



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

BG medium

nutrient broth	8.0	กรัม
yeast extract	0.1	กรัม
KCl	0.1	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

*ปรับ pH เท่ากับ 5

potato dextrose broth (PDB)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

*ปรับ pH เท่ากับ 7

potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

*ปรับ pH เท่ากับ 7

ภาคผนวก ข

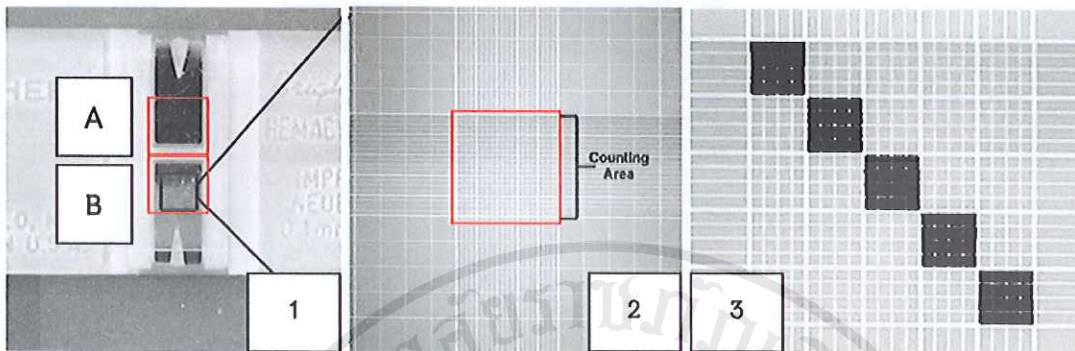
วิธีการวิเคราะห์

1. การคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อรา โดย Hemacytometer

นำเชื้อรามาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อชั่งบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประมาณ 7 วันจากนั้นนำเชื้อรา มาล้างด้วย tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้วใช้ไมโครปิเปตดูดผิวหน้าให้สปอร์แขวนลอยในน้ำ นำไปใส่ในหลอดทดลอง กรองสปอร์ของเชื้อรากับผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร เพื่อให้สปอร์ของเชื้อราแขวนลอยในน้ำ นำสารแขวนลอยโคโคนิดี้ที่ได้ไปตรวจนับ ปรับระดับความเข้มข้นให้ได้ 1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วย tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ที่ นิ่งมาเชื้อแล้ว เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

การคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อรา โดยนำสปอร์ของเชื้อราที่เตรียม มาคำนวณหาความเข้มข้นโดยดูดสารแขวนลอยของโคโคนิดี้จาก Stock ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาตร 900 ไมโครลิตร (หลอดที่ 1 เจือจาง 10 เท่า) จากนั้นดูดสารแขวนลอยสปอร์จากหลอดที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาตร 900 ไมโครลิตร (หลอดที่ 2 เจือจาง 100 เท่า) จากนั้นนำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราที่เจือจาง 100 เท่าไปนับจำนวนสปอร์โดยใช้เครื่องมือนับจำนวนสปอร์ Hemacytometer โดยจะทำการนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 40X ทั้ง 2 ด้าน (A และ B) ดังภาพที่ ข.1 โดยบริเวณที่ใช้สำหรับนับ ให้นับตรงกลางในแต่ละด้าน นับจำนวน 5 ช่อง แต่ละช่องมี 16 ช่องเล็ก ส่วนการนับโคโคนิดี้ของเชื้อรา จะนับในแบบแนวทแยง แล้วนำค่าที่ได้จากนับทั้ง 2 ด้าน มาหาค่าเฉลี่ย และนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อราจากสูตร

ความเข้มข้นของเชื้อรา = ค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ x ค่าคงที่ 2.5×10^5 x ระดับการเจือจางที่ใช้ นับ



ภาพที่ ข.1 การนับสปอร์เชื้อราโดยใช้ Hemacytometer

1. พื้นที่สำหรับการนับ โคนิเดียเชื้อราอยู่ 2 Chamber
2. บริเวณที่ใช้สำหรับนับ
3. การนับ โคนิเดียของเชื้อรา จะนับในแบบแนวทแยง

ตัวอย่าง

นับจำนวนสปอร์ได้ $= 33+39+29+25+36+40+39+31+28+25/10 = 32.5$

โดยนับที่ระดับความเข้มข้น 10^2

ความเข้มข้นของเชื้อรา $= 32.5 \times 2.5 \times 10^5 \times 10^2$

$= 81.25 \times 10^7$

$= 8.13 \times 10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

การทดลองใช้ความเข้มข้น 1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงต้องปรับความเข้มข้นของเชื้อราที่นับได้ 8.13×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้สูตรดังนี้

สูตร $N1V1 = N2V2$

โดย $N1$ = ความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์ของ stock เชื้อรา

$V1$ = ปริมาตรสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราจาก stock ที่ต้องการ

$N2$ = ความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่ต้องการ

$V2$ = ปริมาตรสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่นำไปใช้จริง

การปรับความเข้มข้น จะใช้ tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อ หน่วยความเข้มข้น CFU/ml.

ตัวอย่าง

ต้องการเตรียมสารแขวนลอยโคนิเดีย 3 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 1×10^8 โคนิเดียต่อ มิลลิลิตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

$$8.13 \times 10^8 \times V_1 = 1 \times 10^8 \times 3$$

$$V_1 = 1 \times 10^8 \times 3$$

$$= 8.13 \times 10^8$$

$$= 0.369 \text{ มิลลิลิตร}$$

$$= 0.369 \times 1,000$$

$$= 369 \text{ ไมโครลิตร}$$

ดังนั้น ต้องดูดสารแขวนลอยสปอร์จาก Stock เชื้อรามา 0.369 มิลลิลิตร และเติม tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ $3,000 - 369 = 2,630$ ไมโครลิตร จึงได้สารแขวนลอยโคนิเดีย เชื้อราที่ระดับความเข้มข้น 1×10^8 ในปริมาตร 3 มิลลิลิตร

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

วิธีการนี้สามารถใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาล Reducing sugar ที่มีปริมาณอยู่ในช่วงระหว่าง 5-500 ไมโครกรัมของน้ำตาลกลูโคส

สารเคมี

1. 2 N NaOH 50 มิลลิลิตร (เตรียมโดยละลาย NaOH ปริมาณ 4 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

2. DNS solution เตรียมโดยละลาย 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) 2.5 กรัม ใน 50 มิลลิลิตร ของ 2 N NaOH เติม Sodium potassium tartrate (Rochelle salt) ลงไป 75 กรัม และคน จนกระทั่ง สารละลายหมด จึงเติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสามารถเก็บไว้ใช้ได้นานหลายสัปดาห์

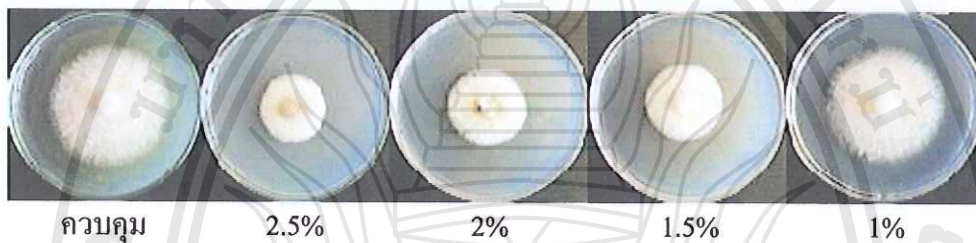
วิธีวิเคราะห์

1. คัดตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลจำนวน 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองสำหรับหลอดที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank) ใช้น้ำกลั่น
2. เติม DNS solution ลงไปในแต่ละหลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที
4. ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว โดยการนำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง
5. เติมน้ำให้ครบ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
6. นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาล ที่ทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอน

ภาคผนวก ค

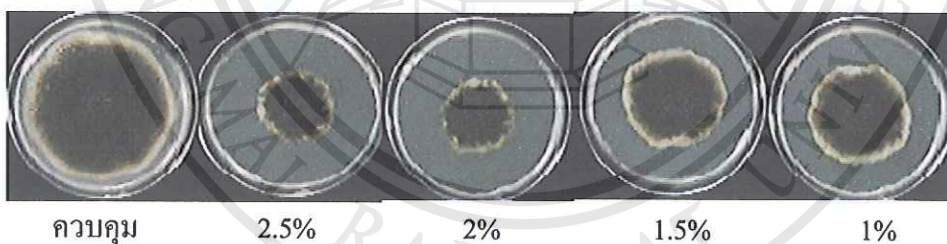
ภาพแสดงผลการทดลองประสิทธิภาพของสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxi*
ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในลำไย

1. ประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. จากลำไย



ภาพที่ ค.1 การเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. จากลำไย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA
ที่ผสมสารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxi* ระดับความเข้มข้น 1, 1.5, 2
และ 2.5 เปอร์เซ็นต์

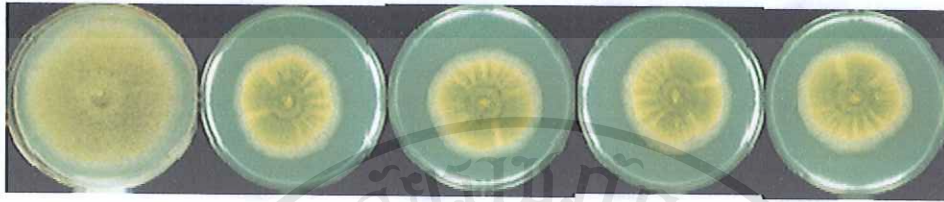
2. ประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* จากลำไย



ภาพที่ ค.2 การเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* จากลำไย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA
ที่ผสมสารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxi* ระดับความเข้มข้น 1, 1.5, 2
และ 2.5 เปอร์เซ็นต์



3. ประสิทธิภาพของโคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* จากลำไย



ควบคุม

2.5%

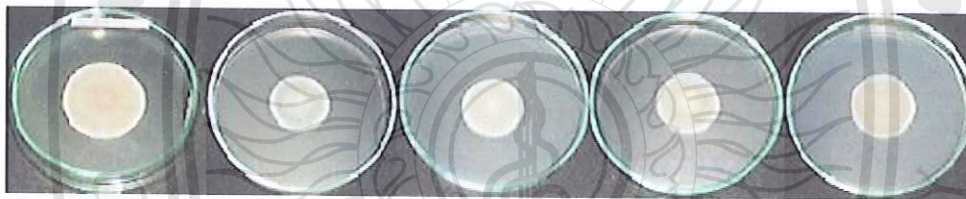
2%

1.5%

1%

ภาพที่ ค.3 การเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* จากลำไย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารสกัดโคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxi* ระดับความเข้มข้น 1, 1.5, 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์

4. ประสิทธิภาพของโคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* sp. จากลำไย



ควบคุม

2.5%

2%

1.5%

1%

ภาพที่ ค.4 การเจริญของเชื้อรา *Penicillium* sp. จากลำไย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารสกัดโคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxi* ระดับความเข้มข้น 1, 1.5, 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์