

ภาคผนวก

ก. สีย้อม

1. Acetone alcohol (ย้อมแกรม)

Ethanol 95% 700 ml

Acetone 300 ml

ผสมให้เข้ากัน

2. Ammonium oxalate crystal violet (ย้อมแกรม)

Crystal violet 2 g

Ethanol 95% 20 ml

'Ammonium oxalate 1% aqueous 80 ml

ละลาย Crystal violet ใน Ethanol แล้วเติม Ammonium oxalate ลงไป ผสมให้เข้ากัน

3. Crystal violet solution 0.1%

Crystal violet 1 g

'Distilled water 1,000 ml

ละลาย Crystal violet ในน้ำกลั่น 100 มล. แล้วจึง เติมน้ำกลั่นให้ มีปริมาตรทั้งหมดเป็น 1,000 มล.

4. Iodine solution (ย้อมแกรม)

Iodine 1 g

Potassium iodide 2 g

Distilled water 300 ml

ผสม Iodine กับ Potassium iodide ให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นลงไป เล็กน้อย เพื่อให้ Iodine ละลายหมด แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรทั้งหมด เป็น 300 มล.

5. Lactophenol

Phenol crystal	20	g
Lactic acid	20	g
Glycerol	40	g
Distilled water	20	ml

ผสม Phenol crystal, Lactic acid, Glycerol และน้ำกลั่นเข้าด้วยกัน
ละลายโดยใช้ไฟอ่อน ๆ

6. Lactophenol cotton blue

Lactophenol	100	ml
Cotton blue (Aniline blue)	0.05	g

ผสมให้เข้ากัน

7. Lactophenol trypan blue

Lactophenol	100	ml
Trypan blue	0.05	g

ผสมให้เข้ากัน

8. Methylene blue

Methylene blue	0.3	g
Ethanol 95%	30	ml
Distilled water	100	ml

ละลาย Methylene blue ใน Ethanol ก่อน แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไป
ให้มีปริมาตรทั้งหมดเป็น 100 มล. ผสมให้เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรอง

9. Phenol erythrocin

Erythrocin	10	g
Phenol	50	g
Distilled water	1,000	ml

ละลาย Erythrocin และ Phenol ในน้ำกลั่น

10. Phenolic rose bengal

Rose bengal	1	g
Calcium chloride	0.03	g
Phenol	5	g
Distilled water.	100	ml

ละลาย Phenol ในน้ำกลั่นก่อน แล้วจึงเติม Rose bengal และ Calcium chloride ลงไป ผสมให้เข้ากัน

11. Safranin (ย้อมแกรม)

Safranin 0	0.25	g
Ethanol 95%	10	ml
Distilled water	100	ml

ละลาย Safranin 0 ด้วย Ethanol ก่อน แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปให้ มีปริมาตรทั้งหมดเป็น 100 มล. กรองด้วยกระดาษกรอง

ข. รีเอเจนต์

1. Calgon Solution 5% w/v

Sodium hexametaphosphate	50	g
Distilled water	1,000	ml

ปรับ pH เป็น 9 ด้วย Sodium carbonate

2. Nessler's Solution

Solution A

Mercuric chloride	45.5	g
Potassium iodide	34.9	g

ละลายส่วนประกอบทั้ง 2 ในน้ำ (ใช้น้ำน้อยที่สุด)

Solution B

Potassium hydroxide	112	g
Distilled water	120	ml

เติม solution B ลงใน solution A แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร เป็น 1.000 มล. (ใช้น้ำที่ปราศจากแอมโมเนียม) เก็บไว้ในขวดสีชาปิดทึบ รักษาดูแลในที่มืดจนแสง

3. Nitrite Test Reagent

Solution A

Sulfanilic acid	5	g
Acetic acid 30% by volume	500	ml

ละลาย Sulfanilic acid ใน Acetic acid โดยคั่งเล็กน้อย ๗

Solution B

Alpha - naphthylamine	1.5	g
Distilled water	350	ml
Glacial acetic acid	150	ml

ต้ม Alpha - naphthylamine ในน้ำกลั่น 2 นาที กรองเอาตะกอนออก
เติม Glacial acetic acid 153 มล. ลงไป
เก็บ Solution A และ Solution B แยกกัน

4. Nitrate Tart Reagent

Zinc dust (commercial grade)

ทำให้ปราศจากไนเตรตและไนไตรต์ โดยต้มใน 0.1 N Acetic acid
1 ชม. กรองโดยใช้เครื่องสุญญากาศ ล้างในน้ำกลั่นและนึ่งให้แห้ง

ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Alkaline Nitrogen - Free Agar

Glucose	20	g
Dipotassium hydrogen phosphate	1	g
Magnesium sulphate ($7H_2O$)	0.5	g
Ferric chloride ($6H_2O$)	0.1	g
Calcium carbonate	2	g
Agar	15	g
Distilled water	1,000	ml

pH 7.5

2. **Ammonium** Solution Medium

Ammonium sulphate	2	g
Dipotassium hydrogen phosphate	1	g
Magnesium sulphate	0.5	g
Ferrous sulphate	0.4	g
Calcium carbonate	5	g
Distilled water	1,000	ml

