

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1. อาหารสูตรพื้นฐานสำหรับการแยกและการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่สามารถผลิตไลเปส (Lipase Medium) (กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย, 2532)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.0	กรัม
K_2HPO_4	1.8	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3	กรัม
Gum arabic	1.0	กรัม
Yeast extract	0.6	กรัม
Palm oil	10.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
pH 7.0		

เตรียมโดยผสมองค์ประกอบทั้งหมดยกเว้นน้ำมันปาล์มให้เข้ากันในน้ำกลั่น ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ก่อนนำไปอุ่นให้ร้อน แล้วเติมน้ำมันปาล์มลงไป ปั่นด้วยเครื่องปั่นผสม (Homogenizer) ที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำมาเชื่อมด้วยหม้อนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สำหรับอาหารแข็งที่ใช้ในการคัดเลือกและเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง จะมีการเพิ่มผงวุ้นลงไป 20 กรัม (2.0 เปอร์เซ็นต์) และลดน้ำมันปาล์มเหลือ 3.0 มิลลิลิตร (0.3 เปอร์เซ็นต์) วิธีการเตรียมทำโดยละลายองค์ประกอบทั้งหมดยกเว้นผงวุ้น และน้ำมันปาล์มในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0 แล้วเติมผงวุ้นลงไป นำไปหลอมละลายด้วยความร้อน เมื่อผงวุ้นหลอมละลายแล้ว นำสารละลายร้อนนี้มาปั่นกับน้ำมันปาล์มทันทีด้วยเครื่องปั่นผสมที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ

ไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Nutrient broth + 0.5% Yeast extract

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
pH 7.0		

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ให้ได้เท่ากับ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Luria-Bertani broth (LB broth)

Tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
pH 7.0		

เตรียมโดยผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปปรับพีเอชให้ได้ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สำหรับอาหารแข็ง (LB agar) จะมีการเติมผงวุ้น 20 กรัม (2.0 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเตรียมโดยผสมองค์ประกอบต่างๆในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ยกเว้นผงวุ้น นำไปต้มให้ความร้อนจนวุ้นหลอมละลาย เติม tributyrin oil 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นขณะร้อนด้วยเครื่อง

ปั่นผสม ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สำหรับอาหารแข็งที่มีการเติมยาแอมพิซิลลิน เตรียมโดย ผสมสารละลายแอมพิซิลลิน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. Ampicillin stock solution

เตรียมโดยชั่ง แอมพิซิลลิน (ampicillin) มา 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส