บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย (Research methodology)

ส่วนที่ 1 การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของยีสต์ที่แยกได้จากเขื่อนอุบลรัตน์

การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของยีสต์ โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดิน ผลไม้ ใบไม้ และดอกไม้จากบริเวณต่างๆภายในป่าเขื่อนอุบลรัตน์ อำเภออุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่น

1. การเก็บตัวอย่าง

วิธีการทดลอง

สุ่มเก็บตัวอย่างดิน ผลไม้ ใบไม้ และดอกไม้จากบริเวณต่างๆภายในป่าเขื่อนอุบลรัตน์

2. การคัดแยกยีสต์

วิธีการทดลอง

1. นำตัวอย่างที่เก็บจากเขื่อนอุบลรัตน์มา enrichment โดยชั่งตัวอย่างมา 25 g ใน Yeast extract-malt extract (YM) broth 225 ml pH 4.5
2. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24- 48 ชั่วโมง
3. Cross sreak ลงบน Yeast extract-malt extract (YM) agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะ chloramphenical 150 ppm เพื่อให้บริสุทธิ์และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24- 48 ชั่วโมง
4. คัดเลือกยีสต์ที่เป็นโคโลนีเดี่ยวและมีลักษณะโคลีแตกต่างกันมา Cross sreak ใน YM agar บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24- 48 ชั่วโมง
5. เก็บเชื้อที่บริสุทธิ์แล้วใน YM agar slant เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติต่อไป

3. การศึกษาคุณสมบัติของยีสต์

วิธีการทดลอง

1. ทดสอบประสิทธิภาพการเจริญเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ

วิธีการทดลอง

1.1 Cross streak เชื้อลง YM agar plate บ่มที่อุณหภูมิ30 องศาเซลเซียส 24- 48 ชั่วโมง

1.2 ตัวอย่างเชื้อใน YM agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำเป็น suspension โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

1.3 ใช้ pasture pipette ดูดตัวอย่าง suspension เชื้อ หยดเชื้อลง 1 หยด

ลงในอาหาร YM broth 2 มิลลิลิตร

1.4 บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40, 45และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

1.5 บันทึกผลทุกๆวันโดยสังเกตการเจริญ เป็นเวลา 7 วัน

2. การทดสอบการเจริญของยีสต์ที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 30, 50, 60,70 และ 80 %

วิธีการทดลอง

2.1 Cross streak เชื้อลง YM agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24- 48 ชั่วโมง

2.2 Simple streak เชื้อลงใน YM agar plate ที่มีน้ำตาล 30, 50, 60, 70 และ 80 %

บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน

2.3 บันทึกผลทุกๆวันโดยสังเกตการเจริญ เป็นเวลา 7 วัน

3. การทดสอบการเจริญของยีสต์ที่ความเข้มข้นของเกลือ 3, 5, 10, 15 และ 20%

วิธีการทดลอง

3.1 Cross streak เชื้อลง YM agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24- 48 ชั่วโมง

3.2 Simple streak เชื้อลง YM agar plateที่ความเข้มข้นของเกลือ 3, 5, 10, 15 และ 20% บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน

3.3 บันทึกผลทุกๆวันโดยสังเกตการเจริญ เป็นเวลา 7 วัน

4. ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสับสเตรท

4.1 การย่อยโปรตีน

วิธีการทดลอง

1. Cross streak เชื้อลง YM agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24- 48 ชั่วโมง

2. Point inoculation เชื้อลง YM agar plate ที่ผสม 1% Skim milk

3.บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน

4. ตรวจผลการย่อยโปรตีนเชื้อที่สามารถย่อยได้จะสร้างโซนใส(clear zone) รอบๆโคโลนี

4.2 การย่อยแป้ง

วิธีการทดลอง

1. Cross streak เชื้อลง YM agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24- 48 ชั่วโมง

2. Point inoculation เชื้อลง YM agar plate ที่ผสม 1% Soluble starch

3. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน

4. ตรวจผลความสามารถในการย่อยแป้ง โดยวางเกล็ดไดโอดีนลงบนฝาจานอาหารเลี้ยง

เชื้อให้ โคโลนีอยู่เหนือเกล็ดไอโอดีนทิ้งไว้ 10-20 นาที ไอโอดีนจะเข้าทำปฏิกิริยากับแป้งในอาหารทำให้เกิดสีน้ำเงิน เชื้อที่สามารถย่อยแป้งได้จะเกิดโซนใสรอบๆโคโลนี

1.3 การย่อย Xylan

วิธีการทดลอง

1. Cross streak เชื้อลง YM agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24- 48 ชั่วโมง
2. Point inoculation เชื้อลง YM agar plate ที่ผสม 1% Oat spelt xylan
3. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน
4. ตรวจผลความสามารถในการใช้ไซแลนเป็นสับสเทรต โดยใช้ congo red ราดลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการ Point inoculation ของเชื้อ

5. การทดสอบการเจริญที่ความเข้มข้นของเอทานอลต่างๆ

วิธีการทดลอง

1.1 Cross streak เชื้อลง YM agar plate บ่มที่อุณหภูมิ30 องศาเซลเซียส 24- 48 ชั่วโมง

1.2 ตัวอย่างเชื้อใน YM agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำเป็น suspension โดยใช้ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

1.3 ใช้ pasture pipette ดูดตัวอย่าง suspension เชื้อ หยดเชื้อลง 1 หยด ลงในอาหาร2 มิลลิลิตร

ของ YM broth ที่มีเอทานอล 5, 8, 10, 15 และ 20%

1.4 บ่มที่อุณหภูมิ 30องศาเซลเซียส

1.5 บันทึกผลทุกๆวันโดยสังเกตการเจริญ เป็นเวลา 7 วัน

6. การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์

วิธีการทดลอง

1. Cross streak เชื้อลง YM agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24- 48 ชั่วโมง
2. .Inoculate เชื้อลงใน 10 ml YM broth บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง
3. inoculate เชื้อ 1 ml ลงใน 10 ml YM broth ที่มี 20% glucose บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน
4. ดูดส่วนใสใส่ใน eppendorf tube และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์

5. ดูดส่วนใสใส่ใน eppendorf tube อันใหม่

6. วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ยีสต์สามารถผลิตได้ โดยใช้วิธี Gas Chromatgraphy

ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยวิธี Gas Chromatgraphy

1. เตรียม External standard ของ ethanol ความเข้มข้น0.625%, 1.25%, 2.5%, 5%, 10% v/v

2. เตรียม Internal standard ของ propanol ความเข้มข้น5% v/v

3. ฉีด Internal standard ปริมาตร 1µl เข้าเครื่อง GC และบันทึกค่า retention time

4. ฉีด External standard ปริมาตร 1µl เข้าเครื่อง GC และบันทึกค่า retention time

5. ผสม External standardแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 200 µl กับ Internal standard ปริมาตร

200 µl จากนั้นนำตัวอย่าง1µl ฉีดเข้าเครื่อง GC และบันทึกค่า retention time

6. นำค่าที่ได้มาทำเป็นกราฟมาตรฐานของเอทานอล

7. นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร200µlผสมกับ n-propanolที่เป็น Internal standardปริมาตร 200 µl

8. นำตัวอย่างที่ได้ปริมาตร1µl ฉีดเข้าเครื่อง GC หลังจากนั้น 15 นาทีเครื่องจะประมวลผล

และแสดงค่าพีคเอทานอลและตามด้วย พีคของn-propanolที่เวลา 3.87 นาที

9. จากนั้นคำนวณหาค่าอัตราส่วนระหว่าง Peak height ของเอทานอลกับn-propanol และคำนวนหาความเข้มข้นของเอทานอลจากกราฟมาตราฐาน

<u>ส่วนที่ 2</u> การจัดจำแนกประเภทยีสต์โดยเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของยีสต์

การจัดจำแนกประเภทยีสต์โดยเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 เชื้อที่ได้มีการรวบรวมไว้โดย นางสาวสมพร สาระวัง จากการเก็บตัวอย่างดิน ผลไม้ และดอกไม้บริเวณโคกภูตากา อำเภอภูเวียง จังหวัดขอนแก่นและบริเวณป่าเขื่อนจุฬาภรณ์ อำเภอคอนสาร จังหวัดชัยภูมิ โดยได้นำยีสต์ 20 สายพันธุ์ซึ่งได้จากแหล่งต่างๆ ดังนี้

ชนิดตัวอย่าง	ชื่อตัวอย่าง	รหัสไอโซเลท
ผลไม้	ลูกฮัมบัว	109-1, 109-3
ใบไม้	ใบเครือ	105-1
ดิน	ดินตอนต้นของแปลงที่ 1	S11-1
ดิน	ดินตอนท้ายของแปลงที่ 1	S13-1
ผลไม้	แก่นเทา	210-1, 210-3
ดอกไม้	ต้างไก่	203-1
ดอกไม้	หญ้าทักษิณ	216-2
ใบไม้	unknown 24	204-1, 204-2
ใบไม้	unknown27	214-1
ดอกไม้	สาบเสือ	F1-5
ดอกไม้	งิ้วป่า	F12-6
ดอกไม้	Unknown35	F5-1
ดอกไม้	Unknown38	F14-1, F14-2
ดิน	จากหน้าผา	S5-5
ดิน	Unknown39	S1-1
จำนวนทั้งหมด		20

1. การสกัด DNA

วิธีการทดลอง

1. เขี่ยเชื้อที่เป็นเซลล์ยีสต์ที่มีอายุเชื้อ 24-48 ชั่วโมง มาละลายใน lysis buffer 200 µl
2. ต้มในน้ำเดือด 15 นาที

3. เติม 2.5M Potassiumacetate pH 7.5 ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากันและแช่ในน้ำแข็ง 1 ช.ม

4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13000 rpm 5 นาที 4 องศาเซลเซียส จากนั้นก็ดูดส่วนใสมาใส่ใน eppendrof อันใหม่

5. เติม $CHCl_3$-isoamylalchol(24:1) 1เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยง13000 rpm 5 นาที 4 องศาเซลเซียส จากนั้นก็ดูดส่วนใสมาใส่ใน eppendrof อันใหม่

6. เติม 1 เท่าของ cold-isopropanal ผสมให่เข้ากันและแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส 20 นาทีและต่อจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14500 rpm 16 นาที และจากนั้นนำส่วนใสทิ้งไป

7. ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol ผสมให้เข้ากันปั่นเหวี่ยงที่ 14500 rpm 5 นาที และ 95% ethanol ตามลำดับ

8. ทำให้ตะกอน DNA แห้งจากนั้นเติม sterilized nanopure water 20-30 µl จากนั้นเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

9. ทำ dilution ของ DNA ที่ 10^{-1} , 10^{-2}

2. Amplification of D1/D2 domain of 26s rDNA

1. Reaction mixture for PCR (100 µl)

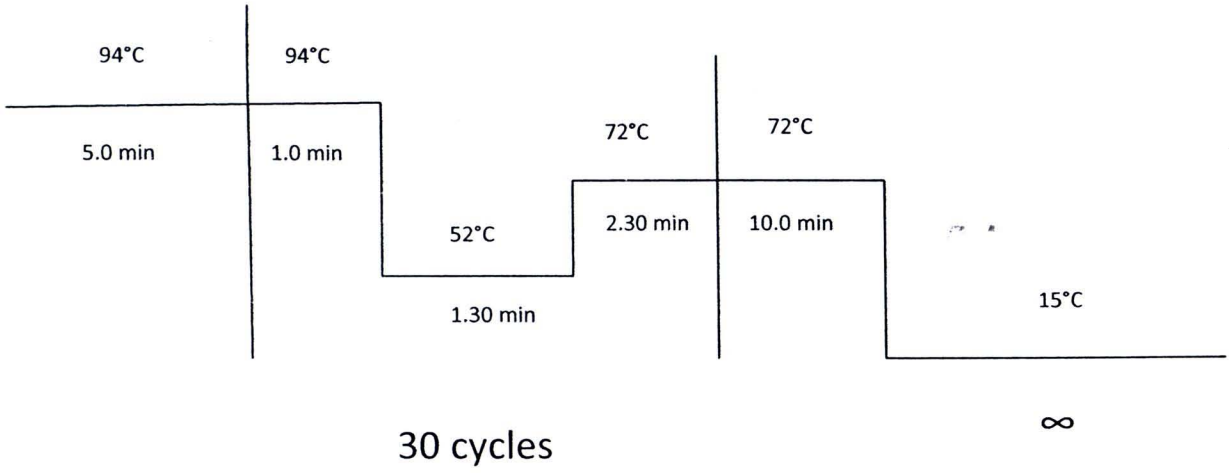
10X Taq buffer	10.0 µl
$MgCl_2$ (25mM)	8.0 µl
dNTP mixture (2.5 mM)	8.0 µl
Primer : F63 (10 pM)	3.0 µl
: LR3 (10 pM)	3.0 µl
Sterilized nano pure water	57.5 µl
Taq Polymerase (5U / µl)	0.5 µl

2. ผสมให้เข้ากันและใส่ใน PCR 90 µl

3. เติม DNA 10 µl / tube สำหรับการทำเป็น large scale

4. จากนั้นเมื่อเข้าเครื่อง PCR แล้วนำไป gel electrophoresis

PCR cycle for 26s rDNA



การเตรียม Agarose gel

0.8 % Agarose ผสมใน 1X TAE buffer (50X TAE buffer : 242 g Tris base, 57.1 ml glacial acetic acid, 37.2 g Na_2EDTA)

1. หยด Dye solution 1.3 µl ลงในแผ่น paraffin
2. เติมตัวอย่างที่เข้าเครื่อง PCR แล้ว 3 µl และผสมให้เข้ากัน
3. เติมสารละลาย DNA ลงใน agarose gel
4. Run gel โดยใช้ 100 v 35 นาที

3. การทำ DNA ของ PCR product ให้บริสุทธิ์ (Purification of PCR product)

1. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

1.1 นำ DNA จาก PCR product 100 µl ใส่ใน microcentrifuge tube อันใหม่

1.2 เติม DF buffer ปริมาตร 5 เท่าของ DNA ตัวอย่าง และผสมให้เข้ากัน

2. ขั้นตอนการจับกันของ DNA

2.1 ดูดสาร DF buffer และ DNA ลงใน DF column

2.2 ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 30 วินาที

2.3 ดึง DF column ออก และเทสารที่อยู่ข้างล่างทิ้งไป

3. ขั้นตอนการล้าง

3.1 เติม wash buffer ที่เติม ethanol 600 µl ลงในตรงกลางของ DF column

3.2 ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 30 วินาที

3.3 เทสารทิ้งอีกที

3.4 ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 3 นาที

4. DNA Elution

1. ย้าย column ไปบน microcentrifuge tube อันใหม่
2. เติม Elution buffer หรือ water 15-50 µl ลงตรงกลางของ column
3. ตั้งทิ้งไว้ 2นาที เพื่อละลาย DNA บนเมมเบรน
4. ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 2 นาที

5. Gel electrophoresis

การเตรียม Agarose 0.8 % Agarose ผสมใน 1X TAE buffer (50X TAE buffer : 242 g Tris base, 57.1 ml glacial acetic acid, 37.2 g Na_2EDTA)

1. หยด Dye solution 1.3 µl ลงในแผ่น paraffin
2. เติมตัวอย่างที่เข้าเครื่อง PCR แล้ว 3 µl และผสมให้เข้ากัน
3. เติมสารละลาย DNA ลงใน agarose gel
4. Run gel โดยใช้ 100 v 35 นาที
5. เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนนี้ได้นำดีเอ็นเอที่ได้นำส่งไปวิเคราะห์ต่อที่ macrogen ต่อไป

6. การวิเคราะห์ผล Sequence

ผลของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก macrogen จะได้ข้อมูลที่เป็นสาย Forward sequence และ Reverse sequence นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเส้น Reverse ไปทำ Reverse complement

1. ทำ Reverse complement

Search [http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html] จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสของทั้งสองเส้นคือ Forward sequence และ Reverse sequence มาทำการเปรียบเทียบลำดับเบสด้วยการทำ Pairwise alinment

2. Pairwise alinment

Search [http://genome.cs.mtu.edu/align/align.html] หลังจากที่ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งสองเส้น จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยวิธี Blast

3. เปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลพื้นฐาน

Search [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi]

การจัดจำแนกทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของยีสต์

(Identification of yeast by physiological and biochemical characteristics)

