บทปฏิบัติการที่ 2

อาหารเลี้ยงเชื้อราและการฆ่าเชื้อ

(Fungus Culture Medium and Method for Sterilization)

เชื้อราอาจนำไปเลี้ยงให้เจริญเติบโตได้บนอาหารที่แตกต่างกัน ซึ่งอยู่ในรูปของเหลวหรือค่อนข้างแข็งโดยการเติมวุ้มลงไป ราส่วนมากเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูงและมี pH อยู่ระหว่าง 5-6 แต่แบคทีเรียปกติเจริญได้ดีในอาหารที่มีโปรตีนและมี pH ประมาณ 7 ไม่มีอาหารชนิดใดที่จะเหมาะสมสำหรับการเจริญของราทุกชนิด เพราะราแต่ละชนิดต้องการอาหารไม่เหมือนกัน เชื้อราบางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอินทรีย์สารผสมอยู่ แต่บางชนิดต้องการอาหารที่มีส่วนประกอบทางเคมีที่พิเศษไปกว่าปกติ

อาหารเลี้ยงเชื้อรา (Fungus culture medium) หมายถึง วัตถุใดก็ตามที่นำไปเลี้ยงเชื้อราแล้วสามารถทำให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ดี และปราศจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นขึ้นปะปน อาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดหนึ่ง ๆจะมีคุณสมบัติดีเลวอย่างไร มีข้อควรพิจารณาดังต่อไปนี้ คือ

1. ส่วนประกอบของธาตุอาหารและความเข้มข้น
2. ระดับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร
3. อัตราของออกซิเจนและความชื้น
4. การเปลี่ยนแปลงในอุณหภูมิปกติ
5. ความเกี่ยวพันธ์กับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ

ถ้าแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อราตามส่วนประกอบทางเคมีแล้ว แบ่งได้ 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือ

1. **อาหารเลี้ยงเชื้อตามธรรมชาติ (Natural Media)** ประกอบไปด้วย สารตามธรรมชาติอาจได้จากชิ้นส่วนของพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ด้วยกัน ไม่ทราบอัตราส่วนของสารประกอบทางเคมีที่แน่นอน เช่น

1 .1 **Alphacel** Medium

Alphacel	20 กรัม
$MgSO_4$	1 กรัม
KH_2PO_4	1.5 กรัม
$NaNO_3$	1 กรัม
น้ำมะพร้าว	50 มิลลิลิตร

วุ้น	15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ปรับระดับความเป็นกรดเป็นด่างให้ได้ประมาณ 5.6 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ใช้เวลา 20 นาที ส่วนน้ำมะพร้าวหลังจากกรองด้วยกระดาษกรองแล้ว ให้แยกนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที เก็บไว้ที่ 6 องศาเซลเซียส เวลาจะใช้จึงนำไปผสมกับส่วนประกอบอื่น ๆ อาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้ใช้กระตุ้นให้เชื้อราหลายชนิดสร้างสปอร์ได้ดี

1.2 BPSMA

ถั่วฝักยาว	200 กรัม
Sucrose	5 กรัม
Malt extract	5 กรัม
วุ้น	17 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

นำถั่วฝักยาวผสมน้ำแล้วบดด้วยเครื่องบด blendor จากนั้นกรองกากทิ้งไป นำ sucrose ไปละลายน้ำแล้วกรองผ่านเครื่องกรองแบคทีเรีย เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อของผสมอื่น ๆเรียบร้อยแล้ว ให้นำ sucrose ที่ผ่านการกรองแล้วไปผสมเข้าด้วยกัน อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้เหมาะสำหรับกระตุ้นให้เชื้อรา *Diplocarpon carliana* สร้างสปอร์

1.3 Corn Meal Agar

Corn meal	20 กรัม
Peptone	20 กรัม
Dextrose	20 กรัม
วุ้น	15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

อาหารชนิดนี้เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อราหลายชนิด และกระตุ้นให้สร้างสปอร์ได้ดี

1.4 **Emersons Y_pS_s Agar**

Yeast extract (Difco)	4 กรัม
Soluble starch	15 กรัม
K_2HPO_4	1 กรัม
$MgSO_4$	0.5 กรัม
วุ้น	20 กรัม

ใช้สำหรับศึกษาวงจรชีวิต และอนุกรมวิธานของเชื้อรา *Allomyces* sp. และพวกรา น้ำอื่น ๆ