ไม่คองซาเชื้อ

3. **Czapek - Dox** Agar

Yeast extract	1	g
Sodium nitrate	3	g
Dipotassium hydrogen phosphate	1	g
Magnesium sulphate ($7H_2O$)	0.5	g
Potassium chloride	0.5	g
Ferrous sulphate ($7H_2O$)	10	mg
Agar	15	g
Distilled water	1,000	ml
Sucrose	30	g

ละลายส่วนประกอบอื่น ๆ ก่อน เติม sucrose เป็นส่วนสุดท้ายก่อนนำไป
นึ่งฆ่าเชื้อ

4. Diluted Nutrient Agar

Peptone	0.5	g
Beef extract	0.3	g
Sodium chloride	0.8	g
Distilled water	1,000	ml
pH = 6.8		

5. Enrichment Medium For **Denitrifying** Bacteria

Potassium nitrate	1.2	g
Dipotassium hydrogen phosphate ($3H_2O$)	0.5	g
Potassium dihydrogen phosphate	0.5	g
Beef extract	3	g
Peptone	5	g
Ammonium chloride	1	g
Distilled water	1,000	ml

ใช้ความเข้มข้นละลาย บรรจุใส่หลอดทดสอบที่มีหลอดกักอากาศหลอดละ 5 มล.
ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งไอน้ำ (autoclave)

6. Mannitol - Soil Extract Agar

Soil extract	500	ml
Tap water	500	ml
Mannitol	5	g
Dipotassium hydrogen phosphate	1	g
Asparagine	0.1	g
Agar	15	g

เตรียม Soil extract โดยใช้ดินที่อุดมสมบูรณ์ 1,000 กรัม เติมน้ำประปา 1,000 มล. นึ่งในหม้อนึ่งไอน้ำ (autoclave) 20 นาที เติม Calcium carbonate 0.5 กรัมเพื่อช่วยตกตะกอนสารต่าง ๆ ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วกรองเพื่อให้ได้สารละลายใส

7. **Mannitol - Yeast Extract - Congo Bed Agar**

Mannitol	10	g
Dipotassium hydrogen phosphate	0.5	g
Magnesium sulphate	0.2	g
Sodium chloride	0.1	g
Calcium carbonate	3	g
Yeast extract	9	g
Congo red 1% solution	2.5	ml
Agar	15	g
Distilled water	1,000	ml

8. **Modified Bennet's Medium**

Maltose	5	g
Peptone	2	g
Meat extract	1	g
Yeast extract	1	g
Agar	15	g
Distilled water	1,000	ml

pH 7.5

ฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อในหม้อนึ่งไอน้ำ เมื่ออุณหภูมิคงที่ 50-55° ซ. เติม
สารละลายของสารปฏิชีวนะในน้ำคั้นฆ่าเชื้อต่อไปนี้ Nystatin 30 ไมโครกรัม/
มล., Cyclohexamide 25 ไมโครกรัม/มล., Nalidixic acid
30 ไมโครกรัม/มล. และ Penicillin G 2.5 ไมโครกรัม/มล.

9. Modified Bristol's Solution

Sodium nitrate	0.25	g
Calcium chloride	0.025	g
Magnesium sulphate ($7H_2O$)	0.075	g
Dipotassium hydrogen phosphate	0.075	g
Potassium dihydrogen phosphate	0.018	g
Sodium chloride	0.025	g
Ferric chloride	0.5	mg
Distilled water	1,000	ml
ไม่คองชาเชื้อ		

10. Nitrite Solution Medium

Sodium nitrite	1	g
Dipotassium hydrogen phosphate	1	g
Magnesium sulphate	0.3	g
Sodium carbonate	1	g
Sodium chloride	0.5	g
Ferrous sulphate	0.4	g
Distilled water	1,000	ml
ไม่คองชาเชื้อ		

11. Nitrogen Free Culture Medium

Glucose	10	g
Magnesium sulphate	0.02	g
Sodium chloride	0.22	g
Calcium sulphate	0.1	g

Calcium carbonate	5	g
Dipotassium hydrogen phosphate	0.5	g
Sodium molybdate	2	ppm
Ferrous sulphate	4	ppm
Distilled water	1,000	ml

12. **Nutrient Agar**

Beef extract	3	g
Peptone	5	g
Sodium chloride	8	g
Agar	15	g
Distilled water	1,000	ml
pH 6.8		

13. **Peptone Iron Agar**

Tryptone	20	g
Ferric ammonium citrate	0.5	g
Dipotassium hydrogen phosphate	1	g
Agar	15	g
Distilled water	1,000	ml

