

บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์ในการบันทึกข้อมูลแหล่งอาศัยของ *Cordyceps*
 - 1.1 เทอร์โมมิเตอร์
 - 1.2 เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศ
2. อุปกรณ์ในการเก็บรวบรวมตัวอย่าง *Cordyceps*
 - 2.1 กล่องพลาสติก
 - 2.2 ถุงพลาสติกและหนังสือ
 - 2.3 ตะกร้า
 - 2.4 พลั่วมือ
 - 2.5 มีด
 - 2.6 เข็มหมุด
 - 2.7 เทปใส
3. อุปกรณ์ในการตรวจสอบ การแยกเชื้อบริสุทธิ์และการเพาะเลี้ยง *Cordyceps*
 - 3.1 กล้องถ่ายรูป Canon EOS 500
 - 3.2 ไม้บรรทัด
 - 3.3 แวนชยาย
 - 3.4 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
 - 3.5 กระบอกใส่จานเพาะเชื้อ
 - 3.6 ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
 - 3.7 ปีกเกอร์ (beaker) ขนาด 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร
 - 3.8 ปีกเกอร์โลหะ ขนาด 500 มิลลิลิตร
 - 3.9 หลอดทดลอง (test tube)
 - 3.10 ที่วางหลอดทดลอง (rack)
 - 3.11 หลอดหยด (dropper)

- 3.12 Pasteur pipette
- 3.13 กรวยแก้ว (funnel)
- 3.14 สไลด์ (slide)
- 3.15 กระจกปิดสไลด์ (cover slips)
- 3.16 ไบมีคโกลน
- 3.17 ปากคีบ (forceps)
- 3.18 เข็มเย็บเข็ม (needle)
- 3.19 ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)
- 3.20 ที่เจาะรูคอร์ก (cork borer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร
- 3.21 ช้อนตักสาร (spatula)
- 3.22 แท่งแก้วคนสาร (stirrer)
- 3.23 กระบอบกตวง
- 3.24 measuring cylinder กระดาษอลูมิเนียม (aluminum foil)
- 3.25 paraffin film
- 3.26 ลำกล้อง
- 3.27 กระดาษทิชชู
- 3.28 กระดาษวัด pH
- 3.29 ผ้าขาวบาง
- 3.30 ถังพลาสติกและหนังยาง
- 3.31 น้ำยาทาเล็บชนิดใส
- 3.32 label paper
- 3.33 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.34 stage micrometer
- 3.35 ocular micrometer
- 4. เครื่องมือ
 - 4.1 ตู้อบ (hot air oven)
 - 4.2 หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)
 - 4.3 ไมโครเวฟ (microwave oven)
 - 4.4 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow)
 - 4.5 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) อุณหภูมิ 20, 25, 30, 37 และ 45 °C

- 4.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 4.7 เครื่องวัด pH (pH meter)
- 4.8 เครื่องชั่ง
- 4.9 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope)
- 4.10 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope)
- 4.11 microwave oven
- 4.12 ตู้เย็น
5. วัสดุ
 - 5.1 มันฝรั่ง
 - 5.2 ข้าวโพดอบ
 - 5.3 ข้าวโอ๊ตอบ
6. สารเคมี
 - 6.1 สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบลักษณะของ asci และ ascospores
 - 6.1.1 Melzer's iodine reagent (ภาคผนวก ค)
 - 6.1.2 lactophenol cotton blue
 - 6.1.3 immersion oil
 - 6.2 สารเคมีที่ใช้แยกเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps*
 - 6.2.1 sodium hypochlorite (5.25%)
 - 6.2.2 ethyl alcohol (70% และ 95%)
 - 6.2.3 chloramphenicol
 - 6.2.4 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ
 - 6.3 สารเคมีที่ใช้ในการปรับ pH
 - 6.3.1 lactic acid
 - 6.3.2 hydrogen peroxide
7. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ข)
 - 7.1 corn meal agar
 - 7.2 Czapek's agar
 - 7.3 malt extract agar
 - 7.4 oat meal agar
 - 7.5 potato dextrose agar

