ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาบางประการของยีสต์ที่เจริญในน้ำทิ้งจากการทำยางแผ่น

SOME MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF YEASTS GROWING IN RUBBER SHEET PROCESSING WASTE

เลขหมู่ TP460 ย76 ล80 ค.2
เลขทะเบียน 024269
20 ก.ค. 2530

เยาวลักษณ์ ดิสระ
วิลาวัณย์ อัจจิมากุล

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการสืบพันธุ์ ความสามารถในการเฟอร์เมนต์น้ำตาล การใช้แหล่งคาร์บอนและการใช้เกลือไนเตรท ตลอดจนการสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสและการสร้างแป้งของยีสต์จำนวน 3 ไอโซเลทที่แยกได้จากดินและน้ำทิ้งบริเวณที่มีการทำยาง และเจริญได้ดีในน้ำทิ้งจากการทำยางแผ่น จากลักษณะดังกล่าวนำมาใช้ในการจัดจำแนกได้ว่าไอโซเลท Y_3 เป็น *Taphrina* sp. และไอโซเลท Y_{15} และ Y_{16} จัดเป็น *Candida mesenterica*

Abstract

The cultural, morphological and reproductive characteristics and the ability for sugar fermentation, carbon and nitrate assimilation and acid and starch production were determined on 3 isolates of yeast from soil and waste water in rubber processing areas and grown in sterilized rubber sheet processing waste. These characteristics were used for identification. Isolate Y_3 was found to be *Taphrina* sp. and isolates Y_{15} and Y_{16} *Candida mesenterica*.

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
สารบาญตาราง	iii
ความนำและการตรวจเอกสาร	1
วัตถุประสงค์	1
อุปกรณ์และวิธีการ	2
ผลการทดลองและวิจารณ์	5
สรุปผลการทดลอง	9
เอกสารอ้างอิง	10
ภาคผนวก	11

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติในการใช้แหล่งคาร์บอนของยีสต์ระหัส Y_3	6
2	คุณสมบัติในการใช้แหล่งคาร์บอนของยีสต์ระหัส Y_{15} และ Y_{16}	8

ความนำและการตรวจเอกสาร

ยีสต์เป็นรากลุ่มหนึ่งที่ดำรงชีวิตอยู่ในสภาพเซลล์เดียวเป็นส่วนใหญ่ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (vegetative reproduction) โดยทั่วไปเป็นแบบแตกหน่อ (budding)

ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวกแซโพรไฟต์ (saprophyte) พบอยู่ทั่วไปในธรรมชาติเช่น อาศัยอยู่กับพืชตามส่วนของดอก ผล ใบ ลำต้นและยางไม้เป็นต้น หลายชนิดพบอยู่ในดินและในน้ำ บางชนิดอาศัยอยู่กับแมลงและกระเพาะของสัตว์จำพวกกระต่ายโดยไม่ทำให้เกิดโรค (Carmo - Sousa, 1969 และ Ronald and Bartha, 1981)

จากการทดลองที่ผ่านมา (สุมาลีและเยาวลักษณ์, 2528) ได้ทำการแยกยีสต์จากดินและน้ำทิ้งจากบริเวณที่มีการผลิตยางพบว่ายีสต์ที่คัดเลือกได้บางสายพันธุ์สามารถนำมาเลี้ยงให้เจริญเติบโตได้ในน้ำทิ้งจากการทำยางแผ่นซึ่งไม่เติมสารช่วยการเจริญใดๆ เนื่องจากยีสต์ดังกล่าวมีปริมาณโปรตีนสูงอาจจะนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมโปรตีนได้ จึงทำการศึกษาต่อถึงสภาวะและธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ พบว่า เมื่อปรับสภาวะให้เหมาะสมแล้วสามารถเพิ่มน้ำหนักแห้งของยีสต์ได้สูงขึ้น (เยาวลักษณ์และวิลาวัณย์, 2529) ดังนั้นเพื่อให้การศึกษาครั้งนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงได้ศึกษาถึงข้อมูลพื้นฐานคือลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาบางประการของยีสต์ดังกล่าว เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดต่อไป

วัตถุประสงค์

การทดลองครั้งนี้เป็นการทดลองต่อเนื่องจากการทดลองที่สุมาลีและเยาวลักษณ์ (2528) และเยาวลักษณ์และวิลาวัณย์ (2529) ได้ทำมาแล้ว เพื่อจะได้ทำให้การศึกษาครั้งนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์คือ ศึกษาถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาบางประการของยีสต์ที่เจริญได้ดีในน้ำทิ้งจากขบวนการทำยางแผ่นดังกล่าว เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิด

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง

ยีสต์ที่ใช้ในการทดลองเป็นยีสต์ที่แยกได้จากดินและน้ำทิ้งบริเวณที่มีการผลิตยาง และได้ผ่านการคัดเลือกว่ามีปริมาณโปรตีนสูง จำนวนทั้งหมด 3 ไอโซเลท คือ Y_3 Y_{15} และ Y_{16}

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาบางประการ

วิธีการที่ใช้ในการศึกษาดำเนินการตามวิธีการที่บรรยายไว้ในหนังสือ Identification Method for Microbiologists ของ B.M.Gibbs และ D.A.Shapton, 1968 และหนังสือ The Yeast, A Taxonomic Study ของ Lodder ปี 1952 และปี 1970 โดยพิจารณาจากลักษณะดังต่อไปนี้

2.1 การศึกษาลักษณะการเจริญ (Cultural characteristics)

2.1.1 ศึกษาลักษณะการเจริญในอาหารแข็ง (MY agar) โดยดูลักษณะของโคโลนี ลักษณะของขอบโคโลนี ความมัน ความด้าน และลักษณะเป็นเมือก

2.1.2 ศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อในอาหารเหลวโดยเขี่ยเชื้อลงในอาหาร MY broth เมื่อครบ 3 วัน 7 วัน และ 2 อาทิตย์ สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อว่าลอยเป็นฝ้า (pellicle) อยู่ที่ผิวหรือตกตะกอน (flocculation) อยู่ที่ก้นหลอด

2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)

2.2.1 ศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดของเซลล์ โดยนำเชื้ออายุ 3-5 วัน จากอาหาร MY broth มาทำ wet mount ด้วย methylene blue ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้ high power objective และ oil immersion objective การวัดขนาดทำได้โดยการใช้ micrometer วัดเซลล์จำนวนไม่น้อยกว่า 20 เซลล์ เพื่อหาค่าเฉลี่ย

2.2.2 ศึกษาลักษณะการสร้าง pseudomycelium และ true mycelium โดยการเขี่ยเชื้อลงบนผิวหน้าของอาหาร PDA ใช้ปากคีบสับ cover glass ที่ม่าเชื้อแล้วปิดทับลงบนรอย streak หลังจากนำไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน นำมาตรวจหา pseudomycelium และ true mycelium โดยใช้ high power objective และ oil immersion objective

2.3 การศึกษาลักษณะการสืบพันธุ์ (Characteristic of reproduction)

2.3.1 ศึกษาการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จากเชื้อที่อายุ 3-5 วันในอาหาร MY agar สังเกตการสืบพันธุ์แบบต่างๆ เช่น การแบ่งตัวแบบ fission, การแตกหน่อแบบ unipolar, bipolar หรือ multipolar โดยการทำ wet mount ด้วย methylene blue ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x และ 100x สำหรับการตรวจหา asexual spore ทำได้เช่นเดียวกับข้อ 2.2 โดยการเขี่ยเชื้อทั้งที่เจริญอยู่ในและนอก cover glass มาทำ wet mount ด้วย methylene blue

2.3.2 ศึกษาการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศคือการสร้างแอสโคสปอร์โดยการเขี่ยเชื้อลงในอาหาร MY agar, PDA และ acetate agar ปิดทับด้วย cover glass ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อครบ 3 วัน 7 วันและ 4 สัปดาห์ นำมาตรวจหาแอสโคสปอร์โดยสังเกตรูปร่าง ขนาด และจำนวน นอกจากจะตรวจหาจากบริเวณที่อยู่ใต้ cover glass แล้วยังตรวจหาจากรอยที่เขี่ยเชื้อที่ไม่ได้ปิด cover glass ด้วย โดยการทำ wet mount ด้วย methylene blue

2.4 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา (Physiological characteristics)

2.4.1 ศึกษาความสามารถในการเฟอร์เมนต์ (fermentation) น้ำตาล โดยการเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลว yeast nitrogen base ซึ่งมีน้ำตาลชนิดต่างๆอยู่ 2 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวกหน้า 11) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้วอ่านผลโดยสังเกตการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ (Durham's tube) ถ้ามีก๊าซเต็มหลอดภายใน 3 วัน ถือว่า มีความสามารถในการเฟอร์เมนต์เร็ว (vigorous) ถ้าก๊าซเต็มหลอดภายหลัง 7 วัน ถือว่ามีความสามารถในการเฟอร์เมนต์ช้า (slow) ถ้าก๊าซยังไม่เต็มหลอดภายในสองสัปดาห์ ถือว่ามีความสามารถในการเฟอร์เมนต์น้อย (weak) บันทึกความสามารถในการเฟอร์เมนต์จนครบ 21 วัน น้ำตาลที่ใช้ในการทดสอบคือ glucose, galactose sucrose, maltose, lactose, melibiose, raffinose trehalose rhamnose, melizitose, fructose, xylose, inulin, sorbitol, arabinose, mannose, manitol และ inositol

2.4.2 ศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน (assimilation of carbon sources) โดยการเขี่ยเชื้อที่ต้องการลงในอาหาร yeast nitrogen base ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนต่างๆชนิดละ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวกหน้า 11) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนำมาตรวจผลเมื่อครบ 3 วัน โดยเขย่าหลอดให้เชื้อกระจายในอาหาร นำหลอดมาทาบกับกระดาษยาว

Central Library
Prince of Songkhla University

ที่ยึดเส้นลึบหนาประมาณ 2 มิลลิเมตร ยาว 3 เซนติเมตร นำหลอดทดลองมาเขย่าให้เชื้อกระจายทั่วกัน แล้วนำหลอดมาทาบกับเส้นสีดำที่ทำไว้ ถ้าเชื้อยุ่นมากมองไม่เห็นเส้นดำ ถือว่าใช้น้ำตาลนั้นได้ดี บันทึกเป็น +++ ถ้าเห็นเส้นดำเพียงรางๆ ถือว่าใช้ได้ปานกลาง บันทึกเป็น ++ และถ้ายังเห็นเส้นดำอยู่ ถือว่าใช้น้ำตาลนั้นไม่ได้ บันทึกเป็น + หลอดที่อ่านผลได้ + และ ++ นำมาตรวจผลอีกทุกสัปดาห์จนครบ 3 สัปดาห์ แหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดลองคือ lactose, glucose, fructose, maltose, sucrose, galactose, melibiose, trehalose, xylose, inulin, sorbitol, rhamnose, melizitose, arabinose, mannose, raffinose , manitol และ inositol

2.4.3 ศึกษาความสามารถในการใช้เกลือไนเตรท (nitrate assimilation) นำเชื้อไปเลี้ยงในอาหาร yeast carbon base ที่มี KNO_3 อยู่ 0.078 % 3 วัน ถ่ายเชื้อลงในอาหารเดิมอีกครั้งหนึ่ง แล้วจึงทำการตรวจหาปริมาณการเจริญของยีสต์ในอาหารนั้น เช่นเดียวกับข้อ 2.4.2 เฉพาะเชื้อที่เจริญได้มากขนาด +++ จึงจะถือว่ามีความสามารถในการใช้เกลือไนเตรทได้