1.5 Filter Paper Yeast Agar

กระดาษกรอง	12 กรัม
Yeast extract	4 กรัม
วุ้น	24 กรัม
น้ำก๊อก	1000 มิลลิลิตร

ให้ปั่นกระดาษกรองในน้ำแล้วนำไปผสมกับส่วนผสมอื่น ๆ เหมาะสำหรับกระตุ้นให้เชื้อรา *Sordaria* sp. สร้าง perithecia

1.6 Glucose **Peptone Agar**

Glucose	10 กรัม
Bacto-Peptone	2 กรัม
KH_2PO_4	0.5 กรัม
$MgSO_4.7H_20$	0.6 กรัม
วุ้น	15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Gloeosporium musarum* ให้สร้าง conidia

1.7 Leonian Agar

Peptone	0.625 กรัม
Maltose	6.25 กรัม
Malt extract	6.25 กรัม
KH_2PO_4	1.25 กรัม
$MgSO_4.7H_20$	0.625 กรัม
วุ้น	20 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้มีประโยชน์สำหรับกระตุ้นให้เชื้อราบางชนิดสร้างโครงสร้างพิเศษ และเป็นอาหารมาตรฐานสำหรับศึกษาเชื้อราใน Sub-Division Ascomycotina โดยเฉพาะ Order Sphaeropsidales

1.8 Liia Bean **Agar**

ถั่วปากอ้า	62.5 กรัม

วุ้น	15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

เตรียมโดยนำถั่วปากอ้าแช่น้ำทิ้งไว้ 8 ชั่วโมง ปอกเปลือกออกแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น blendor จากนั้นกรองกากทิ้ง นำน้ำที่ได้ไปต้มผสมกับวุ้น แล้วบรรจุภาชนะนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

1.9 Littman Oxgall Agar

Peptone	10 กรัม
Dextrose	10 กรัม
Oxgall	15 กรัม
Agar	20 กรัม
Crystal violet	0.01 กรัม

อาหารชนิดนี้ใช้สำหรับแยกเชื้อราจากสัตว์ ให้ละลาย 1.25 กรัมของ crystal violet ลงในเอธิลแอลกอฮอล์ชนิด 95 เปอร์เซนต์ 25 มิลลิลิตร แล้วผสมสารละลายนี้ลงในอาหาร 0.2 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร

1.10 Malt Extract Agar

Malt extract	25 กรัม
วุ้น	15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

เหมาะสำหรับเชื้อราที่เจริญอยู่บนไม้ผุและราอื่น ๆ อีกหลายชนิด

1.11 Potato Dextrose Agar

มันฝรั่งปอกเปลือก	200 กรัม
Dextrose	10 กรัม
วุ้น	15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

เหมาะสำหรับเชื้อราทั่วไป

1.12 Phytone Dextrose Agar

Phytone (BBL)	15 กรัม
Dextrose	15 กรัม
Yeast extract	1 กรัม
วุ้น	17 กรัม

ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Stemphylium* sp. ให้สร้างสปอร์

1.13 Rice Polish Agar

ข้าวสาร	20 กรัม
วุ้น	17 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ผสมข้าวสารกับน้ำ 500 มิลลิลิตร ลงในคนโทแก้วนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอประมาณ 15 นาที โดยไม่ใช้ความดัน นำข้าวที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่องบด blendor เสร็จแล้วผสมกับวุ้นที่หลอมละลายด้วยน้ำที่เหลืออีก 500 มิลลิลิตร จึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้ออีกครั้ง อาหารชนิดนี้ใช้เลี้ยงให้เชื้อรา *Piricularia oryzae* สร้างสปอร์ และถ้าใช้ข้าวสาร 30 กรัม วุ้น 23 กรัม ใช้สำหรับกระตุ้นให้ *Helminthosporium oryzae* สร้างสปอร์ได้ดี

1.14 Sabouraud Dextrose Agar

Neopeptone	10 กรัม
Dextrose	40 กรัม
วุ้น	15 กรัม

อาหารสูตรนี้ใช้สำหรับแยกเชื้อราจากสัตว์เลี้ยงต่าง ๆ ที่เป็นโรคเกี่ยวกับเชื้อรา

1.15 V-8 Juice Agar

V-8 Juice	200 มิลลิลิตร
$CaCO_3$	3 กรัม
วุ้น	17 กรัม
น้ำกลั่น	800 มิลลิลิตร

ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อราทั่วไปให้สร้างสปอร์

2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่สังเคราะห์ขึ้น (Synthetic Media) หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อที่ทราบส่วนประกอบทางเคมี จำนวนและปริมาณที่แน่นอน เช่น

2.1 Alcohol Agar

วุ้น	7.5 กรัม
Streptomycin sulfate	0.1 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

แบ่งน้ำกลั่นออกเป็น 2 ส่วน ประมาณส่วนละ 500 มิลลิลิตร ส่วนหนึ่งบรรจุลงคนโทแก้วแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ และอีกส่วนนำไปผสมวุ้นตั้งบนไฟคนจนกว่าวุ้นละลาย จึงนึ่งฆ่าเชื้อ

ให้นำน้ำกลั่นส่วนแรกผสมกับ Streptomycin เขย่าจนกว่าตัวยาละลายหมด จากนั้นนำวุ้นที่ละลายน้ำและผ่านการฆ่าเชื้อทิ้งไว้ให้เย็นที่ 50-60 องศาเซลเซียส ผสมกับน้ำยาของ Streptomycin จึงนำไปบรรจุคนโทแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้กระบอกตวงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 90 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติม 0.5 มิลลิลิตรของเอธิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute ethanol) ลงในคนโทแก้วแต่ละใบ อาหารชนิดนี้เหมาะสำหรับการตรวจหาเชื้อรา *Verticillium* sp. ในดิน เวลาใช้ควรเก็บไว้ในที่มืด 10-15 วัน

2.2 **Botrytis** Separation **Agar**

KC1	0.1 เปอร์เซนต์
KH_2PO_4	0.15 เปอร์เซนต์
$NaNO_3$	0.3 เปอร์เซนต์
$MgSO_4$	0.05 เปอร์เซนต์
Caesein hydrolysate	0.5 เปอร์เซนต์
Yeast extract	0.3 เปอร์เซนต์
Glycerol	0.5 เปอร์เซนต์
L-sorbose	0.25 เปอร์เซนต์
Agar	2 เปอร์เซนต์
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

เหมาะสำหรับใช้จำแนกชนิดของ *Botrytis* sp. ระหว่าง B. cinema และ B. *alli*

2.3 **Czapek's Agar**

$NaNO_3$	3 กรัม
K_2HPO_4	1 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 กรัม
KCl	0.5 กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01 กรัม
Sucrose	30 กรัม
วุ้น	15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ใช้เลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. และ *Nocardia* sp.

2.4 **Glucose** Nitrate **Sterol Medium**

Glucose	5.4 กรัม
$NaNO_3$	1.5 กรัม

KH_2PO_4	1 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 กรัม
วุ้น	17 กรัม
Sterol	0.8 กรัม
Thiamine hydrochloride 1000 ppm	2 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 6 แล้ว นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 10 นาที โดยไม่มี Sterol ให้เติม Sterol 20 mg ที่ละลายใน 2 มิลลิลิตรของ Ether บนผิวหน้าของอาหาร 25 มิลลิลิตร หลังจากทิ้งไว้หลายชั่วโมงเพื่อให้ Ether ระเหย แล้วใส่เชื้อ *Phytophthora* sp. หรือ *Pythium* sp. นำไปเก็บไว้ในที่มืด เชื้อจะสร้าง oospore

2.5 Glucose Yeast Agar

Glucose	1 เปอร์เซนต์
Yeast extract	0.3 เปอร์เซนต์
K_2HPO_4	0.2 เปอร์เซนต์
$MgSO_4.7H_2O$	0.02 เปอร์เซนต์
วุ้น	2 เปอร์เซนต์
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

เหมาะสำหรับเชื้อราพวก *Coprinus lagopus* และ Agaricales อื่นๆ ให้สร้างโครงสร้างพิเศษ

2.6 Lukens and Sisler Synthetic Medium

Glucose	20 กรัม
Ammonium sulfate	3 กรัม
Magnesium sulfate	0.25 กรัม
Monobasic potassium phosphate	3 กรัม
Glycine	1 กรัม
Niacin	20 ไมโครกรัม
Biotin	1 ไมโครกรัม
I-inositol	200 ไมโครกรัม
Pyridoxine	10 ไมโครกรัม
Folic acid	10 ไมโครกรัม
Boron	0.01 ppm

Mn	0.01 ppm
Zn	0.07 ppm
Cu	0.001 ppm
Mo	0.001 ppm
Fe	0.05 ppm
น้ำกลั่นเติมลงไปให้ได้	1000 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 6 ด้วย KOH ใส่กระดาษกรองลงไปเล็กน้อยจะช่วยกระตุ้นให้ *Helminthosporium vagans* และ *Alternaria solani* สร้างสปอร์ได้ดีขึ้น

2.7 Petri Medium

Calcium nitrate	0.4 กรัม
Magnesium sulphate	0.15 กรัม
Potassium acid phosphate	0.15 กรัม
Potassium chloride	0.05 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

เหมาะสำหรับเลี้ยงเชื้อ *Phytophthora* sp. ให้สร้าง sporangium โดยการวางชิ้นส่วนของ agar พืชและเมล็ดที่มี mycelium ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารชนิดนี้อยู่พอท่วม 3-4 วัน ที่ 12-20 องศาเซลเซียส

2.8 Sach's Agar

Calcium nitrate	1 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	0.25 กรัม
$MgSO_4$	0.25 กรัม
Ferric chloride	เล็กน้อย
$CaCO_3$	4 กรัม
วุ้น	20 กรัม
น้ำ	1000 มิลลิลิตร

ใช้ส่วนผสมของเมล็ดหรือใบของข้าวโพดผสม เพื่อกระตุ้นให้เชื้อ *Helminthosporium* sp. สร้าง perithecia

2.9 **Schizophyllum** Fruiting Medium

Glucose	20 กรัม
L-asparagine	2 กรัม
Thiamine hydrochloride	100 ไมโครกรัม

KH_2PO_4	0.46 กรัม
K_2HPO_4	1 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 กรัม
วุ้น	20 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

2.10 **Synthetic Mucor**

Dextrose	40 กรัม
Asparagine	2 กรัม
KH_2PO_4	0.5 กรัม
$MgSO_4$	0.25 กรัม
Thiamine chloride	0.5 มิลลิกรัม
วุ้น	15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

สำหรับใช้จำแนกชนิดของ Mucorales

วิธีการฆ่าเชื้อ (Methods of Sterilization)

เมื่อเตรียมอาหารสูตรต่าง ๆ ได้เรียบร้อยแล้ว ก่อนนำไปใช้เลี้ยงเชื้อรา จำเป็นต้องกำจัดสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่อาจหลงเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้หมดอย่างสมบูรณ์ได้ 2 วิธี คือ

1. วิธีทางฟิสิกส์ (Physical Methods)
2. วิธีทางเคมี (Chemical Methods)

1. **วิธีทางฟิสิกส์** โดยการใช้ความร้อนและการกรอง การใช้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อในอาหารชนิดต่าง ๆ นั้น โดยทั่วไปใช้ความร้อนชื้น เนื่องจากสามารถแทรกซึมผ่านเข้าทำลายจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆได้ดี และไม่ทำให้น้ำซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อระเหยหรือแห้งหายไป ความร้อนชื้นที่ใช้มีอยู่ 2 แบบ คือ

1.1 **ความร้อนชื้นแบบของอาร์โนลด์ (Arnold Sterilization)** เป็นการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่มีอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 3 วัน ๆละ 1 ครั้ง ๆละ 20 นาที (แต่ละครั้งเว้นห่างกันประมาณ 24 ชั่วโมง) วิธีนี้ฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อพวกเยลาติน นม และคาร์โบไฮเดรตต่าง ๆหากใช้อุณหภูมิสูงกว่านี้หรือเวลานานเกินไป สารประกอบคาร์โบไฮเดรตต่าง ๆจะแตกตัวและเยลาตินจะไม่แข็งตัวเมื่อทิ้งไว้ให้เย็น ความจำเป็นที่ต้องใช้การฆ่าเชื้อถึง 3 ครั้ง เนื่องจาก

การฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 เซลร่างกายของจุลินทรีย์ (vegetative cell) จะถูกทำลายหมด ส่วนพวกที่เป็นสปอร์จะไม่ตาย เมื่อทิ้งไว้ต่อไปสปอร์ของจุลินทรีย์จะงอกได้เป็นเซลร่างกายภายใน 24 ชั่วโมง

การฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ปฏิบัติหลังครั้งแรก 24 ชั่วโมง จากความร้อนและเวลาที่ใช้จะทำลายเซลต่าง ๆที่เพิ่งงอกจากสปอร์ทั้งหมด ดังนั้นจุลินทรีย์ทั้งที่เป็นเซลร่างกายและสปอร์จะถูกทำลายทั้งหมด เพื่อความแน่นอนจึงปฏิบัติครั้งที่ 3 อีกครั้งหนึ่ง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้ว

1.2 **การฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งไอ (Autoclave Sterilizer)** เป็นการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่ได้จากหม้อนึ่งความดันไอ ซึ่งจุลินทรีย์จะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15 นาที ความร้อนที่ได้จากไอน้ำนั้นจะต้องมีไอน้ำเป็นจำนวนมากพอที่จะให้ความร้อนสูงถึง 121 องศาเซลเซียส ดังนั้นหม้อนึ่งต้องสามารถทนความดันของไอน้ำที่เกิดขึ้นภายในหม้อนึ่งความดันไอนั้นได้ หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อราครบเวลาตามกำหนดเรียบร้อยแล้ว ก่อนนำออกจากหม้อนึ่งความดันไอจำเป็นต้องปล่อยทิ้งไว้ให้หม้อค่อย ๆเย็นลง โดยการดับไฟจนความดันภายในหม้อเหลือไม่เกิน 5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว แล้วค่อย ๆเปิดลิ้นนิรภัย (safety valve) ให้ไอออกหมดจึงเปิดฝาออก อย่าเปิดลิ้นนิรภัยทันทีหลังจากที่นึ่งฆ่าเชื้อเสร็จ เพราะจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อราเดือดแล้วดันสำลีที่อุดจุกไว้หลุดขณะที่ไอน้ำพุ่งออกจากลิ้นนิรภัย

การฆ่าเชื้อด้วยการกรอง (Sterilization by Filtration) วิธีนี้เหมาะสำหรับใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เสื่อมสลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน เช่น สารพวกฮอร์โมน และวิตามินบางชนิด เครื่องกรองที่ใช้จะต้องมีประสิทธิภาพดีสามารถนำจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ยกเว้นไวรัสออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เช่น เครื่องกรองแบคทีเรีย เป็นต้น

2. **วิธีทางเคมี** การฆ่าเชื้อด้วยวิธีทางเคมีเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยม และใช้ได้ผลมากพอสมควร แต่มีข้อเสียอยู่ที่ว่าสารเคมีบางชนิดเป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ และพืช และสารเคมีบางชนิดราคาค่อนข้างแพง อย่างไรก็ดีการนำวิธีการฆ่าเชื้อทางเคมีมาใช้กับวิชาเชื้อราวิทยาสามารถกระทำได้ดังนี้

2.1 **การใช้สารโปรไพลีนออกไซด์ (Propylene oxide)** ฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของวุ้น โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นลงบนจานเลี้ยงเชื้อ 20 มิลลิลิตรแล้วเอียงให้อาหารกระจายทั่วจานเลี้ยงเชื้ออย่างสม่ำเสมอ ปล่อยให้อาหารแข็งตัว เติมสารโปรไพลีนออกไซด์ 1 มิลลิลิตร แล้วปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อเมื่อครบ 24 ชั่วโมง จึงนำจานเลี้ยงเชื้อนั้นไปใช้ต่อไป

2.2 **การฆ่าเชื้อบนโต๊ะปฏิบัติการ** โดยการใช้เอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์-

เซนต์ หรือสารประกอบของเกลือแคลเซียมหรือโซเดียมฮายโปคลอไรท์เข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ ชุบสำลีทำความสะอาดบริเวณพื้นโต๊ะปฏิบัติการ

2.3 **การฆ่าเชื้อในตู้ย้ายเชื้อ** สารเคมีที่ใช้ คือ ด่างทับทิม 5 กรัม ผสมฟอร์มาลินเข้มข้น 10 มิลลิลิตร แล้วปล่อยทิ้งไว้ 5 วันจึงใช้งาน

วิธีปฏิบัติ

1. ให้นักศึกษาฝึกหัดเตรียมอาหาร Potato Dextrose Agar โดยใช้มันฝรั่งสด และบรรจุลงหลอดเลี้ยงเชื้อเพื่อทำเป็น slant agar อาหาร Potato Dextrose Agar มีส่วนผสม ดังนี้

มันฝรั่งปอกเปลือก	200 กรัม
Dextrose	10 กรัม
วุ้น	15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

แบ่งน้ำกลั่นออกเป็น 2 ส่วน ๆ ละ 500 มิลลิลิตร นำส่วนแรกไปต้มผสมกับมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วล้างน้ำให้สะอาดตัดออกเป็นชิ้นเล็ก ๆสี่เหลี่ยมจตุรัสขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จนมันฝรั่งสุกจึงกรองด้วยผ้าขาวบางเอาเนื้อมันฝรั่งออก เติม Dextrose ลงไป 10 กรัม ต้มและคนจน Dextrose ละลายแล้วนำส่วนผสมนี้ผสมกับวุ้นที่ต้มจนละลายในน้ำกลั่นส่วนที่เหลือ โดยตั้งไฟให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นแทนน้ำที่ขาดหายไปเนื่องจากการต้ม จนครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปบรรจุลงในคนโทแก้วและหลอดเลี้ยงเชื้อต่อไป

2. ให้นักศึกษานำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้แล้วนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) เป็นเวลา 20 นาที จดบันทึกขั้นตอนการใช้โดยละเอียด

3. ให้นักศึกษาฝึกเตรียม slant agar ได้ดังต่อไปนี้

3.1 นำอาหารที่เตรียมได้ในข้อ 1 บรรจุลงหลอดทดสอบให้ได้ปริมาณ 3-4 มิลลิลิตร

3.2 ปิดด้วยจุกสำลีแล้วใส่ลงในตะกร้าหุ้มด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ หรือกระดาษตะกั่วเพื่อป้องกันไอน้ำซึมผ่านจุกสำลีปะปนกับอาหาร

3.3 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอตามวิธีการฆ่าเชื้อด้วยวิธีทางฟิสิกส์ ข้อ 1.2

3.4 เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อครบกำหนดเวลาและปล่อยให้ความดันไอลดลงที่ขีดศูนย์แล้ว ไม่ควรเปิดฝาทันทีเนื่องจากจะทำให้อาหารที่อยู่ในหลอดเกิดมีไอน้ำขึ้นได้ ควรเปิดฝาเพียงเล็กน้อยพอให้ไอร้อนค่อย ๆระเหยประมาณ 30-45 นาที

3.5 นำอาหารที่ผ่านขบวนการข้างต้นไปเอียง 45 องศา ณ อุณหภูมิห้อง เมื่อเย็นและอาหารแข็งตัวเก็บให้เรียบร้อยเพื่อไว้ใช้ต่อไป

4. การฆ่าเชื้อในตู้ย้ายเชื้อ โดยฟอร์มาดีไฮด์แกสกระทำได้ดังนี้ คือ

4.1 ชั่งด่างทับทิม 5 กรัม ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีภาชนะรองรับ

4.2 ตวงฟอร์มาลินเข้มข้น 10 มิลลิลิตร รินลงบนด่างทับทิมให้ผสมเข้าด้วยกัน จนสังเกตเห็นควันสีขาวของฟอร์มาดีไฮอ์แกสเกิดขึ้น

4.3 ปิดตู้ย้ายเชื้อเพื่อป้องกันฟอร์มาดีไฮด์แกสระเหยออกนอกตู้ ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 5-7 วัน จึงเปิดใช้ได้

คำถามท้ายบท

1. จากอาหารสูตรต่าง ๆให้นักศึกษาบอกส่วนประกอบที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา

2. จงบอกวิธีการฆ่าเชื้อสำหรับสิ่งต่อไปนี้

2.1 น้ำส้มคั้น

2.2 ตู้ย้ายเชื้อ

2.3 จานเพาะเชื้อ

2.4 ดิน 0.5 กิโลกรัม

3. ในการใช้หม้อนึ่งความดันไอ ถ้าท่านไล่อากาศออกไม่หมดจะมีผลอย่างไร

4. ในการฆ่าเชื้อโดยใช้ตู้อบแห้งกับหม้อนึ่งไอ โดยใช้อุณหภูมิและเวลาเท่ากัน ท่านเห็นว่าเครื่องมือชนิดใดฆ่าเชื้อโรคได้ดีกว่ากัน เพราะเหตุใด

5. จากคำกล่าวที่ว่าไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใดที่จะเหมาะสมสำหรับการเจริญของราทุกชนิดได้ ท่านเห็นด้วยหรือไม่ อธิบาย