วิธีการสำรวจและวิจัย

1. การเก็บรวบรวม *Cordyceps* บริเวณอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย

1.1 การกำหนดพื้นที่สำรวจ

จากการสำรวจขึ้นต้นบริเวณสวนสัตว์เชียงใหม่ น้ำตกวังบัวบาน น้ำตกมณฑาธาร ห้วยคอกม้า บ้านม้งช้างเคียน และแหลมสน ในเขตอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย พบว่าทุกพื้นที่มี *Cordyceps* เจริญอยู่ ยกเว้นแหลมสน จึงได้กำหนดพื้นที่สำรวจดังนี้ ป่าบริเวณสวนสัตว์เชียงใหม่ และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (รูป 9) เป็นตัวแทนป่าผสมผลัดใบ มีระดับความสูง 460 เมตรจากระดับน้ำทะเล ป่าบริเวณน้ำตกวังบัวบาน (รูป 10) เป็นตัวแทนป่าผสมผลัดใบอีกแห่งหนึ่งที่อยู่สูงขึ้นไป มีความสูง 650 เมตรจากระดับน้ำทะเล ป่าบริเวณน้ำตกมณฑาธาร (รูป 11) เป็นตัวแทนป่าเต็งรัง มีความสูง 700 เมตรจากระดับน้ำทะเล ป่าบริเวณห้วยคอกม้า (รูป 12) เป็นตัวแทนป่าดิบเขา มีความสูง 1,250 เมตรจากระดับน้ำทะเล และป่าบริเวณบ้านม้งช้างเคียน (รูป 13) เป็นตัวแทนป่าสนเขา มีความสูง 1,650 เมตรจากระดับน้ำทะเล พื้นที่สำรวจทั้ง 5 บริเวณมีสภาพป่าไม้ที่อุดมสมบูรณ์ เป็นแหล่งต้นน้ำลำธาร มีความชื้นและอุณหภูมิเหมาะสม เป็นแหล่งอาศัยของแมลงหลากหลายชนิดที่มีความสัมพันธ์กับ *Cordyceps* เช่น ผีเสื้อ มวน มด ตัวต่อและผึ้ง เป็นต้น



บันทึกภาพ 7 มิ.ย. 2543

รูป 10 ป่าบริเวณสวนสัตว์เชียงใหม่ ความสูง 460 เมตรจากระดับน้ำทะเล



บันทึกภาพ 14 ก.ค. 2543

รูป 11 ป่าบริเวณน้ำตกวังบัวบาน ความสูง 650 เมตรจากระดับน้ำทะเล



บันทึกภาพ 2 ก.ย. 2543

รูป 12 ป่าบริเวณน้ำตกมณฑาธาร ความสูง 700 เมตรจากระดับน้ำทะเล



บันทึกภาพ 12 มี.ย. 2543

รูป 13 ป่าบริเวณห้วยคอกม้า ความสูง 1,250 เมตรจากระดับน้ำทะเล



บันทึกภาพ 16 ก.ค. 2543

รูป 14 ป่าบริเวณบ้านมั่งช้างเคียน ความสูง 1,650 เมตรจากระดับน้ำทะเล

1.2 การเก็บรวบรวมตัวอย่าง *Cordyceps*

สำรวจป่าทั้ง 5 บริเวณ โดยเดินสำรวจพื้นที่บริเวณละประมาณ 1 ตารางกิโลเมตร เดือนละ 3 ครั้งในช่วงฤดูฝน ระหว่างเดือนมิถุนายน-ตุลาคม 2543 บันทึกชนิดของ host ลักษณะการเจริญบนแหล่งอาศัย บันทึกภาพของ *Cordyceps* และบันทึกสภาพแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศ ความชื้นของดิน โดยนำดินไปอบแห้งแล้วชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์กับน้ำหนักของดินก่อนอบ และ pH ของดินบริเวณที่พบ *Cordyceps* โดยนำตัวอย่างดินละลายในน้ำกลั่น ทิ้งให้ตกตะกอนแล้ววัดด้วย pH meter เก็บตัวอย่างจากแหล่งสำรวจด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากบางตัวอย่างมีขนาดเล็กและบอบบาง อาจเสียหายได้ง่าย ตัวอย่างที่มี host ฝังอยู่ในดินจะใช้พลั่วมือช่วยในการขุดหรือเขี่ยขึ้นมา บางตัวอย่างที่ติดอยู่กับใบไม้หรือกิ่งไม้เล็ก ๆ ที่อยู่ใกล้เคียงจะใช้มีดค่อย ๆ ตัดเพื่อแยกตัวอย่างออกจากใบไม้และกิ่งไม้ เก็บตัวอย่าง *Cordyceps* พร้อมทั้ง host ใส่ในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิดหรือถุงพลาสติกเกรดยาง เพื่อป้องกันความเสียหายและคงสภาพความสดของตัวอย่าง ระบุวัน เดือน ปี สถานที่เก็บ และให้รหัสหมายเลขตัวอย่าง

2. การตรวจสอบทางอนุกรมวิธาน

2.1 การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา มีขั้นตอนดังนี้

2.1.1 บันทึกลักษณะทั่วไปที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (macroscopic characters) ได้แก่ รูปร่าง สี ความสูง ความกว้าง ลักษณะผิวและเนื้อสัมผัสของ stroma จำนวนของ stroma ที่เจริญอยู่บน host รวมทั้งชนิดของ host ที่เป็นแหล่งอาศัย และบันทึกภาพ

2.1.2 ตัด stroma ตรงส่วน fertile part ตามขวางโดยใช้ใบมีดโกน บันทึกลักษณะที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (microscopic characters) ดังต่อไปนี้

2.1.2.1 ตรวจสอบลักษณะการวางตัวของ perithecia บน stroma ว่าเป็นแบบฝังใน stroma ทั้งหมด (immersed perithecia) หรือฝังอยู่เพียงบางส่วน (superficial perithecia)

2.1.2.2 หยคน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงบริเวณ perithecia ทิ้งไว้ 1 นาทีแล้วใช้หัวงาช้างเขี่ยและหยคน้ำมาวางบนสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ บันทึกรูปร่าง สี ความกว้าง ความยาวทั้งหมดของ asci ขนาดและรูปร่างของ ascus cap บันทึกภาพของ asci ข้อมด้วย

Melzer's iodine reagent เพื่อทดสอบการติดสีของ ascospores
บันทึกผล

2.1.2.3 เตรียมสไลด์ด้วยวิธีการเดียวกันกับข้อ 2.1.2.2 ย้อมสี ascospores
ด้วย lactophenol cotton blue เพื่อให้เห็นรูปร่างของ ascospores
ชัดเจนยิ่งขึ้นเนื่องจาก ascospores ของ *Cordyceps* จะไม่มีลิ้นงมอง
ผ่านกล้องจุลทรรศน์ บันทึก รูปร่าง และขนาดของ ascospores
รวมทั้ง รูปร่าง และขนาดของ part-spores ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
แบบเลนส์ประกอบกำลังขยาย 400-1,000 เท่า บันทึกภาพ
ascospores และ part-spores

2.2 การบ่งบอกชื่อวิทยาศาสตร์

ใช้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาขั้นต้น เทียบกับรูปวิธานของ Arora (1986), Zhishu *et al.* (1993) และ Horn *et al.* (1993) (ภาคผนวก ก) และเทียบกับภาพประกอบคำบรรยายในหนังสือของ Dennis (1978), Pacioni (1985), Bessette & Sundberg (1987), Imazeki *et al.* (1988), Pegler & Spooner (1994), Shaffer-Fehre (1996) และ Spooner (1996) หรือหนังสือรูปวิธานอื่น ๆ ให้ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ระดับสปีชีส์

2.3 การเก็บรักษาตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างชั่วคราวไว้ในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิดอย่างแน่นหนาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 10 °C เพื่อรอการตรวจสอบรายละเอียดและการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ เพื่อป้องกันตัวอย่างแห้งจนเสียสภาพ เก็บตัวอย่างถาวรโดยการทำให้แห้งด้วยการอบที่ 60 °C เป็นเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เก็บตัวอย่างไว้ในกล่องพลาสติกที่มีการบุเพื่อใช้ป้องกันแมลง และซิลิกาเจลป้องกันความชื้น ปิดฝากล่องให้สนิทเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ณ ห้องปฏิบัติการฟัซิงใจ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3. การแยกเชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างของ *Cordyceps* แต่ละสปีชีส์มาแยกให้ได้เส้นใยบริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation และ tissue culture

3.1 single spore isolation มีวิธีการดังต่อไปนี้

3.1.1 ล้างเศษดิน หรือสิ่งสกปรกต่าง ๆ ออกจากตัวอย่างด้วยน้ำสะอาด

- 3.1.2 นำเชื้อบริเวณผิวนอกของตัวอย่างโดยใช้วิธี triple surface sterilization ดังนี้
 - 3.1.2.1 แช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 นาที
 - 3.1.2.2 แช่ใน sodium hypochlorite 5.25% เป็นเวลา 1 นาที
 - 3.1.2.3 แช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 30 วินาที
- 3.1.3 ล้างสารละลายส่วนเกินออก โดยการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 นาที แล้วนำตัวอย่างวางบนจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษทิชชูปราศจากเชื้อเพื่อซับน้ำให้แห้ง
- 3.1.4 ตัดตัวอย่างตรงส่วน fertile part ตามขวางด้วยใบมีดโกน หยคน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงบนสไลด์ 1-2 หยด ใช้ปากคีบคีบตัวอย่างคว่ำด้านที่เป็นรอยตัดบนหยคน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง จะมองเห็น asci ลักษณะงู้นขาวแวววาวลอยในน้ำกลั่น ใช้เข็มเย็บเย็บให้ asci แฉกออก
- 3.1.5 ใช้ Pasteur pipette ดูดสารแขวนลอยของสปอร์บนสไลด์ ใส่ลงในสารละลาย chloramphenicol 0.01% ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดแบคทีเรียที่ติดมากับสปอร์
- 3.1.6 บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 3.1.7 ตรวจสอบการงอกของสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ ใช้ micro pipette ดูดสปอร์หรือ part-spores ที่มีการงอกใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารวุ้น potato dextrose agar (PDA) 5 จด จุดละ 1 สปอร์ หรือ 1 part-spore
- 3.1.8 บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ในที่มืด เป็นเวลา 15-60 วัน
- 3.1.9 สังเกตการเจริญของเส้นใย ยืนยันผลการแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยเส้นใยของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องมีลักษณะเหมือนกันทุกจุด และไม่พบการปนเปื้อนจากแบคทีเรียหรือยีสต์
- 3.1.10 เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นเลี้ยง potato dextrose agar ในตู้เย็น (อุณหภูมิประมาณ 10°C) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป
- 3.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) มีวิธีการดังต่อไปนี้
 - 3.2.1 ล้างเศษดิน หรือสิ่งสกปรกต่าง ๆ ออกจากตัวอย่างด้วยน้ำสะอาด
 - 3.2.2 นำเชื้อบริเวณผิวนอกของตัวอย่าง โดยใช้วิธี triple surface sterilization ดังนี้

- 3.2.2.1 แช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 นาที
- 3.2.2.2 แช่ใน sodium hypochlorite 5.25% เป็นเวลา 1 นาที
- 3.2.2.3 แช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 30 วินาที
- 3.2.3 ล้างสารละลายส่วนเกินออก โดยการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 นาที แล้วนำตัวอย่างวางบนจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษทิชชูปราศจากเชื้อเพื่อซับน้ำให้แห้ง
- 3.2.4 ผ่าตรงส่วน fertile part ด้วยใบมีดโกน ใช้เข็มเย็บเย็บเนื้อเยื่อที่อยู่ภายใน วางเป็น 5 จุดบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร potato dextrose agar
- 3.2.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ในที่มืด เป็นเวลา 15-60 วัน
- 3.2.6 สังเกตการเจริญของเส้นใยออกมาจากเนื้อเยื่อ ยืนยันผลการแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยเส้นใยของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องมีลักษณะเหมือนกันทุกจุด และไม่พบการปนเปื้อนจากแบคทีเรียหรือยีสต์
- 3.2.7 เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นเลี้ยง potato dextrose agar ในตู้เย็น (อุณหภูมิประมาณ 10°C) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4. การศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้น

เพื่อหาชนิดของอาหารวุ้นที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* แต่ละสปีชีส์ สามารถเจริญได้ดีที่สุดมีวิธีการดังต่อไปนี้

- 4.1 นำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* แต่ละสปีชีส์ เพาะเลี้ยงในจานอาหารวุ้น potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ในที่มืด เป็นเวลา 15-60 วัน
- 4.2 ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนี นำมาวางบนอาหารวุ้นที่ใช้ศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์ชนิดต่าง ๆ ดังนี้ corn meal agar, Czapek's agar, malt extract agar (MEA), oat meal agar (OA) และ potato dextrose agar
- 4.3 บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ในที่มืด เป็นเวลา 15 วัน สำหรับเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* บางสปีชีส์ที่เจริญได้ช้าได้เพิ่มระยะเวลาการบ่มเป็น 30-60 วัน
- 4.4 สังเกตและวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีโดยใช้ไม้บรรทัด บันทึกผล

5. การศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้นที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เพื่อหาอุณหภูมิที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* แต่ละสปีชีส์ สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารวุ้น มีวิธีการดังต่อไปนี้

- 5.1 นำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* แต่ละสปีชีส์ เพาะเลี้ยงในงานอาหารวุ้น potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ในที่มืด เป็นเวลา 15-60 วัน
- 5.2 ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีนำมาวางบนอาหารวุ้นที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* สปีชีส์นั้น ๆ สามารถเจริญได้ดีที่สุด (จากข้อ 4) จำนวน 6 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ
- 5.3 นำงานอาหารวุ้นแต่ละชุดการทดลองบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 37, 45°C และอุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ตามลำดับ ในที่มืด เป็นเวลา 15 วัน สำหรับเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* บางสปีชีส์ที่เจริญช้าได้เพิ่มระยะเวลาการบ่มเป็น 30-60 วัน
- 5.4 สังเกตและวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีโดยใช้ไม้บรรทัด บันทึกผล

6. การศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้นที่ pH ต่าง ๆ

เพื่อหา pH เริ่มต้นที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* แต่ละสปีชีส์ สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารวุ้น มีวิธีการดังต่อไปนี้

- 6.1 นำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* แต่ละสปีชีส์ เพาะเลี้ยงในงานอาหารวุ้น potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ในที่มืด เป็นเวลา 15-60 วัน
- 6.2 ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีนำมาวางบนอาหารวุ้นที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* สปีชีส์นั้น ๆ สามารถเจริญได้ดีที่สุด (จากข้อ 4) จำนวน 6 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองจะปรับ pH เป็น 4, 5, 6, 7 และ 8 โดยใช้ lactic acid หรือ hydrogen peroxide และชุดการทดลองที่ไม่ได้ปรับ pH ตามลำดับ ทำการทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ
- 6.3 นำงานอาหารวุ้นแต่ละชุดการทดลอง บ่มที่อุณหภูมิที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* สปีชีส์นั้น ๆ สามารถเจริญได้ดีที่สุด (จากข้อ 5) ในที่มืด เป็นเวลา 15 วัน สำหรับเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* บางสปีชีส์ที่เจริญช้าได้เพิ่มระยะเวลาการบ่มเป็น 30-60 วัน
- 6.4 สังเกตและวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีโดยใช้ไม้บรรทัด บันทึกผล