2.4.4 ศึกษาการสร้างกรด (acid production) จากน้ำตาลกลูโคสโดยการเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดลองลงบนผิวอาหาร yeast agar slant (ภาคผนวกหน้า 13) ที่มี calcium carbonate 0.5 % เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน ถ้ายีสต์มีความสามารถสร้างกรดได้จะทำให้ calcium carbonateที่มีอยู่ในอาหารดังกล่าวละลาย

2.4.5 ศึกษาการสร้างแป้ง (starch production) โดยการเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดลองลงในอาหาร yeast nitrogen baseซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 3% เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา7 และ 14 วัน นำมาทดลองโดยการหยดสารละลายไอโอดีนลงไป

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากการนำเชื้อรหัส Y_3 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาบางประการนั้นพบว่า

เมื่อเลี้ยงในอาหาร MY โคโลนีมีสีเหลืองอ่อน ผิวหน้าย่น ขอบเรียบ มีการแตกหน่อแบบ multipolar budding พบ pseudomycelium บ้างเล็กน้อย ไม่พบ ascospore และ arthrospore ลักษณะเซลล์เป็นรูปรีค่อนข้างกลม ขนาดประมาณ (1.5-2) x3 µm เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวพบว่าเจริญเป็นฝ้าที่ผิวหน้า เมื่อเขย่าจะตกตะกอนรวมกันที่ก้นหลอดทดลอง

สำหรับความสามารถในการเฟอร์เมนต์น้ำตาลนั้นพบว่า ไม่เฟอร์เมนต์น้ำตาลทุกชนิด สามารถ assimilate น้ำตาล glucose sucrose maltose mannose fructose และ galactose ส่วนน้ำตาลอื่นๆไม่ใช้ ดังแสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 1 และไม่สามารถใช้เกลือไนเตรทได้ ไม่พบการสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส แต่มีการสร้างแป้งภายใน 7 วัน

จากลักษณะดังกล่าว Lodder (1970) จัดเป็นพวก Taphrina ซึ่งเป็น yeast-like fungi มีลักษณะคล้ายคลึงกับยีสต์ใน genus *Cryptococcus* และ *Rhodotorula* มาก

Taphrina เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะโคโลนีและการยยายพันธุ์แบบ budding คล้ายคลึงกับยีสต์ เป็นพาราไซต์กับพืช (Ross,1979) ดังนั้นจึงอาจพบได้ในดิน

ตารางที่ 1 คุณสมบัติในการใช้แหล่งคาร์บอนของยีสต์รหัส Y_3

แหล่งคาร์บอน	fermentation				assimilation			
	3	7	14	21	3	7	14	21
	(วัน)				(วัน)			
glucose	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
fructose	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
sucrose	-	-	-	-	++	+++	+++	+++
maltose	-	-	-	-	++	+++	+++	+++
galactose	-	-	-	-	+	++	+++	+++
lactose	-	-	-	-	+	+	+	+
mannose	-	-	-	-	++	+++	+++	+++
xylose	-	-	-	-	+	+	+	+
rhamnose	-	-	-	-	+	+	+	+
arabinose	-	-	-	-	+	+	+	+
raffinose	-	-	-	-	+	+	+	+
melibiose	-	-	-	-	+	+	+	+
trehalose	-	-	-	-	+	+	+	+
melizitose	-	-	-	-	+	+	+	+
manitol	-	-	-	-	+	+	+	+
sorbitol	-	-	-	-	+	+	+	+
inositol	-	-	-	-	+	+	+	+
inulin	-	-	-	-	+	+	+	+

ส่วนเชื้อรหัส Y_{15} และ Y_{16} นั้น มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาเหมือนกัน ดังนี้คือ

เมื่อเลี้ยงในอาหาร MY โคโลนีลีครีม ผิวหน้าแห้ง ย่น มีการสร้างทั้งpseudo-mycelium และ true mycelium ไม่พบการสร้าง ascospore และ arthrospore มีการแตกหน่อแบบ multipolar budding ลักษณะเซลล์เป็นรูปรี ยาว ขนาดประมาณ(2-3)x(3-5)µm เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่า เจริญเป็นฝ้าที่ผิวหน้า เมื่อเขย่าจะตกตะกอน รวมกันที่ก้นหลอดทดลอบ

สำหรับความสามารถในการเฟอร์เมนต์น้ำตาลนั้น พบว่า ไม่เฟอร์เมนต์น้ำตาลทุกชนิด สามารถใช้น้ำตาล glucose sucrose maltose fructoseและ mannose ส่วน arabinose และ melizitose ใช้ได้เล็กน้อย ส่วนน้ำตาลอื่นๆไม่ใช้ ดังแสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 2 ไม่สามารถใช้เกลือไนเตรทได้ ไม่พบการสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส และไม่มีการสร้างแป้งภายใน 14 วัน

จากลักษณะดังกล่าว Lodder(1970)และ Beech and Davenport(1968) จัดเป็น *Candida mesenterica* แต่ตามรายงานของ Lodder กล่าวว่าสามารถแยก *C. mesenterica* ได้จากเบียร์น้ำล่า ในท่อส่งของโรงงานผลิตเบียร์

ตารางที่ 2 คุณสมบัติในการใช้แหล่งคาร์บอนของยีสต์รหัส Y_{15} และ Y_{16}

แหล่งคาร์บอน	fermentation				assimilation			
	3	7	14	21	3	7	14	21
			(วัน)			(วัน)		
glucose	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
fructose	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
sucrose	-	-	-	-	++	+++	+++	+++
maltose	-	-	-	-	++	+++	+++	+++
galactose	-	-	-	-	+	+	+	+
lactose	-	-	-	-	+	+	+	+
mannose	-	-	-	-	++	+++	+++	+++
xylose	-	-	-	-	+	+	+	+
arabinose	-	-	-	-	++	++	++	++
rhamnose	-	-	-	-	+	+	+	+
raffinose	-	-	-	-	+	+	+	+
melibiose	-	-	-	-	+	+	+	+
trehalose	-	-	-	-	+	+	+	+
melizitose	-	-	-	-	++	++	++	++
manitol	-	-	-	-	+	+	+	+
sorbitol	-	-	-	-	+	+	+	+
inositol	-	-	-	-	+	+	+	+
inulin	-	-	-	-	+	+	+	+

สรุปผลการทดลอง

ยีสต์ที่แยกได้จากดินและน้ำทิ้งบริเวณที่มีการผลิตยางบางสายพันธุ์สามารถนำมาเลี้ยงให้เจริญเติบโตได้ในน้ำทิ้ง จากการทำยางแผ่นซึ่งไม่เติมสารช่วยการเจริญใดๆ (สุมาลีและเยาวลักษณ์ ,2528) และเมื่อปรับสภาวะให้เหมาะสมสามารถเพิ่มน้ำหนักแห้งของยีสต์ได้สูงขึ้น (เยาวลักษณ์และ วิลาวัณย์,2529) เซลล์ยีสต์ที่ได้อาจนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป เช่นใช้เป็นอาหารเสริมของสัตว์ เป็นต้น วัตถุประสงค์ของการทดลองเพื่อศึกษาถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาบางประการของยีสต์ดังกล่าว เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดต่อไป

จากการศึกษาลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการสืบพันธุ์ ความสามารถในการเฟอร์เมนต์น้ำตาล การใช้แหล่งคาร์บอนและการใช้เกลือไนเตรท ตลอดจนการสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส และการสร้างแป้งของยีสต์ดังกล่าวจำนวน 3 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลท Y_3 เป็น *Taphrina* sp.และไอโซเลท Y_{15} และ Y_{16} จัดเป็น *Candida mesenterica*

เอกสารอ้างอิง

1. ลุ่มาลี ศิรธนกิจ และเยาวลักษณ์ ติสระ. 2528. การเจริญของยีสต์ในน้ำทิ้งจากการทำยางแผ่น. ว. สงขลานครินทร์ 7(2) : 155-158.

2. เยาวลักษณ์ ติสระ และวิลาวัณย์ อัจฉิมากูล. 2529. ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ในน้ำทิ้งจากการทำยางแผ่น. ว. สงขลานครินทร์ 8(4) : 435-443.

3. Beech,F.W. and R.R.Davenport. 1968. Two simplified schemes for identifying yeast cultures. In : Identification Methods for Microbiologists. B.M.Gibbs and D.A.Shapton. (editor). London, Academic Press. pp.151-175.

4. Carmo-Sousa Do Lidia. 1969. Distribution of yeasts in nature. In: The Yeasts (Vol 1), Bioloby of yeasts. Rose H.A. and J.S. Harrison (editor). London, Academic Press. pp.79-105.

5. Lodder,J. and N.J.W. Kreger-Van Rij. 1952. The Yeast a taxonomic study. Amsterdam, North-Holland Publishing Company.

6. Ronald,M.A. and R.Bartha. 1981. Microbial ecology : Fundamentals and application. Reading, Addison-Wesley Publishing Company.

7. Van der Walt,J.P. 1970. Criteria and method used in classification, In : The Yeasts, a Taxonomic study. Lodder J.(editor). Amsterdam, North-Holland Publishing Company.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Acetate agar

Glucose	1.0 กรัม
Potassium chloride	2.5 กรัม
Yeast extract	2.5 กรัม
Sodium acetate trihydrate	2.5 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที

Carbon assimilation medium

Bacto yeast nitrogen base	6.7 กรัม
แหล่งคาร์บอนที่ใช้	5 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ทำให้ปราศจากเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Carbon fermentation medium

เตรียมเช่นเดียวกับอาหารสำหรับทดสอบ carbon assimilation แต่ให้แหล่งคาร์บอนต่างๆปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร บรรจุในหลอดทดสอบที่มีหลอดดักก๊าซอยู่ภายใน

Malt yeast extract broth (MY broth)

Yeast extract	3.0 กรัม
Malt extract	3.0 กรัม
Peptone	5.0 กรัม
Glucose	10.0 กรัม

น้ำกลั่น 1000 มล.

ละลายส่วนประกอบต่างๆให้เข้ากัน ปรับพีเอช 4.5 บรรจุหลอดๆละ 5 มล. นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่เตรียมเป็นอาหารแข็ง MY agar ให้ใส่วุ้นผง 1.5% ของ MY broth

Nitrate assimilation medium

Bacto yeast carbon base	11.7 กรัม
KNO_3	0.78 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

ละลายส่วนประกอบต่างๆให้เข้ากัน ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Potato dextrose agar (PDA)

White potato	200.0 กรัม
Dextrose	20.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

ปอกเปลือกมันฝรั่งหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ต้มกับน้ำกลั่น ให้เดือดประมาณ 15 นาที กรองเอาแต่น้ำ เติมน้ำตาล dextrose และวุ้นเติมน้ำจนครบ 1000มล. ทำให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

Starch production medium

glucose	3 กรัม
Difco yeast nitrogen base	6.7 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

ผสมส่วนต่างๆให้เข้ากัน ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

Yeast agar slant

Glucose	5 กรัม
$CaCO_3$	2 กรัม
Difco yeast extract	2 กรัม
agar	2 กรัม
น้ำกลั่น	100 มล.

ผสมส่วนประกอบต่างๆใส่หลอดฝาเกลียว ทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทำให้เย็นที่ 50 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน ใส่ลงในน้ำแข็งทันที