14. **Peptone** Solution

เตรียมเช่นเดียวกับ **Peptone Iron Agar** แต่ไม่ต้องใส่ **Agar**

15. **Phosphate Agar**

Dipotassium hydrogen phosphate	1	g
Agar	15	g
Distilled water	1,000	ml

16. **Potato Dextrose Agar**

Potatoes (peeled and sliced)	200	g
Dextrose	20	g
Agar	17	g
Distilled water	1,000	ml

ต้มมันฝรั่งในน้ำกลั่น 500 มล. 1 ชม. หลอมเหลวในน้ำกลั่น 500 มล.
กรองเอาน้ำต้มมันฝรั่ง เติมน้ำกลั่นในขวดที่หลอมเหลว เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร
เป็น 1,000 มล. แล้วจึงเติม **Dextrose** ก่อนที่จะนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

17. **Rose Bengal Agar**

Dextrose	10	g
Yeast extract	0.5	g
Potassium dihydrogen phosphate	0.5	g
Dipotassium hydrogen phosphate	0.5	g
Magnesium sulphate (7H₂O)	0.5	g
Peptone	0.5	g
Distilled water	1,000	ml
Agar	17	g
Rose bengal	0.05	g

ละลายส่วนประกอบต่าง ๆ ในน้ำกลั่น เติมน้ำลงไปตั้งไฟจนกระทั่งอุ่น
ละลายจึงยกลง เติม **Rose bengal** นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งไอน้ำ
เมื่ออุณหภูมิลดลงที่ 50 - 55 °ซ. เติมสารละลายของ **Streptomycin**
ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 30 ไมโครกรัม/มล.

18. Sodium Albuminate Agar

Dextrpsc	1	g
Egg albumin	0.25	g
Dipotassium hydrogen phosphate	0.5	g
Magnesium sulphate ($7H_2O$)	0.2	g
Ferric sulphate	0.01	g
Agar	15	g
Distilled water	1,000	ml

ละลาย **Egg albumin** ใน 0.1 N **Sodium hydroxide** 10 มล.
โดยตั้งไฟอ่อน ๆ เติมส่วนประกอบอื่น ๆ ลงไป ปรับ pH เป็น 7 ฆ่าเชื้อ
ในหม้อนึ่งไอน้ำ เมื่ออุณหภูมิลดลงที่ 50 - 55 °ซ. เติมสารละลายของ
Actidione ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 40 ไมโครกรัม/มล.

19. Sodium Lactate - Yeast Extract - Sulphate **Medium**

Dipotassium hydrogen phosphate	0.5	g
Ammonium chloride	1	g
Sodium sulphate	1	g
Calcium chloride ($2H_2O$)	0.1	g
Magnesium sulphate ($7H_2O$)	2	g

Sodium lactate	7.5	ml
Yeast extract	1	g
Ferrous sulphate ($7H_2O$)	0.2	g
Agar	15	g
Tap water	1,000	ml

pH 7.2 - 7.4

เมื่อฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งไอน้ำแล้ว ก่อนที่จะเทอาหารให้เก็บสารละลาย Sodium ascorbate 0.01% และ Sodium thioglycolate 0.01%

20. Soil Extract Agar

Glucose	1	g
Dipotassium hydrogen phosphate	0.5	g
Potassium nitrate	0.1	g
Soil extract	100	ml
Agar	15	g
Tap water	900	ml

pH 6.5 - 7

21. Solution For Cellulolytic Organisms

Dipotassium hydrogen phosphate	, 1	g
Sodium nitrate	0.5	g
Magnesium sulphate ($7H_2O$)	0.5	g
Potassium chloride	0.5	g
Ferrous sulphate ($7H_2O$)	0.01	g

Distilled water 1,000 ml

pH 7.5

บรรจุใส่หลอดทดสอบหลอดละ 9 มล. และใส่กระดาษกรองขนาด 1 x 9 ซม.
หลอดละ 1 ชิ้น ซ้ำเชื้อในหมอนึ่งไอน้ำ

22. Thiosulphatt Agar

Sodium thiosulphate (5H ₂ O)	5	g
Dipotassium hydrogen phosphate	0.1	g
Sodium hydrogen carbonate	0.2	g
Ammonium chloride	0.1	g
Agar	15	g
Distilled water	1,000	ml

23. Thfosulphate Solution (Beijerinck)

Sodium thiosulphate	5	g
Ammonium chloride	0.1	g
Sodium hydrogen carbonate	1.0	g
Disodium hydrogen phosphate	0.2	g
Magnesium chloride (6H ₂ O)	0.1	g
Tap water	1,000	ml

เมื่อฆ่าเชื้ออาหารแล้ว ก่อนใช้ให้เค็มสารละลาย Ferrous sulphate 1%
ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2-3 หยกต่ออาหาร 35 มล.

24. Urea Solution

Urea	30	g
Dipotassium hydrogen phosphate	0.5	g
Calcium citrate	10	g
Distilled water	1.000	ml
pH 7		