การจัดจำแนกทางสรีรวิทยาและชีวเคมี ของเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากเขื่อนอุบลรัตน์ 4 สายพันธุ์ และ เชื้อยีสต์ที่ได้จากการจัดจำแนกประเภทยีสต์โดยเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของยีสต์จาก 20 สายพันธุ์ ได้เชื้อยีสต์ที่คาดว่าเป็นสายพันธุ์ใหม่ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ รวมเชื้อยีสต์ที่ต้องทำการทดสอบมีทั้งหมด 7 สายพันธุ์ ดังนี้

Code	BLAST Results	Accession No.	Number of Nucleotide Substitution	Gaps	Identities	Rema
204-2	Kodamaea ohmeri	FM180533.1	4	1	498/503 (99%)	Siste sp.
F5-1	Candida sp. EN28S10	FJ527133.1	5	2	550/557 (98%)	Siste sp.
S11-1	Debaryomyces polymorphus	U45836.1	26	20	530/576 (92%)	New sp.
L1	Pichia sydowiorum	U74594.1	6	3	555/564 (98%)	New sp.
FR7-1	Candida pseudohaemulonii	EU881953.1	50	24	455/529 (86%),	New sp.
FW10	Candida sp. EM 33	AB500861.1	9	2	506/517 (97%)	New sp.
S3-1-2	Torulaspora delbrueckii	GU565197.1	4	4	570/578 (98%)	Siste sp.

Biochemical characteristics

1. การใช้สารประกอบคาร์บอน (Utilizetion of Carbon Compound)

1.1 การหมักคาร์ไฮเดรต (fermentation of carbohydrates)

fermentation basal medium

1. Glucose fermentation medium
2. Galactose fermentation medium
3. Sucrose fermentation medium
4. Maltose fermentation medium
5. Lactose fermentation medium
6. Raffinose fermentation medium

วิธีการทดลอง

(1) การทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคส

1. ตัวอย่างเชื้อใน YM agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส inoculate 2 หยด ของ cell suspension ลงใน Glucose fermentation medium ที่มี bromthymal blue เป็น indicator และมี Durham tube
2. หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน
3. ตรวจสอบผลทุกวันเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นตรวจผลทุก 7 วัน โดยดูการสร้างแก๊ส และการเปลี่ยนสีของอาหาร

(2) การทดสอบการใช้น้ำตาล กาแลคโตส ซูโครส มอลโตส แลคโตส ราฟินโนส เมลิบิโอส

1. ตัวอย่างเชื้อใน YM agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส inoculate2 หยดของ cell suspension ลงใน fermentation basal mediumที่มีที่มี bromthymal blue และ Durham tube ที่มี 2 % (w/v) ของสารละลายน้ำตาล ยกเว้น ราฟินโนสใช้ 4% (w/v)
2. จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน

3. ตรวจสอบผลทุกวันเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นตรวจผลทุก 7 วัน โดยดูการสร้างแก๊ส และการเปลี่ยนสีของอาหาร

2. การใช้สารประกอบคาร์บอน (Assimilation of carbon compounds)

1. ตัวอย่างเชื้อใน YM agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส inoculate 1 หยดของ cell suspension ลงใน carbon compounds assimilation medium
2. หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน
3. ตรวจสอบผลทุกสัปดาห์โดยเทียบกับ positive control คือ กลูโคส และ negative control ที่เป็นน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยดูการเจริญของเชื้อเทียบกับแผ่นกระดาษขาวที่มีเส้นทึบสีดำที่มีความหนา 0.75 มิลลิเมตร

หมายเหตุ : การตรวจผลและบันทึกผลจะกำหนดเป็น

+++ : ความขุ่นของเชื้อยีสต์ที่มีการเจริญจะทำให้ไม่เห็นเส้นสีดำ

++ : ความขุ่นของเชื้อยีสต์ที่มีการเจริญจะทำให้เห็นเส้นสีดำพร่า

+ : ความขุ่นของเชื้อยีสต์ที่มีการเจริญจะทำให้เห็นเส้นขอบสีดำไม่ชัดเจน

- : ไม่มีการเจริญของเชื้อยีสต์เส้นขอบสีดำชัดเจน

3. การสร้างกรดจากกลูโคส (Acid formation from glucose)

