

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. อาหาร de Man Rogosa Sharpe (MRS)

1.1 MRS Basal Medium

Peptone	10.0	g
Beef extract	8.0	g
Yeast extract	4.0	g
Tween 80	1.0	ml
K_2HPO_4	2.0	g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.04	g
Ammonium citrate, dibasic	2.0	g
Sodium acetate	5.0	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0	g
น้ำกลั่น	1.0	l

1.2 อาหารแข็ง MRS agar

Basal medium	1.0	l
Glucose	20.0	g
Agar	20.0	g

ปรับ pH เป็น 7.0

ผสมส่วนประกอบต่างๆ และละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ $121^{\circ}C$ เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

1.3 อาหารเหลว MRS broth

Basal medium	1.0	l
Glucose	20.0	g

ปรับ pH เป็น 7.0

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมเข้าด้วยกันแบ่งใส่ในหลอดทดลอง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

1.4 อาหาร MRS agar slant

Basal medium	1.0	l
Glucose	20.0	g
Agar	20.0	g

ปรับ pH เป็น 7.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดทดลองแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ จากนั้นนำออกมาเลี้ยงให้มีความเยือกพอประมาณ

1.5 อาหาร MRS agar ที่มี 2% soluble starch (w/v)

Basal medium	1.0	l
Soluble starch	20.0	g
Agar	20.0	g

ปรับ pH เป็น 7.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

การเติม bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์ใช้ bromocresol green 25 mg ต่อ basal medium 1 l

2. อาหาร homofermentative-heterofermentative differential (HHD) (ดัดแปลงจาก McDonald, 1987)

Fructose	2.5	g
KH_2PO_4	2.5	g
Phytone peptone	1.5	g
Casamino acids	3.0	g
Yeast extract	1.0	g
Tween 80	1.0	g
Bromocresol green	20.0	ml
Agar	20.0	g
น้ำกลั่น	1.0	l

ปรับ pH เป็น 7.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ

3. อาหารที่ใช้ในการหมักกรดแลกติก

3.1 MRS (Merk) ปรับ pH เป็น 7.0

3.2 JP2 (ดัดแปลงจาก Giraud *et al.*, 1991)

Peptone	2.5	g
Soytone	5.0	g
Casein peptone	2.5	g
Beef extract	2.5	g
Yeast extract	5.0	g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.2	g
Soluble starch	3.0	g
NaCl	3.0	g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0	g

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	g
Tween	0.4	ml

ปรับ pH เป็น 6.75

ละลายส่วนผสมทั้งหมดของอาหารแต่ละชนิดให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml อุดจุกสำลี แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

3.3 Glucose Yeast extract Peptone (GYP)

Yeast extract	10.0	g
Glucose	10.0	g
Peptone	10.0	g
Salt solution	5.0	ml
น้ำกลั่น	1.0	l

Stock salt solution

MgSO ₄ ·7H ₂ O	4.0	g
FeSO ₄	0.2	g
NaCl	0.2	g
น้ำกลั่น	1.0	l

ปรับ pH เป็น 6.8

3.4 Zhang, 1991

FeSO ₄	0.03	g
Sodium acetate	1.0	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.23	g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.034	g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.65	g
KH ₂ PO ₄	0.5	g
Yeast extract	30.0	g
Glucose	20.0	g

น้ำกลั่น

1.0 1

ปรับ pH เป็น 5.5

4. M17 agar (Oxoid Unipath)

Disodium β -glycerophosphate	19.0	g
Agar	11.0	g
Beef extract	5.0	g
Papaic digest of soybean meal	5.0	g
Yeast extract	2.5	g
Ascorbic acid	0.5	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25	g
Lactose solution	50.0	g
น้ำกลั่น	1.0	l

ปรับ pH เป็น 6.9±0.2

การเตรียม Lactose solution

ชั่ง lactose 10 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

การเตรียมอาหาร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน (ยกเว้น lactose solution) ปรับปริมาตรให้ได้ 950 ml นำไปต้มก่อนนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 45-50°C เติม 50 ml ของ lactose solution โดย aseptic technique

