ภาคผนวก ก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Alkaline peptone water (APW)

ส่วนประกอบต่อลิตร

Peptone	10	กรัม
Sodium chloride	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น ปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร pH 8.5 นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บสารละลายไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2. Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS)agar

ส่วนประกอบต่อลิตร

Yeast extract	5	กรัม
Proteose peptone No.3	10	กรัม
Oxgall	5	กรัม
Bromthymol blue	0.04	กรัม
Saccharose	20	กรัม
Ferric citrate	10	กรัม
Sodium citrate	10	กรัม
Sodium thiosulfate	10	กรัม
Sodium chloride	10	กรัม
Thymol blue	0.04	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดโดยใช้ megnetic sterer ผสมให้เข้ากัน ต้มให้เดือดนาน 1 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียสเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. LB (Luria Bertani) Broth

ส่วนประกอบต่อลิตร

Yeast extract	10	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ต้มด้วยไฟอ่อน ๆ แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิลิตร หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. NA (Nutrient Agar)

ส่วนประกอบต่อลิตร

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดโดยใช้ magnetic stirer ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH 7.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: เติมโซเดียมคลอไรด์เพิ่ม 10 กรัม

5. TSI (Triple sugar iron agar)

ส่วนประกอบต่อลิตร

Beef extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	15	กรัม
Protease peptone	5	กรัม
Lactose	10	กรัม
Dextose	1	กรัม
Sucrose	10	กรัม
Ferrous sulfate	0.2	กรัม
Sodium thiosulfate	0.3	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Agar	12	กรัม
Phenol red	0.024	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ต้มจนวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด13x100 มิลลิลิตร หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เอียงหลอดทดลองเพื่อทำ agar slant แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: เติมโซเดียมคลอไรด์เพิ่ม 10 กรัม

6. Lysine decarboxylase broth

ส่วนประกอบต่อลิตร

Peptone	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Dextrose	1	กรัม

L-lysine	5	กรัม
Bromthymolblue	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม

ชั่งอาหารสำเร็จรูป Lysine decarboxylase broth 14 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิลิตร หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: เติมโซเดียมคลอไรด์เพิ่ม 10 กรัม

7. Motility test medium

ส่วนประกอบต่อลิตร

Tryptose	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Agar	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม

ชั่งอาหารสำเร็จรูป motility test medium 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือดจนวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดขนาด 13x100 มิลลิลิตร ในปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยการautoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นามี แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. 1% peptone

ส่วนประกอบต่อลิตร

Peptone	10	กรัม
Sodium chloride	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมด ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิลิตร หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9. CHROMagar

ส่วนประกอบต่อลิตร

Agar	15	กรัม
Peptone & Yeast extracts	8	กรัม
Sodium chloride	51.4	กรัม
Chromogenic mix	0.3	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดโดยใช้ magnetic stirer ผสมให้เข้ากัน ต้มให้เดือดนาน 1 นาที (ขณะเตรียมห้ามโดนแสง)ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10. Tryptic Soy Broth (TSB)

ส่วนประกอบต่อลิตร

Peptone from casein	15	กรัม
Peptone from soymeal	5	กรัม
Sodium chloride	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดโดยใช้ magnetic stirer ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปล่อยให้เย็น แล้วเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสารละลาย

1. 0.5 MacFarland standard

เตรียม 1% sulfuric acid 99.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 1.175 % barium chloride 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดฝาเกลียว เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่ง 0.5 MacFarland standard มีความขุ่นเทียบเท่ากับ ปริมาณเชื้อ 1.5×10^8 cfu/ml

2. 1.5% Agarose gel

ส่วนผสม Agarose gel	4.5	กรัม
1XTBE buffer	30.0	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	30.0	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม ผสมส่วนผสมทั้งหมดโดยใช้ magnetic stirer ผสมพร้อมกับให้ความร้อนจนได้สารละลายใส เทลงในแบบพิมพ์ ตั้งทิ้งไว้ตนแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

3. 0.1 นอร์มอล โซเดียมไธโอซัลเฟต

วิธีการเตรียม ละลาย $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 25 กรัม ในน้ำกลั่นต้มเดือดใหม่ ๆ 1 ลิตร แล้ว standardize ด้วยโปตัสเซียมไบไอโอเดต ภายหลังจากตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 2 อาทิตย์ เติมคลอโรฟอร์ม 2-3 มิลลิลิตร เพื่อลดการย่อยสลายของโซเดียมไธโอซัลเฟตเนื่องจากแบคทีเรีย

4. 0.1 นอร์มอล โปตัสเซียมไบไอโอเดต

วิธีการเตรียม ละลาย $KH(IO_3)_2$ 3.249 กรัมในน้ำกลั่น เติมน้ำจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เก็บในขวดแก้วมีจุกปิด

5. สารละลายแป้งอินดิเคเตอร์

วิธีการเตรียม ละลายแป้งมัน 5 กรัม ในน้ำเย็นเล็กน้อยเทลงในน้ำที่กำลังเดือด 1 ลิตร คนตั้งค้างคืน รินแต่น้ำใส ๆ ข้างขนเก็บโดยการเติมกรดซาลิซิลิค 1.25 กรัมต่อน้ำแป้ง 1 ลิตร

6. การ standardization 0.1 นอร์มอล โซเดียมไธโอซัลเฟต

วิธีการเตรียม นำน้ำกลั่นมา 80 มิลลิลิตร เติมพร้อมคน 1 มิลลิลิตรกรดกำมะถันเข้มข้น และ 10.00 มิลลิลิตร 0.1 นอร์มอล โปตัสเซียมไบไอโอเดต และ 1 กรัม โปตัสเซียมไอโอได ทิเทรตทันทีด้วย 0.1 นอร์มอล โซเดียมไธโอซัลเฟต จนกระทั่งสีเหลืองของไอโอดีนที่ถูกขับออกมาเกือบจะหมด เติมน้ำแป้ง 1 มิลลิลิตร เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ ทิเทรตจนสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นหายไป

$$\text{นอร์มอลลิตี้ของ } Na_2S_2O_3 = \frac{1}{\text{จำนวนของ } Na_2S_2O_3 \text{ ที่ใช้(มิลลิลิตร)}}$$

7. การ standardization ของสารละลายคลอรีน

เพื่อให้ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน จะต้อง re – standardize สารละลายคลอรีนทุกครั้งก่อนใช้ เพราะคลอรีนสลายตัวได้เร็ว การ standardize ทำดังนี้

นำน้ำกลั่นมา 150 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปกรวย เติม KI 1-2 กรัม เขย่าจนละลาย เติม 50 มิลลิลิตร ของสารละลายคลอรีนที่จะหาความเข้มข้น และ 1 มิลลิลิตร gracial acetic acid ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้การขับ I_2 ออกมาสมบูรณ์ แล้วทิเทรตด้วย 0.025 นอร์มอล โซเดียมไธโอซัลเฟต ใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ จนกระทั่งสีน้ำเงินหายไป

เพราะว่า 1 มิลลิลิตรของ 0.025 นอร์มอล โซเดียมไธโอซัลเฟต สมมูลย์กับ 0.886 มิลลิลิตรกรัมคลอรีน ดังนั้น

$$\text{ความเข้มข้นของคลอรีน} = \frac{\text{จำนวนของ } Na_2S_2O_3 \text{ ที่ใช้ (มิลลิลิตร)} \times 0.886}{50}$$

ภาคผนวก ข

MPN tables : For 3 tubes each at 0.1 , 0.01 , 0.001 g inocula, the MPNs per gram and 95 percent confidence intervals.

Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	…..	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	…..

ที่มา : http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html