1. ตัวอย่างเชื้อใน YM agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำมา streak หรือ ใช้ loop แตะ ลงบนจานอาหาร Custer's chalk medium ที่แบ่งเป็น 7 ช่อง/ จานอาหาร

2. หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน

3. การตรวจผลจะดูการสร้างกรดที่มีการย่อยแคลเซียมคาร์บอเนตจะเกิดบริเวณใสรอบรอยเชื้อที่เจริญ บันทึกผลเป็นวันที่ 3, 5, 7, 9,...จนถึง 21 วัน โดยวัดขนาดของบริเวณใส

4. การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมซิสสูง (Growth in media of hight osmotic pressure : (50% Glucose, 60% Glucose and 5% Glucose + 10% Sodium Chloride, 5% Glucose + 15% Sodium Chloride)

1. ตัวอย่างเชื้อใน YM agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2. นำมา streak ลงในอาหาร 50 %, 60% glucose agar slant และ 5% Glucose + 10%, 15% Sodium Chloride agar slant
3. หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน
4. ตรวจผลโดยดูการเจริญของเชื้อ และบันทึกผล

5. การเจริญที่ 25, 30, 35, 37, 40, 42 องศาเซลเซียส

2. ตัวอย่างเชื้อใน YM agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำเป็น suspension โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
3. ใช้ pasture pipette ดูดตัวอย่าง suspension เชื้อ หยดเชื้อลง 1 หยด ลงในอาหาร YM broth 2 มิลลิลิตร
4. หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 25, 30, 35, 37, 40, 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน
5. ตรวจผลโดยดูการเจริญของเชื้อและบันทึกผล

6. Gelatin liquefaction

1. ใช้ needle เขี่ยเชื้อที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง และแทงใน gelatin medium ตรงกลางอย่างรวดเร็ว
2. จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 28 วัน
3. ตรวจผลโดยดูการเจริญและย่อย Gelatin ในส่วนที่เป็นของเหลววัดเป็น มิลลิเมตร

7. การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์(amyloid) หรือแป้งภายนอกเซลล์

1. หยด Logol's iodin ลงใน carbon compounds assimilation medium ที่ผ่านการบ่มมา 28 วัน

   2 หยด
2. สังเกตการณ์เปลี่ยนสีของอาหาร
3. บันทึกสีน้ำเงินที่เกิดขึ้น

8. การเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามิน

1. ตัวอย่างเชื้อใน YM agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำเป็น suspension โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

2. ใช้ pasture pipette ดูดตัวอย่าง suspension เชื้อ หยดเชื้อลง 1 หยด ลงในอาหาร vitamin free medium (starvation) บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส 7วัน
3. ย้ายเชื้อจากหลอดที่บ่มแล้ว 7 วัน นำมาหยด1 หยดลงในอาหาร vitamin free medium ที่เตรียมไว้อีกชุด แล้วบ่มเป็นเวลา 28 วัน
4. บันทึกผลการเจริญของเชื้อ

9. ความต้านทานต่อไซโครเฮกซิไมด์

1. ตัวอย่างเชื้อใน YM agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำเป็น suspension โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
2. ใช้ pasture pipette ดูดตัวอย่าง suspension เชื้อ หยดเชื้อลง 1 หยด ลงในอาหาร ที่มี 0.01%, 0.1% Cycloheximide บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส 28 วัน
3. ตรวจผลดูการเจริญของเชื้อ

10. การใช้แหล่งไนโตรเจน

1. ตัวอย่างเชื้อใน YM agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำเป็น suspension โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
2. ใช้ pasture pipette ดูดตัวอย่าง suspension เชื้อ หยดเชื้อลง 1 หยด ลงในอาหาร YCB บ่ม 25 องศาเซลเซียส 7 วัน
3. แล้วนำเชื้อจากอาหาร YCB นำมาหยด1 หยดลงบนอาหาร nitrogen agar plate ที่แหล่งไนโตรเจนต่างกัน ดังนี้

N0= No nitrogen (negative control)

N1= $(NH_4)_2PO_4$ (positive control)

N2= KNO_3

N3= $NaNO_2$

N4= Ethylamine

N5= L-Lysine

N6= Cadaverine

4. บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส 28 วัน ตรวจผลการเจริญโดยเทียบกับจานอาหารที่เป็น negative control และ positive control

11. ทดสอบการย่อยยูเรีย

1. ตัวอย่างเชื้อใน YM agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
2. นำมา streak ลงในอาหาร urea agar slant
3. หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน
4. ตรวจผลโดยดูการเจริญของเชื้อ และบันทึกผล โดยดูสีของอาหารถ้าอาหารมีสีชมพูบานเย็นแสดงว่า มีการย่อยยูเรีย

Morphological characteristics

วิธีการทดลอง

1. ลักษณะการเจริญบนอาหาร YM broth

1. ตัวอย่างเชื้อใน YM agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำเป็น suspension โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
2. ใช้ pasture pipette ดูดตัวอย่าง suspension เชื้อ หยดเชื้อลง 1 หยด ลงในอาหาร YM broth บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส 28 วัน
3. ตรวจผลโดยดูลักษณะการเจริญที่ผิวหน้าอาหารและดูลักษณะตะกอนที่ก้นหลอด

2. ลักษณะการเจริญบนอาหาร YM agar slant

1. ตัวอย่างเชื้อใน YM agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
2. นำมา streak ลงในอาหาร YM agar slant
3. หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน
4. ตรวจผลโดยดูการเจริญของเชื้อตามรอยที่ทำการ streak

3. ลักษณะโคโลนีบนผิวหน้าอาหาร

i. ตัวอย่างเชื้อใน YM agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
ii. นำมา streak ลงในอาหาร YM agar plate
iii. หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน
iv. ตรวจผลโดยดูการเจริญของเชื้อ บนผิวหน้าของอาหาร โดยดูลักษณะดังนี้ รูปร่างของโคโลนี, ระดับความนูน, ลักษณะของผิวหน้า, ริมขอบ, ลักษณะเกี่ยวกับแสง, เนื้อใน และ ลักษณะสีของโคโลนี

4. การสร้าง Ascospore

1. ตัวอย่างเชื้อใน YM agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
2. นำมา **Streak ลงบน YM agar, 5% Malt extract agar, Acetate-GSH agar slant**
3. หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 วัน
4. ตรวจผลโดยตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5. การสร้าง Pseudomycelium

1. ตัวอย่างเชื้อใน YM agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
2. เตรียม Corn meal agar (CMA)

   Slide แก้วที่ปลอดเชื้อแล้ว

   Cover slipe ปลอดเชื้อ

   กระดาษกรอง ปลอดเชื้อ

   แท่งแก้วสามเหลี่ยม ปลอดเชื้อ

   Plate แก้ว ปลอดเชื้อ

   น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
3. นำกระดาษกรองมาวางบน Plate แก้ว ปลอดเชื้อ แล้วเทน้ำกลั่นลงไปให้พอชุ่ม เพื่อที่จะไม่ให้อาหารแห้งจนเกินไปเมื่อนำไปบ่ม แล้วนำแท่งแก้วสามเหลี่ยมมาวางไว้บนกระดาษกรอง (ทุกขั้นตอนต้องทำอย่างปลอดเชื้อ)
4. นำอาหาร CMA ที่หลอมแล้วนำมาเทบนแผ่นสไลด์แก้วแล้วเอียงเพื่อเทเอาอาหารส่วนเกินออก แล้วตั้งให้แผ่นสไลด์ให้ตรงเพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเรียบเสมอกัน แล้วนำไปวางบน Plate แก้ว ปลอดเชื้อที่เตรียมไว้แล้ว เพื่อให้แข็งตัว
5. นำ loop ปลอดเชื้อ มาแตะเชื้อเพียงเล็กน้อยแล้วนำมาลากเป็นระนาบเดียวบนผิวหน้าอาหาร CMA
6. นำ Cover slipe ปลอดเชื้อ มาวางลงบนแผ่นสไลด์แก้ว ที่มีเชื้อโดยต้องวางไม่ให้เกิดอากาศบริเวณที่มีเชื้อ แล้วนำไปวางบน Plate แก้วดังเดิม นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส 28 วัน
7. ตรวจผลโดยดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์