5. อาหาร Modified MRS

Peptone	10.0	g
Yeast extract	4.0	g
Tween 80	1.0	ml

Soluble starch	20.0	g
น้ำกลั่น	1.0	l

ปรับ pH เป็น 7.0

6. Skim milk

Skim milk	10.0	g
น้ำกลั่น	100.0	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปอุ่นแล้วคนให้ละลายจนหมด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

7. Litmus milk (Difco)

Litmus milk	100.0	g
น้ำกลั่น	1.0	l

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

8. 20% glycerol

Tryptone broth 2%	80.0	ml
Glycerol	20.0	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน บรรจุในหลอดๆ ละ 2.0 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

9. Carbohydrate Media for fermentation test

Sugar as desired	7.0	g
Beef extract	1.0	g
Peptone	10.0	g
NaCl	5.0	g
Phenol red	0.018	g

น้ำกลั่น

1.0 1

ละลายอาหารลงในหลอด Wasserman พร้อมทั้งใส่หลอดดักก๊าซในแต่ละหลอด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที น้ำตาลกลูโคส แลคโตสและซูโครสทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีนี้ได้ แต่ฟรุคโตสและไซโลสต้องทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีกรองส่วนน้ำตาลชนิดอื่นนอกจากนี้ต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 7 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

10. Hugh & Leifson O-F medium

Peptone	2.0	g
NaCl	5.0	g
K ₂ HPO ₄	0.3	g
Agar	3.0	g
Bromthymol blue (1% aqueous solution)	3.0	ml
น้ำกลั่น	1.0	l

ปรับ pH เป็น 7.1

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

เตรียมสารละลาย 10% ของคาร์โบไฮเดรตที่จะทดสอบ ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง นำสารละลายคาร์โบไฮเดรตที่กรองแล้ว 10 ml ผสมกับอาหารวุ้นที่ยังหลอมเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 50°C ปริมาตร 100 ml จากข้างต้น โดย aseptic technique แบ่งอาหารใส่หลอดทดสอบขนาด 16x150 ml หลอดละ 5 ml

11. อาหารวุ้นน้ำมะพร้าว

Peptone	10.0	g
Yeast extract	5.0	g
Sodium acetate	5.0	g
Ammonium citrate	2.0	g
Tween 80	1.0	ml
Glucose	20.0	g

น้ำมะพร้าวแก่	1.0	1
---------------	-----	---

ปรับ pH เป็น 6.2-6.6

กรองน้ำมะพร้าวให้ใสสะอาด ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำมะพร้าวให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

12. Tryptone broth

Tryptone	10.0	g
น้ำกลั่น	1.0	l

ปรับ pH เป็น 6.8

ผสม tryptone กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน ถ่ายใส่หลอดทดลอง หลอดละ 10 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

13. Nitrate reductions

Potassium nitrate	0.1	g
Peptone	2.5	g
น้ำกลั่น	500	ml
Agar	0.85	g

14. Gelatin Liquefaction

Beef extract	0.6	g
Peptone	1.0	g
Gelatine	24.0	g
น้ำกลั่น	200	ml

แช่ gelatine ในน้ำ 15-30 นาที คั้นให้ละลาย เติมสารอื่นๆ ปรับ pH ให้เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115°C เป็นเวลา 20 นาที

15. Citrate test

Sodium citrate	0.5	g
NaCl	2.5	g
MgSO ₄	0.1	g
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5	g
K ₂ HPO ₄	0.5	g
Bromthymol blue	0.02	g
Agar	5.0	g
น้ำกลั่น	500	ml

ปรับ pH เป็น 6.8

16. Motility test

beef extract	0.9	g
peptone	1.5	g
Agar	1.5	g
น้ำกลั่น	300	ml

17. VP test

Proteose peptone	2.1	g
Glucose	1.5	g
NaCl	1.5	g
น้ำกลั่น	300	ml

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานโพตัสเซียมไฮโดรเจนฟทาเลต (KHP) 0.1000 M

ชั่ง KHP 2.0526 g ละลายในน้ำกลั่น จนปริมาตรครบ 100 ml

2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน

ชั่งสาร NaOH 1.00 g ละลายในน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 250 ml จากนั้นเปิดสารละลายมาตรฐาน KHP ใส่ลงใน flask ขนาด 150 ml ขวดละ 10 ml หยดสารละลาย phenolphthalein 2-3 หยด ไตเตรตกับสารละลาย NaOH จนถึงจุดยุติ สังเกตได้จากสีของสารละลายจากไม่มีสีเปลี่ยนไปเป็นสีชมพู ทำการทดลองซ้ำอีกครั้งแล้วนำปริมาตรเฉลี่ยของสารละลาย NaOH ที่ใช้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย NaOH

3. สารละลายฟีนอล์ฟทาเลอิน (phenolphthalein solution)

ชั่ง phenolphthalein 1 g ละลายในเอทานอล 95% 60 ml เจือจางด้วยน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 100 ml

4. 3% Hydrogen peroxide (3% H_2O_2)

H_2O_2	3	g (คำนวณจากฉลากข้างขวด)
Distilled water	100	ml

5. Kovac 's solution

Para-dimethyl-amino benzaldehyde	5	g
Amyl หรือ butyl alcohol	75	ml
HCl , concentrate	25	ml

ผสม para-dimethyl-amino benzaldehyde กับ alcohol ใน water bath อุณหภูมิ 30 - 60°C 5 นาที ขณะปล่อยให้เย็น ริน HCl ลงไปช้าๆ เขย่าให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาไว้ในตู้เย็น

6. ชุดย้อมสีแกรม

Crystal violet stain

Crystal violet	0.5	g
Distilled water	100	ml

Decolourizer

95% ethanol	250	ml
Acetone	250	ml

Gram iodine solution

Iodine	1	g
Potassium iodine	2	g
Distilled water	300	ml

Safranin O solution

Safranin O	2.5	g
Ethanol	100	g

เมื่อต้องการนำมาใช้ให้เจือจางลงอีก 5 -10 เท่าโดยใช้น้ำกลั่น

7. DNS reagent

3, 5-dinitrosalicylic acid	1.0	%
Phenol	0.2	%
Na_2SO_3	0.05	%
NaOH	1.0	%

ละลาย 3, 5-dinitrosalicylic acid กับ NaOH จนหมดในน้ำกลั่น 50 ml ก่อนแล้วจึงเติม phenol และ Na_2SO_3 ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml เก็บในขวดสีชา

8. Na-K tartrate

นำ Na-K tartrate 40 g มาละลายในน้ำกลั่น 100 ml คนให้ละลายจนหมด

9. Phosphate buffer (Gomori, 1955)

stock solution

A: 0.2 M ของสารละลาย monobasic sodium phosphate (27.8 g ของ monobasic sodium phosphate ในน้ำกลั่น 1,000 ml)

B: 0.2 M ของสารละลาย dibasic sodium phosphate (53.65 g ของ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ หรือ 71.7 g ของ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ในน้ำกลั่น 1,000 ml)

Working solution

X ml ของ A + Y ml ของ B เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวม 200 ml

ตารางแสดงการเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ

X	Y	pH	X	Y	pH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

ภาคผนวก ค
การคำนวณหาปริมาณกรดรวม

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ คือ

$$\text{ปริมาณกรดต่อสารละลายตัวอย่าง 100 ml} = \frac{(V)(N)(MW)(100)}{(1000)(U)}$$

โดยกำหนดให้

V = ปริมาตร โดยเฉลี่ยของสารละลายต่างมาตรฐานที่ใช้ในการไทเทรตจนถึงจุดยุติ (ml)

N = normality ของสารละลายต่างมาตรฐาน NaOH (N)

U = ปริมาณของสารละลายตัวอย่างที่นำมาไทเทรต (ml)

MW = น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 90.08

แทนค่าต่างๆ ในสูตรจะได้ว่า

$$\text{ปริมาณกรดต่อสารละลายตัวอย่าง 100 ml} = \frac{(V)(N)(90.08)(100)}{(1000)(10)}$$

ตัวอย่างของการคำนวณ

ถ้าปริมาณสารละลายตัวอย่างเป็น 10.0 ml และปริมาตรเฉลี่ยของ NaOH ที่ใช้ไปเป็น 24.4 ml จะได้ว่า

$$\begin{aligned} \% (W/V) \text{ Total acid} &= (24.4)(N)(0.9008) \\ &= 2.20(N) \end{aligned}$$

ภาคผนวก ง

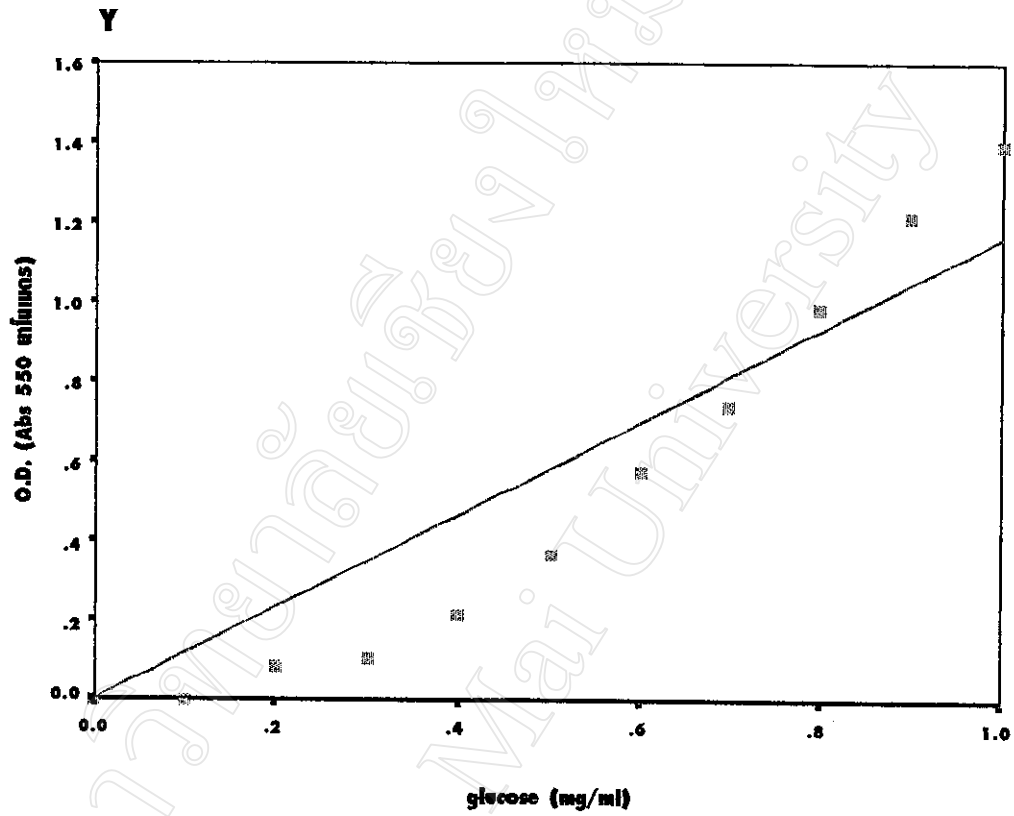
กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส (glucose)

การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส (คณินท์, 2534 และ นลิน, 2541)

1. เตรียม stock solution ของ glucose ความเข้มข้น 1.0 mg / ml โดยชั่งกลูโคส 100 mg ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml โดยใช้ volumetric flask จะได้สารละลายความเข้มข้น 1 mg / ml
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสในหลอดทดลอง โดยดูดกลูโคสจาก stock solution 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 ml เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 1.0 ml ในแต่ละหลอดทดลองจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 mg / ml ตามลำดับ
3. เติมสารละลาย DNS ลงไปหลอดละ 2 ml แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที
4. เติมสารละลาย 40% Na-K tartrate ลงไปหลอดละ 1 ml
5. ทิ้งไว้ให้เย็น แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เทียบกับหลอดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นแทนกลูโคส ได้ผลดังนี้

Glucose (mg / ml)	ค่าการดูดกลืนแสง
0	0
0.1	0.004
0.2	0.086
0.3	0.10925
0.4	0.2185
0.5	0.367
0.6	0.575
0.7	0.7445
0.8	0.985
0.9	1.219
1.0	1.3985

6. นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างปริมาณกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสง



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวธัญริกา เพ็ญหทัยกุล

วัน เดือน ปี เกิด 8 มีนาคม 2518

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนมงฟอร์ตวิทยาลัย
จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2535
สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2539

ที่อยู่ 107/1 ม.11 ถ.เชียงใหม่-หางดง อ.หางดง จ.เชียงใหม่ 50230