ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Modified version of Rennie medium (RM medium)

Modified version of Rennie medium (RM medium) ซึ่งผ่านการปรับปรุง เป็นอาหารที่ใช้แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช มีสูตรอาหาร แบ่งเป็น 4 ส่วน ดังนี้

Solution A

K_2HPO_4	0.8 g
KH_2PO_4	0.2 g
NaCl	0.1 g
NaFeEDTA	0.28 mg
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25 mg
Yeast extract	0.1 g
Sucrose	5.0 g
Manitol	3.0 g
Sodium Malate	2.0 g
Na-Lactate	0.5 ml
Noble agar	2.0 g
Distilled water	900 ml

Solution B

$MgSO_4.7H_2O$	0.20 g
$CaCl_2.2H_2O$	0.06 g
Distilled water	100 ml

Solution C

Biotin	5.0 µg
Para-aminobenzoic acid(PABA)	10.0 µg
Orchid extract	1.25 ml

ขั้นตอนการเตรียม Orchid extract :

การเตรียม Orchid extract เป็นการเตรียมน้ำสกัดจากกล้วยไม้เพื่อผสมลงในอาหารให้มีส่วนประกอบใกล้เคียงกับภายในต้นกล้วยไม้จริงมากที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Orchid shoot 20 g + 50 ml 80% ethanol

↓

บดตัวอย่างในโกร่งบดที่ผ่านการ autoclave

↓

กรองผ่าน กระดาษกรองที่ sterilize แล้ว

↓

กรองผ่าน filter membrane

↓

นำไปผสมในอาหาร 1.25 ml ต่อ อาหาร 1 ลิตร

ส่วนที่เหลือสามารถเก็บไว้ใช้ได้ในครั้งต่อไป โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศา

ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารแยกเป็น 4 ส่วน คือ ส่วนของ Solution A, Solution B, Solution C และ Orchid extract โดยส่วนที่1 คือ solution A ชั่งสารเคมีตามข้างต้น ผสมกับน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 7.0 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 900 ml นำไปต้มกับวุ้นละลายให้เข้ากัน ต้มจนเดือด แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ขวด แต่ละขวดแบ่งให้มีปริมาณขวดละ 22.5 ml (แบ่งได้ 4 ขวด) ปิดด้วยจุกสำลี และปิดทับจุกสำลีมัดด้วยกระดาษอีกชั้น จากนั้นเตรียม solution B ละลาย 0.20 กรัมของ $MgSO_4.7H_2O$ และ0.06 กรัม $CaCl_2.2H_2O$ ในน้ำกลั่น 100 ml แบ่งใส่ใน flask ขนาด 125 ml flask ละ 25 ml (แบ่งเป็น 4 ขวด) นำทั้ง 2 ส่วนไปนึ่งในหม้อความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

นำ Solution A และB ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อมาผสมกับ Solution C และOrchid extract ในตู้ปลอดเชื้อ(Laminar air flow) ในขั้นตอนการผสมต้องรอให้ Solution A และ B มีอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส (หลังมือแตะได้) ส่วน Solution C และOrchid extract ก่อนผสมต้องกรองผ่าน filter membrane เพื่อการฆ่าเชื้อ ผสมให้เข้ากันตามอัตราส่วนที่กล่าวในสูตรอาหาร จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 9 ml ปิดด้วยฝาปิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Nutrien agar medium (NA) (กัญจนา และคณะ, 2547)

Beef extract	3.0 g
Peptone from meat	5.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1000.0 ml
pH 6.8-7.0	

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนประกอบต่างๆลงในน้ำกลั่น คนด้วยแท่งแก้วให้ส่วนประกอบของอาหารละลาย ปรับปริมาตรให้ครบตามสูตร โดยยังไม่ปรับปริมาตร เมื่อส่วนผสมละลายหมด ปรับ pH ด้วย 0.1 N NaOH หรือ 0.1 N HCl จนได้ประมาณ 6.8-7.0 ปรับปริมาตรเท่ากับ 1000 ml

นำไปผสมกับวุ้นต้มจนละลาย เทอาหารใส่ขวดปริมาณขวดละ 200 ml ปิดด้วยจุกสำลี ปิดทับด้วยกระดาษอีกครั้ง นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ(autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

Viande-Levure medium (VL)(Elbeltagy, 2001)

Nutrient broth	8.0 g
Yeast extract	5.0 g
NaCl	5.0 g
Glucose	2.0 g
Cysteine-HCl	0.3 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1000.0 ml

(วิธีการเตรียมเหมือนเตรียม NA medium)

การเลี้ยงเชื้อในสภาพไร้ออกซิเจน

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะทำการทดสอบใส่ลงใน anaerobic jar (Anaerocult®MERCK) ปริมาตร 2.5 ลิตร เตรียมแผ่นดูดออกซิเจน(Aerocult® A MERCK) ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับออกซิเจนอย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ ทำให้สภาพใน anaerobic jar เป็นสภาพไร้ออกซิเจน การใช้แผ่นดูดออกซิเจน มีวิธีคือ เตรียมน้ำกลั่น 35 ml ค่อยๆเทลงบนแผ่นดูดออกซิเจน โดยเทให้กระจายทั่วทั้งแผ่นจากนั้นนำไปวางไว้บริเวณด้านข้างภายใน anaerobic jar ใส่แผ่น indicator (Anaerotest®MERCK) ลงไปเพื่อตรวจสอบว่ามีออกซิเจนอยู่หรือไม่ จากนั้นปิดฝาให้แน่น สังเกตแผ่น indicator หากภายใน anaerobic jar อยู่ในสภาพไร้ออกซิเจนแผ่นจะเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีขาว เช่นเดียวกันหากในระหว่างการทดลองมีการรั่วของฝาปิด จนทำให้มีออกซิเจนใน anaerobic jar indicator จะเปลี่ยนจากสี ขาว เป็นสีฟ้า

ส่วนประกอบของ Aerocult® A

Kiesenlguhr
Iron powder
Sodium carbonate

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 23 Anaerobic jar ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อในกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจน(anaerobic bacteria)

Ammonium Mineral Salt Agar

เตรียมอาหาร Ammonium Mineral Salt Agar (Plazinski and Rolfe., 1985) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับวิเคราะห์การใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่าง มีสูตรอาหารดังนี้

$(NH_4)SO_4$	2.0 g
KH_2PO_4	3.0 g
Na_2HPO_4	4.5 g
Yeast extract	1.5 g
Sodium Malate	5.0 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.3 g
$FeSO_4.7H_2O$	2.0 mg
$CaCl_2$	2.0 mg
H_3BO_3	0.1 mg
$MnSO_4$	0.1 mg
$ZnSO_4.7H_2O$	0.17 mg
$CuSO_4.8H_2O$	0.5 mg
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.1 mg
Agar	15.0 g
0.5%Bromothymol blue	5.0 ml
Distilled water	1000.0 ml

ขั้นตอนการเตรียมเหมือนขั้นตอนการเตรียม NA การทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างนั้นใช้สูตรอาหารชนิดเดียวกัน แตกต่างกันที่แหล่งน้ำตาลที่นำมาทดสอบ (ตัวหนังสือสีน้ำเงิน) โดยใช้แหล่งคาร์บอนจาก 4 แหล่ง คือ arabinose, glucose, malate และ manitol แล้วตรวจการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหาร

Mineral salt – cellulose medium (อรลัดดา, 2537)

NH_4Cl	1.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g
KH_2PO_4	0.1 g

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

K_2HPO_4	0.1 g
$CaCl_2$	0.4 g
$MgSO_4$	0.1 g
α Cellulose	1.0 g
agar	15 g
Distilled water	1000.0 ml

ปรับ pH 6.8 – 7

น้ำยาทดสอบ

สารละลาย 0.1 % congo red

ละลาย congo red 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร และเติม ethanol 95 % อีก 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์

ละลาย NaCl 58.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

สีและน้ำยาที่ใช้ย้อม

Gram's stain (กัญจนา และคณะ, 2547)

1. Crystal violet

สารละลาย A

Crystal violet (85% dye)	2.0 g
Ethyl alcohol 95%	20.0 ml.

ละลายสีในแอลกอฮอล์จนสีละลายหมด

สารละลาย B

Ammonium Oxalate	0.8 g
น้ำกลั่น	80.0 ml.

ผสมสารละลาย A และ B ถ้ามรตะกอนกรองก่อนใช้ และถ้าสีเข้มเกินไปอาจเจือจางสารละลาย A เป็น 1:10 ก่อนผสมกับสารละลาย B

2. Gram's iodine solution

Iodine(crystal)	1.0 g.
Potassium iodide(KI)	2.0 g.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำกลั่น 300.0 ml.

ละลาย iodine และ KI ในน้ำกลั่นปริมาณน้อยๆก่อน แล้วเติมน้ำให้ครบ เก็บในขวดสีชา

3. Safranin O counterstain (stock solution)

Safranin O 2.5 g.

Ethyl alcohol 95% 100.0 ml.

ถ้าจะใช้สีในการย้อมให้เจือจางเป็น 1:10 ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้

สีย้อมเนื้อเยื่อ

1. Safranin O

โดยชั่ง Safrani O 0.1 กรัม ผสมกับ ethyl alcohol 95 % 100 ml. จากนั้นผสมน้ำกลั่นลงไปเท่าตัว

2. Fast green

ละลาย fast green ในส่วนผสมของ clove oil – absolute alcohol (3:1) จนมีสีเข้มตามต้องการ

พืชที่ใช้ในการทดลอง

เอื้องสายสามสี (*Dendrobium crystallinum*)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้นเป็นลำผอม ยาว 30-60 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลางต้น 6-7 มม. ผิวมักเป็นร่องตามยาว ขึ้นเป็นกอห้อยลง ข้อมีโคนกาบใบเหลือติดอยู่ ใบรูปรีแกมรูปหอก ขนาด 8-10 x 2-2.5 ซม. แผ่นใบบาง ปลายแหลม มักทิ้งใบก่อนฤดูดอก ดอกเกิดตามข้อเป็นช่อสั้นๆช่อละ 1-3 ดอก ขนาดดอก 3-4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ซม. กลีบขาวปลายสุดม่วง โคนกลีบปากแคบและห่อ ตรงกลางสีเหลือง สีเหลืองสด ฝาครอบอับเรณูมีตุ่มใสๆ ปลายแหลมมองดูคล้ายผลึกแก้ว

ฤดูดอก : กุมภาพันธ์-พฤษภาคม

แหล่งที่พบในประเทศไทย : เกือบทุกภาค ยกเว้น ภาคใต้

เขตการกระจายพันธ์ : พม่าและ อินโดจีน

Gas Chromatography

คุณสมบัติของเครื่อง GC

GC เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการแยก องค์ประกอบต่าง ๆ ของสารที่เราสนใจซึ่งเทคนิคนี้เหมาะ ที่จะใช้กับสารที่มีคุณสมบัติพิเศษ คือ สามารถระเหยกลายเป็น gas ได้เมื่อถูกความร้อน และกลไกที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ในสารตัวอย่างจะอาศัยหลักของความชอบที่แตกต่างกันขององค์ประกอบในตัวอย่างที่มีต่อ phase 2 phase คือ stationary phase และ mobile phase

องค์ประกอบที่สำคัญของเครื่อง GC สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วนคือ

1. Injector
2. Oven
3. Detector

การคำนวณการวัดการตรึงไนโตรเจนจากตัวอย่างพืชและเชื้อ

การคำนวณปริมาณ C_2H_4

$$C_2H_4 \text{ formation} = \frac{A \times 1000 \times V}{22.4 \times C \times B} \quad \mu\text{mole/hr/unit}$$

A = sample C_2H_4 1 ml peak hight (area)

B = standard C_2H_4 1 ml peak hight (area)

V = ปริมาตรของบรรยากาศเหนือในภาชนะ

C = ปริมาตรของภาชนะที่ใช้เจือจางหาค่า ethylene มาตรฐาน

22.4 = ปริมาตรมาตรฐานของก๊าซ C_2H_4 ที่ NTP

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ 1 ตาราง Analysis of variance ของอัตราการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อกล้วยไม้ที่ได้รับการปลูกเชื้อ

Data	SOV	df	MS
กล้วยไม้พันธุ์เอื้องสายสามสี	Isolate(A)	2	207.22*
	Part(B)	1	13.67*
	A X B	2	6.21
	Cell	5	88.10*
	Reidual	18	1.02
	Total	23	19.95
กล้วยไม้ลูกผสม	Isolate	2	42.90*
	Error	9	0.23
	Total	11	

*มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $P_{0.05}$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาววรยุวัน ชวนไชยสิทธิ์
วัน เดือน ปีเกิด	24 พฤษภาคม 2523
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนวัฒโนทัยพายัพ เชียงใหม่ ปีการศึกษา 2540 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2544
ทุนการศึกษา	ได้รับทุนอุดหนุนจากโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2547-2548 ได้รับทุนอุดหนุนทุนบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2548

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved