

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast extract malt extract (YM) agar

ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์	3.0	กรัม
มอลท์เอ็กซ์แทรกซ์	3.0	กรัม
เปปโทน	5.0	กรัม
กลูโคส	10.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

2. Yeast extract malt extract (YM) broth

ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์	3.0	กรัม
มอลท์เอ็กซ์แทรกซ์	3.0	กรัม
เปปโทน	5.0	กรัม
กลูโคส	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

3. 5% malt extract agar

มอลท์เอ็กซ์แทรกซ์	50	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

4. Fowell's acetate agar

โซเดียมอะซิเตดไตรไฮเดรต	5.0	กรัม
วุ้น	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Stock Carbon solution (10X)

ยีสต์ในโตรเจนเบส (Difco)	6.7	กรัม
สารประกอบคาร์บอน	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อโดยการกรอง และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสจนกระทั่งนำมาใช้งาน

6. Stock Nitrogen solution (10X)

ยีสต์คาร์บอนเบส (Difco)	11.7	กรัม
สารประกอบไนโตรเจน	X	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อโดยการกรอง และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสจนกระทั่งนำมาใช้งาน

สารประกอบไนโตรเจน: แอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 กรัม โพแทสเซียมไนเตรด (KNO_3) 0.78 กรัม โซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2) 0.26 กรัม เอทิลลามีนไฮโดรคลอไรด์ 0.64 กรัม แอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์ 0.56 กรัม คาดาเวอรีน 0.68 กรัม

7. Yeast Carbon Base (YCB) medium

7.1) Stock YCB solution (10X)

ยีสต์คาร์บอนเบส (Difco)	11.7	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อโดยการกรอง และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสจนกระทั่งนำมาใช้งาน		

7.2) เติม stock YCB solution (10X) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบขนาด 13x100 มิลลิเมตร ที่มีน้ำกลั่น 1.8 มิลลิลิตร

8. Yeast Nitrogen Base (YNB) medium

8.1) Stock YNB solution (10X)

ยีสต์ไนโตรเจนเบส (Difco)	6.7	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อโดยการกรอง และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสจนกระทั่งนำมาใช้งาน		

8.2) เติม stock YNB solution (10X) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบขนาด 13x100 มิลลิเมตร ที่มีน้ำกลั่น 1.8 มิลลิลิตร

9. Carbon assimilation medium

เติม stock Carbon solution (10X) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบขนาด 13x100 มิลลิเมตร ที่มีน้ำกลั่น 1.8 มิลลิลิตร

10. Nitrogen agar plate

เตรียมสารละลายยูเรีย (1.67%) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และปล่อยให้เย็นลง หลังจากนั้นเติม stock Nitrogen solution (10X) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงในจานเพาะเชื้อ

11. Fermentation test medium

Basal medium:

ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์	4.5	กรัม
เปปโทน	7.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

Bromothymol Blue

เติม Basal medium ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบขนาด 13x100 มิลลิเมตร ที่บรรจุ Durham tube ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากเย็นลง เติมน้ำประปารับรองที่มีความเข้มข้นซึ่งฆ่าเชื้อโดยการกรองจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2% ยกเว้นราฟิโนสที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4%

12. Vitamin-free medium

กลูโคส	0.1%
แอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.25%
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.01%
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4)	0.005%
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)	0.001%
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.001%
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที	

13. Growth in media of high osmotic pressure

50% glucose agar

วุ้น	13	กรัม
กลูโคส	500	กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์	1%	
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

60% glucose agar

วุ้น	22.5	กรัม
กลูโคส	600	กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์	1%	
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

10% NaCl+5% glucose medium

โซเดียมคลอไรด์	100	กรัม
กลูโคส	50	กรัม
ยีสต์ไนโตรเจนเบส	6.7	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

16% NaCl+5% glucose medium

โซเดียมคลอไรด์	160	กรัม
กลูโคส	50	กรัม

ยีสต์ไนโตรเจนเบส	6.7	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

14. Christensen's Urea agar

เปปโทน	1	กรัม
กลูโคส	1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2	กรัม
วุ้น	20	กรัม
ฟีนอลเรด (phenol red)	0.012	กรัม
pH 6.8		

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

15. Sabouraud's 4% glucose 0.5% Yeast extract agar

เปปโทน	10	กรัม
กลูโคส	40	กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	5	กรัม
วุ้น	20	กรัม
pH 7.0		

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

16. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
เดกซ์โทรส	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารเคมี

1. 50X TAE buffer

Tris (hydroxymethane) aminomethane	24.2	กรัม
0.5M EDTA-2Na (pH8.0)	10	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	5.71	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นจนครบ	100	มิลลิลิตร

2. 0.5M EDTA-2Na (pH8.0)

EDTA-2Na	46.5	กรัม
NaOH	5	กรัม
น้ำกลั่นจนครบ	250	มิลลิลิตร

3. Diazonium Blue B reagent

Diazonium Blue B salt	0.15	กรัม
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)	15	มิลลิลิตร
buffer pH 7.0 (0.25M)		