

ภาคผนวก

การเตรียม potato dextrose agar

วัสดุ

- | | | |
|--------------------|------|-----------|
| 1. มันฝรั่ง | 200 | กรัม |
| 2. กลูโคส | 20 | กรัม |
| 3. agar granulated | 15 | กรัม |
| 4. น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

pH 5.6±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

วิธีการเตรียม

นำมันฝรั่งมาปอกเปลือกแล้วหั่นเป็นชิ้นขนาดลูกเต๋า นำไปต้มในน้ำกลั่น อัตราส่วนมันฝรั่ง 200 กรัมต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 15 นาที กรองแยกส่วนน้ำออกมา เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เติมกลูโคส 20 กรัม agar 15 กรัม นำไปต้มให้กลูโคสและ agar ละลาย หลังจากนั้นนำไปนึ่งอบไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

การเตรียม potato dextrose agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะ

streptomycin	0.5	กรัม
chloramphenicol	0.5	กรัม
penicillin G	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

วิธีเตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะ

ละลายยาปฏิชีวนะทั้ง 3 ในน้ำกลั่นไร้เชื้อ ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร กรองด้วย Millipore filter ที่มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร

วัสดุ

1. มันฝรั่ง	200	กรัม
2. กลูโคส	20	กรัม
3. agar granulated	15	กรัม
4. น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

pH 5.6±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

วิธีการเตรียม

นำมันฝรั่งมาปอกเปลือกแล้วหั่นเป็นชิ้นขนาดลูกเต๋า นำไปต้มในน้ำกลั่น อัตราส่วนมันฝรั่ง 200 กรัมต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 15 นาที กรองแยกส่วนน้ำออกมา เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เติมกลูโคส 20 กรัม agar 15 กรัม นำไปต้มให้กลูโคสและ agar ละลาย หลังจากนั้นนำไปนึ่งอบไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เติมสารละลายยาปฏิชีวนะที่เตรียมไว้ 20 มิลลิลิตร ขณะอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส

การเตรียม potato dextrose broth

วัสดุ

- | | | |
|-------------|------|-----------|
| 1. มันฝรั่ง | 200 | กรัม |
| 2. กลูโคส | 20 | กรัม |
| 3. น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

pH 5.6±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

วิธีการเตรียม

นำมันฝรั่งมาปอกเปลือกแล้วหั่นเป็นชิ้นขนาดลูกเต๋า นำไปต้มในน้ำกลั่น อัตราส่วนมันฝรั่ง 200 กรัมต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 15 นาที กรองแยกส่วนน้ำออกมา เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เติมกลูโคส 20 กรัม นำไปต้มให้กลูโคสละลาย หลังจากนั้นนำไปนึ่งอบไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

การเตรียม pumpkin dextrose agar**วัสดุ**

- | | | |
|--------------------|------|-----------|
| 1. ฟักทอง | 200 | กรัม |
| 2. กลูโคส | 20 | กรัม |
| 3. agar granulated | 15 | กรัม |
| 4. น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

pH 5.6±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

วิธีการเตรียม

นำฟักทองมาปอกเปลือกแล้วหั่นเป็นชิ้นขนาดลูกเต๋า นำไปต้มในน้ำกลั่น อัตราส่วนฟักทอง 200 กรัมต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 15 นาที กรองแยกส่วนน้ำออกมา เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เติมกลูโคส 20 กรัม agar 15 กรัม นำไปต้มให้กลูโคสและ agar ละลาย หลังจากนั้นนำไปนึ่งอบไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

การเตรียม glucose yeast extract agar

วัสดุ

- | | | |
|--------------------|------|-----------|
| 1. กลูโคส | 20 | กรัม |
| 2. yeast extract | 10 | กรัม |
| 3. agar granulated | 15 | กรัม |
| 4. น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

pH 5.6±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

วิธีการเตรียม

เติมกลูโคส 20 กรัม yeast extract 10 กรัม และ agar granulated 15 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ส่วนผสมทั้งหมดละลาย หลังจากนั้นนำไปนึ่งอบไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

การเตรียม sweet potato dextrose agar

วัสดุ

- | | | |
|--------------------|------|-----------|
| 1. มันเทศ | 200 | กรัม |
| 2. กลูโคส | 20 | กรัม |
| 3. Agar granulated | 15 | กรัม |
| 4. น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

pH 5.6±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

วิธีการเตรียม

นำมันเทศมาปอกเปลือกแล้วหั่นเป็นชิ้นขนาดลูกเต๋า นำไปต้มในน้ำกลั่น อัตราส่วนมันเทศ 200 กรัมต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 15 นาที กรองแยกส่วนน้ำออกมา เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เติมกลูโคส 20 กรัม agar 15 กรัม นำไปต้มให้กลูโคสและ agar ละลาย หลังจากนั้นนำไปนึ่งอบไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

การเตรียม minimal salt medium (Bacto)

วัสดุ

1. sodium phosphate, dibasic, anhydrous	33.9	กรัม
2. potassium phosphate, monobasic	15	กรัม
3. sodium chloride	2.5	กรัม
4. ammonium chloride	5	กรัม
5. sterile 20 % glucose solution	20	มิลลิลิตร
6. sterile 1.0 M magnesium sulfate solution	2	มิลลิลิตร
7. sterile 1.0 M calcium chloride solution	0.1	มิลลิลิตร

8. น้ำกลั่น

pH 5.6 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

วิธีการเตรียม

การเตรียม minimal salts (5x) โดยละลาย sodium phosphate 33.9 กรัม, potassium phosphate 15 กรัม, sodium chloride 2.5 กรัม และ ammonium chloride 5 กรัมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH 6.8 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สารละลายจะใสไม่มีสี นำไปนึ่งอบไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

การเตรียม minimal salts medium โดยดูด minimal salts (5x) 200 มิลลิลิตร เติมในน้ำกลั่นไร้เชื้อ 750 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส ด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ เติม sterile 20 % glucose solution 20 มิลลิลิตร, sterile 1.0 M magnesium sulfate solution 2 มิลลิลิตร และ sterile 1.0 M calcium chloride solution 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

การเตรียม PDB ผสม เปลือกกุ้ง 1 %

วัสดุ

- | | | |
|------------------------------|------|-----------|
| 1. มันฝรั่ง | 200 | กรัม |
| 2. กลูโคส | 20 | กรัม |
| 3. เปลือกกุ้งอบแห้งบดละเอียด | 10 | กรัม |
| 4. น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

pH 5.6±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

วิธีการเตรียม

นำมันฝรั่งมาปอกเปลือกแล้วหั่นเป็นชิ้นขนาดลูกเต๋า นำไปต้มในน้ำกลั่น อัตราส่วนมันฝรั่ง 200 กรัมต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 15 นาที กรองแยกส่วนน้ำออกมา เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เติมกลูโคส 20 กรัม และเปลือกกุ้งอบแห้งบดละเอียด 10 กรัม นำไปต้มให้กลูโคสละลาย หลังจากนั้นนำไปนึ่งอบไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

การเตรียมแผ่นยา Amphotericin B

ผสมน้ำกลั่นไร้เชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดยาที่มี Amphotericin B ผง 50 มิลลิกรัม จะได้ยาที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางยาต่อให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายยามา 10 ไมโครลิตร หยดลงตรงกลางแผ่น disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้แห้ง จะได้แผ่นยาที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อแผ่น

การเตรียม McFarland Standard**วัสดุ**

1% sulfuric acid

1% barium chloride

วิธีการเตรียม

ผสม 1% sulfuric acid และ 1% barium chloride ตามอัตราส่วนดังตาราง

McFarland	1% sulfuric acid	1% barium chloride	Corresponding density of bacteria (10^8)
0.5	9.95	0.05	1.5
1	9.9	0.1	3
2	9.8	0.2	6
3	9.7	0.3	9
4	9.6	0.4	12
5	9.5	0.5	15
6	9.4	0.6	18
7	9.3	0.7	21
8	9.2	0.8	24
9	9.1	0.9	27
10	9.0	1.0	30

แผนภาพ 96 well microtiterplate

conidial suspension 100 ml + test dilution 100 ml (final concentration 512-1mg/ml)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

triplicate

standard

drug Miconazole

media control ↑

growth control ↑

แผนภาพ 24 well microtiterplate