สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยง *Azotobacter* sp. (Ashby, 1907)

Distilled water	1000 ml
Mannitol	15.0 g
K_2HPO_4	0.2 g
$MgSO_47H_2O$	0.2 g
NaCl	0.2 g
$CaSO_4.2H_2O$	0.1 g
$CaCO_3$	5.0 g
pH	6.8 ± 0.2

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยง Ammonifying bacteria

Peptone medium

Peptone	5.0 g
K_2HPO_4	1.0 g
KH_2PO_4	1.0 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g
NaCl	Trace (1 g)
Distilled water	1000 ml
pH	7

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหาร Standard plate count agar (APHA)

A standard medium corresponding to the AHPA formulation for milk, water, food and dairy products.

Yeast extract	2.5 g
Pancreatic digest of casein	5.0 g
Glucose	1.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1000 ml
pH	7 ± 0.2

ชั่ง SPCA 23.5 กรัม ลงในน้ำ 1 ลิตร ต้มให้ละลาย แล้วใส่ในขวดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหาร Proteolytic bacteria

Frazier gelatin medium

NaCl	3.0 g
K_2HPO_4	1.5 g
KH_2PO_4	0.5 g
Gelatin	4.0 g
Dextrose	0.05 g
Peptone	0.1 g
Beef extract	5.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1000 ml
pH	7

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Nitrate broth

Beef extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Potassium nitrate	1.0 g
Distilled water	1000 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำโดยใช้ความร้อนช่วยบรรจุหลอดทดสอบซึ่งมี Durham tube นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Nitrite-Formation medium

$(NH_4)_2SO_4$	2.0 g
K_2HPO_4	1.0 g
$MgSO_4$	0.5 g
$FeSO_4$	0.4 g
$CaCO_3$	5.0 g
Distilled water	1000 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยความร้อน บรรจุหลอด หากเตรียมแล้วใช้ได้ทันที่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อ การฆ่าเชื้อใช้การนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. Nitrate-formation medium

$NaNO_2$	1.0 g
K_2HPO_4	1.0 g
$MgSO_4$	0.3 g
Na_2CO_3	1.0 g
NaCl	1.0 g
$FeSO_4$	0.4 g
Distilled water	1000 ml

การเตรียมเช่นเดียวกับ Nitrite-Formation medium (คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม สำหรับนักศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ 326-424. 2540)

8. Casein medium

Tryptone	5.0 g
Yeast extract	2.5 g
Glucose	1.0 g
Agar	15.0 g
Skim milk	20 ml
Distilled water	980 ml

ใส่ Skim milk ก่อนผสมลงในขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Nessler's reagent

ละลาย Potassium iodide 3.5 g ในน้ำกลั่น 15 ml เป็นสารละลาย ก

ละลาย Mercuric acid chloride 1.7 g ในน้ำกลั่น 30 ml เป็นสารละลาย ข

ละลาย Sodium hydroxide 12 g ในน้ำกลั่น 30 ml เป็นสารละลาย ค

นำสารละลาย ข ค่อยๆ เติมลงไปในสารละลาย ก พร้อมทั้งเขย่าไปด้วยจนเกิดตะกอนสีแดงอย่างถาวร จากนั้นเติมสารละลาย ค แล้วเจือจางให้สารละลายทั้งหมด ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ค่อยๆ เติมสารละลาย ข ที่เหลือ จนเกิดตะกอน ขุ่นขึ้นเล็กน้อย วางทิ้งไว้ให้ใส รินเอาส่วนใสมาใช้

2. Sulfanilic acid 1%

Sulfanilic acid	0.8 g
Acetic acid 5 N	100 ml

ละลาย Sulfanilic acid ใน Acetic acid ผสมให้เข้ากันดี

3. α- Nephthylamine

α- Naphthylamine	5 g
Sulphuric acid conc.	8 ml
Distilled water	1000 ml

เติม Sulphuric acid conc. ใน Distilled water ผสมให้เข้ากัน เติม α- Nephthylamine ลงไป เขย่าให้เข้ากัน

4. Diphenylamine reagent

Diphenylamine	0.7 g
Sulphuric acid conc.	60 ml
HCl	11.3 ml
Distilled water	29 ml

ละลาย Diphenylamine ลงใน Sulphuric acid conc. จากนั้นค่อยๆ เท ลงไปในน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้เย็นเติม HCl ลงไปช้าๆ ทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนใช้

5. น้ำยาทดสอบ Bacteria ย่อยโปรตีน

$HgCl_2$	15 g
HCl	20 ml
Distilled water	100 ml

Quantitative determination of microorganisms

Table for analyzing results of quantitative count of bacteria by dilution method (MPN)

Numerical Characteristic	Probable Number in Presence of Parallel Test Tubes		
	3	4	5
000	0.0	0.0	0.0
001	0.3	0.2	0.2
002	—	0.5	0.4
003	—	0.7	—
010	0.3	0.2	0.2
011	0.6	0.5	0.4
012	—	0.7	0.6
013	—	0.9	—
020	0.6	0.5	0.4
021	—	0.7	0.6
022	—	0.9	—
030	—	0.7	0.6
031	—	0.9	—
040	—	0.9	—
041	—	1.2	—
100	0.4	0.3	0.2
101	0.7	0.5	0.4
102	1.1	0.8	0.6
103	—	1.0	0.8
110	0.7	0.5	0.4
111	1.1	0.8	0.6
112	—	1.1	0.8
113	—	1.3	—
120	1.1	0.8	0.6
121	1.5	1.1	0.8
122	—	1.3	1.0
123	—	1.6	—
130	1.6	1.1	0.8
131	—	1.4	1.0
132	—	1.6	—
140	—	1.4	1.1
141	—	1.7	—
200	0.9	0.6	0.5
201	1.4	0.9	0.7
202	2.0	1.2	0.9
203	—	1.6	1.2
210	1.5	0.9	0.7
211	2.0	1.3	0.9
212	3.0	1.6	1.2
213	—	2.0	—
220	2.0	1.3	0.9
221	3.0	1.6	1.2
222	3.5	2.0	1.4
223	4.0	—	—
230	3.0	1.7	1.2
231	3.5	2.0	1.4
232	4.0	—	—
240	—	2.0	1.4
241	—	3.0	—
300	2.5	1.1	0.8
301	4.0	1.6	1.1
302	6.5	2.0	1.4
303	—	2.5	—
310	4.5	1.6	1.1
311	7.5	2.0	1.4
312	11.5	3.0	1.7
313	16.0	3.5	2.0
320	9.5	2.0	1.4
321	15.0	3.0	1.7
322	20.0	3.5	2.0
323	30.0	—	—
330	25.0	3.0	1.7
331	45.0	3.5	2.0
332	110.0	4.0	—
333	140.0	5.0	—
340	—	3.5	2.0
341	—	4.5	2.5
350	—	—	2.5
400	—	2.5	1.3
401	—	3.5	1.7
402	—	5.0	2.0
403	—	7.0	2.5
410	—	3.5	1.7
411	—	5.5	2.0
412	—	8.0	2.5
413	—	11.0	—
414	—	14.0	—
420	—	6.0	2.0
421	—	9.5	2.5
422	—	13.0	3.0
423	—	17.0	—
424	—	20.0	—
430	—	11.5	2.5
431	—	16.5	3.0
432	—	20.0	4.0
433	—	30.0	—
434	—	35.0	—
440	—	25.0	3.5
441	—	40.0	4.0
442	—	70.0	—
443	—	140.0	—
444	—	160.0	—
450	—	—	4.0
451	—	—	5.0
500	—	—	2.5
501	—	—	3.0
502	—	—	4.0
503	—	—	6.0
504	—	—	7.5
510	—	—	3.5
511	—	—	4.5
512	—	—	6.0
513	—	—	8.5
520	—	—	5.0
521	—	—	7.0
522	—	—	9.5
523	—	—	12.0
524	—	—	15.0
525	—	—	17.5
530	—	—	8.0
531	—	—	11.0
532	—	—	14.0
533	—	—	17.5
534	—	—	20.0
535	—	—	25.0
540	—	—	13.0
541	—	—	17.0
542	—	—	25.0
543	—	—	30.0
544	—	—	35.0
545	—	—	45.0
550	—	—	25.0
551	—	—	35.0
552	—	—	60.0
553	—	—	90.0
554	—	—	100.0
555	—	—	180.0

ที่มา Ritra R. Colwell and Michsel S. Zambruski.1973. **Method in aquatic microbiology.**