

## ภาคผนวก ก

### สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. YM Agar ที่มี 0.01% chloramphenical และ 0.002% Streptomycin

Yeast extract      0.3%

Malt extract	0.3%
Peptone	0.5%
Glucose	1 %
Agar	2% (กรณีเตรียมอาหารแข็ง)

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดของ YM Agar หรือ Broth ในน้ำทะเล 1 ลิตร แบ่งใส่พลาสติกขนาด 500 มล. พลาสติกละ 250 มล. (ใส่แท่งแม่เหล็กลงไปด้วย) นำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ 20 นาที ทั้งอาหารให้เย็นตัวลง ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 55°ซ

เตรียม 10 % chloramphenicol 10 มล. ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง ใช้ syringe filter โดยกรองใส่หลอดฝาเกลียวที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่ -20°ซ

เตรียม 2 % Streptomycin 10 มล. ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง ใช้ syringe filter โดยกรองใส่หลอดฝาเกลียวที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่ -20°ซ

เติม 250 µl ของ 10 % chloramphenicol และ 250 µl ของ 2 % Streptomycin ลงในอาหาร YM Agar ที่มีอุณหภูมิ < 55°ซ คนให้เข้ากัน แล้วเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 2. Yeast Malt Broth (YMB)

Yeast Extract	0.3 %
Malt extract	0.3 %
Peptone	0.5 %
Glucose	1.0 %
Sea water	100 ml

### วิธีการเตรียม

- ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันใส่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมใส่ Magnetic bar ขนาด 1.5 เซนติเมตร ลงไป 1 ชิ้น
- ฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที(สำหรับอาหารแข็งจะทำการเพิ่มผงวุ้น 1.5 กรัม

## 3. Tryptone Soy Broth (TSB)

ประกอบด้วย	Tryptone	1.5 %
	Soytone	0.5 %
	Sea water	100 ml

### วิธีการเตรียม

- ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันใส่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมใส่

Magnetic bar ขนาด 1.5 เซนติเมตร ลงไป 1 ชั้น

- ฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที(สำหรับอาหารแข็งจะทำการเพิ่มผงวุ้น 1.5 กรัม(1.5% Agar)

#### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อผสมของ TSB และ YMB

ประกอบด้วย	Yeast Extract	0.6%
	Malt extract	0.6%
	Peptone	1.0%
	Glucose	2.0%
	Tryptone	3.0%
	Soytone	10.0%
	Sea water	100 ml

#### วิธีการเตรียม

- ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไปอุ่นให้พอร้อนเพื่อให้อาหารละลาย ปิดเปิดใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 20 x 150 mm ปริมาตร 9 มล.
- ฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

#### 5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Casien Agar

Solution A	Skim milk	75.0 g
	Distilled water	500 ml
Solution B	Agar	20.0 g
	Distilled water	500 ml

#### วิธีการเตรียม

- เตรียม Solution A พร้อมใส่แท่งคนแม่เหล็กขนาด 1.5 เซนติเมตร ลงไป 1 ชั้น คนบน magnetic stirrer เพื่อไม่ให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 113-115°C เป็นเวลา 15 นาที
- เตรียม Solution B แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที
- เท Solution B ลงใน Solution A ผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยไม่ให้เกิดฟองอากาศโดยนำไปวางบน magnetic stirrer จึงนำไปเทบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อขณะยังร้อน

#### 6. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrate Reduction Medium

Nutrient broth	0.8%
Potassium nitrate	0.1%
Distilled water	100 ml

### วิธีการเตรียม

- ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไปอุ่นให้พอร้อนเพื่อให้อาหารละลาย ปิดฝา ใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 13x100 mm 3 มล.
- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

### 7. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin Medium

Yeast Extract	0.3%
Malt extract	0.3%
Peptone	0.5%
Gum Arabic	0.1%
Tributyrin	0.3%
Agar	2.0%
Sea water	100 ml

### วิธีการเตรียม

- ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมใส่ Magnetic bar ขนาด 1.5 เซนติเมตร ลงไป 1 ชิ้น
- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอັคโอ(Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สำหรับอาหารแข็งจะทำการเพิ่มผงวุ้น 1.5 กรัม(1.5% Agar)
- นำมามีผสมให้น้ำมันเข้ากันกับอาหารด้วยเครื่อง Stirrer จึงนำไปเทเหลวๆละ 15 มิลลิลิตร