห็ดนางรมที่ตัดแต่งแล้วจุ่มลงไปจนมิดดอกเห็ด แล้วนำออกมาวางบนกระดาษที่สะอาด ปล่อยให้แอลกอฮอล์ระเหยออกจากดอกเห็ดจนแห้ง จากนั้นทำการผ่าดอกเห็ดออกเป็น 2 ซีก แล้วกรีดเนื้อเห็ดตรงแกนกลางด้านในออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วตักชิ้นถ้ำใส่ด้วยพลาสติกสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดที่เตรียมไว้ ถ้วยละ 1 ชิ้น โดยให้เนื้อเชื้อเห็ดอยู่บริเวณกึ่งกลางถ้วยพอดี ทำการปิดฝาด้วย
4. นำไปเก็บไว้ในห้องที่สะอาด ปราศจากมดและแมลง อุณหภูมิห้องปกติ ประมาณ 7 - 10 วัน จะเห็นเส้นใยเห็ดสีขาวเจริญจากเนื้อเชื้อเห็ด จะนำไปใช้เป็นแม่เชื้อต่อไปได้ ถ้าเส้นใยเป็นสีอื่น หรือสีขาวนูนเข้ม แสดงว่ามีเชื้อราและแบคทีเรียปนเปื้อนเกิดขึ้น จะทำการทำลายทิ้งไป



ภาพที่ 3.4 ตำแหน่งของเนื้อเชื้อภายในก้านดอกเห็ดนางรมที่นำมาเพาะเลี้ยง

วิธีการขยายเชื้อ

เส้นใยเห็ดในอาหารเพาะเลี้ยง เรียกว่า แม่เชื้อ (Mother mycelium) ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์นั้นไม่นิยมถ่ายไปเลี้ยงวัสดุเพาะโดยตรง เพราะจะเกิดการปนเปื้อนสูง จะต้องผ่านการทำหัวเชื้อหรือเชื้อขยาย (Spawn) ก่อนเพื่อให้มีปริมาณของเชื้อเห็ดมากพอที่จะถ่ายต่อไปยังวัสดุเพาะ โดยจะแยกเส้นใยที่เจริญออกมาจากอาหารเพาะเลี้ยงในอาหารลูกเห็ดที่เลี้ยงในถ้วยพลาสติกขนาด 3 ออนซ์ ไปเพาะขยายเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารเมล็ดลูกเห็ดในถ้วยพลาสติกขนาด 8 ออนซ์ (ใช้วิธีการเดียวกับการเตรียมอาหารลูกเห็ดผสม H_2O_2) ในขั้นตอนนี้เส้นใยจะเจริญแผ่ขยายออกจากหัวเชื้อเห็ดกระจายออกไปทุกทิศทางจนเต็มเมล็ดลูกเห็ดทุกเมล็ด โดยเห็ดนางรมจะใช้เวลาประมาณ 10 วัน หลังจากนั้นหัวเชื้อเห็ดในเมล็ดลูกเห็ดก็สามารถที่จะนำไปถ่ายเชื้อลงในถุงก้อนเชื้อเพื่อเพาะให้เกิดดอกเห็ดต่อไป

ก้อนเชื้อวัสดุเพาะสำหรับผลิตดอกเห็ดเป็นก้อนจี๋เลื่อยผสมอาหารเสริมที่ซื้อมาจากฟาร์มเห็ดผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ขนาดถุงเพาะ 1 กิโลกรัม ทำการเอาเชื้อเห็ดในเมล็ดลูกเห็ดหยอดลงไปประมาณ 20 เมล็ด ใส่ลงไปในกลุ่มจี๋เลื่อย แล้วนำก้อนจี๋เลื่อยที่ใส่เชื้อเห็ดแล้วไปเก็บภายในห้องที่อากาศถ่ายเทได้

สะดวก และไม่มีเศษผงละอองมากเกินไป โดยเก็บไว้ที่ระดับอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) ทำการตรวจสอบทุกวัน หากพบว่าก้อนใดมีการปนเปื้อนของเชื้ออื่นก็นำออกไปฆ่าเชื้อ เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อปลอมปน การบ่มก้อนเชื้อเห็ดนางรมจะใช้ระยะเวลาประมาณ 25 วัน เส้นใยเห็ดนางรมก็จะเดินเต็มก้อนอย่างสม่ำเสมอเป็นสีขาวทั่วทั้งก้อน จากนั้นจึงปล่อยให้เส้นใยเห็ดรัดตัวและมีการสะสมอาหาร อีกประมาณ 7 วัน แล้วจึงนำไปเปิดดอกในโรงเรือนสำหรับเปิดดอกเห็ดต่อไป

การเปิดดอกเห็ด

เมื่อเชื้อเห็ดเจริญเต็มก้อนขึ้นเชื้อแล้วจึงนำไปเข้าโรงผลิตดอก โดยดึงจุกสำลีและคอกววดพลาสติกที่รวบปากถุงไว้ออก เพื่อให้ก้อนเชื้อได้สัมผัสกับอากาศ ความชื้น และแสง

การปฏิบัติดูแลรักษา

หลังจากทำการเปิดถุงก้อนเชื้อและนำก้อนเชื้อไปไว้ในโรงเรือนสำหรับเปิดดอกแล้ว สิ่งที่จะต้องระมัดระวังเป็นพิเศษก็คือ ความสะอาดของโรงเรือน โรงเรือนจะต้องสะอาดและปราศจากแหล่งที่อยู่อาศัยของแมลงศัตรูเห็ด

การรดน้ำจะทำวันละ 2 ครั้ง คือ เช้า และเย็น

การเก็บดอกเห็ด

ดอกเห็ดจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยดอกเห็ดจะโตเต็มที่ภายใน 3 - 4 วันซึ่งเป็นระยะที่เหมาะสมแก่การเก็บเกี่ยว ทำการเก็บดอกเห็ดในตอนเช้ามืดก่อนการรดน้ำ แล้วทำการชั่งน้ำหนักสด ลักษณะดอกเห็ดนางรมที่อยู่ในระยะเก็บเกี่ยว คือ ในขณะที่ดอกบานเต็มที่ แต่ขอบหมวกดอกยังไม่บาน้วย แต่อย่างไรก็ตาม กลุ่มดอกเห็ดในถุงก้อนเชื้อเดียวกันอาจมีขนาดและอายุไม่เท่ากัน บางดอกโตเต็มที่ แต่บางดอกยังเล็กอยู่ การเก็บจะต้องเก็บมาให้หมดทั้งกลุ่ม ถ้าหากเก็บเฉพาะดอกใหญ่ออกมาดอกเล็กที่เหลือก็จะเสียไป ทำการเก็บผลผลิต 4 ครั้ง

การบันทึกข้อมูล

การทดลองที่ 1

เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน (%)

เส้นใยเห็ดที่จะเจริญจากเนื้อเยื่อเห็ดซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า มีลักษณะเป็นเส้นใยฟูสีขาว ส่วนที่เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น เส้นใยจะเป็นสีอื่น เช่น ดำ เขียว หรือขาวขุ่นเข้ม แสดงว่า

มีเชื้อราและแบคทีเรียปนเปื้อนเกิดขึ้น ถ้าวัสดุเลี้ยงเชื้อเห็ดเกิดการปนเปื้อนไม่เกิน 40% ในระยะเวลา 20 วัน ถือว่าวิธีการฆ่าเชื้อวัสดุเลี้ยงเชื้อเห็ดนั้นเป็นยอมรับได้

การทดลองที่ 2

ระยะเวลาเชื้อเห็ดเดินเต็มถุงเพาะ (วัน)

จำนวนวันเฉลี่ยที่ใช้ในการเห็ดดอกหลังเปิดถุง (วัน)

น้ำหนักสดของดอกเห็ด/ถุงเพาะ 1 กิโลกรัม (กรัม)

สถานที่ทำการทดลอง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ต.สะลวง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่

ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง 1 ตุลาคม 2551 – 30 กันยายน 2552 รวมเป็นระยะเวลา 12 เดือน

การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองที่ 1 วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance) และหาค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference (LSD)

การทดลองที่ 2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Two sample T-test โดยใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป