เอกสารอ้างอิง

กล้าณรงค์ ศรีรอต, สิริพล โกสินทรเสนีย์, เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, ปฐมา จาตกานนท์, สิทธิโชค วัลลภาทิตย์. 2548. การพัฒนาการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อลดต้นทุนการผลิตและปลอดจากผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม. รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

จิรศักดิ์ ชูความดี. 2542. การร่วงหล่นและการย่อยสลายของซากพืชป่าชายเลนบริเวณปากแม่น้ำท่าจีน จังหวัดสมุทรสาคร, กรุงเทพ ฯ.

จิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล อินทนู. 2546. การผลิตเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสดด้วยเทคนิคอย่างง่ายเพื่อใช้ควบคุมโรคเน่าระดับดินของถั่วฝักยาวที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolsii*. การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. วันที่ 4-7 กุมภาพันธ์ 2545. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ชริดา ปุกหุต, จำรัส แก้วแรมเรือน, วาริณี พละสาร และอรัญญา พิมพ์มงคล, 2548. การย่อยสลายแกลบและฟางข้าวด้วยเชื้อเห็ดไวท์รือทจีนัสเลนไทนัส. ใน การประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสุรนารี. จังหวัดนครราชสีมา.

เนริสา คุณประทุม. 2543. การผลิตไซแลนเนสจาก *Trichoderma reesei* โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เบญจวรรณ ยันต์วิเศษภักดี. 2545. การผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากรากลุ่มไวท์รอทบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เมธี เอกศิรินิมิต, พิชิต แก้ววงษ์ศรี และนพรัตน์ บำรุงรักษ์.2542. "ผลของแสมทะเล (*Avicennia marina*) ในการเป็นไม้เบิกนำต่ออัตราการเจริญเติบโต และการรอดตายของโกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) บนหาดเลนใหม่ของอ่าวปัตตานี." รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี จังหวัดปัตตานี.

พงศธร กิมเฮง. 2547. สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อผลิตน้ำตาลไซลิทอลโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ยศนันท์ พรหมโชติกุล, อรุณี วีณิน และธีรวัฒน์ บุญทวีคุณ. 2548. การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน เพื่อการใช้ประโยชน์. การประชุมความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้และสัตว์ป่า. "ความก้าวหน้าของผลงานวิจัยและกิจกรรมปี 2548". ระหว่างวันที่ 21-22 สิงหาคม จังหวัด เพชรบุรี.

วสันต์ ศรีสวัสดิ์. 2540. "ความเจริญเติบโตของพันธุ์ไม้ป่าชายเลน 3 ชนิด โดยใช้ระยะปลูกต่างๆ กันที่จังหวัดสตูล." ใน การสัมมนาระบบนิเวศป่าชายเลนแห่งชาติ ครั้งที่ 10. กรุงเทพฯ.

วันทนีย์ ชุ่มจิตต์. 2547. การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาเพื่อควบคุมโรคพืช. สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 จันทบุรี. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 64 น.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2529. เทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 163 หน้า.

วัชรินทร์ ศรีสวัสดิ์สกุลมี. 2545 ความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราในป่าชายเลน ณ พื้นที่สงวนชีวมณฑลระนอง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

วิจารณ์ มีผล 2550. การเติบโตและผลผลิตซากพืชของใบโกงกางใบใหญ่ที่ปลูกในพื้นที่นากุ้งร้าง อำเภอดอนสัก จังหวัดสุราษฎร์ธานี ประมวลผลงานวิจัยการประชุมวิชาการระบบนิเวศป่าชายเลนแห่งชาติ "ป่าชายเลน : รากฐานเศรษฐกิจพอเพียงของชุมชนชายฝั่ง" วันที่ 12-14 กันยายน 2550 จังหวัดเพชรบุรี กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

วัฒนา พรประเสริฐ สมใจ หวานนท์ สนิท อักษรแก้ว อัชราพร เปี่ยมสมบูรณ์ พูลศรี เมืองสง, 2540 ความสำพันธ์ระหว่างผลผลิตการประมงกับการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ป่าชาย

ศรินทร์ ตันติพุกนนท์, 2536 การเจริญเติบโตและอัตราการรอดของต้นอ่อนไม้ป่าชายเลน 3 ชนิดที่ปลูกบนพื้นที่นากุ้งร้าง จังหวัดสมุทรสาคร วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

ศิริวัฒนา บัญชรเทวกุลและคณะ. 2550. การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลไซโลส กลูโคส และอราบิโนส จากฟางข้าวและชานอ้อย เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตเอทานอล. รายงานการวิจัย คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. จุลชีววิทยาปฏิบัติการ. พิมพ์ครั้งที่ 5. บริษัทเจ้าพระยาระบบการพิมพ์ จำกัด. 2547.

มยุรีย์ พันชัย และคณะ. จุลชีววิทยาหลักเบื้องต้นและวิธีปฏิบัติ. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2544.

สรายุทธ บุณยะเวชชีวิน, ธนิตย์ หนูยิ้ม และโชวโซ นากามูระ. 2540. "อัตราการรอดตายและการเจริญเติบโตของโกงกางใบเล็กและโกงกางใบใหญ่ ที่ระดับความเข้มแสงต่างๆ." ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35. สาขาประมง วิทยาศาสตร์วิศวกรรมศาสตร์ การจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม คหกรรมศาสตร์ ศึกษาศาสตร์ และเศรษฐศาสตร์ 3-5 กุมภาพันธ์ 2540. กรุงเทพ ฯ.

สนิท อักษรแก้ว. 2540. "โครงการ: การฟื้นฟูและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนเพื่อสังคมและเศรษฐกิจอย่างยั่งยืนของประเทศไทย." ใน รายงานความก้าวหน้าของโครงการฯ ในรอบ 12 เดือน (ปีที่ 2) หน้า 69. กรุงเทพฯ : เมธีวิจัยอาวุโส.

สนิท และคณะ 2547 การจัดการสวนป่าชายเลนแบบผสมผสานเพื่อการพัฒนาทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม บริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศไทย (Integrated Management of Mangrove Plantations for Development of Coastal Resources and Environments of Thailand) โครงการเมธีวิจัยอาวุโส สกว.

สุกาญจน์ รัตนเลิศนุสรณ์. 2550. ประสิทธิภาพเชื้อราปฏิปักษ์จากดินเลนในการควบคุมโรคเน่าในผักและผลไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ นเรศวรวิจัย ครั้งที่ 3. ความสำเร็จของการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ วันที่ 28-29 กรกฎาคม 2550 มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.

สุกาญจน์ รัตนเลิศนุสรณ์ 2550 อัตราการย่อยสลายและการหมุนเวียนธาตุอาหารในป่าชายเลนจังหวัดสมุทรสาคร และความหลากหลายทางชีวภาพเชื้อราดินเลน. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

สุกาญจน์ รัตนเลิศนุสรณ์ 2552 . ความหลากหลายทางชีวภาพเชื้อราบนฝักโกงกางใบเล็กและแสมขาว:การใช้ประโยชน์เชื้อรา *Trichoderma viride* วารสารการจัดการป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ปีที่ 3 ฉบับที่5(2552)

สุกาญจน์ รัตนเลิศนุสรณ์ สายัณห์ สมฤทธิ์ผล และอัชฌาณัท รัตนเลิศนุสรณ์, 2553. รายงานการวิจัย การใช้ประโยชน์เชื้อราปฏิปักษ์จากดินเลนในการควบคุมโรคเน่าบนโกงกางใบเล็กและแสมขาว คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ปทุมธานี

สุกาญจน์ รัตนเลิศนุสรณ์, 2554. การใช้เชื้อราปฏิปักษ์เพื่อปรับปรุงคุณภาพกล้าไม้ การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 วันที่ 1-4 กุมภาพันธ์ 2554 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ

สุกาญจน์ รัตนเลิศนุสรณ์ 2554 การย่อยสลายใบโกงกางและใบแสมด้วยเชื้อรา การประชุมวิชาการนเรศวรวิจัย ครั้งที่ 7 วันที่ 29-30 กรกฎาคม 2553 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

สุกาญจน์ รัตนเลิศนุสรณ์ 2554 การชักนำการเจริญเติบโตไม้เบิกนำ นากุ้งร้างด้วยเทคนิคทางชีวภาพ ประมวลผลงานวิจัยการประชุมวิชาการระบบนิเวศป่าชายเลนแห่งชาติ ระหว่างวันที่ 7-8 กันยายน 2554 ณ โรงแรมมิราเคลแกรนด์ กรุงเทพฯ

โสภนา วงศ์ทอง 2544. ความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราชั้นสูงในป่าชายเลน ณ สถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุนันทา ชูแก้ว. 2549. การผลิตเอทานอลโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

โสภนา วงศ์ทอง. 2544. ความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราชั้นสูงในป่าชายเลน ณ สถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2553.

นพรัตน์ บำรุงรักษ์. 2550. การฟื้นฟูพื้นที่นากุ้งต่างระดับโดยการคัดเลือกพันธุ์ไม้ชายเลนที่เหมาะสม ประมวลผลงานวิจัยการประชุมวิชาการระบบนิเวศป่าชายเลนแห่งชาติ. “ป่าชายเลน: รากฐานเศรษฐกิจพอเพียงของชุมชนชายฝั่ง.” วันที่ 12-14 กันยายน 2550 จังหวัดอนิวรรต เฉลิมพงษ์ และ ธีรวัฒน์ บุญทวีคูณ. 2533. “เชื้อราน้ำเค็มท่วมถึงในระบบนิเวศป่าชายเลนระนอง”. วารสารวนศาสตร์ 9: 83-93.

บุญส่ง ปั้นพานิช ชัชวาล ยุทธชัยยางกุล ศิมาลักษณ์ ดิถีสวัสดิ์เวทย์ ดาริวรรณ เศรษฐีธรรม และวรรณา ชัยคำรงค์กุล. 2545. การกำจัดขยะมูลฝอยชุมชนโดยวิธีการทำปุ๋ยหมักแบบใช้สารเร่ง. ศูนย์อนามัยสิ่งแวดล้อมเขต 6 ขอนแก่น กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. ขอนแก่น.

อรวรรณ พรานไชย. 2546. การฟื้นฟูป่าชายเลนบนพื้นที่นากุ้งร้างบริเวณอำเภอขนอม จังหวัดนครศรีธรรมราช . สาขาวิชาชีววิทยาป่าไม้, ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้

อนิวรรต เฉลิมพงษ์ และ ธีรวัฒน์ บุญทวีคูณ. 2533. "เชื้อราน้ำเค็มท่วมถึงในระบบนิเวศป่าชายเลนระนอง". วารสารวนศาสตร์ 9: 83-93.

Aro et al FEM 2005 Microbiol. Rev in press

Bourbonnais R. and M.G. Paice 1995. Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. Tappi J. 79(6):199-204

Fell, J. M. and I. M. Master. 1980. The associated and potential role of fungi in mangrove detrial System. Bol. Mar. 23:257-263.

Frank,A.B. 2005. Mycorrhizae: the challenge to evolutionary and ecology theory Mycorrhiza, 15(4): 277-281

Ito T., and A. Nakagiri,1997. A Mycofloral study on mangrove mud in Okinawa, Japan : IFO res Commum. 18: 32-39.

Kirk, T. K. and D. Cullen. 1980. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi, pp. 273-307. In R. A. young and M. Akhtar, eds. Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. John Wiley&Sons, Inc., Canada.

Kirk, T. K. and Shimada. 1985 Lignin Biodegradation: The microorganisms involved and the physiology and biochemistry of degradation by white rot fungi, pp. 233-245 In T. Higuchi,ed Biosynthesis and Biodegration of wood components.Academic Press, London

Kirk, T. K. Higuchi and H.M. Chang 1980. Lignin Biodegradation; Microbiology, Chemistry and Potential Applications. CRC Press, Boca Raton, Florida

Kleifeld, O and Chet I. 1992 *Trichoderma hazianum* interaction with plants and effects on growth Response, Plants and Soil Vol 144 No3 pp267-272

Kohlmeyer, J. 1969. Marine fungi of Hawaii including the new gen Heliscus. Can. J. Bot. 47: 1469-1487.

Kuthubutheen, A. J. 1984. Leaf surface fungi associated with *Avicennia alba* and *Rhizophora mucronata* in Malasia. p. 153-171. In E. Soepadmo, A. V. Rao and D. J. Macintosh(eds). Proc. Asia.

Lee, J. 1997. Biological conversion of lignocellulose biomass to ethanol. Journal of Biotechnology. 56:1-24.

Liming and Xueliang.2004 Biores Technol .91:259-262

Lowry, O.H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Determination of protein with the Folin- Ciocalteau reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-270.

Meepol, W.2002. Litter production and site characteristics in relation to structure and composition of mangrove forest in Raong province southern Thailand. PhD Thesis University of the Phillppines Los Banos.

Smith, V.L. W.F. Wilcox and G.E. Harman. 1990. Potential for biological control of *Phythophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. Phytopathol. 80: 880-885.

Sukhan, K. 2001. Decomposition Rates and Associated Degradation Fungi on mangrove Leaf Litters of *Rhizophora apiculata* and *A. alba* at Thachine estuary Samut Sakhon Province. PhD Thesis. Kasatsart University, Bangkok Thailand.

Tronsmo, A. and C. Dennis. 1983. The use of Trichoderma species to control strawberry fruit rots. Plant. Pathol . 85:449-455.

Tangnu, S. K. 1982. Process development for ethanol production basec on enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. Process Biochemistry. May/June: 36-49.

Yedidia ,I., A.K. Srivastva, Y. Kapunik, and I. Chet. 2001. Effect of *Trichoderma hazianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant and soil 235(2): 235-243.

Wood, T. M. and K. M. Bhat. 1988. Method for Measuring Cellulase Activity. Method in Enzymol. 160: 87-91.

แหล่งพันธุกรรมจุลินทรีย์. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก : http://web.agri.cmu.ac.th/ppath/course/360301/lesson2.pdf. (สืบค้นเมื่อวันที่ 17 กุมภาพันธ์ 2554).

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อรา

อาหารเลี้ยงเชื้อรา

Potato Dextrose Agar

ประกอบด้วย

Potato	200	g
Dextrose	20	g
Agar	15	g
Distilled Water	1	liter

วิธีการเตรียม

1. นำมันฝรั่งมาปอกเปลือก แล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดเท่ากับลูกเต๋า

2. นำมันฝรั่งมาต้มกับน้ำที่สะอาด ประมาณ 1 ลิตร โดยใช้ไฟอ่อนๆ ทั้งนี้เพราะถ้าใช้ไฟแรง มันฝรั่งอาจจะเปื่อยยุ่ย

3. ให้กรองเอากากมันฝรั่งออก แล้วต้มน้ำที่กรองต่อไป จากนั้นจึงเติมน้ำตาล Dextrose ในอัตราส่วนตามสูตรลงไป หรืออาจจะใช้น้ำตาลทราย ในประมาณเท่าๆ กันแทนก็ได้แล้วให้คนจนกระทั่งน้ำตาลละลายหมด

4. เติมผงวุ้นโดยนำไปละลายกับน้ำก่อนจนละลายหมดแล้วนำมาต้มรวมกับอาหารที่เตรียมไว้

5. เมื่ออาหารวุ้นละลายหมดแล้วจึงนำอาหารมาบรรจุขวด

6. นำขวดอาหารวุ้นมานึ่งฆ่าเชื่อด้วยหม้อนึ่งความดัน โดยใช้ความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นานประมาณ 15-20 นาที

Malt Extrct Agar

Malt Extrct	25	g
Agar	15	g
Distilled Water	1	liter

นำส่วนประกอบข้างต้นมาต้มให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ให้เย็นและนำมาฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน โดยใช้ความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นานประมาณ 15-20 นาที

2. ละลายให้เข้ากันแล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน โดยใช้ความดันที่15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นานประมาณ 15-20 นาที

การเตรียมอาหารหลักตรวจสอบเอนไซม์ Hemicellulolytic (Xylanolytic)

เตรียมอาหารหลัก Xylanolysis basal media (XBM) ดังนี้

$C_4H_{12}N_2O_6$	5	g
KH_2PO_4	1	g
$MgSO_47H_2O$	0.5	g
Yeast Extract	0.1	g
$CaCl_22H_2O$	0.001	g
Distilled Water	1000	ml

1. ละลายส่วนผสมดังกล่าวให้เข้ากัน นำ stock media (XBM) 100 มิลลิลิตร เติม xylan 4 กรัม และ Agar 1.6 กรัม ต้มละลายให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เย็น

2. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน โดยใช้ความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นานประมาณ 15-20 นาที

การเตรียมอาหารย่อยฟางข้าว Fahraeus

ประกอบด้วย

Glucose or Dextrose	20.00	g
L-Asparagine	2.50	g
L-Phenylalanine	0.150	g
Adenine	0.0275	g
Thiamine-HCl	50.00	g
KN_2PO_4	1.00	g
$Na_2HPO_4.2H_2O$ (Anhydrous)	0.50	g
$MgSO_4.4H_2O$	0.010	g
$ZnSO_4.5H_2O$	0.0010	g
$FeSO_47H_2O$	0.010	g
$CuSO_45H_2O$	0.002	g
Distilled Water	1	lit
Agar	15-20	g/lit

Czapek's Agar (CZA)

NaNO	3	g
KHPO	1	g
KCI	0.50	g
MgSo7HO	0.50	g
Feso7HO	0.01	g
Sucrose	30.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1.0	liter

นำส่วนประกอบข้างต้นมาต้มให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ให้เย็นและนำมาฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน โดยใช้ความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นานประมาณ 15-20 นาที

การเตรียมอาหารสูตรหลัก (Lignin Modifying Enzyme Basal Media/ LBM)

KH_2PO_4	1	g
$C_4H_{12}N_2O_6$	0.5	g
$MgSO_47H_2O$	0.5	g
$CaCl_22H_2O$	0.001	g
Yeast Extract	0.01	g
$CuSO_45H_2O$	0.001	g
$Fe_2(SO_4)_3$	0.001	g
$MnSO_4H_2O$	0.001	g
Distilled Water	1000	ml

การเตรียมอาหารทดสอบเอนไซม์ Peroxidase โดยวิธี Azure-B agar

1. นำส่วนประกอบข้างต้นมาต้มให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำ stock media (LBM) 100 มิลลิลิตร เติม Azure-B 0.01 กรัม และ Agar 1.6 กรัม

2. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน โดยใช้ความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นานประมาณ 15-20 นาที

การเตรียมอาหารทดสอบเอนไซม์ Laccase โดยวิธี ABTS agar

1. นำ stock media (LBM) 100 มิลลิลิตร เติม ABTS (2,2-azion-bis(3-thylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) 0.01 กรัม และ Agar 1.6 กรัม

ละลายน้ำให้เข้ากันและนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน โดยใช้ความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นานประมาณ 15-20 นาที

วิธีการใช้เครื่อง pH meter

1. เปิดเครื่อง หมุนปุ่มไปที่ค่าที่ต้องการวัด pH

2. ทำการ Calibrate โดยจุ่มหัว Probe ลงใน Buffer แล้วหมุนปุ่มด้านขวามือสุดให้ตรงกับค่าของ Buffer ที่เตรียมไว้

3. นำตัวอย่างดิน 1 กรัม ที่ละลายน้ำ 10 มิลลิลิตร ไปวัดค่า pH

4. เมื่อใช้งานเสร็จแล้วล้างหัว Probe ด้วย Deionized แล้วเช็ดให้แห้ง เก็บหัว Probe ไว้ในที่ครอบที่ใส่สำลีชุบน้ำ

หมายเหตุ ล้างหัว Probe ด้วยน้ำ Deionized แล้วเช็ดให้แห้ง ทุกครั้งก่อนการวัดค่าตัวอย่างตัวต่อไป

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์หาปริมาณธาตุอาหารในดิน

การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัส (P_2O_5)

หลักการ

วิธีการหาฟอสฟอรัสในรูปนี้จะใช้วิธีที่เรียกว่า Colorimetric method มีสองวิธี ซึ่งใช้วิธีทำให้เกิดสีในสารตัวอย่าง แต่ในที่นี้จะขอกล่าวเพียงวิธีเดียว โดยฟอสเฟสจะรวมกับแอมโมเนียมโมลิบเดทภายใต้สภาวะกรด เกิดเป็นแอมโมเนียมฟอสโฟโมลิบเดท จากนั้นจะให้ทำปฏิกิริยาต่อกับแวนาเดียมจะเกิดเป็น Vanadomolybdophosphosporic ซึ่งให้สีเหลือง ความเข้มข้นสีเหลืองนี้เป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้นของฟอสเฟตในสารตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม (จดน้ำหนักละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) เติมกรด HNO_3 20-30 มิลลิลิตร แล้วตามด้วย $HClO_4$ 70% 10-20 ml นำไปต้มจนสารละลายใสอาจมีตะกอนอยู่บ้างบางส่วน ทิ้งไว้ให้เย็น กรองสารละลายแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร อย่างละขวด เติม 20 มิลลิลิตร Molybdovanadate reagent ทั้งสองขวด ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกันกับสารละลายมาตรฐาน

ทำ Blank ของสารตัวอย่างโดย เติมกรด HNO_3 20-30 มิลลิลิตร แล้วตามด้วย $HClO_4$ 70% 10-20 มิลลิลิตร ต้มใช้เวลาเท่ากับที่ใช้ย่อยตัวอย่าง ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกันกับสารละลายมาตรฐาน

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. UV/Vis spectrophotometer (Shimadzu UVl60l)
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
3. ชุดย่อยตัวอย่าง
4. ชุดกรอง
5. เครื่องแก้ว ขวดปรับปริมาตร

สารเคมี

1. Ammonium molybdatetetrahydrate
2. Ammonium metavanadate
3. $HClO_4$ 70%
4. KH_2PO_4

5. HNO_3 65%

6. DI H_2O

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลาย Molybdovanadate reagent

ละลาย 25 กรัม ammonium molybdatetetrahydrate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.H_2O$) ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ละลาย 1.25 กรัม ammonium metavanadate (NH_4VO_3) ในน้ำร้อนอย่างน้อย 25 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติม 70% $HClO_4$ 225 มิลลิลิตร (หรือกรด HCl เข้มข้น 330 มิลลิลิตร) จากนั้นรวมทั้งสองสารละลาย ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. เตรียม Phosphate standard solution

อบ KH_2PO_4 (52.15% P_2O_5) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในโถอบเพื่อเตรียมชั่งน้ำหนักต่อไป โดยเตรียมสารละลายให้มีความเข้มข้นดังตาราง

ตารางที่ 23 แสดงความเข้มข้นของ KH_2PO_4

ขวดที่	น้ำหนัก KH_2PO_4 กรัม	ปรับปริมาตร (ml)	ความเข้มข้น (mg/ml)
1	0.0767	100	
2	0.0959	100	
3	0.1151	100	
4	0.1342	100	
5	0.1534	100	
6	0.1732	100	
7	0.1918	100	

ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวอยู่ในช่วง 0.4-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ppm)

3. เตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve)

ปิเปต 5 มิลลิลิตร ของสารละลายมาตรฐานในข้อ 2 ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำ 45 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 20 มิลลิลิตร Molybdovanadate reagent แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

ทำ blank ของสารละลายมาตรฐานที่เตรียมโดยเติม 20 มิลลิลิตร Molybdovanadate reagent แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4. การวัดค่าการดูดกลืนแสง

4.1 ปิดเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu UVl60l) ตั้งค่าความยาวคลื่นที่ 400 นาโนเมตร นำสารละลาย blank ใส่ลงใน cell รับตัวอย่างจำนวน 2 cell แล้วนำไปวางตรงช่องรับ cell เพื่อทำการ set Zero กดปุ่ม zero

4.2 จากนั้นนำ cell ส่วนที่อยู่ตรงตำแหน่ง sample ออกมาล้าง cell ให้สะอาด ถ่ายสารละลายความเข้มข้นจุดที่ 1 ลงไปล้าง cell ก่อน 1 ครั้ง แล้วจึงถ่ายสารละลายเข้มข้นเดิมลงไปใหม่ เช็ดส่วนรับแสงของ cell ให้ไม่มีรอยโดยการซับด้วยกระดาษชำระ

4.3 นำ cell ที่บรรจุสารละลายนี้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ตั้งค่าไว้ บันทึกค่าการดูดกลืนแสง

ตารางที่ 24 ตัวอย่างตารางบันทึกค่าการดูดกลืนแสง

ขวดที่	ความเข้มข้น (P_2O_5) mg/ml	ค่าการดูดกลืน (Abs) ที่ 400 nm
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
Sample1		

การคำนวณ ผลการวิเคราะห์

$$\%\ (P_2O_5)\ (w/w) = \frac{\text{ค่าที่เทียบได้จากกราฟ (mg/ml)} \times 10^3}{5 \times \text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

การวิเคราะห์ไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldalh Teast

หลักการ

วิธีนี้เป็นการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบให้เปลี่ยนเป็นสารประกอบเกลือของแอมโมเนีย โดยใช้กรด H_2SO_4 และมี $CuSO_4.5H_2O$ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและใช้ K_2SO_4 เป็นตัวช่วยลดจุดเดือด (ทำให้กระบวนการนี้เกิดได้เร็วขึ้นที่อุณหภูมิไม่สูง) ซึ่งกระบวนการจะเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ สารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจน ดังนี้

$$R\text{-}NH_2 + 7H_2SO_4 \xrightarrow[344\text{-}371]{\text{Catalyst, } K_2SO_4} 3CO_2 + 8H_2O + NH_4SHO_4 + 6SO_2$$

ซึ่งขั้นตอนต่อมาให้กลันเอาก๊าซแอมโมเนียออกมาด้วยการเติมด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นลงในสารละลายจากนั้นเก็บก๊าซแอมโมเนียไว้ในสารละลายกรดบอริก แล้วจึงนำไปไทเทรตหาปริมาณไนโตรเจนต่อไป

$$NH_3 + H_3BO_3 \leftrightarrow NH_4^+.H_2BO_3^-$$

$$NH_3 + NH_4.H_2BO_3 \leftrightarrow NH_4^{2+}.H_2BO_3^{2-}$$

$$NH_3 + (NH_4)_2.H_2BO_3 \leftrightarrow (NH_4)_3BO_3$$

ปฏิกิริยาระหว่างการไทเตรตเกลือโบเรตกับ กรด H_2SO_4แสดงได้ดังนี้

$$(NH_4)_3BO_3 + H_2SO_4 \leftrightarrow (NH_4)_2SO_4 + NH_4.H_2BO_3$$

$$2NH_4.H_2BO_3 + H_2SO_4 \leftrightarrow (NH_4)_2SO_4 + 2H_3BO_3$$

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชุดกลั่น Kjeldalh Test
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

สารเคมี

1. NaOH 40%
2. 4% Boric acid
3. H_2SO_4 เข้มข้น 98%
4. K_2SO_4

5. $CuSO_4.5H_2O$
6. Standard 0.05 M H_2SO_4
7. Indicator 0.1% methyl red ใน EtOH 1 ส่วน ผสมกับ 0.1% bromogresol green ใน EtOH 5 ส่วน
8. 0.05 M Na_2CO_3

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลายที่ต้องใช้
   1.1 ชั่ง 40% NaOH 200 กรัม ค่อยๆละลานในน้ำ 300 มิลลิลิตร ก่อนจากนั้นจึงปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร
   1.2 ชั่ง 4% Boric acid มา 20 กรัม ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร
   1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐาน 0.05 M H_2SO_4
   ปิเปต 98% กรด H_2SO_4 มา 2.78 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ซึ่งมีน้ำอยู่ในขวดแล้วเล็กน้อย (ประมาณ 100-200 มิลลิลิตร) จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้นี้ทำ standardize โดยการไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.05 M Na_2CO_3 โดยใช้ methyl red ผสมกับ bromogresol green เป็น indicator
   1.4 การเตรียม indicator
      4.1.1 ชั่ง indicator methyl red มา 0.1 กรัม นำมาละลายด้วย ethanol ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร
      4.1.2 ชั่ง indicator bromogresol green มา 0.1 กรัม นำมาละลายด้วย ethanol ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร
      4.1.3 นำสารละลายทั้งสองมาผสมกันในอัตราส่วน 1:5 ส่วน
2. การย่อยสลายตัวอย่าง (Digestion)
   2.1 ชั่งสารตัวอย่างประมาณ 1 กรัม (ตัวอย่างในรูปของแข็ง) ใส่ใน Kjeldalh flask เติม $CuSO_4.5H_2O$ 0.5 กรัม และ K_2SO_4 10 กรัมแล้วตามด้วย H_2SO_4 เข้มข้น 25 มิลลิลิตร นำไปตั้งบนเตาให้ความร้อนเบาๆ รอจนควันจางหายจึงใช้ความร้อนสูง โดยย่อยจนให้สารละลายใสและย่อยต่ออีก 1 ชั่วโมง หากที่คอขวดมีสีดำติดอยู่ให้รอจนขวดเย็นแล้วใช้น้ำกลั่นฉีดคราบดำลงไปที่ก้นขวดแล้วย่อยต่อจนไม่มีตะกอนสีดำ
   2.2 เตรียม Blank ดังเช่น 2.1 แต่ปราศจากสารตัวอย่าง

3. การกลั่น (Distillation)

3.1 นำตัวอย่างที่ย่อยแล้วทิ้งให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร เติม pumice stone เพื่อป้องกันการเดือดประทุ เตรียม 40% NaOH 130 มิลลิลิตร ต่อชุดน้ำกลั่นกับ Kjeldalh flask โดยให้ปลายของชุดควบแน่นจุ่มลงใน 4% Boric acid 50 มิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในขวดรูปชมพูขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆเติม 40% NaOH 130 มิลลิลิตร ลงใน Kjeldalh flask พร้อมให้ความร้อน กลั่นจนได้สารละลายลงมาในขวดรูปชมพูประมาณ 150 มิลลิลิตร

3.2 กลั่น Blank เช่นเดียวกับสารตัวอย่าง ข้อ 3.1

4. การไทเทรต (titration)

นำสารตัวอย่างที่กลั่นได้มาไทรเทรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.05 M H_2SO_4 โดยใช้ 0.1% methyl red ผสมกับ bromogresol green เป็น indicator (ใช้ 3-4 หยด)

การคำนวณ

$$\%\ N = \frac{(A - B) \times C \times 0.014 \times 100}{D}$$

A = ปริมาตรของ 0.05 M H_2SO_4 ที่ใช้ในตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของ 0.05 M H_2SO_4 ที่ใช้ใน Blank (มิลลิลิตร)

C = ความเข้มข้นของ H_2SO_4 (N) เมื่อ 0.05 M H_2SO_4 = 0.1 H_2SO_4

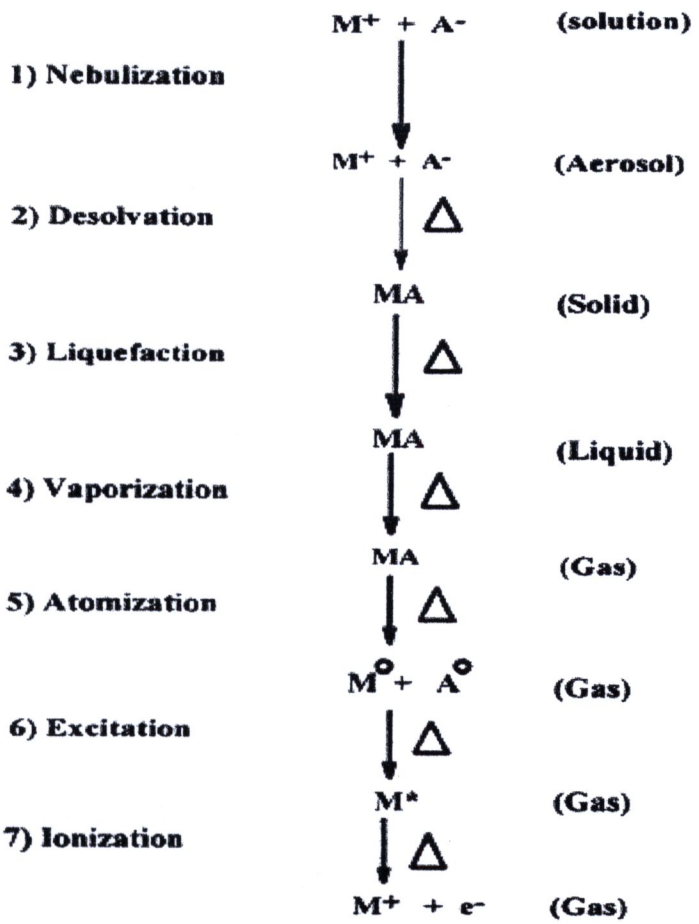
D = น้ำหนักของสารตัวอย่าง (กรัม)

การวิเคราะห์โพแทสเซียม (K_2O)

การวิเคราะห์โพแทสเซียมจะใช้หลักการวัดค่าการดูดกลืนแสงจากการที่อะตอมของโพแทสเซียมในสารตัวอย่างผ่านเข้าสู่ระบบการทำให้อะตอมเกิดการอะตอมไมล์ ซึ่งเรียกว่าเทคนิคทาง Atomic spectroscopy ซึ่งมีหลักการกว้างๆ ดังนี้

การจัดเรียงตัวอิเล็กตรอนของอะตอมของธาตุต่างๆ จะมีลักษณะเฉพาะของแต่ละธาตุ โดยเฉพาะเมื่อเราศึกษาการจักเรียงตัวของอิเล็กตรอน ธาตุโลหะเมื่ออยู่ในสภาวะพื้น (ground state) จะมีระดับพลังงานต่ำ เมื่ออิเล็กตรอนเหล่านี้ได้รับพลังงานที่เหมาะสมก็จะทำให้อิเล็กตรอนวงนอกของอะตอมถูกกระตุ้นให้ขึ้นไปสู่สภาวะกระตุ้น (excited state) ซึ่งสภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่ไม่อยู่ตัวอิเล็กตรอนจะกลับสู่สภาวะพื้น โดยคายพลังงานที่ได้รับออกมาในรูปของคลื่นแสง ที่มีความยาวคลื่นที่ต่างกันขึ้นอยู่กับความซับซ้อนของอิเล็กตรอนวงนอกของธาตุแต่ละธาตุ จากปรากฏการณ์ดังกล่าวเทคนิคทาง Atomic spectroscopy จึงอาศัยหลักการวัดปริมาณพลังงานที่ถูกดูดกลืนหรือคายออกมา มาใช้ในการติดตามปริมาณเฉพาะของธาตุแต่ละธาตุ

Flame process



จาก Flame process กระบวนการให้เกิดอะตอมไมล์ จำเป็นต้องอาศัยเชื้อเพลิง (อะเซตทีลีน) และตัวออกซิไดซ์ (อากาศ) โดยต้องปรับอัตราส่วนให้ได้สัญญาณการดูดกลืนสูงสุด

โดยอาศัยความสัมพันธ์ที่เป็นเชิงเส้นระหว่าง ความเข้มข้นของธาตุในสารละลายกับการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นเฉพาะของธาตุ ตามหลักของ Beer ดังสมการ

$$A = \in bc$$

A คือค่าการดูดกลืนแสง Absorbance (log Io/I)

b คือระยะทางที่แสงเดินทางผ่านการดูดกลืนแสง

c คือความเข้มข้นของสารที่ถูกดูดกลืน

$\in$ คือสัมประสิทธิการดูดกลืนแสง (absorption coefficient)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง Atomic Absorption Spectroscopy AAS (Perkin-Elmer Analyst 800)
2. Fume Hood
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

สารเคมี

1. กรด H_2SO_4 เข้มข้น 96% w/v
2. กรด $HClO_4$ เข้มข้น 70%
3. กรด HCl เข้มข้น 35%
4. สารละลายมาตรฐาน Standard Potassium เข้มข้น 100 ppm
5. DI H_2O

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารตัวอย่าง

กรณีตัวอย่างไม่ใช่ปุ๋ยให้ชั่งตัวอย่างมา 1 กรัม บันทึกน้ำหนักละเอียด ย่อยโดยเติมกรด HNO_3 30 มิลลิลิตร และกรด HCl 5 มิลลิลิตร ต้มจนสีของสารละลายใสหรือสีจางลง (ประมาณ 3 ชั่วโมง) จากนั้นกรองสารละลายแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร (หรือถ้าหากตะกอนที่เหลือมีอยู่เพียงเล็กน้อยให้ทำการปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ก่อน) จากนั้นจึงทำการกรองสารละลายที่ได้โดยทิ้งสารละลายที่ได้จากการกรองครั้งแรกไปก่อน

ประมาณ 10% ของสารละลายทั้งหมด จากนั้นจึงเริ่มเก็บสารละลายที่กรองได้แล้วนำไปทดลองขั้นต่อไป

กรณีตัวอย่างเป็นปุ๋ยให้ใช้ตัวอย่างจากการเตรียมเพื่อวิเคราะห์ P_2O_5 มาใช้ได้เลย

2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน

เจือจางสารละลายมาตรฐานดังตาราง

ตารางที่ 25 ตัวอย่างตารางการเจือจางสารละลายมาตรฐาน

ขวดที่	ปริมาตรที่ใช้จาก 1000 ppm	ความเข้มข้น (ppm)
1		
2		
3		
4		
5		

3. การวัดค่าการดูดกลืนแสงโดย AAS (set เครื่อง AAS โดยเทคนิคเปลวไฟ

การคำนวณหาร้อยละ K_2O จากร้อยละ K ที่ได้จากการวิเคราะห์โดย AAS

การคำนวณ

$$\% K_2O = \frac{\%K \times 94}{78}$$

94 = น้ำหนักโมเลกุลของ K_2O

78 = น้ำหนักอะตอมของ K

ตารางที่ 26 ตารางบันทึกผลค่าการดูดกลืนแสงโดย AAS

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน (ppm) หรือ mg/l	ปริมาณโพแทสเซียมที่วิเคราะห์ได้ (g)
1. น้ำหนัก.....กรัม		
2. น้ำหนัก.....กรัม		
3. น้ำหนัก.....กรัม		

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

สารเคมี

1. สารละลาย เตรียมโดยชั่ง DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) 10 กรัม ละลายในน้ำ 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่าง (ชั่ง NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในน้ำร้อนจนสารละลายใส จากนั้น ชั่ง potassium sodium tartrate (Rochelle Salt) 300 กรัม ค่อยๆเติมลงไปทีละน้อย จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.1000 กรัม ละลายในน้ำปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำมาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

ตารางที่ 27 แสดงความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ปริมารสารละลายกลูโคสมาตรฐาน และ ปริมาณน้ำกลั่นของการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

หลอดที่	ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน(ไมโครกกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมารสารละลายกลูโคส มาตรฐาน 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร (ไมโครลิตร)	ปริมาณน้ำกลั่น (ไมโครลิตร)
1	0	0	5.0
2	0.2	1.0	4.0
3	0.4	2.0	3.0
4	0.6	3.0	2.0
5	0.8	4.0	1.0
6	1.0	5.0	0.0

วิธีการทดลอง

1. ดูดสารละลายตัวอย่าง (ที่ผ่านการแยกเซลล์ออกแล้ว) หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (แต่ละความเข้มข้น) ที่ต้องการวิเคราะห์ 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงไป

3. นำหลอดทดลองดังกล่าวไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที

4. แช่หลอดทดลองลงในน้ำเย็น จนตัวอย่างเย็นลง

5. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

6. ในการวัดใช้น้ำกลั่นเป็น Blank โดยทำเหมือนการวัดตัวอย่างทุกขั้นตอน

7. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในสารละลาย หรือคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar)
ด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Phenol-sulfuric method)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (Sulfuric acid; reagent grade 95.5% specific gravity 1.84)

2. ฟีนอล 5% โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งฟีนอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.0400 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อลิตร จากนั้นนำมาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

ตารางที่ 28 แสดงความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ปริมารสารละลายกลูโคสมาตรฐาน และ ปริมาณน้ำกลั่นของการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ด้วยวิธีฟีนอลซัลฟูริก (Phenol-sulfuric method)

หลอดที่	ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมารสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ไมโครลิตร)	ปริมาณน้ำกลั่น (ไมโครลิตร)
1	0	0	5000
2	10	125	4875
3	20	250	4750
4	40	500	4500
5	60	750	4250
6	80	1000	4000

วิธีการทดลอง

1. ปีเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (แต่ละความเข้มข้น) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมฟีนอล 5% ลงไป 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตรลงไปอย่างรวดเร็ว โดยค่อยๆปล่อยกรดซัลฟูริกลงไปด้านข้างหลอด เขย่าให้เข้ากัน ระวังความร้อนที่เกิดขึ้น

3. ตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเขย่าอีกครั้ง ทิ้งไว้อีกประมาณ 20 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

5. ในการวัดใช้น้ำกลั่นเป็น Blank โดยทำเหมือนการวัดตัวอย่างทุกขั้นตอน

6. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในสารละลาย หรือคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 29 การเก็บรักษาความหลากหลายทางชีวภาพเชื้อรา

ลำดับที่	ชนิดเชื้อรา	รหัส	การเก็บรักษา			
			Subculture	Parafine	ในดิน	Lyophilyzation
1	*Acremonium* sp.	S1	/	/	/	/
2	*Ascomycetes* sp.	S2	/	/	/	/
3	*Ascomycetes perithecium*	S3	/	/	/	/
4	*Ascomycetes cleitothecium*	S4	/	/	/	/
5	*Aspergillus aculeatus*	S5	/	/	/	/
6	*Aspergillus ficuum*	S6	/	/	/	/
7	*Aspergillus flavipes*	S7	/	/	/	/
8	*Aspergillus foetidus*	S8	/	/	/	/
9	*Aspergillus flavus*	S9	/	/	/	/
10	*Aspergillus fumigatus*	S10	/	/	/	/
11	*Aspergillus japonicus*	S11	/	/	/	/
12	*Aspergillus niger group*	S12	/	/	/	/
13	*Aspergillus carbonarius*	S13	/	/	/	/
14	*Aspergillus tubingensis*	S14	/	/	/	/
15	*Aspergillus ochraceous*	S15	/	/	/	/
16	*Aspergillus oryzae*	S16	/	/	/	/
17	*Aspergillus phoenicis*	S17	/	/	/	/
18	*Aspergillus terreus*	S18	/	/	/	/
19	*Aspergillus tubingensis*	S19	/	/	/	/
20	*Aspergillus wentii*	S21	/	/	/	/
21	*Aspergillus eurotium*	S22	/	/	/	/
22	*Rhizopus* sp.	S23	/	/	/	/
ลำดับที่	ชนิดเชื้อรา	รหัส	การเก็บรักษา			
			Subculture	Parafine	ในดิน	Lyophilyzation
23	*Rhizoctonia* sp.	S24	/	/	/	/
24	*Curvularia* sp.	S27	/	/	/	/

25	*Cunninghamella* sp.	S28	/	/	/	/
26	*Nigrospora* sp.	S32	/	/	/	/
27	*Penicillium* sp.	S33	/	/	/	/
28	*Trichoderma* sp.	S36	/	/	/	/
29	*Trichoderma autroviride*	S37	/	/	/	/
30	*Trichoderma koningii*	S38	/	/	/	/
31	*Trichoderma hamatum*	S39	/	/	/	/
32	*Trichoderma harzianum*	S40	/	/	/	/
33	*Trichoderma virens*	S41	/	/	/	/
34	*Trichoderma viride*	S42	/	/	/	/
35	*Trichoderma asperellum*	*S31	/	/	/	/
รวม			35	35	35	35

ตารางที่ 30 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA)

ลำดับที่	ชนิดเชื้อรา	รหัส	วันที่						
			1	2	3	4	5	6	7
1	*Acremonium* sp.	S1	3	11	20	27	32	38	41
2	*Ascomycetes* sp.	S2	10	17	23	28	35	40	45
3	*Ascomycetes perithecium*	S3	5	19	26	28	37	41	46
4	*Ascomycetes cleitothecium*	S4	16	70	>90	>90	>90	>90	>90
5	*Aspergillus aculeatus*	S5	9	22	27	31	35	38	42
6	*Aspergillus ficuum*	S6	6	17	20	24	27	32	35
7	*Aspergillus flavipes*	S7	2	13	21	27	32	38	43
8	*Aspergillus foetidus*	S8	6	17	21	26	30	34	38
9	*Aspergillus flavus*	S9	6	20	30	38	44	57	65
10	*Aspergillus fumigatus*	S10	2	17	25	30	36	49	55
11	*Aspergillus japonicus*	S11	10	25	48	50	53	55	58
12	*Aspergillus niger group*	S12	8	17	23	29	33	36	39
13	*Aspergillus carbonarius*	S13	10	18	24	30	32	35	39
14	*Aspergillus tubingensis*	S14	7	16	24	31	34	37	40
15	*Aspergillus ochraceous*	S15	4	11	22	33	40	47	55
16	*Aspergillus oryzae*	S16	7	16	26	39	44	49	56
17	*Aspergillus phoenicis*	S17	6	16	27	31	37	40	44
18	*Aspergillus terreus*	S18	10	20	29	35	43	47	52
19	*Aspergillus tubingensis*	S19	7	15	27	32	38	41	45
20	*Aspergillus wentii*	S21	8	18	27	35	42	46	50
21	*Aspergillus eurotium*	S22	5	19	37	52	65	>90	>90
22	*Rhizopus* sp.	S23	50	>90	>90	>90	>90	>90	>90
23	*Rhizoctonia* sp.	S24	25	71	>90	>90	>90	>90	>90
24	*Curvularia* sp.	S27	9	23	45	59	70	>90	>90
25	*Cunninghamella* sp.	S28	16	40	59	>90	>90	>90	>90
26	*Nigrospora* sp.	S32	11	20	29	36	40	48	54

ลำดับที่	ชนิดเชื้อรา	รหัส	วันที่						
			1	2	3	4	5	6	7
27	*Penicillium* sp.	S33	7	19	27	44	50	56	63
28	*Trichoderma* sp.	S36	14	55	63	>90	>90	>90	>90
29	*Trichoderma autroviride*	S37	20	60	72	>90	>90	>90	>90
30	*Trichoderma koningii*	S38	16	65	>90	>90	>90	>90	>90
31	*Trichoderma hamatum*	S39	31	>90	>90	>90	>90	>90	>90
32	*Trichoderma harzianum*	S40	17	74	>90	>90	>90	>90	>90
33	*Trichoderma virens*	S41	10	52	>90	>90	>90	>90	>90
34	*Trichoderma viride*	S42	15	48	>90	>90	>90	>90	>90
35	*Trichoderma asperellum*	*S31	17	55	>90	>90	>90	>90	>90

หมายเหตุ - หน่วยเป็นมิลลิเมตร (mm)

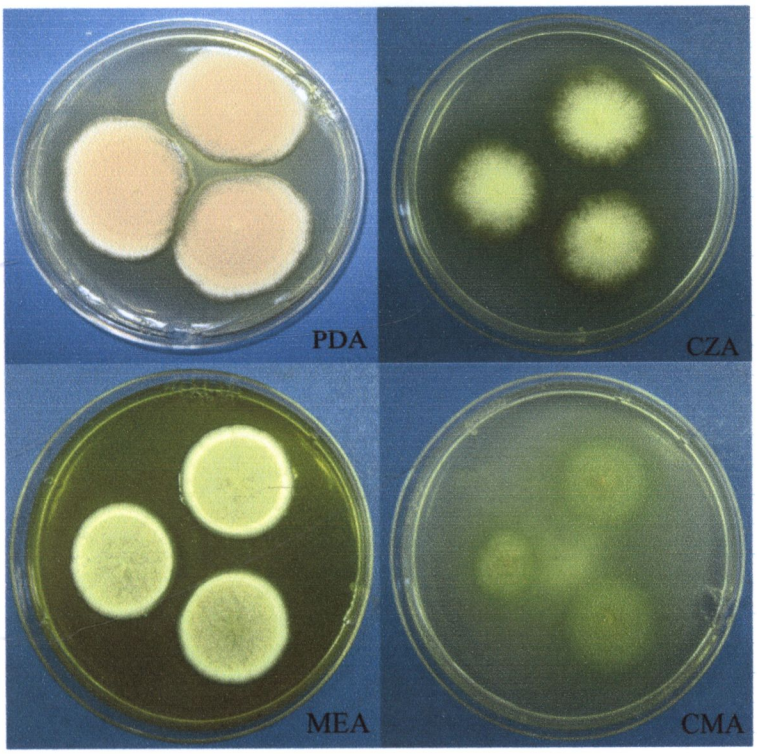
- >90 คือ เชื้อรามีการเจริญมากไม่สามารถวัดได้

ตารางที่ 31 การจำแนกเชื้อราจากแหล่งตัวอย่าง

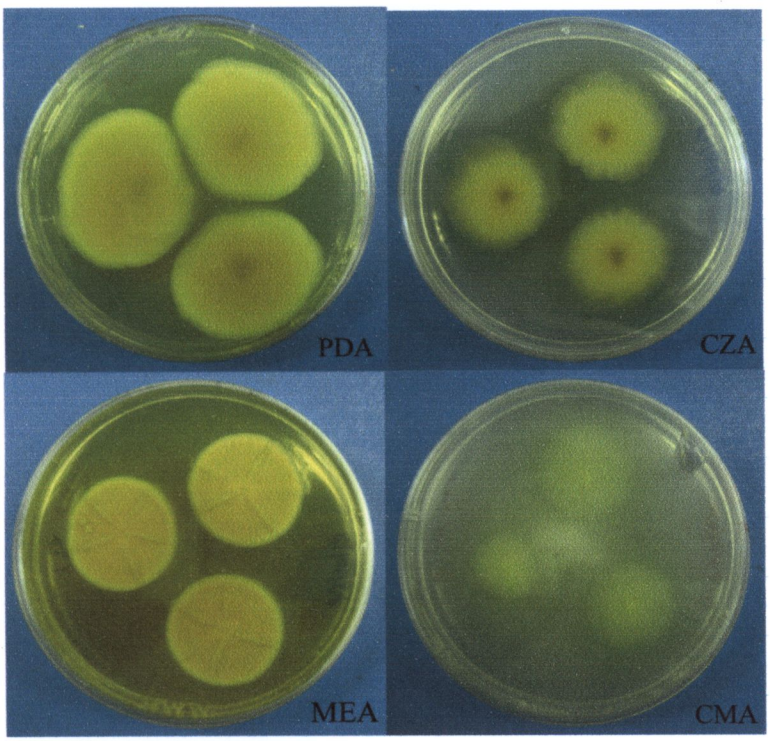
ที่	ชนิดเชื้อรา	รหัส	substates									
			ดินเลนปากแม่น้ำท่าจีน			ดินนากุ้ง	ผักโครงกางใบเล็ก	เมล็ดแสมขาว	เมล็ดแสมทะเล	ซากโครงกางใบเล็ก	ใบโครงกางใบเล็ก	ใบแสมขาว
			ฤดูร้อน	ฤดูฝน	ฤดูหนาว							
1	*Acremonium* sp.	S1	/		/							
2	*Ascomycetes* sp.	S2									/	
3	*Ascomycetes perithecium*	S3									/	
4	*Ascomycetes cleitothecium*	S4									/	
5	*Aspergillus aculeatus*	S5				/	/	/		/	/	/
6	*Aspergillus ficuum*	S6				/				/		
7	*Aspergillus flavipes*	S7			/	/						
8	*Aspergillus foetidus*	S8	/		/	/						
9	*Aspergillus flavus*	S9	/	/	/	/	/			/	/	/
10	*Aspergillus fumigatus*	S10	/	/	/	/	/	/		/		/
11	*Aspergillus japonicus*	S11	/		/	/	/	/		/	/	/
12	*Aspergillus niger group*	S12	/	/	/	/	/			/	/	/
13	*Aspergillus carbonarius*	S13					/	/		/		/
14	*Aspergillus tubingensis*	S14							/			
15	*Aspergillus ochraceous*	S15	/	/			/					
16	*Aspergillus oryzae*	S16					/			/		/
17	*Aspergillus phoenicis*	S17					/					
18	*Aspergillus terreus*	S18					/			/		/
19	*Aspergillus tubingensis*	S19					/					
20	*Aspergillus wentii*	S21			/							
21	*Aspergillus eurotium*	S22									/	
22	*Rhizopus* sp.	S23								/		/
23	*Rhizoctonia* sp.	S24										

ที่	ชนิดเชื้อรา	รหัส	substates									
			ดินเลนปากแม่น้ำท่าจีน									
			ฤดูร้อน	ฤดูฝน	ฤดูหนาว	ดินนาทุ่ง	ฝักโกงกางใบเล็ก	เมล็ดแสมขาว	เมล็ดแสมทะเล	ขากโกงกางใบเล็ก	ใบโกงกางใบเล็ก	ใบแสมขาว
24	*Curvularia* sp.	S27	/									
25	*Cunninghamella* sp.	S28								/		/
26	*Nigrospora* sp.	S32									/	
27	*Penicillium* sp.	S33	/	/	/		/			/	/	/
28	*Trichoderma* sp.	S36		/	/	/				/		
29	*Trichoderma autroviride*	S37	/								/	
30	*Trichoderma koningii*	S38									/	
31	*Trichoderma hamatum*	S39	/									
32	*Trichoderma harzianum*	S40	/									/
33	*Trichoderma virens*	S41	/		/							
34	*Trichoderma viride*	S42			/							
35	*Trichoderma asperellum*	*S31								/	/	
รวม			13	6	12	9	12	4	1	14	13	12

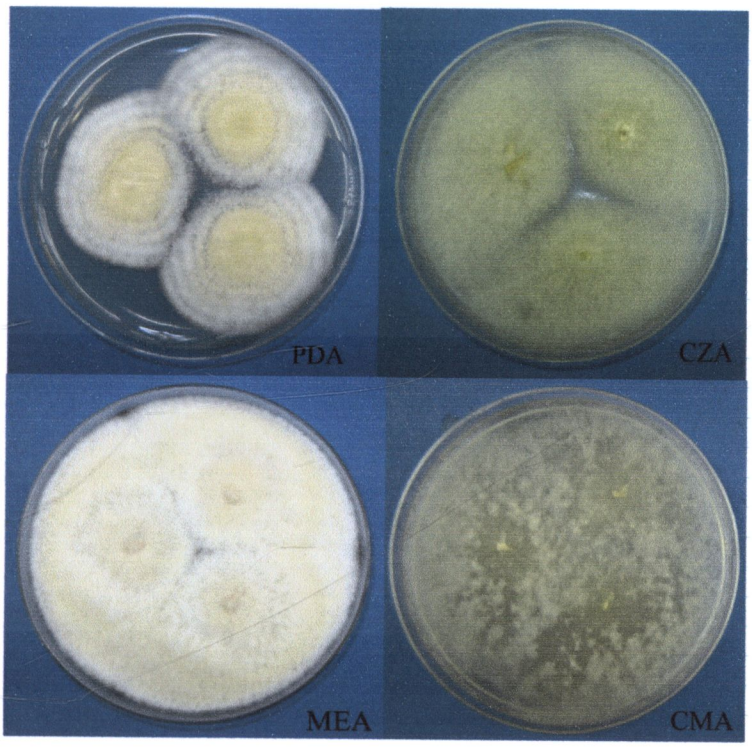
ผลการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร 4 ชนิด



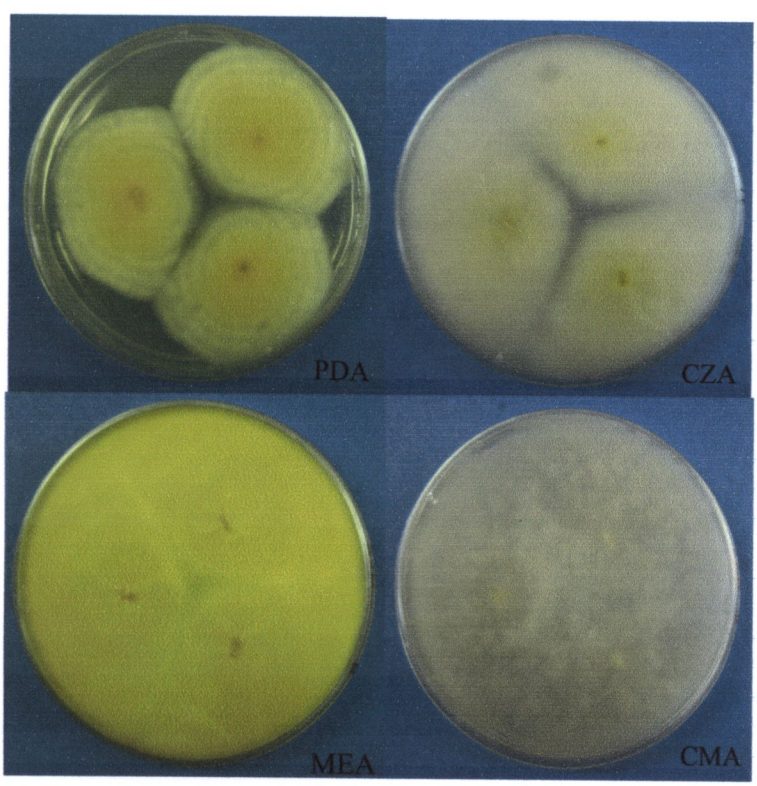
ภาพที่ 58 *Acremonium* sp. (S1)โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



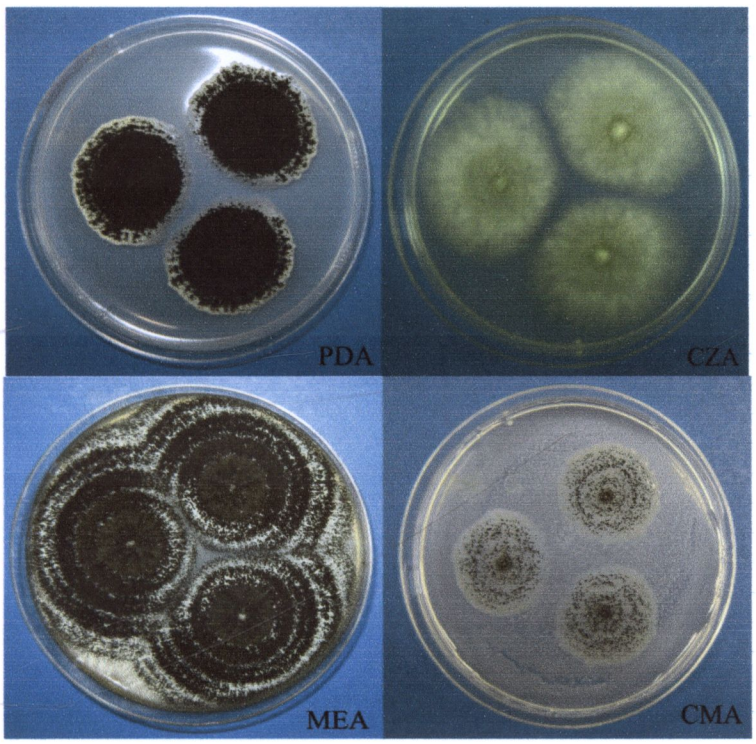
ภาพที่ 59 *Acremonium* sp. (S1) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



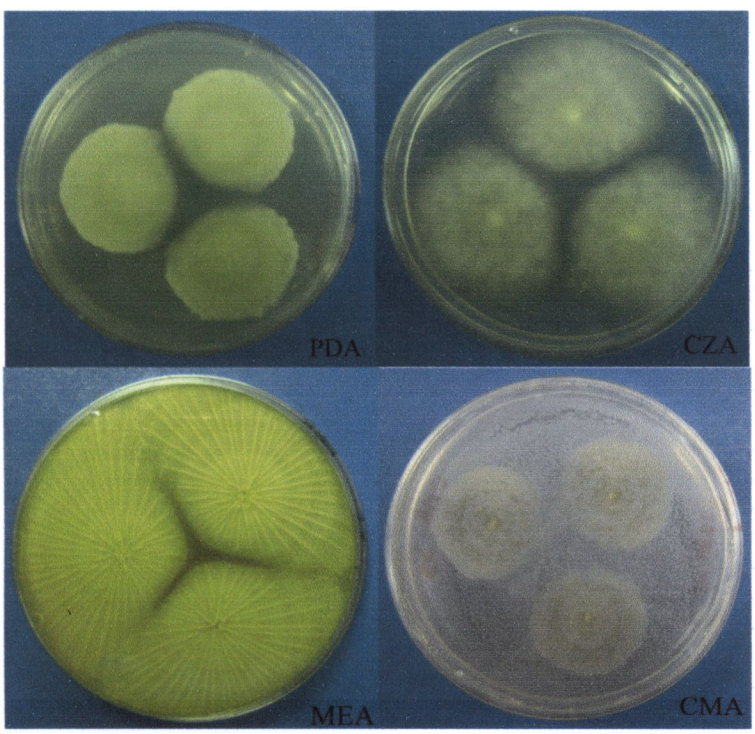
ภาพที่ 60 *Ascomycetes* sp. (S2) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



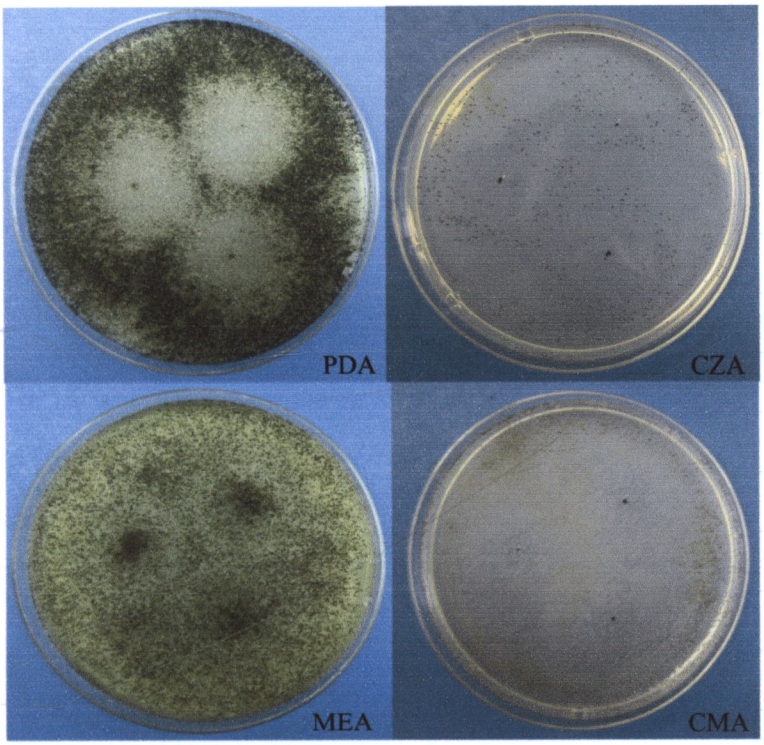
ภาพที่ 61 *Ascomycetes* sp. (S2) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



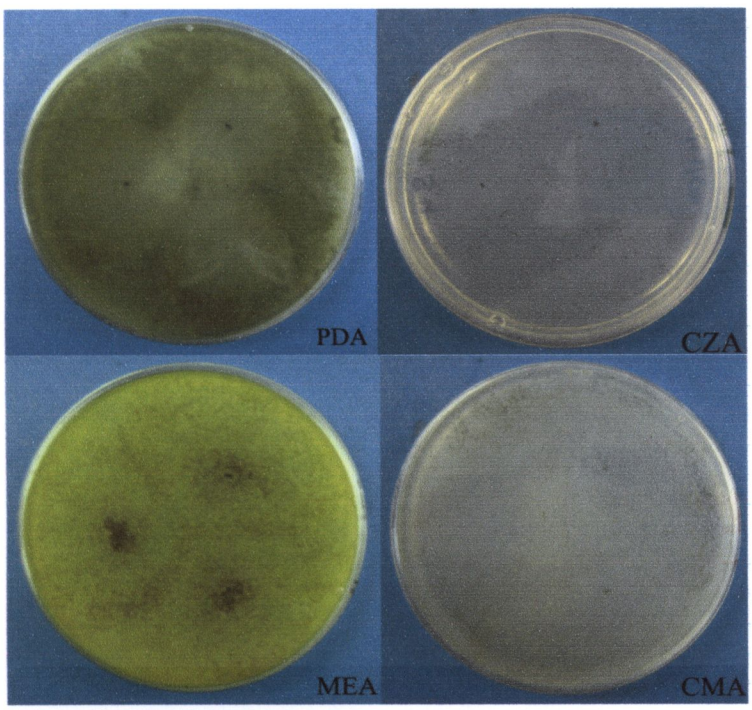
ภาพที่ 62 *Ascomycetes perithecium* (S3) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



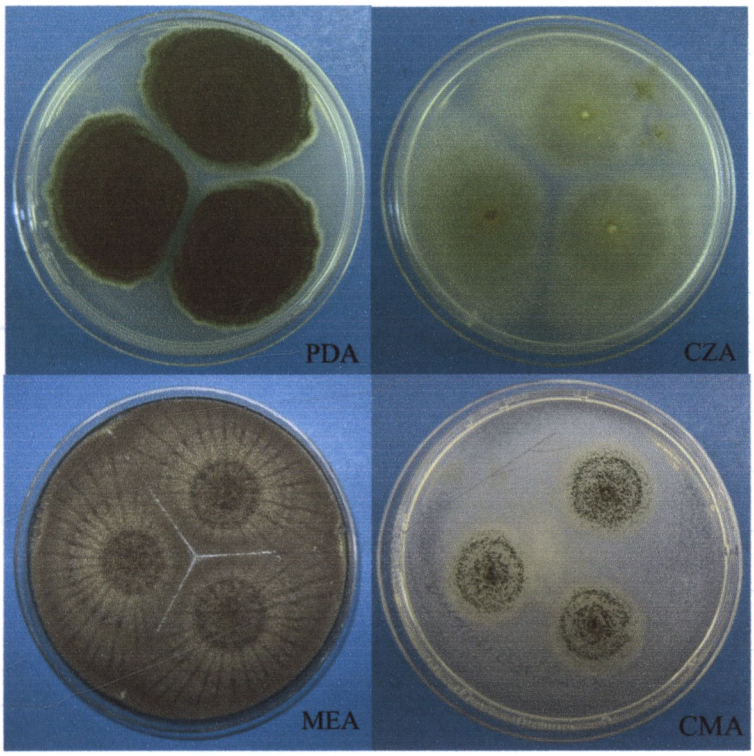
ภาพที่ 63 *Ascomycetes perithecium* (S3) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



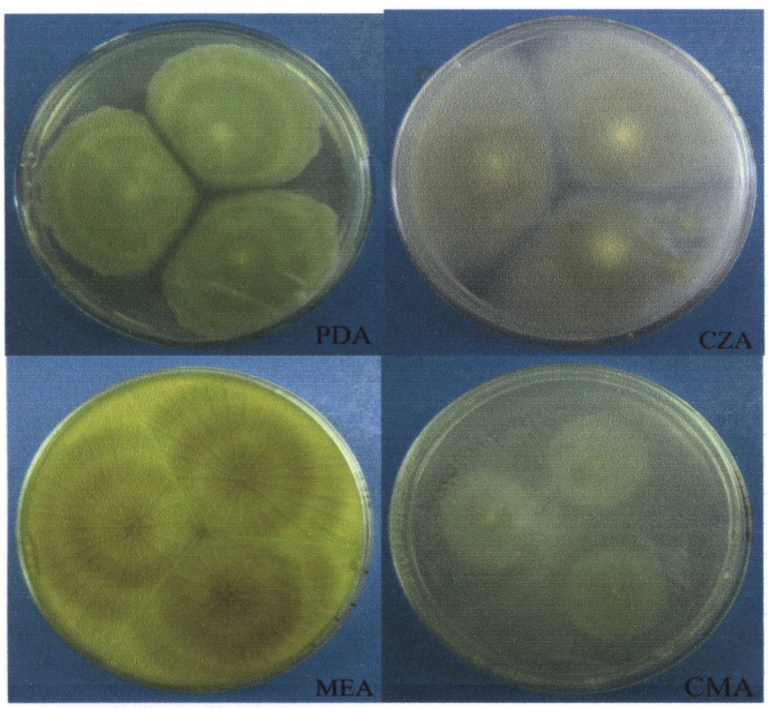
ภาพที่ 64 *Ascomycetes cleitothecium* (S4) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



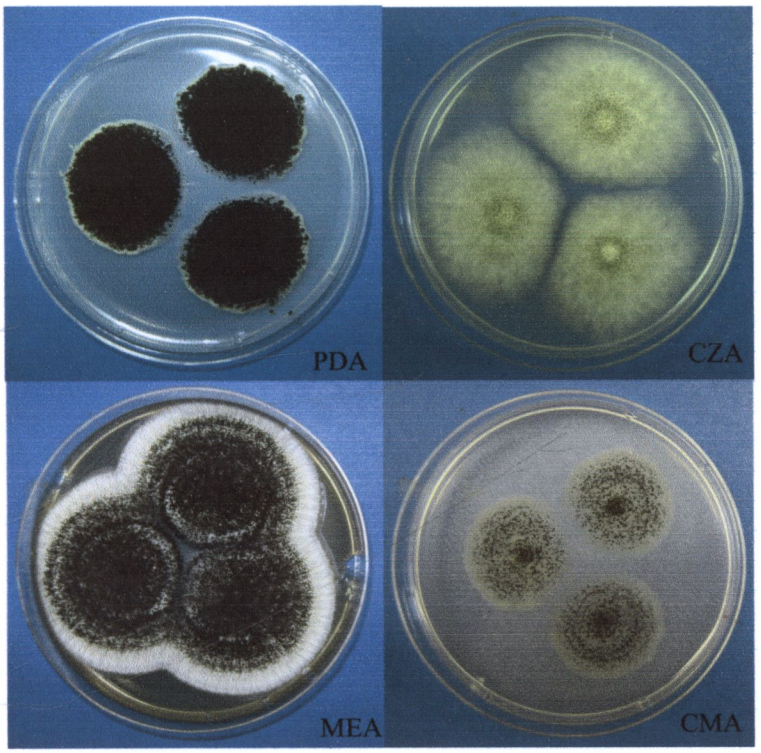
ภาพที่ 65 *Ascomycetes cleitothecium* (S4) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



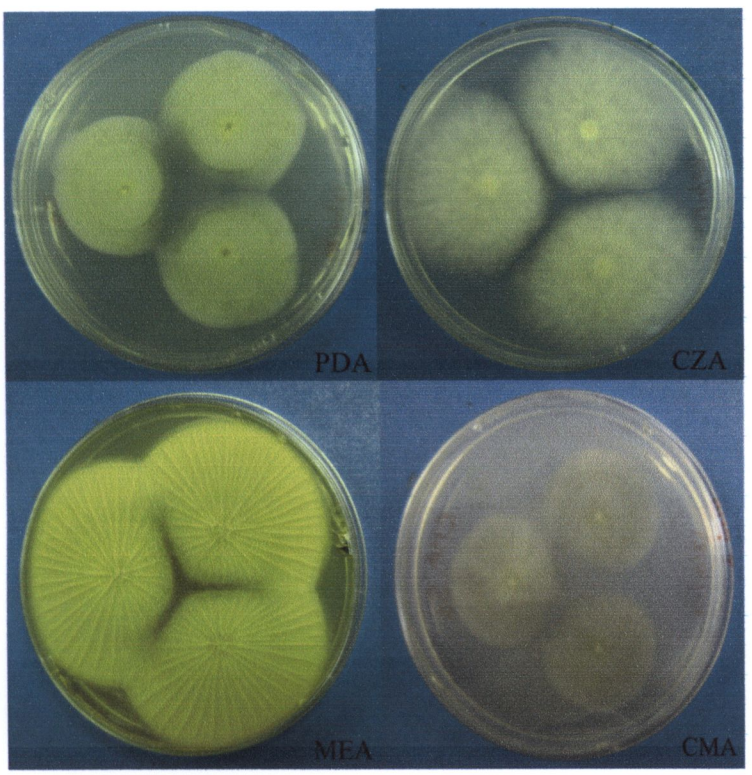
ภาพที่ 66 *Aspergillus aculeatus* (S5) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



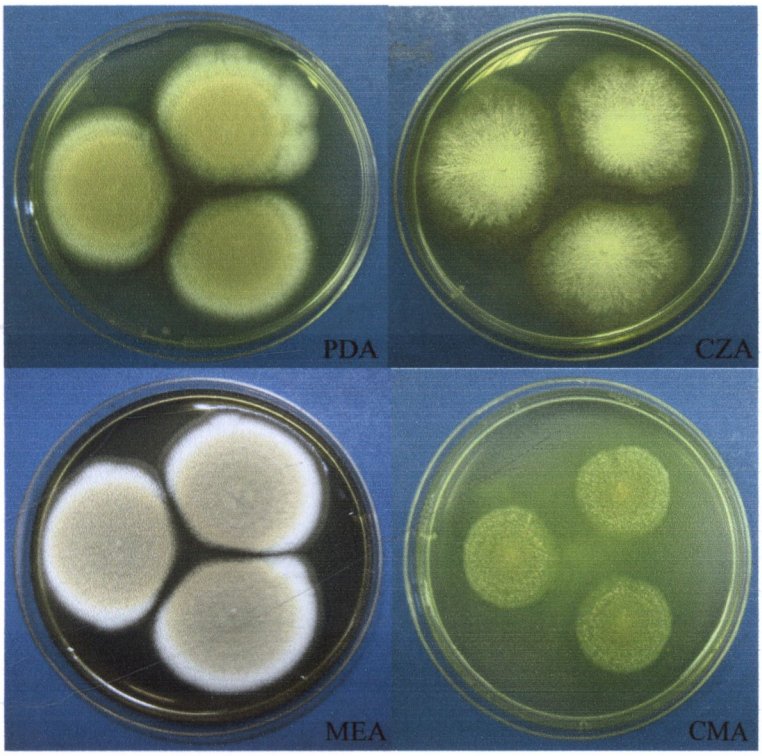
ภาพที่ 67 *Aspergillus aculeatus* (S5) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



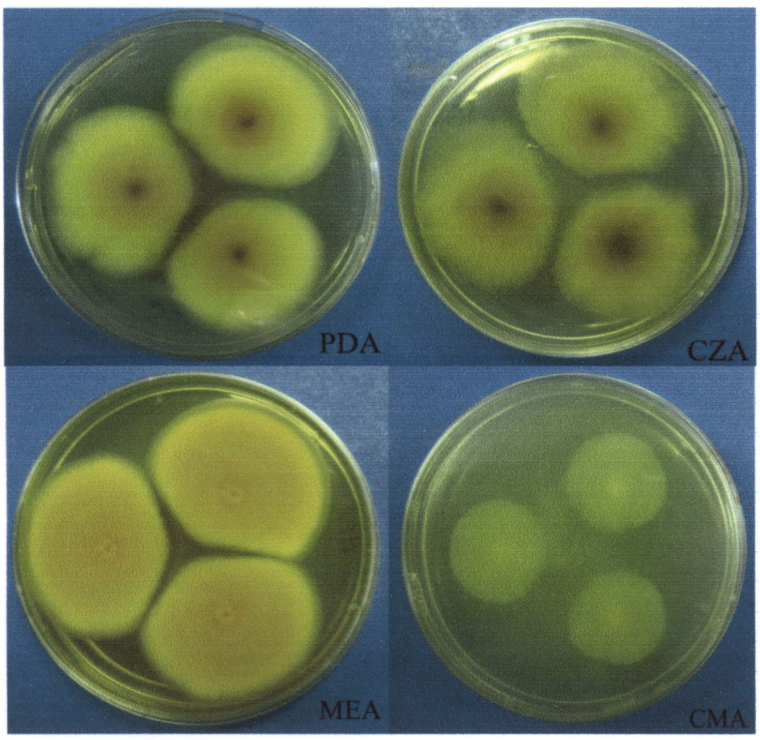
ภาพที่ 68 *Aspergillus ficuum* (S6) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



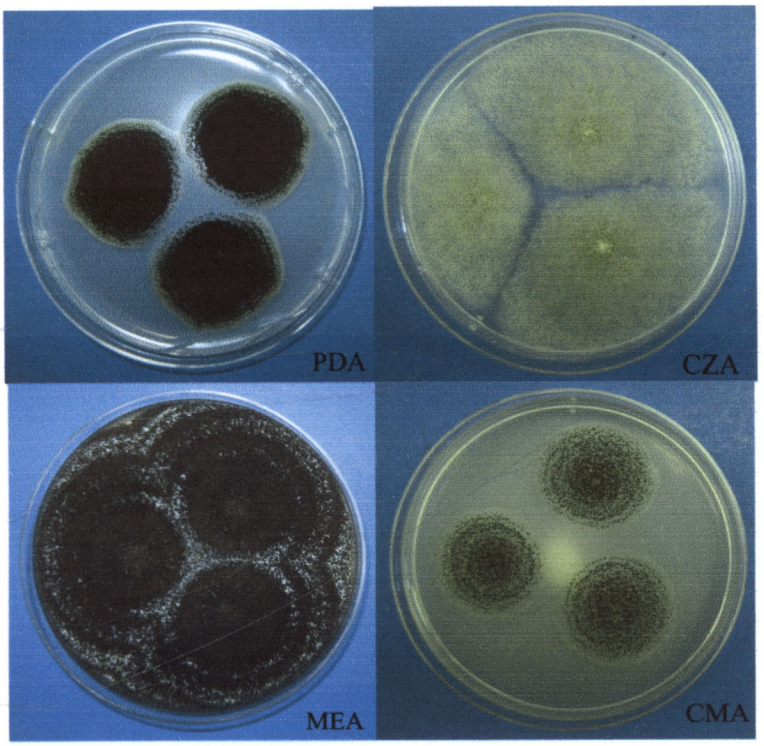
ภาพที่ 69 *Aspergillus ficuum* (S6) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



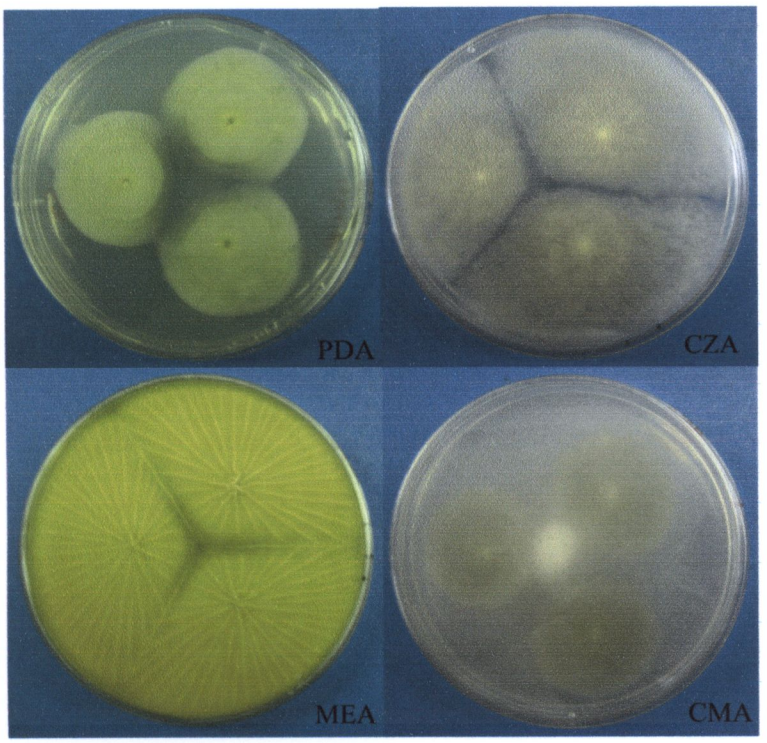
ภาพที่ 70 *Aspergillus flavipes* (S7) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



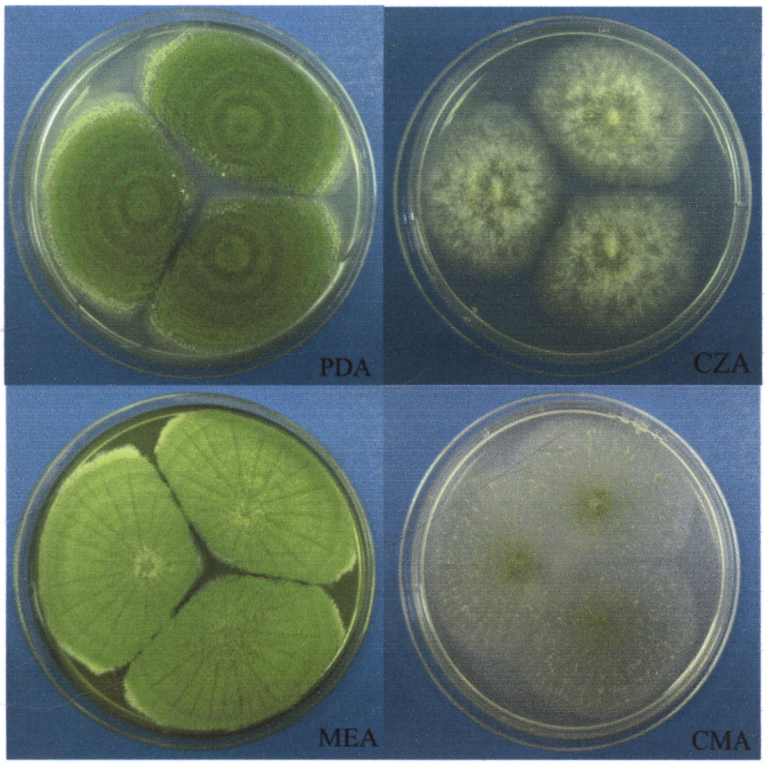
ภาพที่ 71 *Aspergillus flavipes* (S7) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



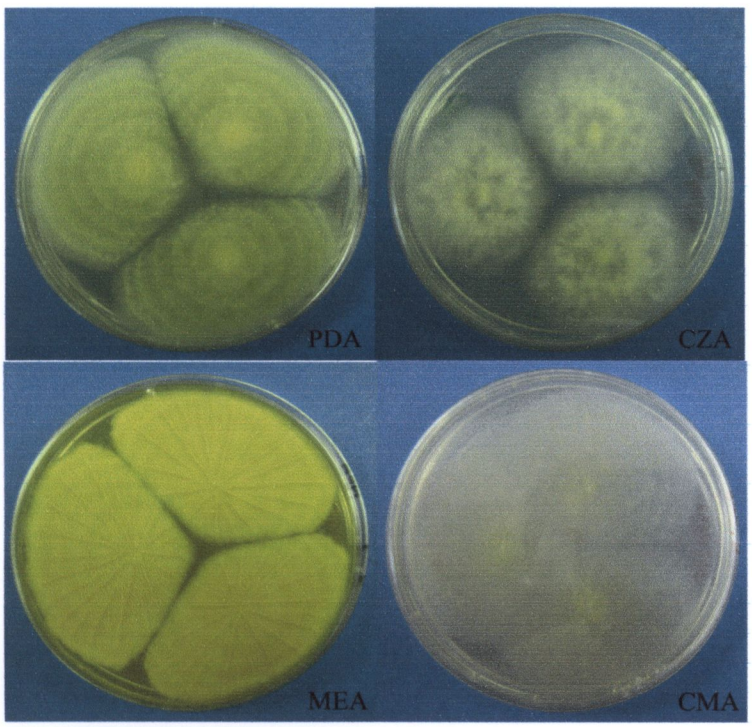
ภาพที่ 72 *Aspergillus foetidus* (S8) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



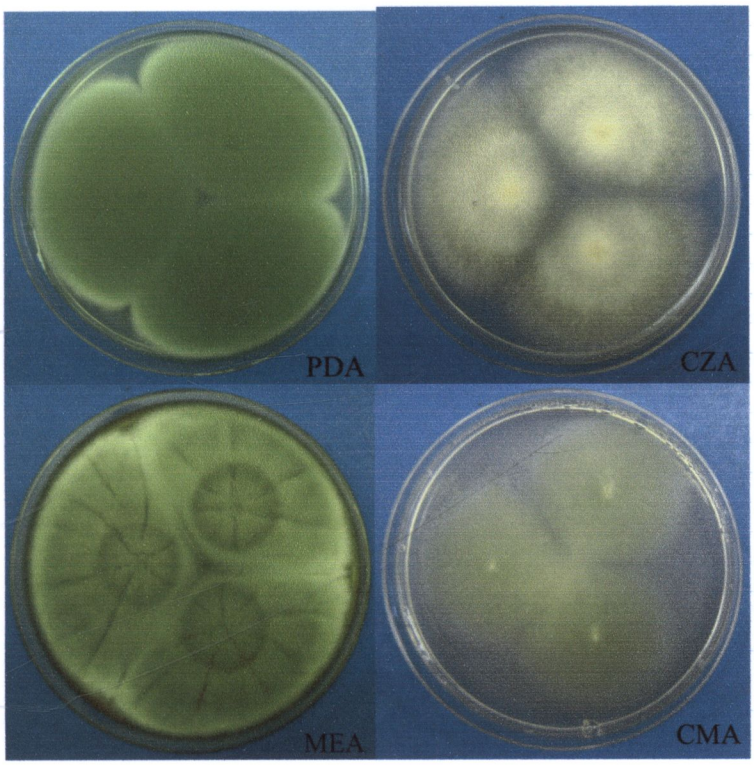
ภาพที่ 73 *Aspergillus foetidus* (S8) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



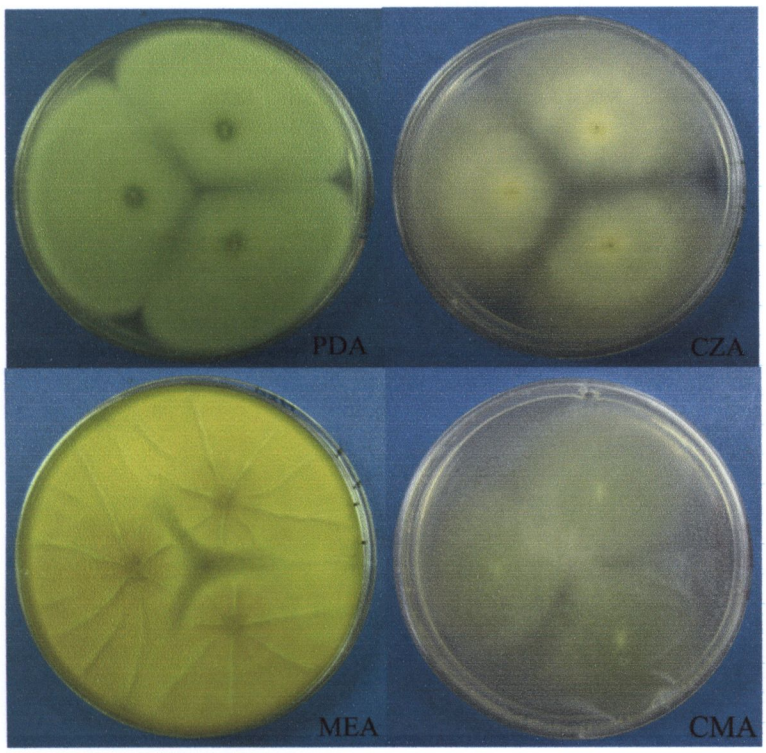
ภาพที่ 74 *Aspergillus flavus* (S9) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



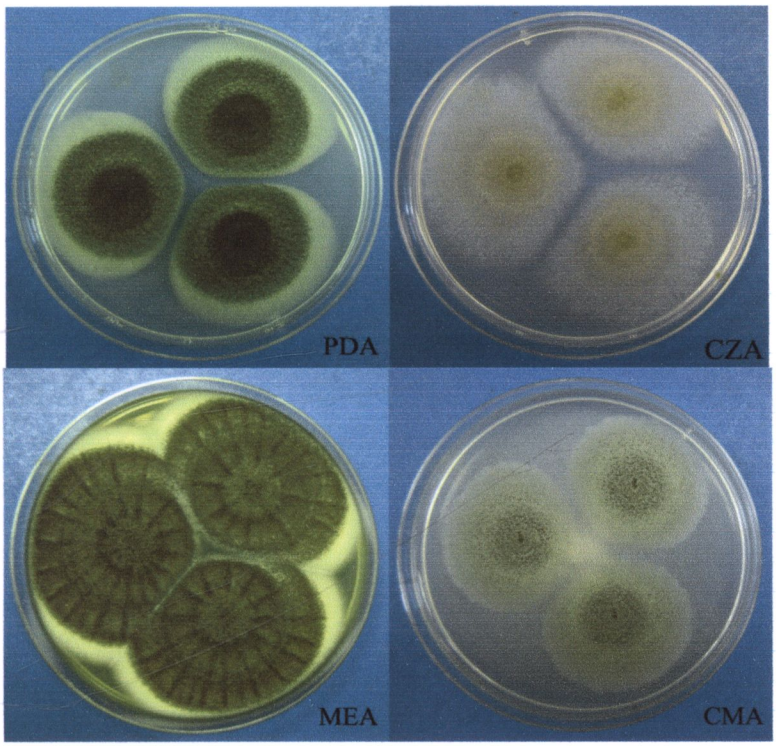
ภาพที่ 75 *Aspergillus flavus* (S9) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



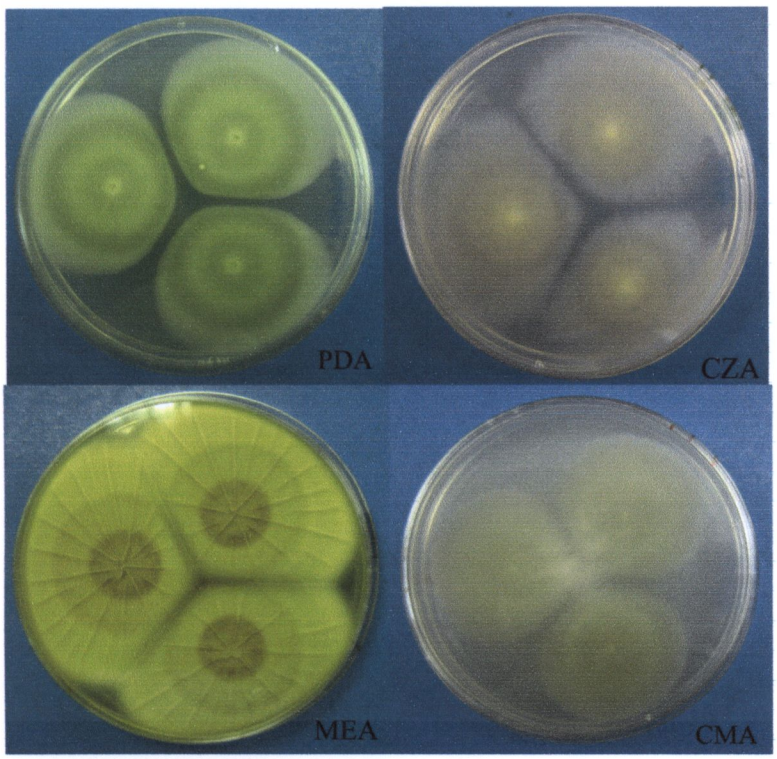
ภาพที่ 76 *Aspergillus fumigatus* (S10) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



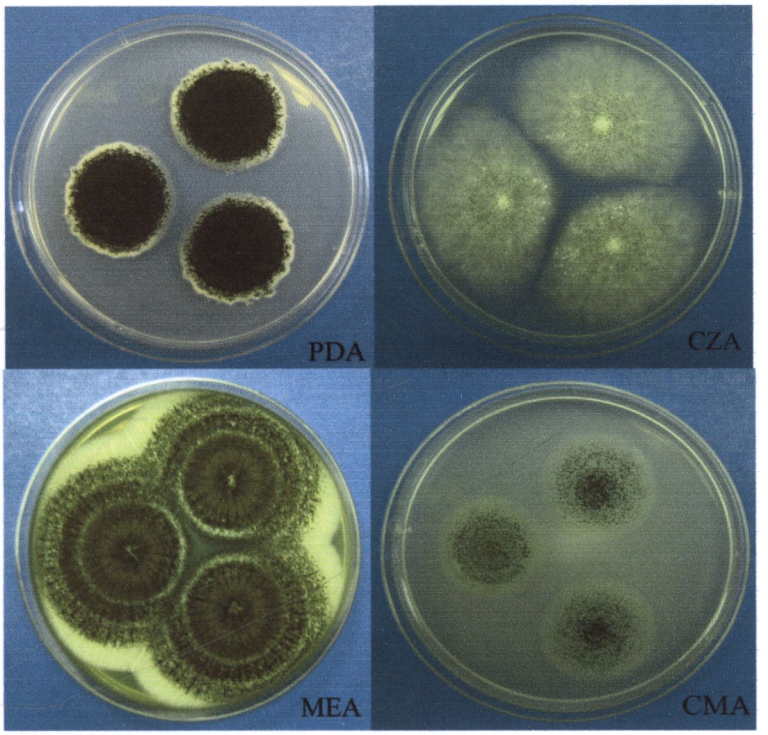
ภาพที่ 77 *Aspergillus fumigatus* (S10) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



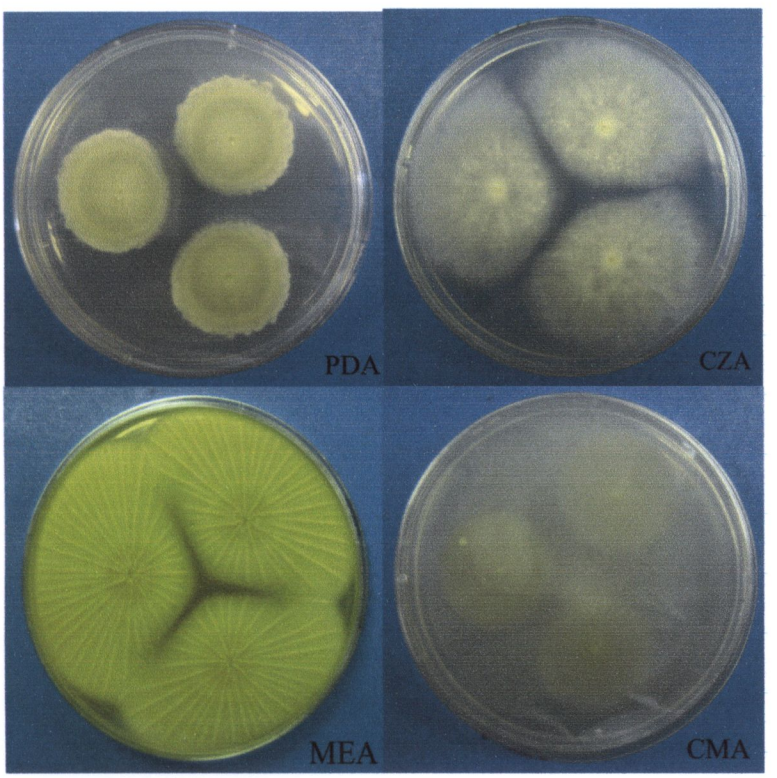
ภาพที่ 78 *Aspergillus japonicus* (S11) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



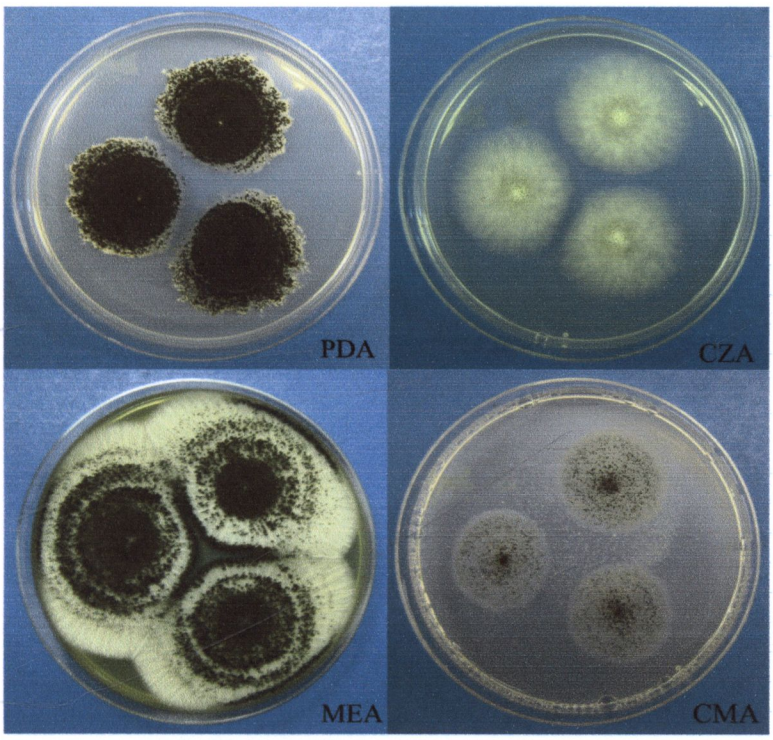
ภาพที่ 79 *Aspergillus japonicus* (S11) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



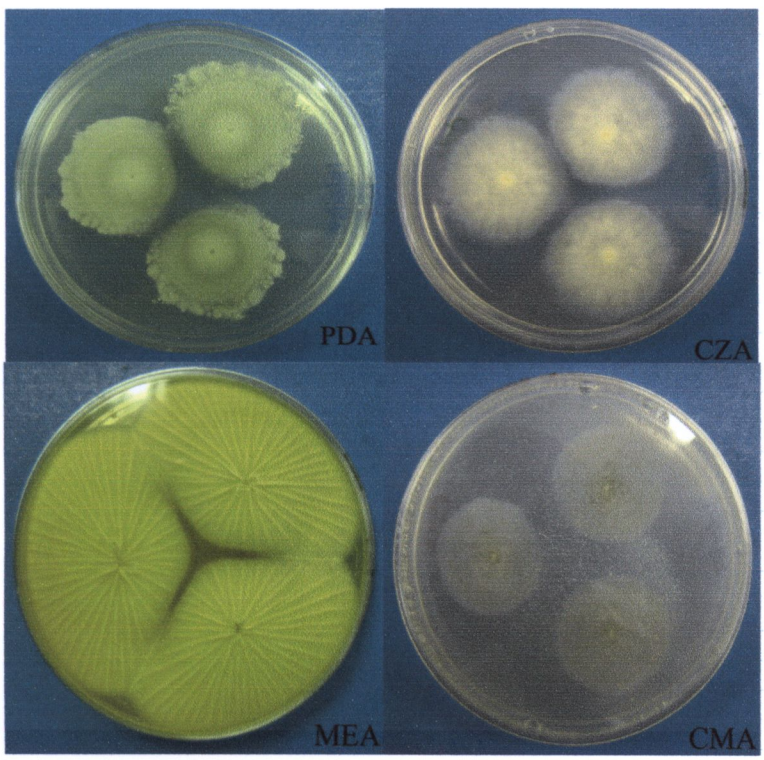
ภาพที่ 80 *Aspergillus niger group* (S12) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



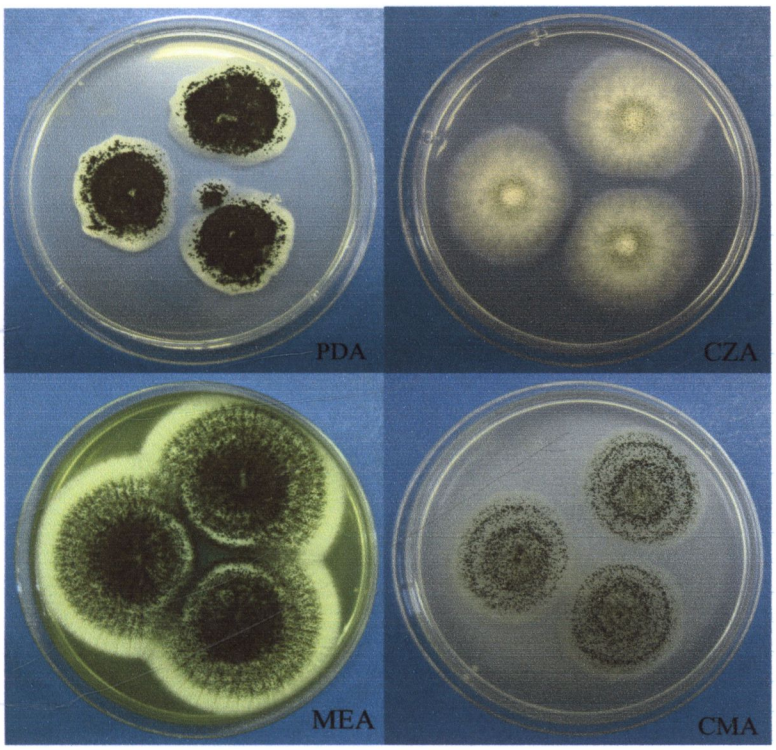
ภาพที่ 81 *Aspergillus niger group* (S12) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



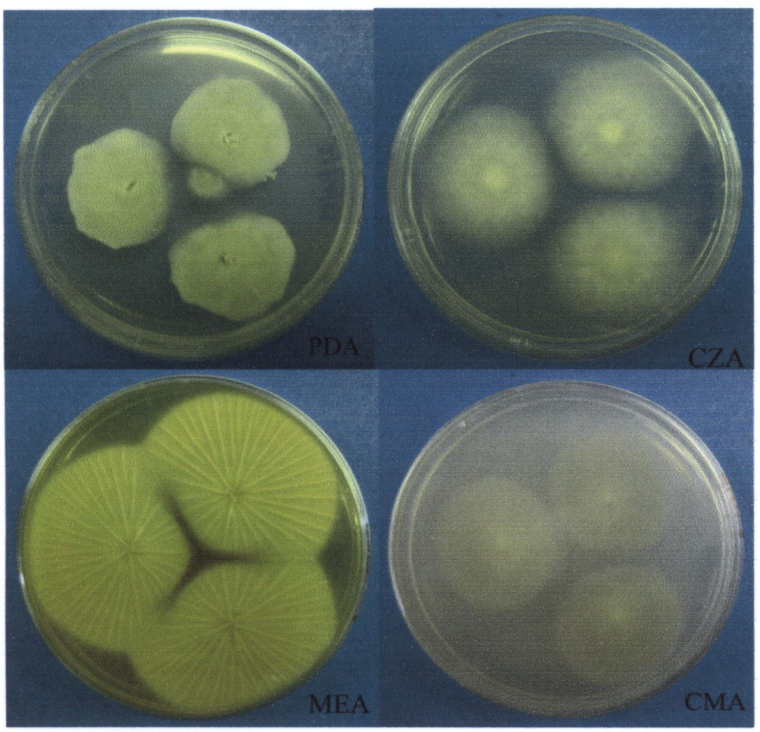
ภาพที่ 82 *Aspergillus carbonarius* (S13) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



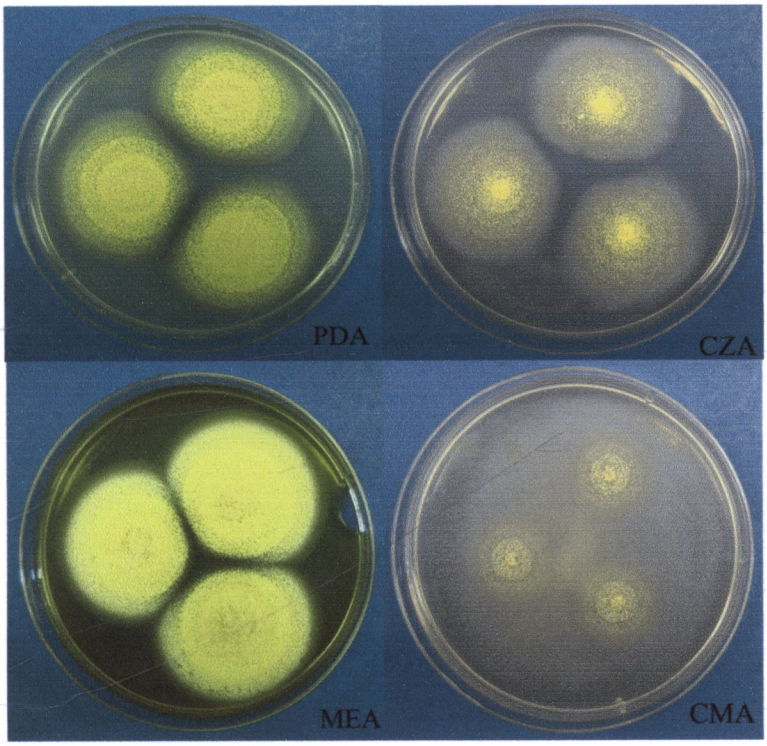
ภาพที่ 83 *Aspergillus carbonarius* (S13) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



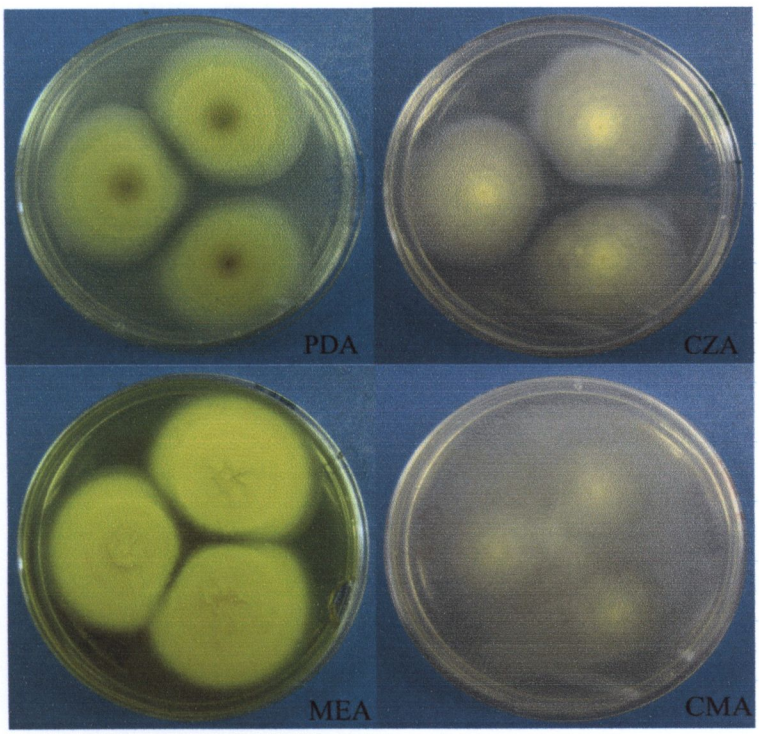
ภาพที่ 84 *Aspergillus tubingingensi* (S14) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



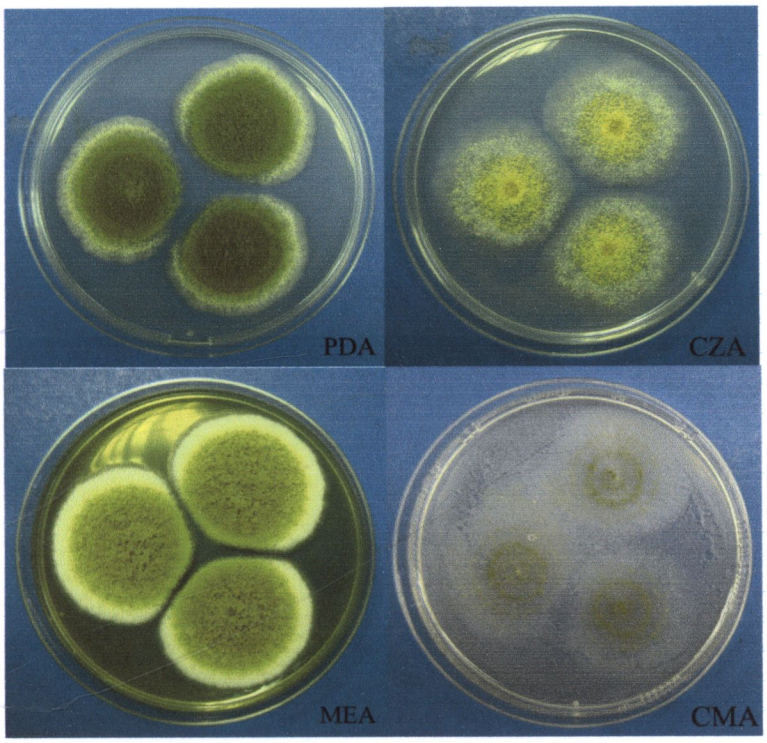
ภาพที่ 85 *Aspergillus tubingingensi* (S14) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



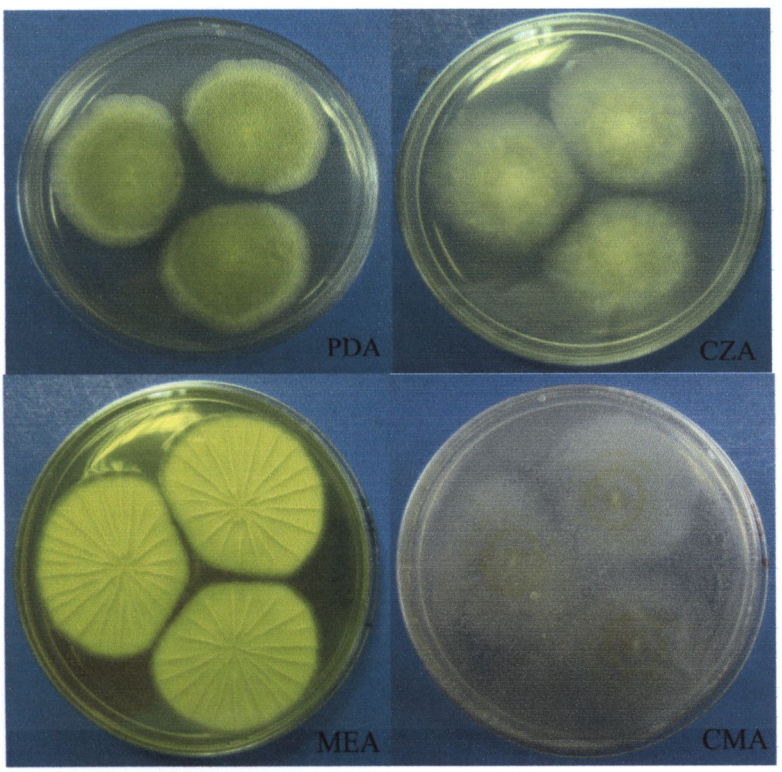
ภาพที่ 86 *Aspergillus ochraceous* (S15) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



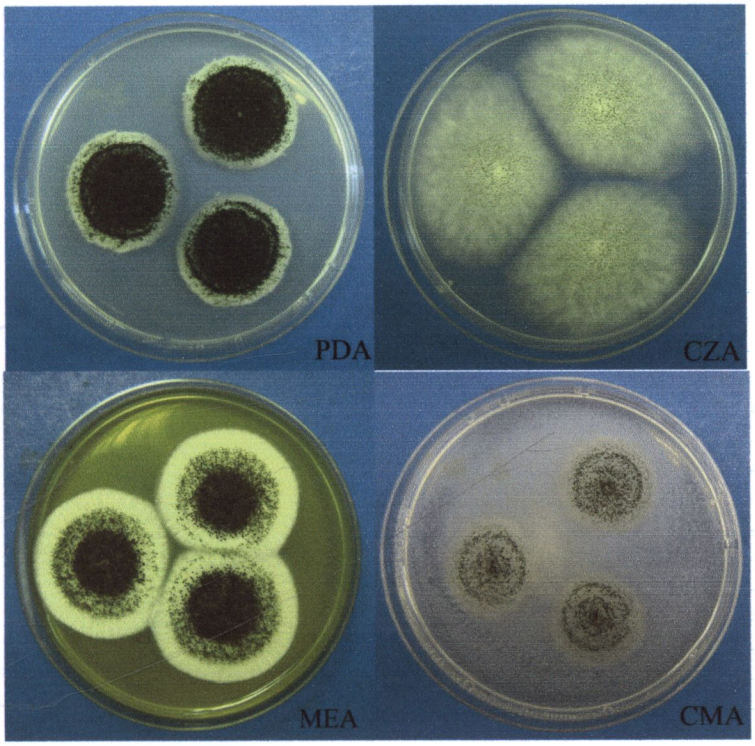
ภาพที่ 87 *Aspergillus ochraceous* (S15) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



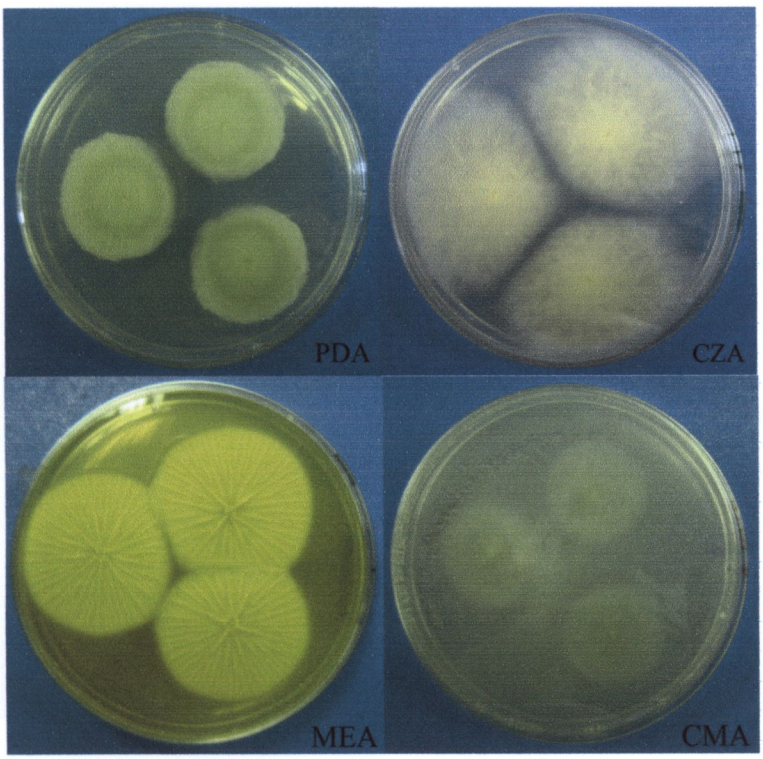
ภาพที่ 88 *Aspergillus oryzae* (S16) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



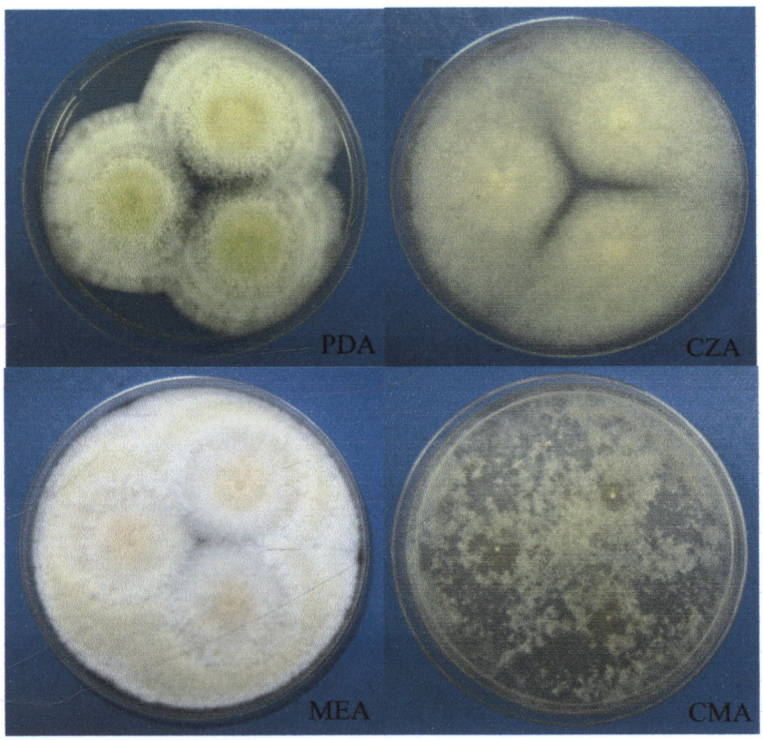
ภาพที่ 89 *Aspergillus oryzae* (S16) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



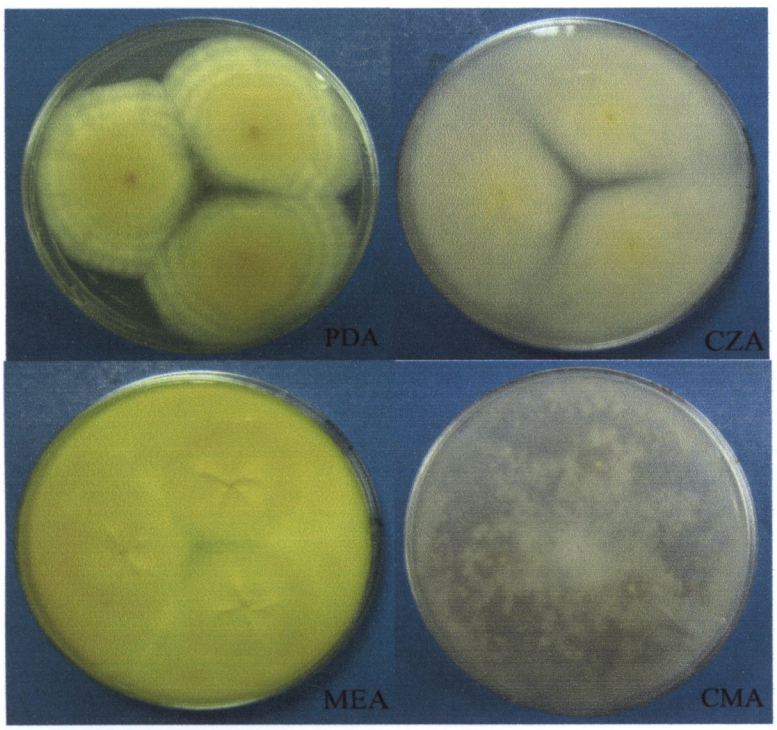
ภาพที่ 90 *Aspergillus phoenisis* (S17) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



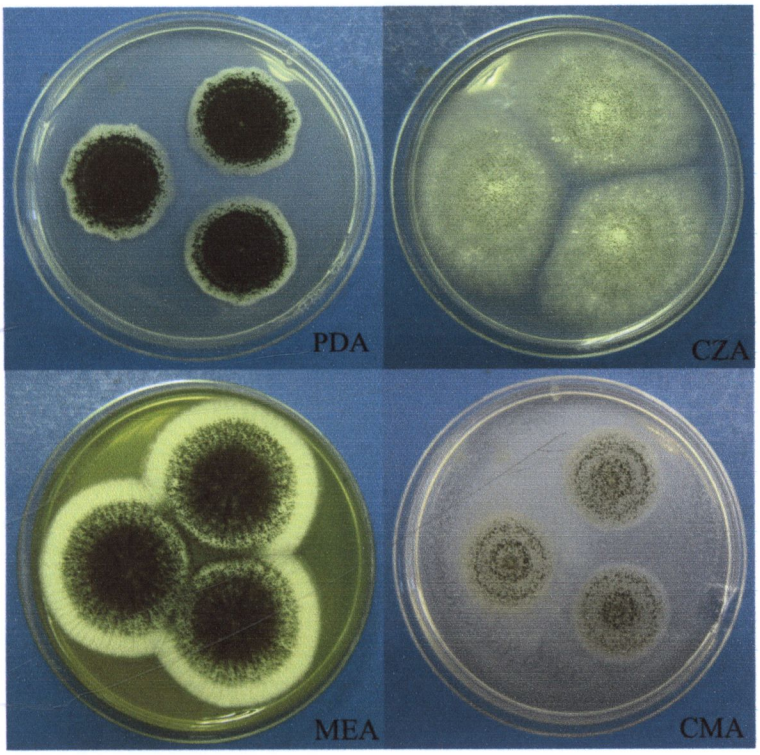
ภาพที่ 91 *Aspergillus phoenisis* (S17) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



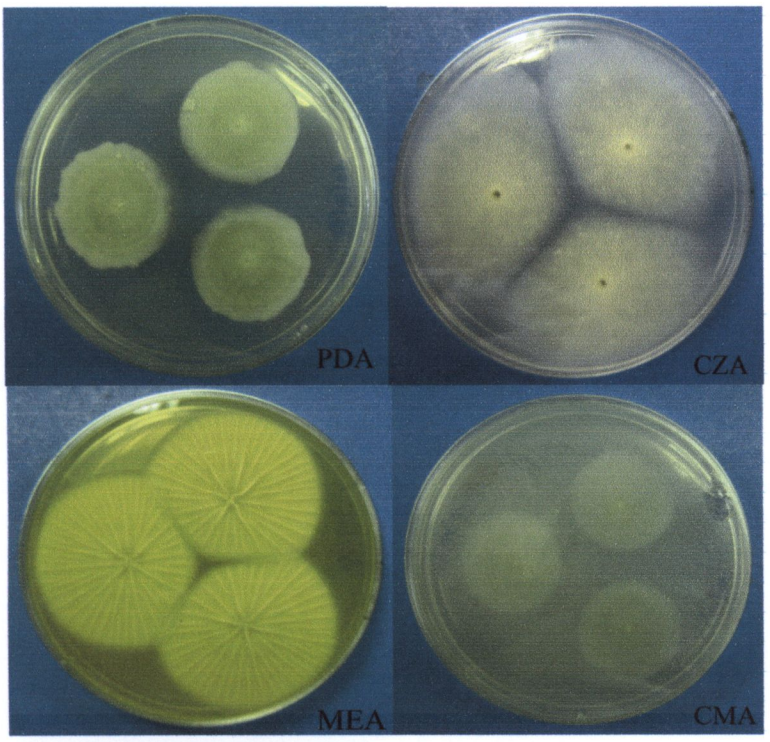
ภาพที่ 92 *Aspergillus terreus* (S18) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



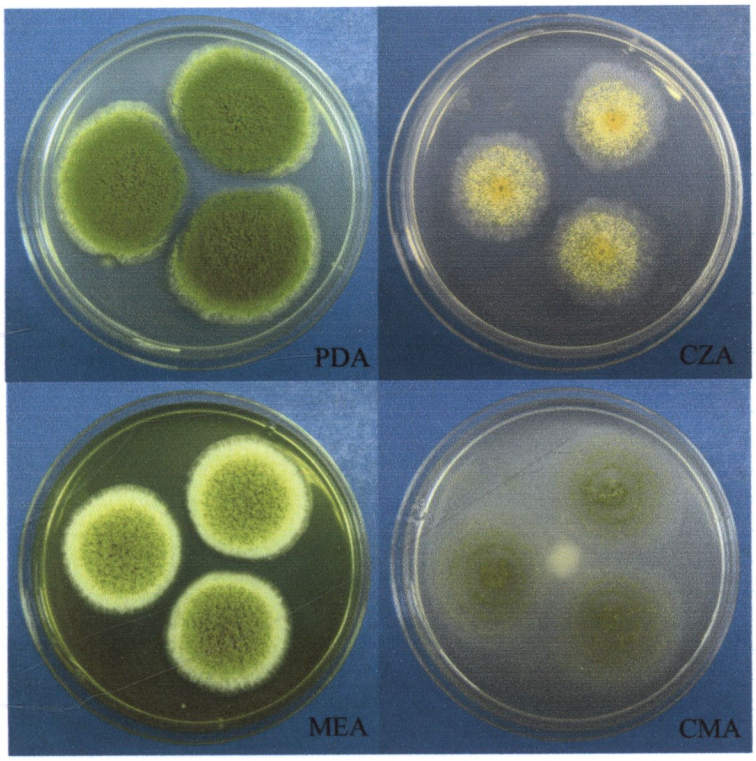
ภาพที่ 93 *Aspergillus terreus* (S18) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



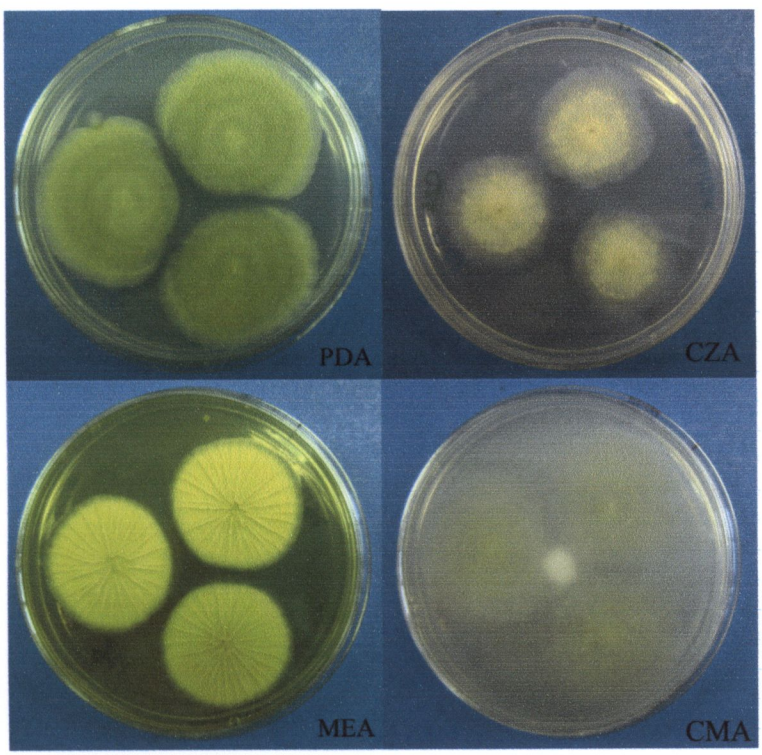
ภาพที่ 94 *Aspergillus tubingensis* (S19) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



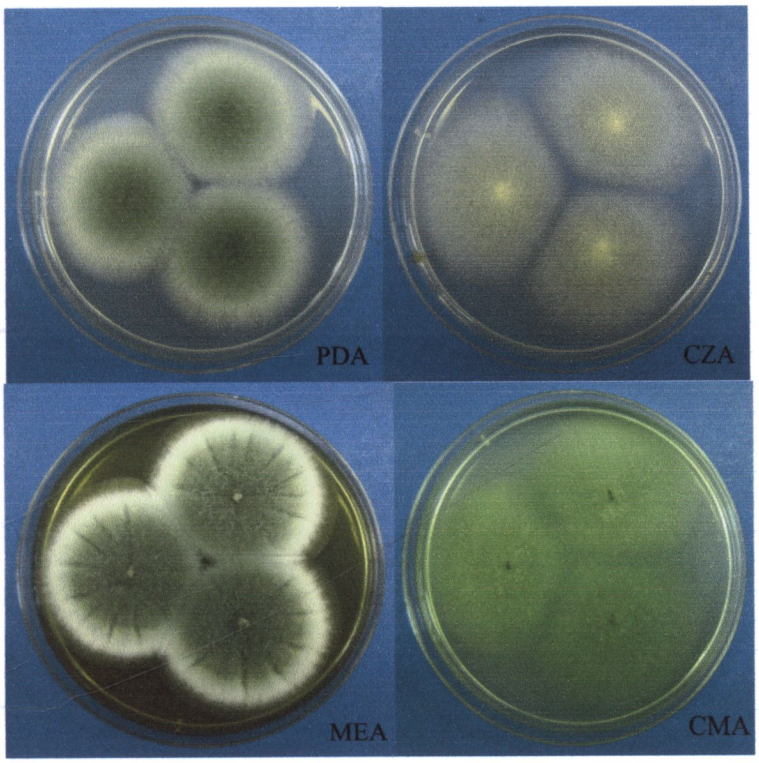
ภาพที่ 95 *Aspergillus tubingensis* (S19) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



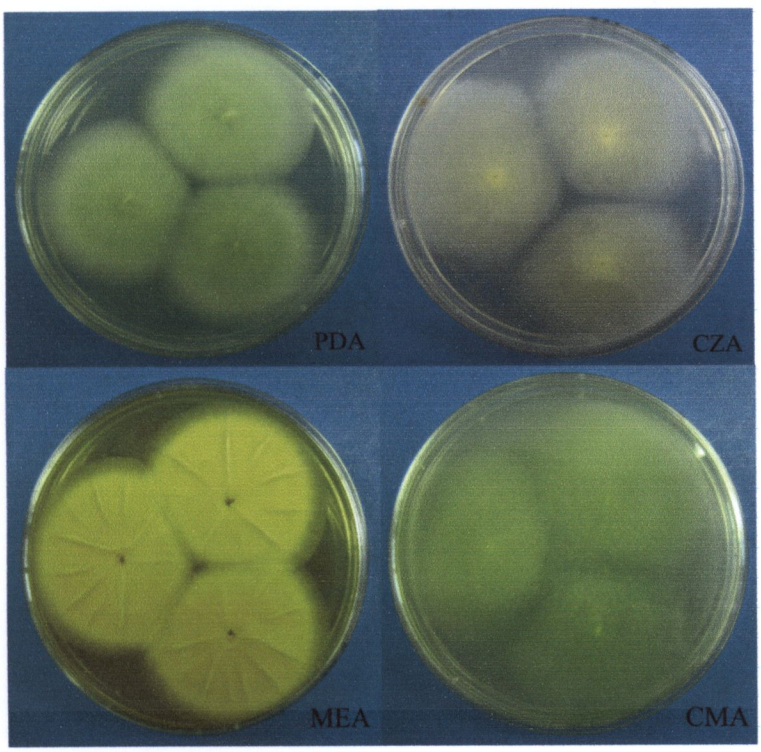
ภาพที่ 96 *Aspergillus wentii* (S21) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



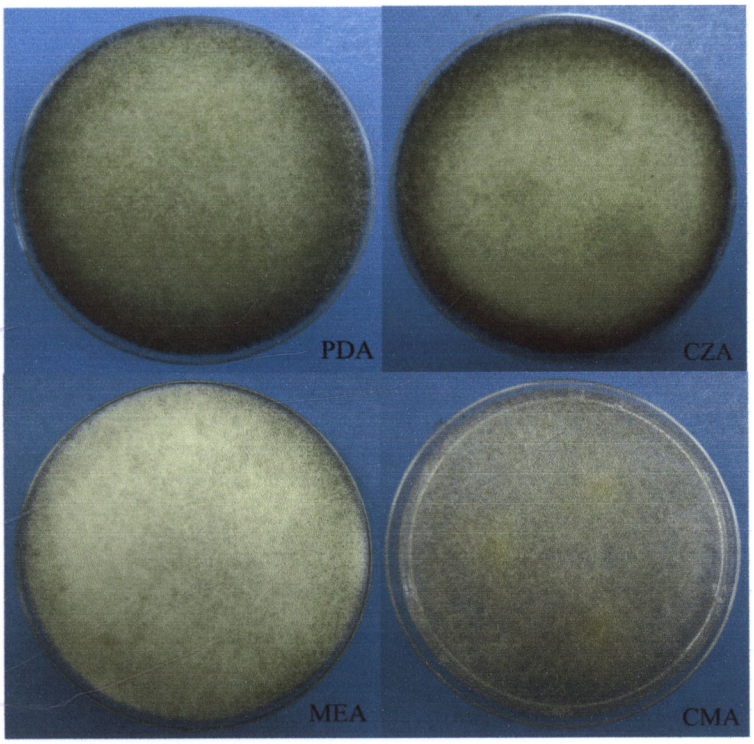
ภาพที่ 97 *Aspergillus wentii* (S21) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



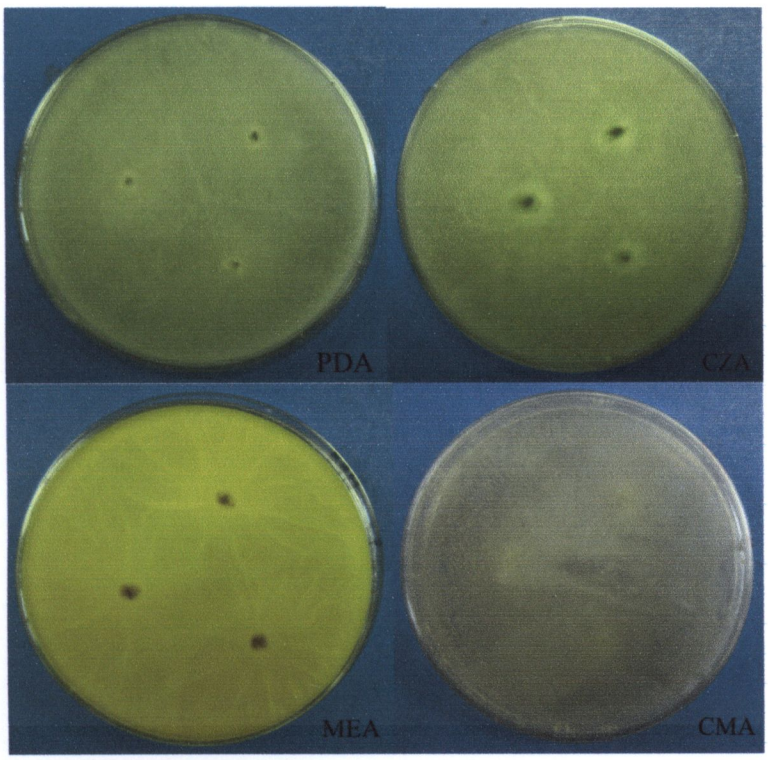
ภาพที่ 98 *Aspergillus eurotium* (S22) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



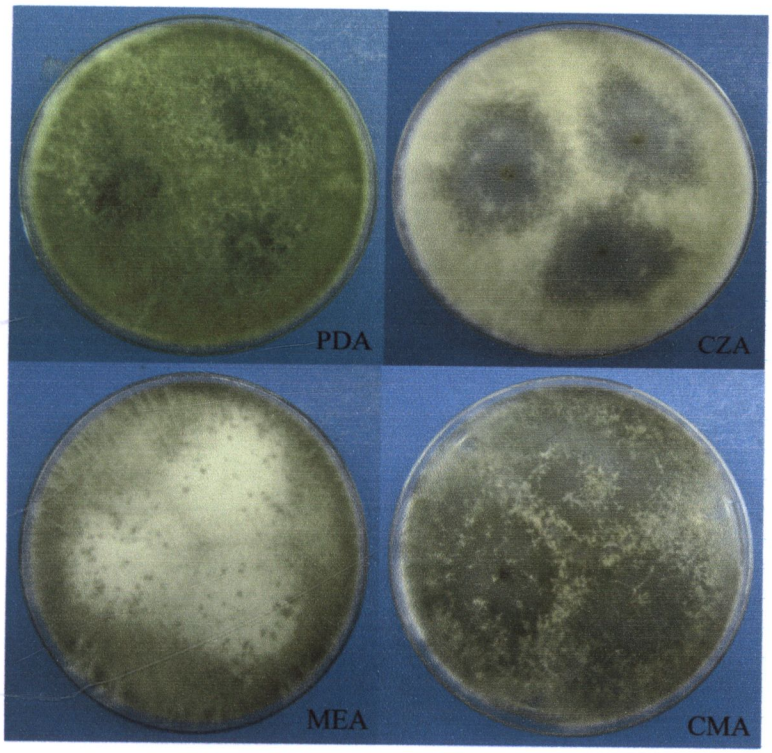
ภาพที่ 99 *Aspergillus eurotium* (S22) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



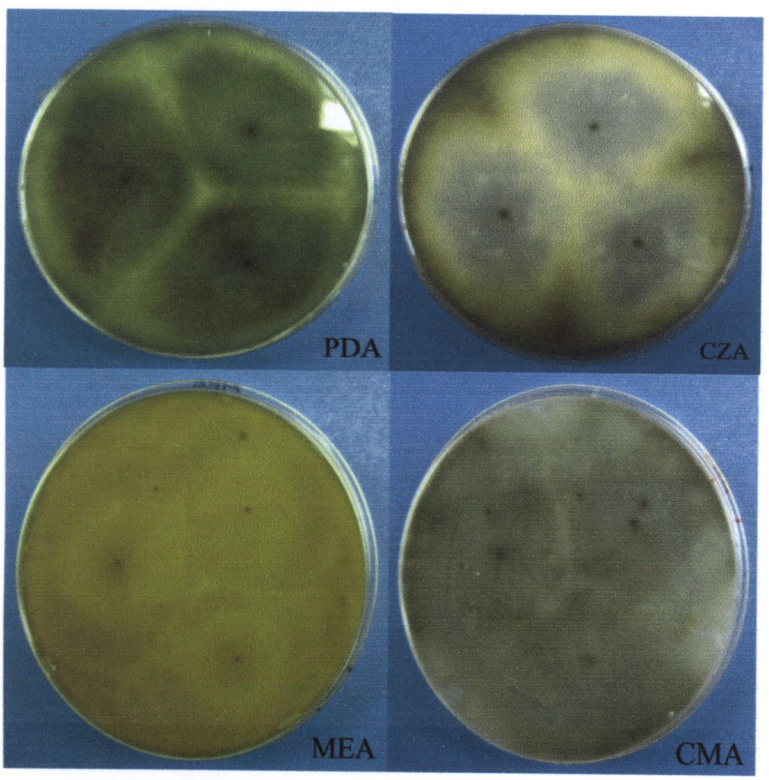
ภาพที่ 100 *Rhizopus* sp. (S23) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



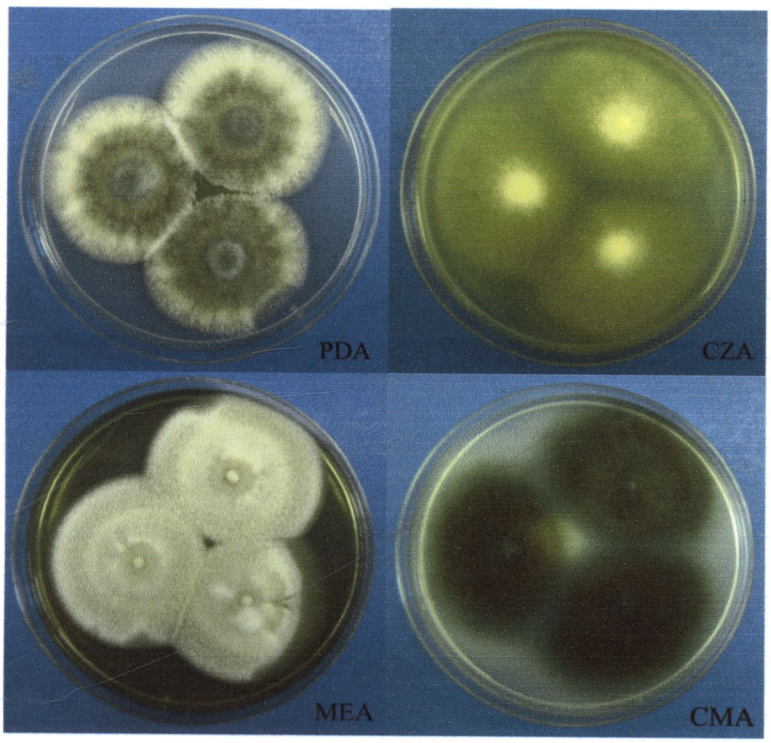
ภาพที่ 101 *Rhizopus* sp. (S23) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



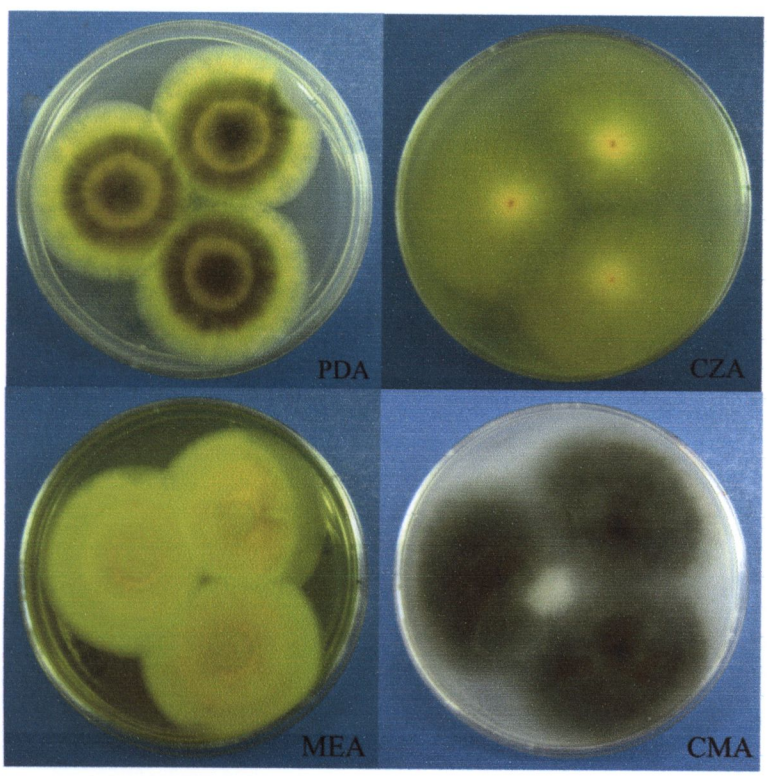
ภาพที่ 102 *Rhizoctonia* sp. (S24) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



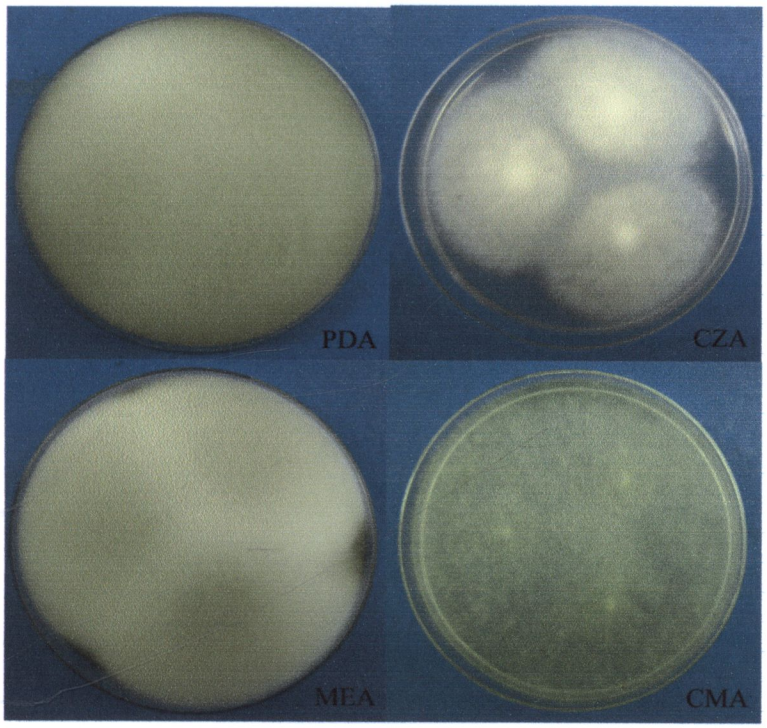
ภาพที่ 103 *Rhizoctonia* sp. (S24) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



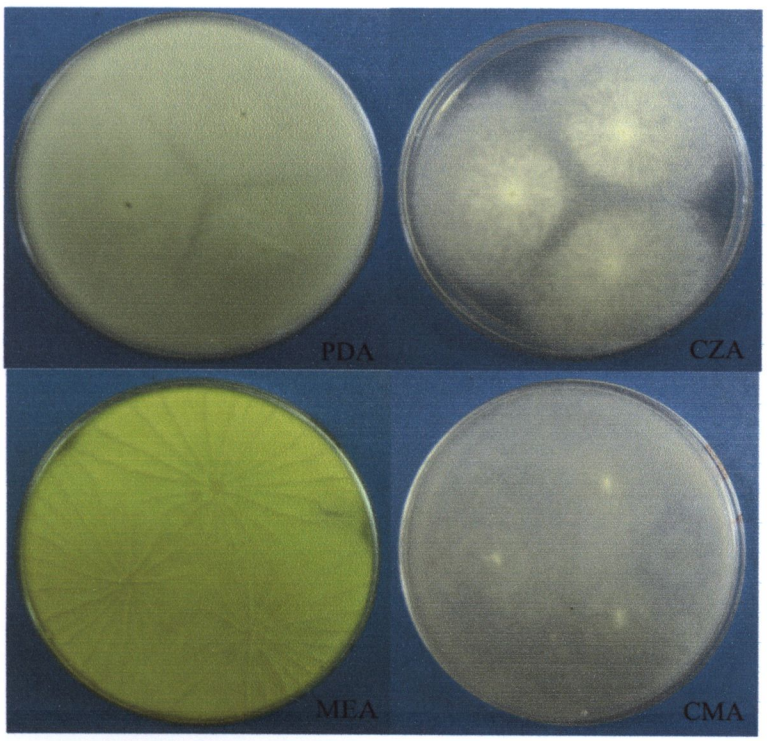
ภาพที่ 104 *Curvularia* sp. (S27) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



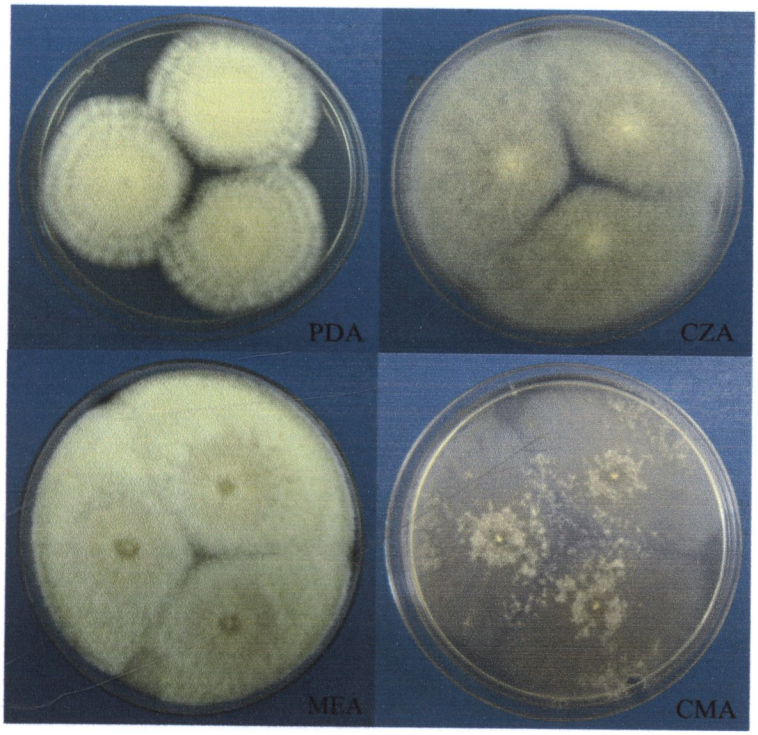
ภาพที่ 105 *Curvularia* sp. (S27) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



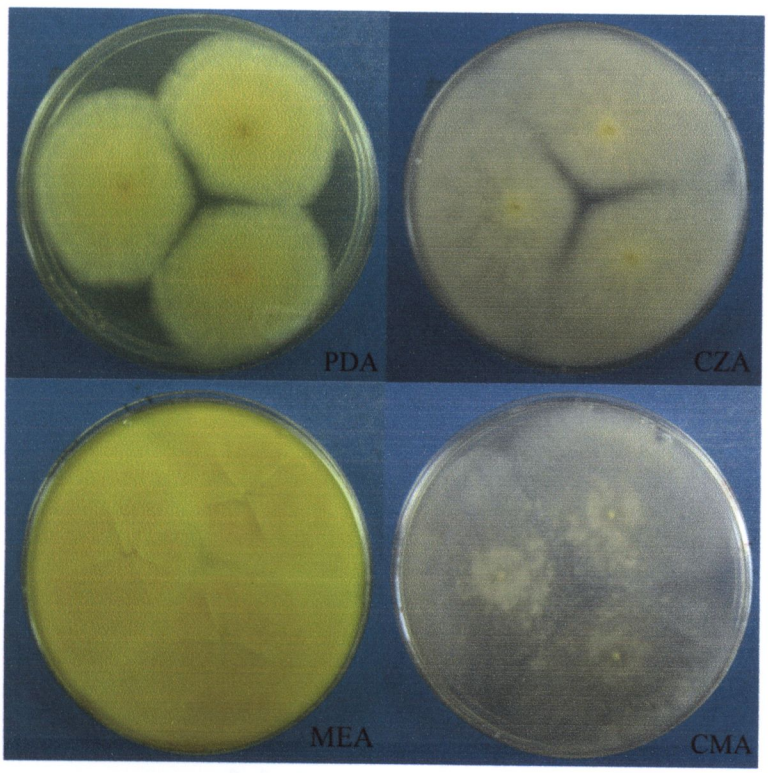
ภาพที่ 106 *Cunninghamella* sp. (S28) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



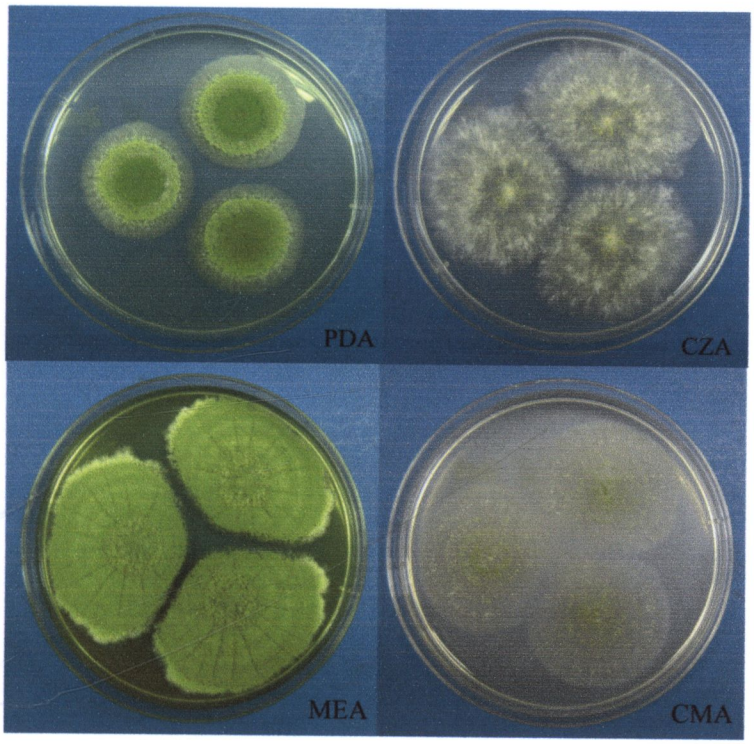
ภาพที่ 107 *Cunninghamella* sp. (S28) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



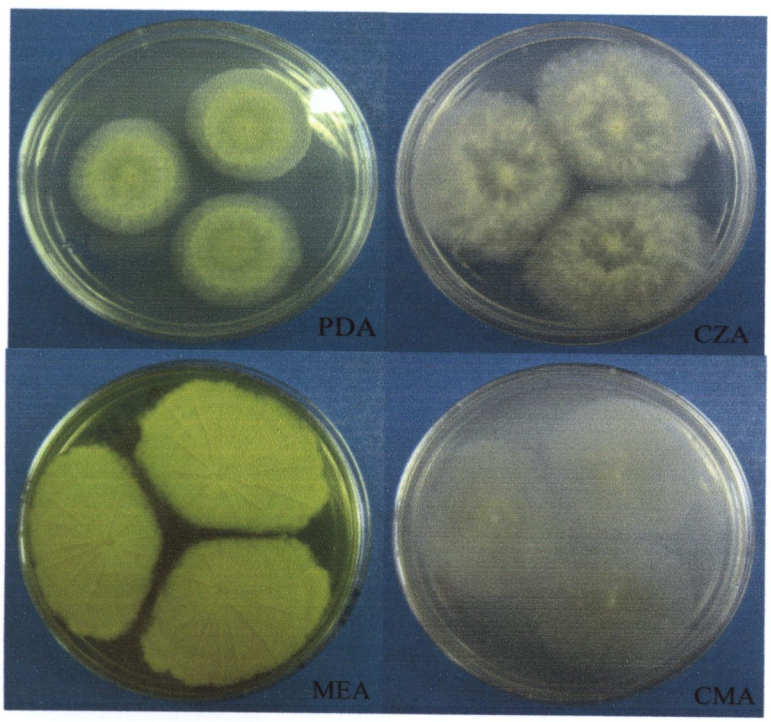
ภาพที่ 108 *Nigrospora* sp. (S32) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



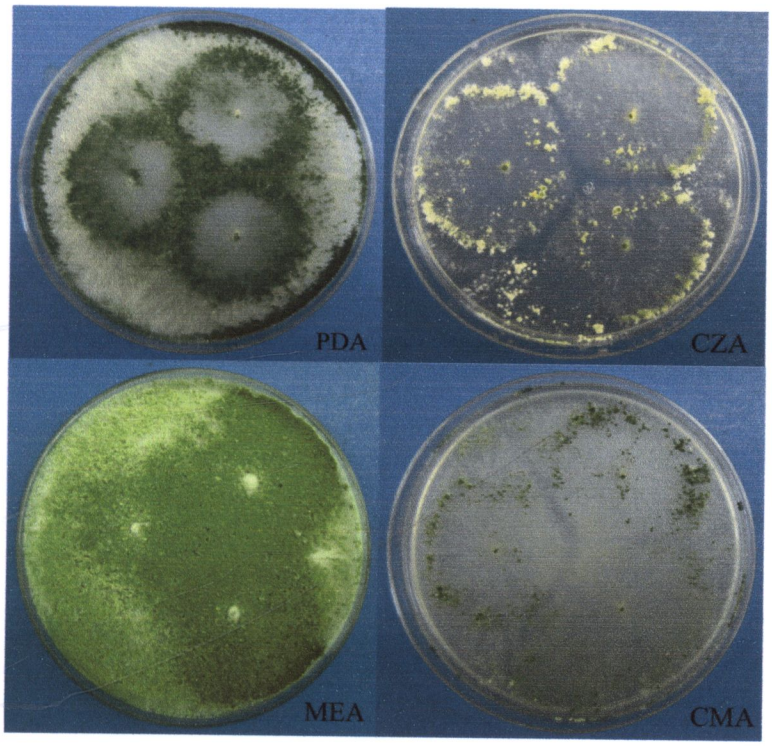
ภาพที่ 109 *Nigrospora* sp. (S32) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



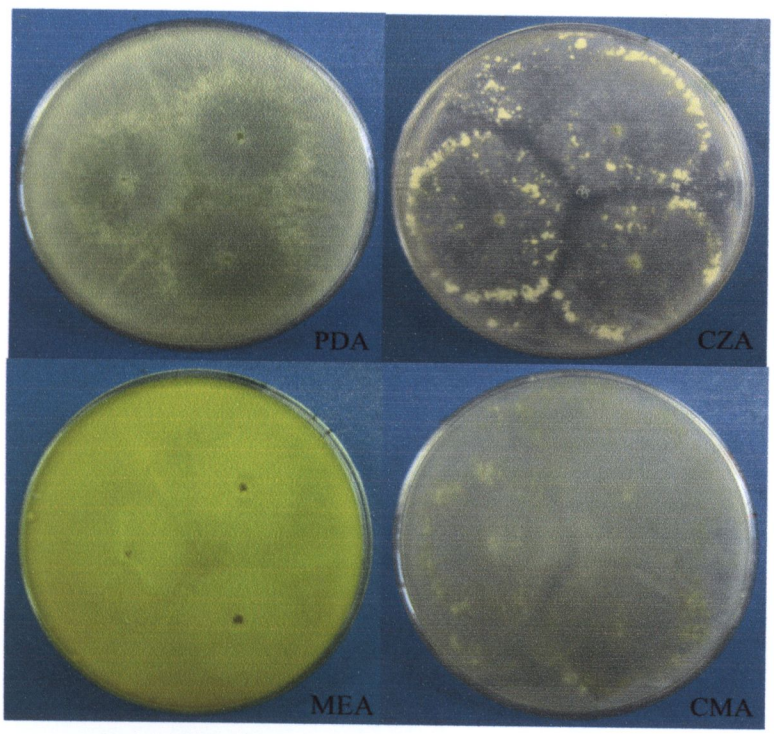
ภาพที่ 110 *Penicillium* sp. (S33) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



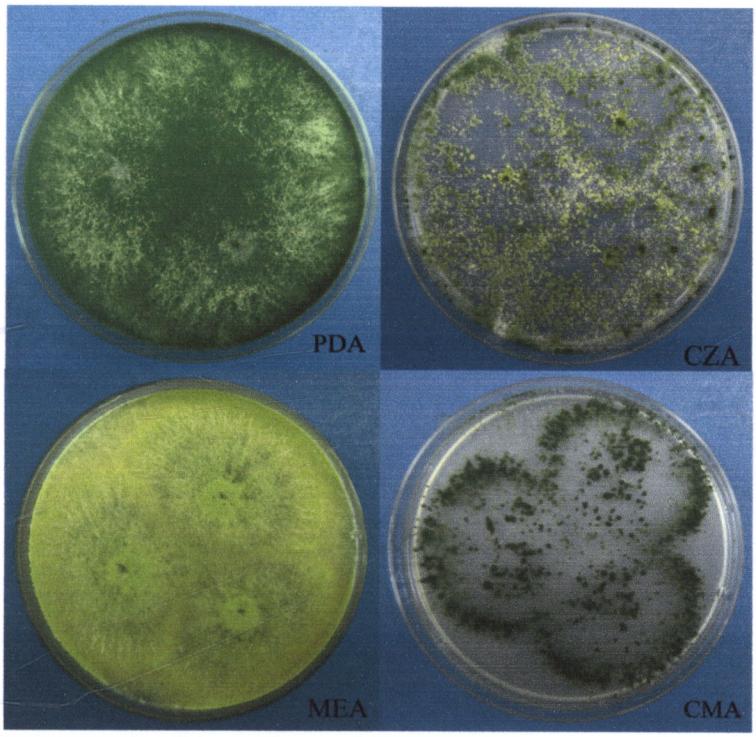
ภาพที่ 111 *Penicillium* sp. (S33) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



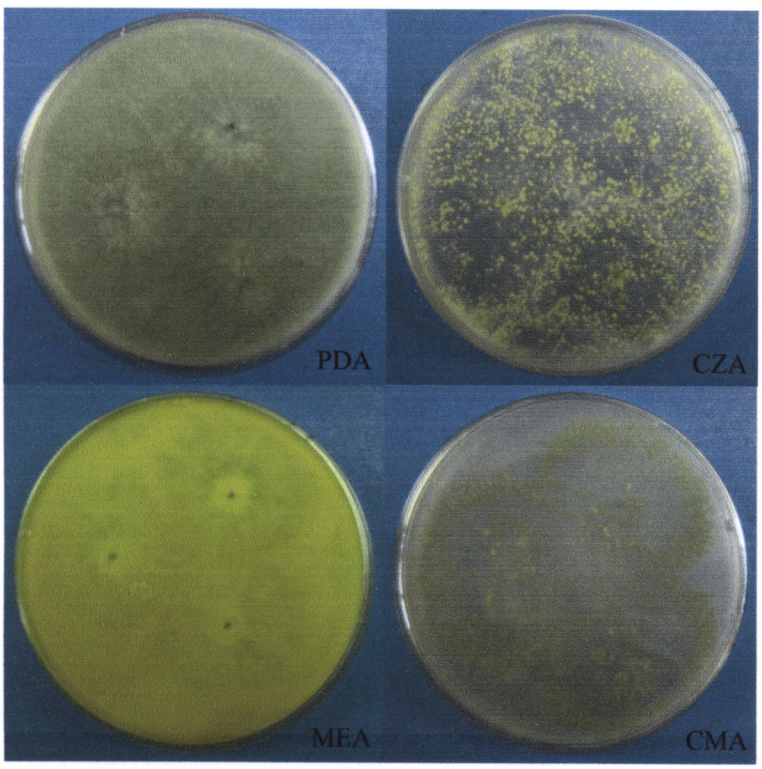
ภาพที่ 112 *Trichoderma* sp. (S36) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



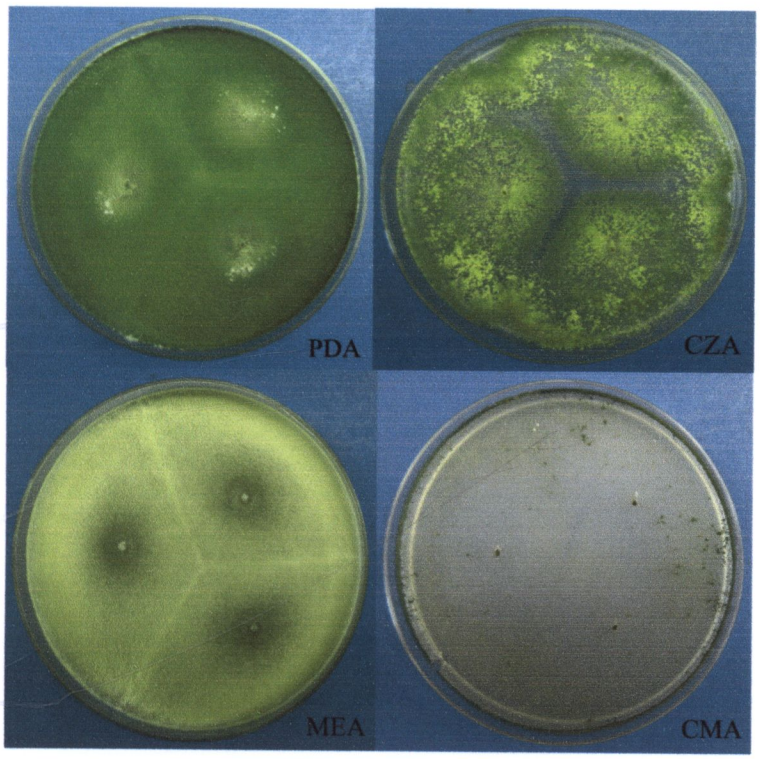
ภาพที่ 113 *Trichoderma* sp. (S36) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



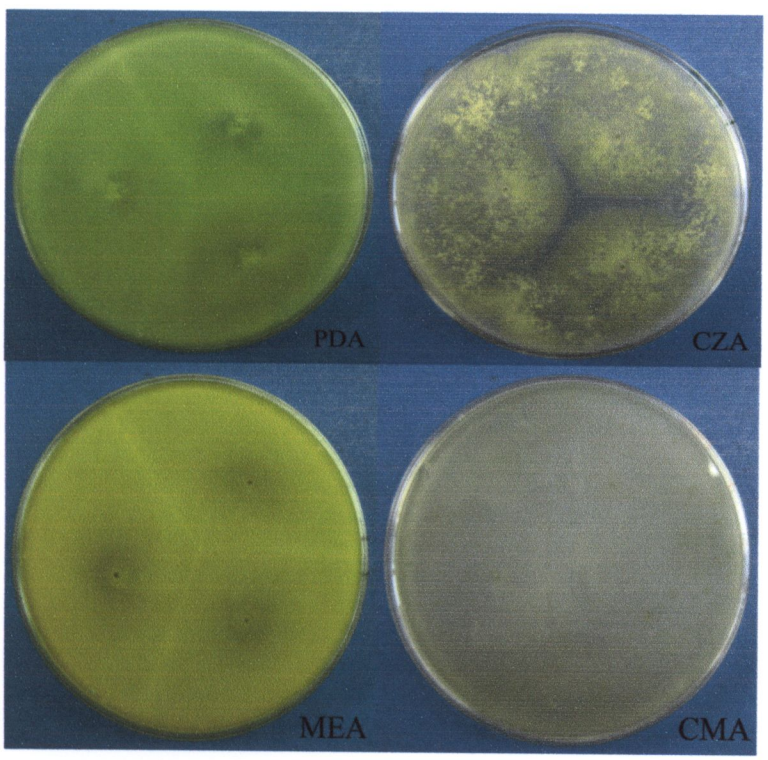
ภาพที่ 114 *Trichoderma autroviride* (S37) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



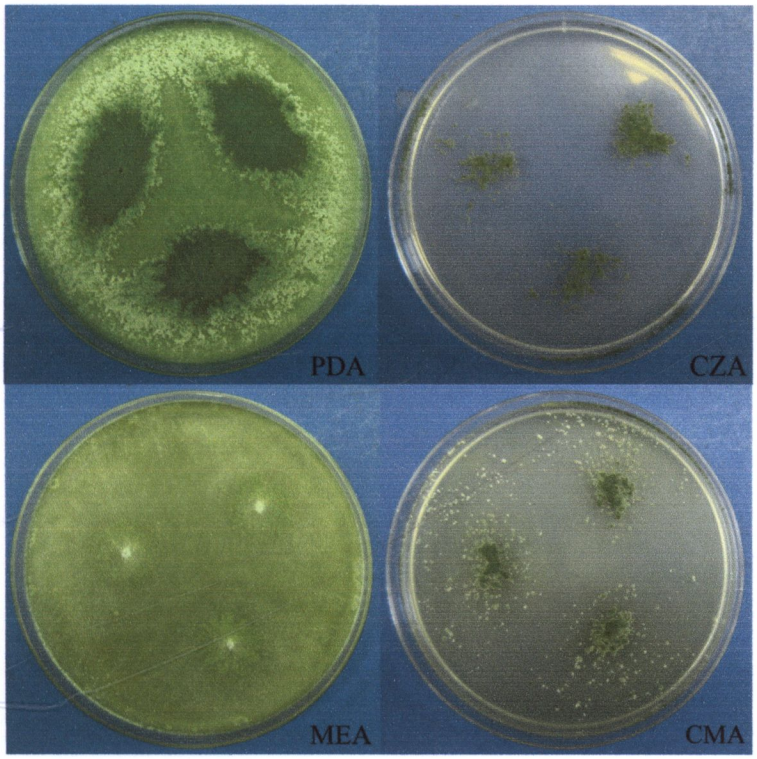
ภาพที่ 115 *Trichoderma autroviride* (S37) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



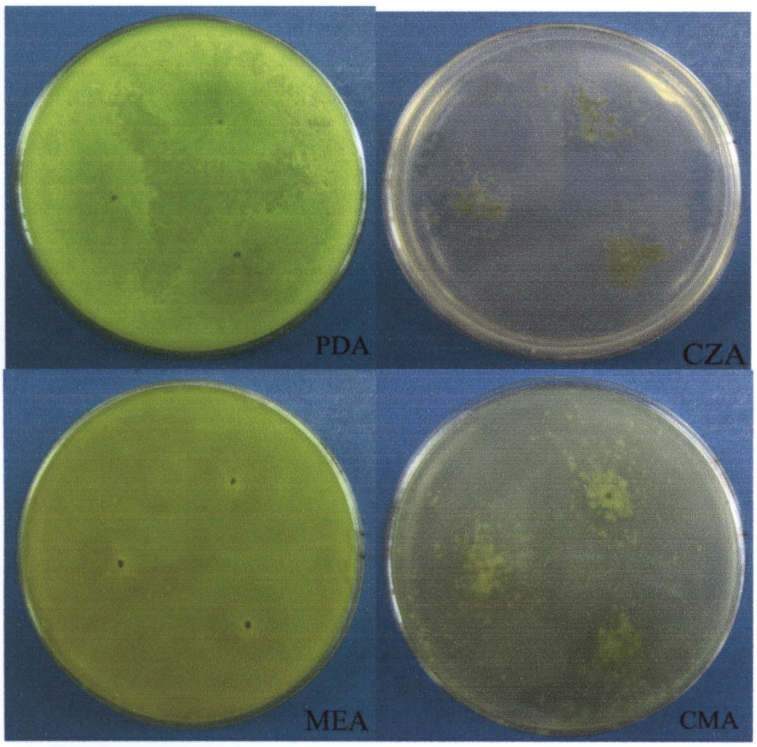
ภาพที่ 116 *Trichoderma konigi* (S38) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



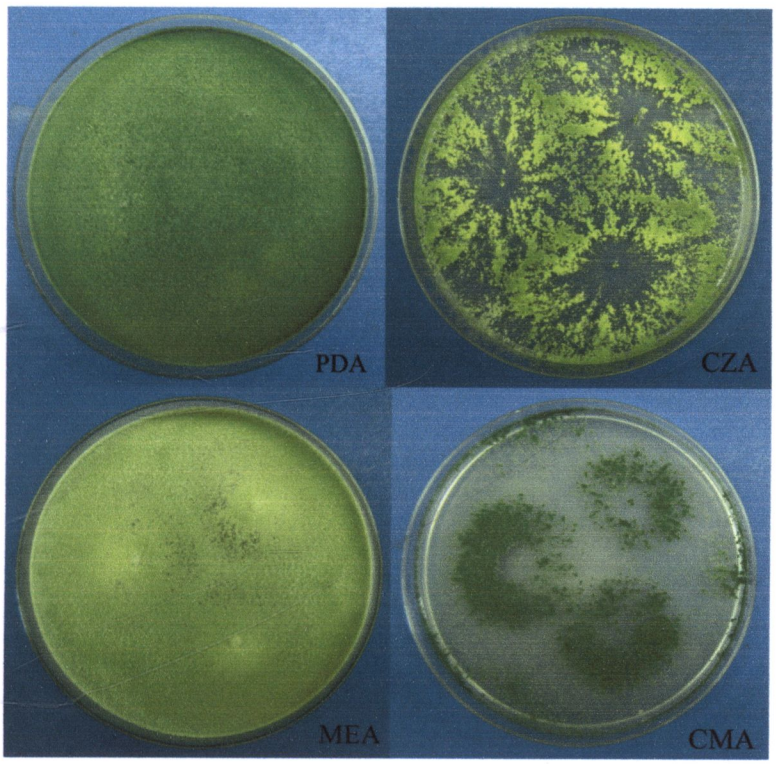
ภาพที่ 117 *Trichoderma konigi* (S38) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



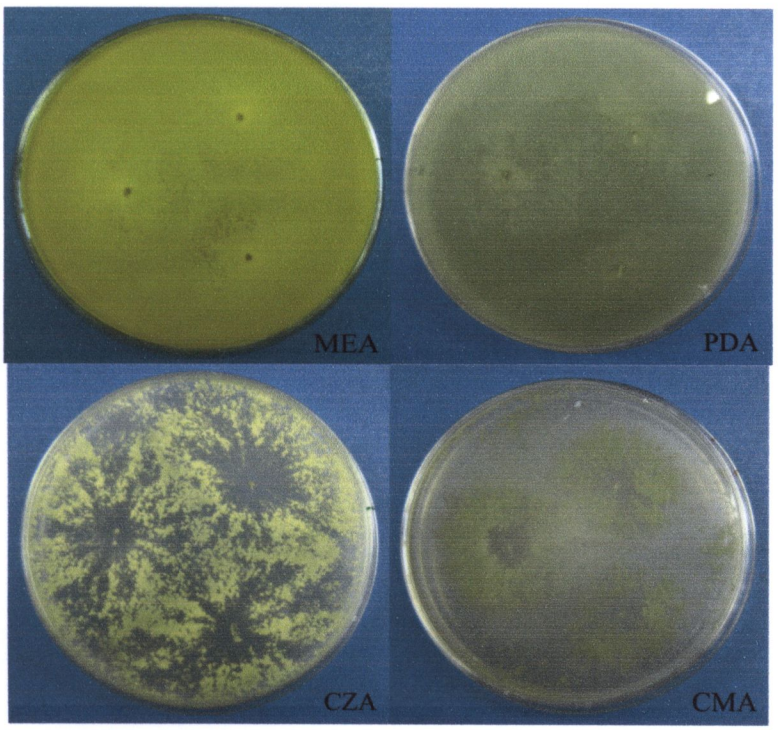
ภาพที่ 118 *Trichoderma hamatum* (S39) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



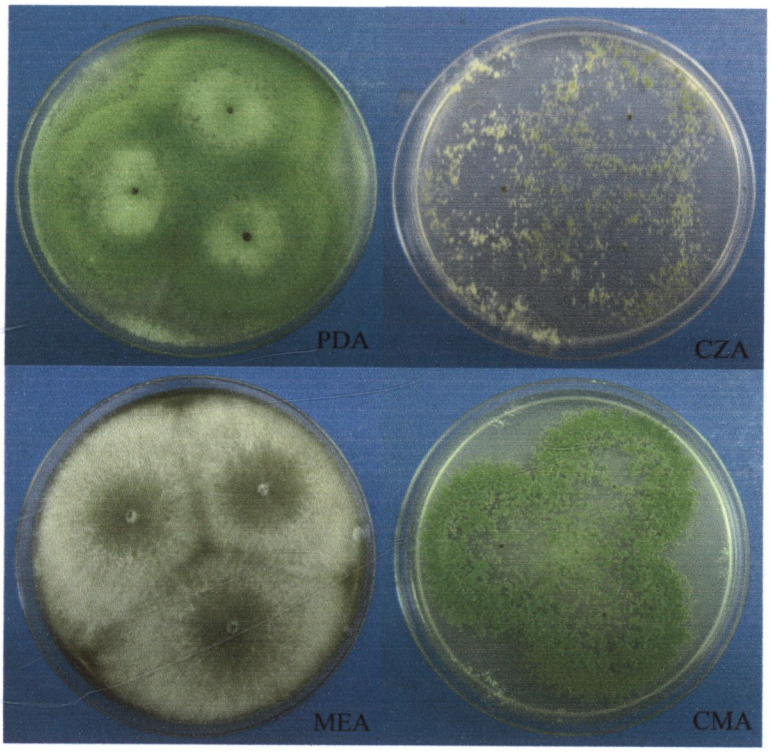
ภาพที่ 119 *Trichoderma hamatum* (S39) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



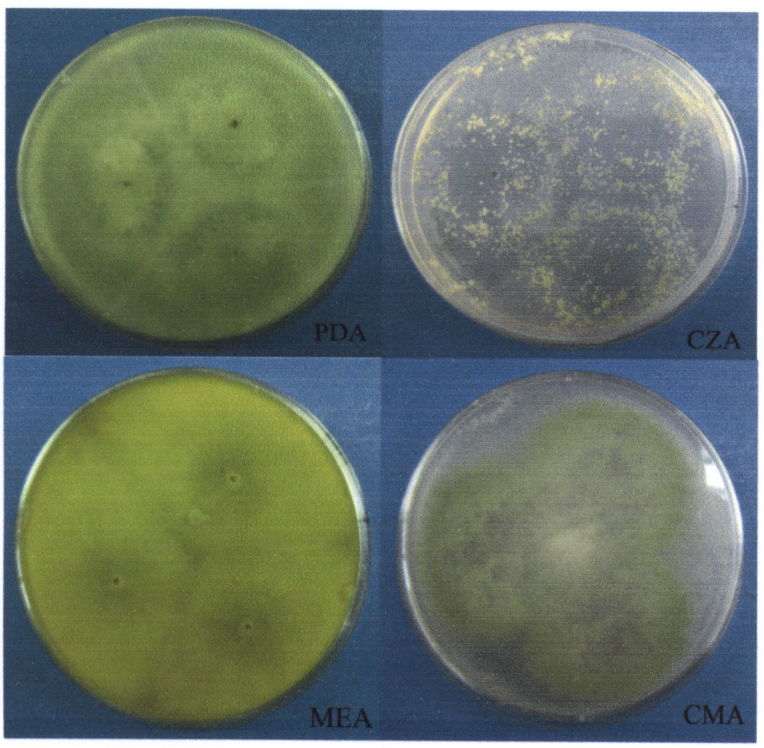
ภาพที่ 120 *Trichoderma harzianum* (S40) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



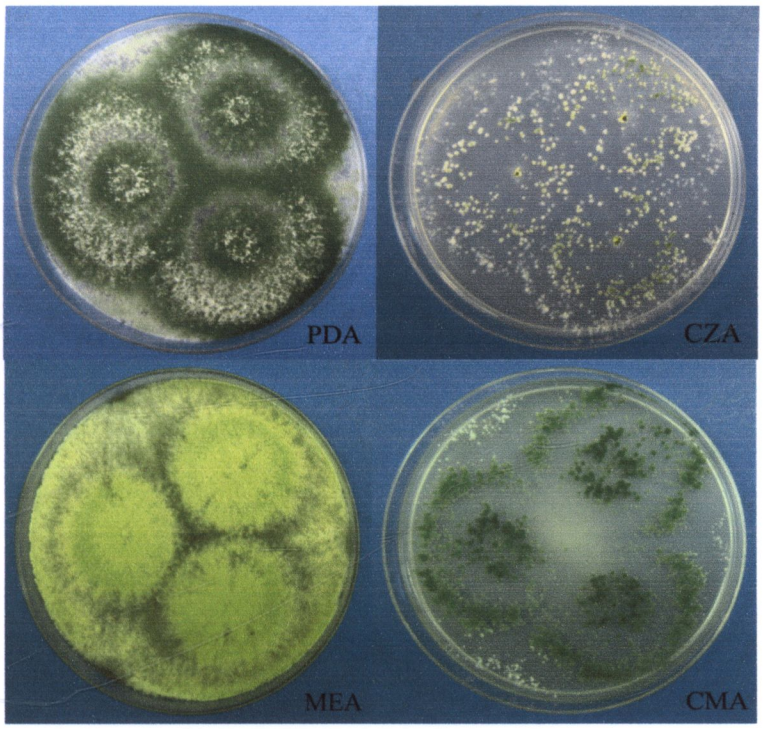
ภาพที่ 121 *Trichoderma harzianum* (S40) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



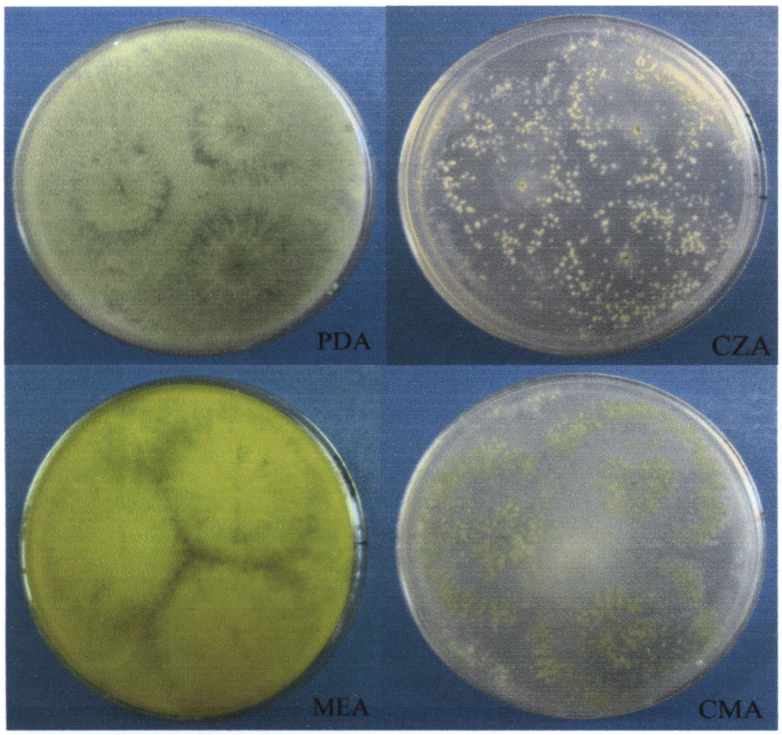
ภาพที่ 122 *Trichoderma virens* (S41) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



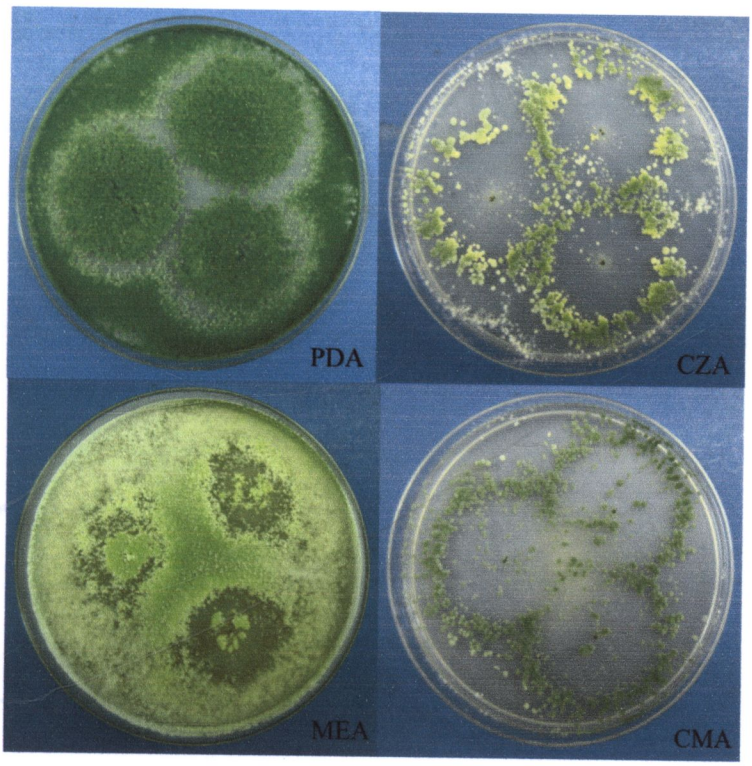
ภาพที่ 123 *Trichoderma virens* (S41) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



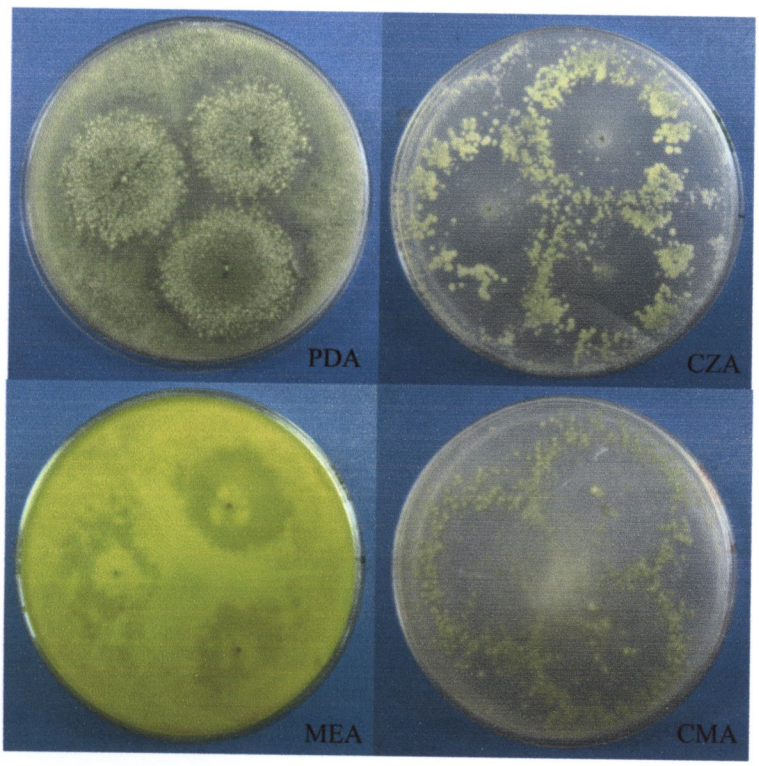
ภาพที่ 124 *Trichoderma viride* (S42) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



ภาพที่ 125 *Trichoderma viride* (S42) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง



ภาพที่ 126 *Trichoderma asperellum* (*S31) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน



ภาพที่ 127 *Trichoderma asperellum* (*S31) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง

ข้อดีและข้อเสียในการเก็บรักษาจุลินทรีย์

การต่อเชื้อ (subculture) ข้อดี คือ

1. ทำง่ายไม่ต้องอาศัยความชำนาญพิเศษ และอุปกรณ์ราคาถูก ไม่ต้องใช้เครื่องมือซับซ้อน สามารถใช้เก็บรักษาจุลินทรีย์ทั่วไป

2. สามารถเก็บเชื้ออยู่ได้เป็นเวลานานตราบเท่าที่ยังมีผู้ชำนาญทำการตรวจสอบ

3. การนำเชื้อออกมาใช้ทำได้ง่าย

ข้อเสีย เช่น

1. เสี่ยงต่อการแปรผันทางพันธุกรรม การสูญเสียความสามารถในการก่อให้เกิดโรคหรือมีลักษณะรูปร่างผันแปรเปลี่ยนแปลงไป

2. เสี่ยงต่อการปนเปื้อนจาก spore ที่ปะปนอยู่ในอากาศ หรือนำพาจากตัวไร

3. ต้องการผู้ชำนาญในการตรวจสอบว่าเชื้อราที่ย้ายยังคงเป็นเชื้อเดิมไม่ใช่เชื้อที่ปนเปื้อน หรือไม่ใช่เชื้อที่ย้ายจากโคโลนีบริเวณที่มีลักษณะผิดปกติ

4. สิ้นเปลืองแรงงานและเวลาหากมีเชื้อเป็นจำนวนมาก

ข้อดีของการเก็บรักษาเชื้อราในดินคือ

1. รามีคุณสมบัติทางพันธุกรรมคงที่พอสมควร แม้ว่าจะมีรายงานถึงการผันแปรของพันธุ์ (variation) เกิดขึ้นบ้าง

2. อยู่รอดได้นานถึง 10 ปี

3. รามักจะไม่ถูกทำลายโดยตัวไร

4. ในหลอดเชื้อเดียวกัน สามารถใช้เป็น inoculum ได้หลายๆครั้ง ทั้งที่ควรจะมีการเก็บ stock culture เอาไว้ด้วย หากหลอดเชื้อนั้นจะเกิดการปนเปื้อน หรือเกิดปัญหาอื่นๆขึ้น

5. เป็นวิธีการที่ ถูก ง่าย ค่าแรงงานต่ำ และไม่ต้องการเครื่องมือซึ่งมีราคาแพง

การทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying หรือ lyophilization)

ข้อดีของวิธีนี้ คือ เหมาะสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจำนวนมากและเก็บรักษาได้นาน

ข้อเสีย คือ มีค่าใช้จ่ายสูงในการซื้ออุปกรณ์และเครื่องมือ

ข้อดีและข้อเสียในการเก็บรักษาเชื้อราภายใต้พาราฟินเหลว

ข้อดี เช่น

1. สามารถเก็บเชื้อราบางชนิดให้มีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานาน มักใช้กับเชื้อราที่ไม่ประสบผลสำเร็จในการเก็บโดยวิธีอื่น
2. เป็นวิธีที่ไม่ต้องการเครื่องมือใดเป็นพิเศษและทำได้ง่าย
3. ไรไม่รบกวน

ข้อเสีย เช่น

1. อาจทำให้เชื้อมีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากเชื้อเจริญอยู่ภายใต้สภาวะปกติ
2. เสี่ยงต่อการปนเปื้อนจาก spore ที่ปะปนอยู่ในอากาศ
3. เชื้อหลังจากที่ย้ายออกมาใช้มีการเจริญเติบโตช้า

มีเทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์หลายวิธีที่นิยมใช้กัน วิธีการทั้งหมดมีทั้งเป็นประโยชน์เฉพาะด้าน และที่ไม่เป็นประโยชน์ จึงเป็นการยากในการตัดสินใจเลือกวิธีการใดวิธีการหนึ่ง การเลือกวิธีการใดควรอาศัยคุณสมบัติของวิธีการนั้นต่อความต้องการของผู้ใช้ และคำนึงถึงสิ่งต่อไปนี้

1. การรักษาให้จุลินทรีย์รอดชีวิต (maintenance of viability) เซลล์อาจตายระหว่างกระบวนการรักษา ทำให้สูญหายไปในที่สุด เพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเชื้อจึงควรคำนึงถึงการเก็บรักษาที่ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดมากที่สุด ทั้งขณะทำการเก็บรักษาและระหว่างการเก็บรักษา

2. การคัดเลือกทำให้ประชากรเปลี่ยนแปลง (population change through selection) สัดส่วนเซลล์ของประชากรรวมอาจลดลงในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการเก็บรักษา แต่อาจหมดปัญหาถ้าเชื้อเริ่มต้นมีจำนวนเซลล์มาก อย่างไรก็ตามการลดจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเป็นผลมาจากการคัดเลือกของประชากรที่ทนทานกว่า และนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงลักษณะบางประการของเชื้อนั้น การเก็บรักษาที่ดีควรให้มีเซลล์รอดชีวิตมากที่สุด และให้คงลักษณะเช่นเดียวกับเชื้อเริ่มต้นมากที่สุด

3. การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม (genetic change) เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดมีความสำคัญทางวิทยาศาสตร์และอุตสาหกรรม จึงจำเป็นต้องเก็บรักษาไม่ให้สูญไป แต่เชื้ออาจกลายพันธุ์หรือสูญเสียพลาสมิด (plasmid) ระหว่างการเก็บรักษา การเก็บรักษาที่ดีจึงควรลดการเปลี่ยนแปลงนี้

4. ความบริสุทธิ์ (purity) เชื้อที่เก็บรักษาควรอยู่ในสภาพที่บริสุทธิ์ และควรลดโอกาสการปะปนของเชื้ออื่นขณะทำการเก็บรักษา

5. ค่าใช้จ่าย (expense) ค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาเชื้อรวมถึงค่าจ้างผู้ร่วมงาน วัสดุอุปกรณ์ และสิ่งอำนวยความสะดวกอื่น เช่น สถานที่และพลังงาน อุปกรณ์ที่มีราคาสูง เช่น เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งต้องเสียค่าใช้จ่ายมาก

6. จำนวนเชื้อ (number of cultures) สิ่งสำคัญที่ควรพิจารณาสัมพันธ์กับจำนวนเชื้อและวิธีการเก็บรักษา คือ ระยะเวลาในการดำเนินงานช่วงแรกและการดำเนินงานขั้นต่อไป ศูนย์เก็บรักษาเชื้อขนาดเล็กที่ใช้วิธีการเหมาะสมจึงมีภาระมากเมื่อเก็บเชื้อจำนวนมากขึ้น การเลือกวิธีการสำหรับเก็บเชื้อได้จำนวนมาก อาจมีผลต่อสถานที่เก็บรักษา

7. คุณค่าของเชื้อ (value of cultures) ควรเก็บรักษาเชื้อที่มีความสำคัญด้วยวิธีการที่ไม่เสี่ยงต่อการสูญเสีย และการเก็บรักษาเชื้อที่มีความสำคัญน้อยก็ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายด้วย

8. การบริการและขนส่งเชื้อ (supply and transportation of cultures) ถ้าต้องการส่งเชื้อให้ผู้อื่น จำเป็นต้องมีเชื้ออยู่อย่างน้อยสองชุดจึงอาจเตรียมเชื้อไว้เป็นจำนวนมากเพื่อใช้ส่งไปยังแหล่งอื่นๆ ความสะดวกของแต่ละอย่างขึ้นอยู่กับวิธีการเก็บรักษาและจำนวนเชื้อที่ต้องการส่ง การส่งเชื้อทางไปรษณีย์ต้องห่อให้เหมาะสมและต้องรอดชีวิตขณะที่เสียเวลาและภาวะอื่นๆ มีข้อจำกัดของการส่งทางไปรษณีย์ภายในประเทศและระหว่างประเทศ จึงต้องทราบถึงรายละเอียดข้อบังคับของแต่ละประเทศนั้น

9. ความบ่อยของการใช้เชื้อ (frequency of use of cultures) เชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์ การผลิตทางอุตสาหกรรมหรือการควบคุมคุณภาพอาจต้องใช้บ่อยในห้องปฏิบัติการ จึงควรคำนึงถึงความสะดวกในการเลี้ยงและความเสี่ยงต่อการปะปนของเชื้ออื่น

ภาคผนวก ค

เทคนิคทางชีววิทยาในการศึกษาเชื้อราและการเก็บรักษาจุลินทรีย์

วิธีการศึกษา

การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาเชื้อรา

- การเลี้ยงเชื้อราบริเวณป่าชายเลน บนอาหาร 4 ชนิด ได้แก่ PDA, CZA, MEA, CMA อายุ 7 วัน ถ่ายรูปโคโลนีเชื้อราบนอาหารด้านบนและด้านล่าง บันทึกขนาดของโคโลนีเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อรา และประสิทธิภาพของเชื้อรา
- ศึกษาการเก็บรักษาเชื้อรา บนใบ และฝัก โกงกางใบใหญ่ โกงกางใบเล็ก แสมขาว แสมทะเล และดินเลน ด้วย 4 วิธี ได้แก่ Subculture, Parafine, ในดิน, Lyophilyzation

วิธีการทำ Lyophilyzation

วัสดุและอุปกรณ์

1. สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เจริญในระยะเริ่มต้นของ stationary phase
2. preservation suspending medium (10% skim milk)
3. อาหารวุ้นเอียง (agar slant)
4. เครื่องเก็บรักษาจุลินทรีย์ (Edward Freeze Dryer Super Modulyo)
5. หลอดเก็บรักษาจุลินทรีย์ (ampoule)
6. Pasture pipette
7. อะลูมินั่มฟอย (aluminum foil)
8. dispensing syringe
9. กรรไกร
10. ปากคีบ (forcep)
11. สำลี
12. ถุงผ้า
13. แท่งแก้ว
14. ขวดขนาด 4 แดรม (vial)
15. กระดาษกรอง Whatman No.1

16. กรวยกรอง

17. ผ้ากลอส

18. หลอดเก็บรักษาจุลินทรีย์พร้อมสำลี (ใช้เฉพาะสำลี)

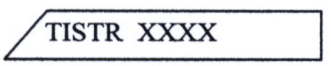
19. อุปกรณ์สำหรับทำหลอดคอด (constrict) และปิดหลอด (seal) หลอดเก็บรักษาจุลินทรีย์

การเตรียมอุปกรณ์

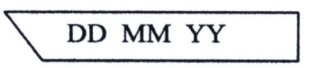
1. เตรียมหลอดเก็บรักษาจุลินทรีย์ หลอดเก็บรักษาจุลินทรีย์ทุกหลอดที่จะนำไปใช้จะต้องล้างให้สะอาดโดยแช่ไว้ใน 2% HCl หนึ่งคืน แล้วล้างด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง แล้วน้ำกลั่นอีก 1 ครั้ง แล้วจึงนำไปอบให้แห้ง พร้อมที่จะนำไปใช้ต่อไป

2. เตรียมป้ายชื่อจุลินทรีย์และอุปกรณ์อื่นๆ

2.1 ทำป้ายชื่อจุลินทรีย์ขนาดกว้าง 5.0 มม. ยาว 30 มม. โดยพิมพ์รหัสของจุลินทรีย์ลงบนกระดาษกรอง(Whatman No.1) ไว้ด้านหนึ่ง ส่วนอีกด้านหนึ่งของกระดาษกรอง Stamp วัน เดือน ปี ที่เก็บจุลินทรีย์ให้ปีอยู่ตรงข้ามกับเลขรหัส และจัดให้ตัวหนังสือ/เลข วางกลับกัน (ตามตัวอย่างข้างล่าง) เพื่อจะทำให้อ่านรหัสจุลินทรีย์และปีที่เก็บจุลินทรีย์ได้ง่าย พิมพ์รหัสและตัดกระดาษดังรูป

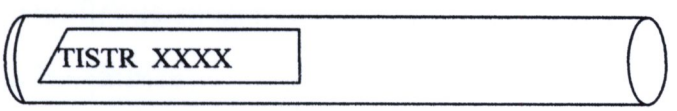


รหัสจุลินทรีย์

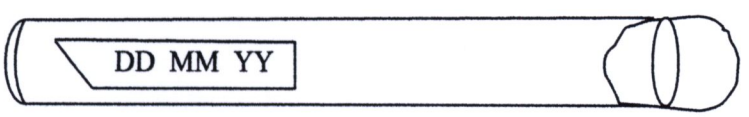


วัน เดือน ปี

2.2 นำกระดาษที่พิมพ์รหัส วัน เดือนปี ที่เก็บ และตัดแล้ว สอดลงใน หลอดเก็บรักษาจุลินทรีย์ โดยให้ ปลายแหลมของแผ่น label อยู่ที่ส่วนก้นหลอด ดังรูป



2.3 อุดหลอดด้วยจุกสำลี ดังรูป



2.4 ห่อหลอดเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่เตรียมจากข้อ 2.1 ถึง 2.3 ด้วยอะลูมินั่มฟอย 2 ชั้น เพื่อป้องกันการเปียกชื้นเมื่อเตรียมทั้งหมดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อพร้อมกับถุงผ้าคลุมจำนวนเท่ากับหลอดเก็บ

รักษาจุลินทรีย์ แท่งแก้ว กรรไกร และปากคีบ โดยห่อด้วยอะลูมินั่มฟอย 2 ชั้น เช่นเดียวกัน นึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121°C15 นาที

3. เตรียม preservation suspending medium (10% skim milk)

3.1 ละลาย Bacto-skim milk ประมาณ 10 กรัม ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ขณะที่ยังอุ่นอยู่ (อุณหภูมิประมาณ 40-50°C หรือแค่นมละลาย) 100 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายเข้ากันแล้วกรองผ่านกรวยกรองที่รองด้วยผ้ากอสและสำลีที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ขวดขนาด 250 มิลลิลิตรที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วรองรับ

3.2 บรรจุ skim milk ที่กรองแล้วลงในขวดขนาด 4 แดรม ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว หลอดละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 15-20 หลอด โดยใช้ dispensing syringe ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปิดจุกไม่แน่นพอให้อากาศผ่านเข้าออกได้

3.3 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°C นาน 10 นาที เมื่อความดันของหม้อนึ่งฆ่าเชื้อลดลงในระดับที่เปิดได้ขณะหม้อนึ่งร้อนอยู่ให้เปิดออกแล้วรีบนำหลอดบรรจุนมไปแช่ในน้ำเย็น เพื่อทำการช็อคจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสปอร์ได้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง

3.4 นำขวด skim milk มานึ่งฆ่าเชื้ออีกครั้งที่อุณหภูมิ 110°C นาน 10 นาที การนึ่งฆ่าเชื้อครั้งนี้จะทำให้จุลินทรีย์ที่มีสปอร์นั้นงอกออกมาเป็นเซลล์ร่างกาย (vegetative cell) ซึ่งจะถูกทำลายได้ในความร้อนระดับนี้ แล้วนำไปแช่น้ำเย็นและบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับข้อ 3

3.5 ตรวจดูการปนเปื้อน (contamination) ของน้ำนมก่อนนำไปใช้ คือถ้ามีการ contamination จะเห็นน้ำนมมีลักษณะตกตะกอนและแยกชั้น ให้คัดทิ้งไป

4. การเตรียมจุลินทรีย์

ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารวุ้นเอียงของอาหารที่เหมาะสม ตามชนิดของจุลินทรีย์โดยดูจากหนังสือ List of Cultures ฉบับที่เป็นปัจจุบัน โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ สายพันธุ์ละ 3 หลอด อาหารวุ้นเอียงต่อ 10% skim milk 5 มิลลิลิตร

วิธีการทำ Lyophilyzation เป็นวิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์แบบถาวร เหมาะสำหรับแบคทีเรีย ยีสต์ และรา (ที่สามารถผลิตสปอร์ได้)

วิธีการทำ Lyophilyzation

เมื่อเตรียมอุปกรณ์ที่จำเป็นพร้อมแล้ว ต่อไปเป็นขั้นตอนการบรรจุเชื้อลงในหลอดเก็บรักษาจุลินทรีย์ซึ่งจะทำในตู้ปลอดเชื้อ โดยก่อนที่ปฏิบัติงานจะต้องเปิดไฟหลอดยูวี เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ภายในตู้เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นเข้าสู่กระบวนการ Lyophilyzation ดังนี้

1. บรรจุเชื้อ (cell suspension) ลงหลอดเก็บรักษาจุลินทรีย์ โดยใช้ Pasteur pipette ที่ปลอดเชื้อ ดูด 10% skim milk จำนวน 5 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ผสมจุลินทรีย์ในหลอดอาหารวุ้นเอียง โดยฉีดแรงๆ ที่อาหารวุ้นเอียง หรือเขี่ยเบาๆ ให้เซลล์กระจายหลุดออกมาอย่างสม่ำเสมอ โดยใช้จุลินทรีย์ทั้ง 3 หลอด แล้วนำมารวมกันเป็นหลอดเดียว จากนั้นใช้ Pasteur pipette ถ่ายสารละลายผสมใส่หลอดเก็บรักษาจุลินทรีย์ หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร โดยประมาณหรือประมาณ 0.7 เซนติเมตรจากก้นหลอดขึ้นมา ทำจนหมดจำนวนหลอดเชื้อที่เตรียมจากนั้นดึงสำลีออกทิ้ง แล้วใช้ถุงผ้าที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วครอบปากหลอดแทนสำลี การบรรจุเชื้อลงหลอดเก็บรักษาจุลินทรีย์นี้ควรทำอย่างรวดเร็วและไม่ควรใช้เวลาเกิน 1 ชั่วโมง เพื่อจุลินทรีย์จะได้ไม่มีโอกาสแบ่งตัวเจริญได้มาก เสร็จแล้วนำหลอดเก็บรักษาจุลินทรีย์บรรจุเชื้อที่เตรียมเสร็จแล้วบรรจุลงบน carrier plate (อุปกรณ์ประกอบเครื่องเก็บรักษาจุลินทรีย์)

2. การทำให้แห้งในระยะที่ 1 (primary dry)

2.1 ขณะที่ทำการบรรจุเชื้อลงหลอดเก็บรักษาจุลินทรีย์ จะทำการเปิดเครื่องเก็บรักษาจุลินทรีย์ โดยกดปุ่ม C.B.10 A ไปที่ I และกดปุ่ม FRIDGE (ไฟสีเขียวจะสว่างขึ้น) เพื่อเป็นการอุ่นเครื่อง Freezer จนได้อุณหภูมิ -40 °C หรือต่ำกว่า -40 °C นำหลอดเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่บรรจุเชื้อจุลินทรีย์แล้วใน carrier plate มาวางบนเครื่อง spin freeze (อุปกรณ์ประกอบเครื่องเก็บรักษาจุลินทรีย์สำหรับเหวี่ยง)

2.2 ปิดฝาครอบ carrier plate และล็อคฝากับเครื่อง spin freeze ให้เรียบร้อย ตั้งเวลาสำหรับเหวี่ยงประมาณ 6 นาที เปิดสวิทช์เครื่องเหวี่ยง ขณะเดียวกันนี้รีบเปิด PUMP ON (ไฟสีส้มจะสว่างขึ้น) เพื่อดูดอากาศออก เมื่อเหวี่ยงรอบ 6 นาที เครื่องเหวี่ยงจะหยุดเอง ปิดสวิทช์เครื่องเหวี่ยง

จะเห็นสารละลายเชื้อแข็งตัวในรูปเอียง ปล่อยให้ PUMP ทำงานต่อไป ประมาณ 3-4 ชั่วโมง ขั้นตอนนี้เป็นการทำให้แห้งแข็งภายใต้สุญญากาศ

2.3 คลายปุ่มวาล์วแก๊สเบาลาซ (gas ballast) ทิ้งไว้ประมาณ 15-20 นาที จากนั้นปิดปุ่มโดยขันให้แน่น

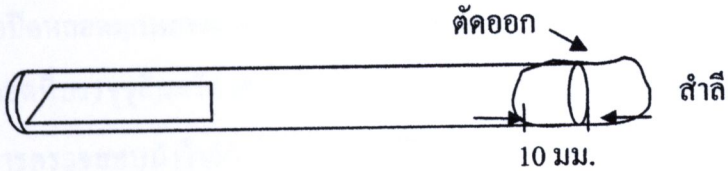
2.4 เมื่อ PUMP ทำงานครบตามเวลาที่กำหนด กดปุ่ม PUMP OFF (ไฟสีส้มจะดับ) จากนั้นไล่ความเป็นสุญญากาศโดยคลายล็อควาล์วใต้ช่องไล่น้ำออก (Drain-valva) จึงสามารถนำหลอดเก็บรักษาจุลินทรีย์ บรรจุเชื้อออกมาจาก spin freeze ได้

3. ทำหลอดเก็บรักษาจุลินทรีย์ให้คอด (ampoule constriction)

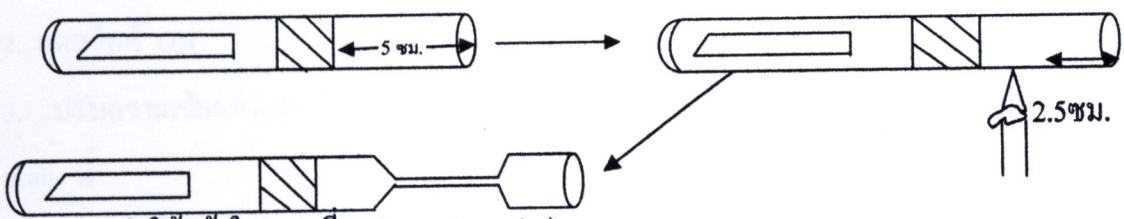
3.1 ทำในตู้เขี่ยเชื้อ โดยเช็ดตู้ให้สะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ

3.2 นำหลอดเก็บรักษาจุลินทรีย์บรรจุเชื้อที่คลุมด้วยถุงผ้ามาเปลี่ยนเป็นอุดด้วยสำลีที่ฆ่าเชื้อมากับหลอดเก็บรักษาจุลินทรีย์เปล่า

3.3 ใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดจุกสำลี



3.4 ใช้แท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วดันจุกสำลีเข้าไปในหลอด ให้ลึกลงไปจากปากหลอดประมาณ 5 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำหลอกมาทำคอดภายนอกตู้ โดยใช้ไฟลนหลอดแก้วห่างจากปากหลอด 2.5 เซนติเมตร จนหลอดแก้วร้อนแดง และอ่อนตัว แล้วจึงดึงหลอดให้คอด ดังรูป



4. การทำให้แห้งในระยะที่ 2 (secondary dry)

4.1 นำแท่นสำหรับดูดอากาศออกจากหลอด (secondary dry manifold) อุปกรณ์สำหรับทำให้แห้งระยะที่ 2 ซึ่งจะมีลักษณะ 2 แขน แขนหนึ่งบรรจุได้ 48 หลอด วางด้านบนของเครื่องเก็บรักษาจุลินทรีย์

4.2 นำหลอดที่ทำดอดแล้วทั้งหมดมาสวมที่ปลายของ manifold ให้แน่นป้องกันมิให้อากาศเข้า

4.3 เปิดเครื่องดูดอากาศ (vacuum) โดยกดปุ่ม PUMP ON (ไฟสีส้มจะสว่าง) จากนั้นปิดวาล์วใต้ช่องที่ไล่น้ำออก (Drain-valve)

4.4 ทิ้งไว้ประมาณ 3 ชั่วโมง จนตัวอย่างแห้ง

4.5 ใช้ไฟจากอุปกรณ์เชื่อมหลอดที่มีหัวแก๊สปิดหลอดบริเวณรอยคอด ระวังอย่าให้มีอากาศจากภายนอกเข้าไปในเครื่อง โดยเชื่อมด้วยความระมัดระวังไม่ให้ช่องว่างภายในหลอดกว้างเกินไป มิฉะนั้นจะทำให้ยากในการปิดหลอด
(กรณีที่มีอากาศเข้าภายในเครื่อง สังเกตจากความดันของเครื่องจะลดต่ำลง ต้องปิดรอยที่อากาศเข้าแล้วเริ่มทำการดูดอากาศออกใหม่อีกครั้งหนึ่ง)

4.6 เมื่อปิดหลอดทุกหลอดเรียบร้อยแล้ว จึงปิดเครื่องเก็บรักษาจุลินทรีย์

5. นำหลอดที่บรรจุจุลินทรีย์แล้วไปตรวจสอบสภาพสุญญากาศโดยใช้เครื่อง Spark tester หลอดที่ผ่านการตรวจสอบนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-10 °C เพื่อรอการตรวจคุณภาพ ส่วนหลอดที่ไม่เป็นสุญญากาศ ทำเครื่องหมายแยกเพื่อการกำจัดโดยการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° C 15 นาที

วิธีการใช้เครื่อง Spark tester

1. เสียบปลั๊ก
2. กดสวิทซ์ ON
3. ปรับความเข้มของแสง โดยการหมุนปุ่มเปิดพอประมาณ ซึ่งจะได้ยินเสียงดังออกมาจากปลาย probe นี้
4. นำ probe จี้ลงไปบริเวณสำลีที่อยู่กึ่งกลางหลอด
5. หลอดที่เป็นสุญญากาศจะเกิดประการแสงสีม่วง หรือน้ำเงินจาง สำหรับหลอดที่ไม่เป็นสุญญากาศจะไม่เกิดประการสีม่วง

การต่อเชื้อหรือการเปลี่ยนอาหารใหม่ (subculture)

วัสดุและอุปกรณ์

1. หลอดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. เข็มเขี่ยเชื้อ
3. กล้อง Stereomicroscope

วิธีปฏิบัติ

1. เพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและบ่มไว้ในสภาพที่เหมาะสม เมื่อถึงเวลาที่อาหารหมดจึงต่อเชื้อลงในอาหารใหม่
2. เขียนรหัสเชื้อที่หลอดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. สังเกตดูลักษณะเชื้อราใต้กล้อง Stereomicroscope แล้วใช้เข็มเขี่ยย้ายลงหลอดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเก็บรักษาเชื้อราโดยวิธีการเก็บในดิน

วัสดุและอุปกรณ์

1. ดินสวน หรือ ดินสีดา
2. น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
3. Vial เก็บเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซม.
4. หม้อนึ่งความดันไอ

วิธีปฏิบัติ

1. นำดินสวน หรือดินสีดา ความชื้นประมาณ 20% (บดและร่อนให้มีขนาดเล็ก)
2. นำดินบรรจุใส่ขวด Vial ประมาณ 2/3 ของขวด เช็ดปากขวดให้สะอาดก่อนปิดฝาเกลียวอย่าให้เศษดินติดอยู่ปากขวด จะทำให้ปิดขวดได้ไม่สนิท
3. นำ Vial ไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นึ่งซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อฆ่าเชื้อในดินให้หมด
4. นำเชื้อราที่เจริญเต็มที่มาผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร
5. เติมน้ำที่ผสมเชื้อรา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วบรรจุดิน

6. ราจะเจริญในขวดดิน ซึ่งวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปิดฝาเกลียวเพื่อให้ความชื้นคงอยู่ในขวด เป็นเวลา 3-10 วัน
7. คลายฝาเกลียวเล็กน้อยในช่วงวันท้ายๆเพื่อให้ความชื้นระเหยออก และให้ดินแห้ง
8. เก็บหลอดเชื้อในสภาพที่คลายฝาเกลียวเล็กน้อยในตู้เย็น อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส

การเก็บรักษาเชื้อราบนอาหารวุ้นภายใต้พาราฟินเหลว

วัสดุและอุปกรณ์

1. หลอดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. พาราฟินเหลวนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีปฏิบัติ

1. เพาะเชื้อราในหลอดอาหารวุ้นผิวเอียง (บ่มให้ไมซีเรียม/สปอร์เจริญเต็มที่)
2. เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารเต็มที่แล้ว จึงเทพาราฟินเหลว(ซึ่งทำการฆ่าเชื้อแล้ว) ทับลงไปในหลอดให้ให้ท่วมโคโลนีของเชื้อ โดยให้ระดับพาราฟินอยู่สูงจากบริเวณที่เชื้อเจริญประมาณ 1 ซม.
3. ปิดฝาให้แน่น นำเก็บที่อุณหภูมิห้อง หรือถ้าจะให้ดียิ่งขึ้นนำเก็บที่อุณหภูมิ 0-5 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato Starch (frominfusion)	4.0 g
Dextrose	20.0 g
Agar	15.0 g

Final pH (at 25°C) 5.4 ± 0.2

Difco™

2. Corn Meal Agar (CMA)

Corn meal (frominfusion)	50.0 gm/lit
Agar	15.0 gm/lit

Final pH (at 25°C) 6.0 ± 0.2

BIOMARK™

3. Malt Extract Agar Base (MEA)

Malt extract	30.0 gm/lit
Mycologicalpeptone	5.0 gm/lit
Agar	15.0 gm/lit

Final pH (at 25°C) 5.4 ± 0.2

BIOMARK™

4. Czapex Dox Agar (CZA)

Sodium nitrate	2.0 g/l
Potassium chloride	0.5 g/l
Magnesium glycerophosphate	0.5 g/l
Forrous sulphate	0.01 g/l
Potassium sulphate	0.35 g/l
Sucrose	30.0 g/l

Final pH (at 25°C) 6.8 ± 0.2

OXOID™