

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient agar medium (NA)

Nutrient broth	8.0 กรัม
ผงวุ้น	15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย Nutrient broth ลงในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแก้วให้สารอาหารละลาย ปรับ pH ด้วย 0.1 NaOH หรือ 0.1 N HCl จนได้ประมาณ 6.8 -7 ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปผสมวุ้นต้มจนละลาย เทอาหารใส่ขวดปริมาณขวดละ 200 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี ปิดทับด้วยกระดาษอีกชั้น นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

Rennie Medium Semi-Solid (RMS)

Solution A

Solution A :	โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8 กรัม
	Yeast extract	0.1 กรัม
	น้ำตาลซูโครส(Sucrose)	5.0 กรัม
	แมนนิทอล(Menital)	3.0 กรัม
	โซเดียมมาเลท(Sodium malate)	2.0 กรัม
	โซเดียมมาเลท(Na- Lactate 60%)	0.5 มิลลิลิตร
	โพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.2 กรัม
	โซเดียมคลอไรด์(NaCl)	0.1 กรัม
	โซเดียมเฟอริกอีเลท(NaFeEDTA)	0.28 กรัม
	โซเดียมโมลิบเดตทวิไฮเดรต($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.25 กรัม
	วุ้น	2.0 กรัม
	น้ำกลั่น	900 มิลลิลิตร
Solution B :	แมกนีเซียมซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2 กรัม

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.06 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

Solution C : ไบโอดีน(Biotin)	5.0 ไมโครกรัม
พาราอะมิโนเบนโซอิก (Para – aminobenzoic acid)	10.0 ไมโครกรัม
สารสกัดจากปทุมมา	1.25 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากพืช

การเตรียมสารสกัดจากพืช เป็นการเตรียมน้ำสกัดจากต้นปทุมมาซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ส่วนของกาบใบ เพื่อผสมลงในอาหารให้มีส่วนประกอบใกล้เคียงกับภายในต้นปทุมมาจริงมากที่สุด โดย ชั่งกาบใบปทุมมา 10 กรัมนำไปบดกับเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 25 มิลลิลิตรในโกร่งบดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ กรองด้วยกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นกรองด้วย filter membrane นำไปผสมในอาหาร 1.25 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 ลิตร (ทำในตู้ปลอดเชื้อ)

ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารแยกออกเป็น 4 ส่วน โดยส่วนที่ 1 คือ Solution A ซึ่งสารเคมีตามข้างต้นผสมกับน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 7.0 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตรนำไปต้มกับวุ้นละลายให้เข้ากัน แบ่งอาหารใส่ขวดแต่ละขวดมีปริมาตร 150 มิลลิลิตรปิดด้วยจุกสำลี ปิดทับด้วยกระดาษอีกครั้ง จากนั้นเตรียมส่วนที่ 2 คือ Solution B ซึ่งสารเคมีตามข้างต้นแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตรขวดละ 50 มิลลิลิตร นำทั้งสองส่วนไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

นำแต่ละส่วนมาผสมกันในตู้ปลอดเชื้อตามอัตราส่วนที่กล่าวไว้ในสูตรอาหาร (ส่วน Solution C และ สารสกัดจากปทุมมา ก่อนผสมต้องกรองผ่าน filter membrane เพื่อการฆ่าเชื้อ) จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 9 มิลลิลิตรปิดด้วยฝาปิด

การเตรียมสารละลาย C

สารละลาย Na หรือ K Tartrate 2 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ CuSO_4 1 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นดูดมา 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Na_2CO_3 2 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 N NaOH 50 มิลลิลิตร

การเตรียม Sulkovskii

1. 0.5 M FeCl₃ กำหนดหาหน้าหนักของสารที่ต้องการ

$$1 \text{ M FeCl}_3 = [18.9984 + (35.453 \times 3)]$$

$$= 125.3574 \text{ กรัม}$$

$$0.05 \text{ M FeCl}_3 = 1.25.3574 \times 0.5 / 1$$

$$= 62.6787 \text{ กรัมต่อลิตร}$$

ซึ่ง 0.05 M FeCl₃ 62.6787 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

2. 35 เปอร์เซนต์ HClO₄ 50 ml ในตู้มี 71 เปอร์เซนต์ HClO₄

ดวง 71 เปอร์เซนต์ HClO₄ 49.30 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

หลังจากนั้นผสม 0.5 M FeCl₃ 1 มิลลิลิตร กับ 35 เปอร์เซนต์ HClO₄ 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

สูตรคำนวณปริมาณก๊าซเอทิลีน

$$\text{ปริมาณ ก๊าซเอทิลีน} = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน} \times B \times V}{V_{\text{std}} \times A}$$

$$V_{\text{std}} \times A$$

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน = 15.46 นาโนโมล

B = พื้นที่ใต้กราฟ(sample area)

V = ปริมาณช่องว่างอากาศ(volumn sample)

Vstd = ปริมาณของสารละลายมาตรฐานที่ฉีดเข้าเครื่อง GC (1 มิลลิลิตร)

A = พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐาน (standard area)

การเตรียม reagent สำหรับวิเคราะห์ไนโตรเจนรวม

A reagent ซึ่งโซเดียมคลอไรด์ 25 กรัม ใส่บีกเกอร์ ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 10 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นตัวปรับ pH จากนั้นเติมสารละลายเมธิลเรด 20 มิลลิลิตร (เมธิลเรด 0.05 กรัม + 60 เปอร์เซนต์เอทานอล 20 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

B reagent ซึ่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 136.09 กรัม ใส่บีกเกอร์ 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร จากนั้นชั่งกรดเบนโซอิก 2.75 กรัม ใส่บีกเกอร์ 500 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันโดยใช้แท่งแก้วคน

C reagent ซึ่งโซเดียมไนโตรพรัสไซด์ 0.1 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตร จากนั้นเติม

ฟีนอล 10.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้นาน 2 สัปดาห์

D reagent ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 7.06 กรัม และไตรโซเดียมฟอสเฟต 31.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติมโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

การเตรียม reagent สำหรับวิเคราะห์ฟอสฟอรัส

E reagent ชั่งแอมโมเนียมโมลิบเดต 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรอง

L reagent เตรียมกรดซัลฟูริก 250 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร

M reagent นำ E reagent มาผสม L reagent โดยเท L reagent ลงในบีกเกอร์ ขนาด 1 ลิตร ค่อยๆเท E reagent ทีละน้อย อย่างช้าๆ ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมามานำมาปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาตั้งทิ้งไว้ในที่มีด

เตรียมสารละลายสแตนดาร์ด โดยชั่ง สแตนดาร์ด 0.25 กรัม เติลงในขวดสีชา (เตรียมในตู้เย็น) เติมกรดไฮโดรคลอริก 5 มิลลิลิตร ละลายให้หมด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ใช้ได้ 3 วัน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล	นางสาวนิภาวัลย์ แหมะไรสง	
วัน เดือน ปี เกิด	19 พฤศจิกายน 2525	
ประวัติการศึกษา	วุฒิ	ชื่อสถาบัน
		ปีที่จบการศึกษา
ประถมศึกษาตอนต้น	เสลภูมิพิทยาคม	2541
ประถมศึกษาตอนปลาย	สุนารีวิทยา2	2544
วท.บ(พืชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยแม่โจ้	2548

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

33/1 หมู่ที่ 3 ตำบลวังไม้แดง อำเภอประทาย จังหวัดนครราชสีมา 30180

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved