เอกสารอ้างอิง

1. Saisithi, Prasert, "Traditional Fermented Fish Products with Special Reference to Thai Products," Asean Food Journal, 3(1), 3-10, 1987.
2. Adans, M.R., R.D. Cooke, and Pongpen Rattagool, "Fermented Fish Products of Southeast Asia," Trop. Sci., 25, 61-73 , 1985.
3. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 47, "น้ำปลา," กระทรวงสาธารณสุข, กรุงเทพฯ , 2523.
4. ผ่องเพ็ญ รัตกูล, ปรีดา เมธาทิพย์, นิรชา วงษ์จินดา และนฤมล แสงทอง, "น้ำปลาไทย," รายงานผลการปฏิบัติงานประจำปี, กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง, กรุงเทพฯ, 2524.
5. ธวัชชัย วิไลพันธุ์, "ทำน้ำปลาใช้เอง," ทักษะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี่, 45, 60-63,2526.
6. สำนักงานสถิติแห่งชาติ, "การสำรวจภาวะการผลิตและการจำหน่ายของอุตสาหกรรมน้ำปลา," สำนักนายกรัฐมนตรี, กรุงเทพฯ, 2526.
7. ประชุม พิริยะพงศ์, "น้ำปลา," วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 17,71-76, 2518.
8. กองนโยบายและแผนงานประมง, "สถิติหน่วยธุรกิจการประมง ปี 2528," กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ , 2528.
9. กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์,"ข้อมูลเศรษฐกิจการพาณิชย์ มกราคม-ธันวาคม 2529," ศูนย์สถิติการพาณิชย์, กรุงเทพฯ , 2529.
10. กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์,"ข้อมูลเศรษฐกิจการพาณิชย์ มกราคม-ธันวาคม 2530," ศูนย์สถิติการพาณิชย์ , กรุงเทพฯ, 2530.
11. Beddows, C, G., "Fermented Fish and Fish Products," Microbiology of Fermented Foods (Wood,Brian J. B., ed.), Vol 2, PP. 1 - 39, Elsevier Applied Science Publishers, London , 1985.
12. Magno-Orejana, F., " Fermented Fish Products, " Fermented Fish Products (Chan, H.T. Jr., ed.), pp. 255 - 295,

Marcel Dekker Inc., New York, 1983.

13. Sands, A., and E.V. Crisan," Microflora of Fermented Korean Foods, " J.Food Sci., 39 , 1002 , 1974.

14. Saisithi, P.," Studies on the Origins and Development of the Typical Flavor and Aroma of Thai Fish Sauce, " Ph.D. Thesis, University of Washington , 1967.

15. Beddows, C.G., A.G. Ardisher, and W.J. bin Daud, "Biochemical Changes Occurring During the Manufacture of Budu, " J. Sci. Food Agric., 30, 1097-1103 , 1979.

16. มัทนา แสงจินดาวงษ์ และ สมศักดิ์ วินิจนันทรัตน์," การศึกษาชนิดและปริมาณแบคทีเรียในระยะต้นของการทำน้ำปลา,"วารสารการประมง, 37 (1), 69 - 71 , 2527.

17. กฤษดา สมิตสิริ , "บักเตรีชอบเค็มในการหมักน้ำปลา,"วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2529.

18. สิทธิพันธุ์ ไชยนันทน์, "การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการของเชื้อบักเตรีที่แยกได้ จากน้ำปลาไทย ซึ่งผลิตจากปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม," วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2521.

19. รวงพร โชติกไกร,จุลชีววิทยาของอาหารและนม,หน้า 159-169,ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง,กรุงเทพฯ, 2525.

20. วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร, เทคโนโลยีของผลิตภัณฑ์ประมง, หน้า 29-46,ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , 2518.

21. Opstvedt, J., "Fish Fats," Fats in Animal Nutrition (Wiseman, J.,ed.),pp.53-82, Butterworths, London, 1984.

22. สิรินทร์ วิริมกข์สันถว์และคณะ, ชีวเคมี, หน้า 176-192, ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพ, 2521.

23. Stansby, M. E., Fish in Nutrition, pp. 55-60, Fishing News (Books) Ltd., London , 1962.

24. Shewan, J. M., "The Microbiology of Sea Water Fish," Fish as food (Borgstrom, G. ed.), Vol 1, pp. 487-560, Academic Press, New York, 1961.

25. Longree, Karla, Quantity Foods Sanitation, pp. 158, Wiley-

Interscience , London , 1972.

26. Frazier, W. C., Food Microbiology, pp. 133-354, TATA McGraw-Hill Publishing Company Ltd., New Delhi, 1967.

27. Froblisher, Martin, and others, Fundamentals of Microbiology, pp. 752, W.B. Saunders Company, London, 1974.

28. Suwanik, R., "Iron and Iodine Fortification of Common Salt and Fish Sauce," Lancet, 2 (8099), pp. 1101-1102,1978.

29. วิเชียร สาครมงคล, สมพูล สุยะสินธุ์ และ กฤษดา ตันธีระธรรม,"การผลิตเกลือในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ," กองการวิจัย กรมวิทยาศาสตร์บริการ, กรุงเทพฯ, 2521.

30. Suntinanalerts, P. "Role of Micro-organisms in the Fermentation of Nam-Pla in Thailand : Relationship of Bacteria Isolated from Nam-Pla Produced from Different Geographical Localities in Thailand," M.S. Thesis, Mahidol University, Bangkok, 1979.

31. สุมาลี เหลืองสกุล, จุลชีววิทยาทางอาหาร, หน้า 268-281, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, กรุงเทพฯ 2527.

32. Brock, Thomas D., David W. Smith, and Michael T. Madigan, Biology of Micro-organisms, pp.250-254, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffis, 1984.

33. Gibbons, N. E., "Isolation, Growth and Requirements of Halophilic Bacteria," Methods in Microbiology (Norris, J.R. and D.W. Ribbons, eds.), Vol. 3B, pp. 169-183, Academic Press, London, 1969.

34. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, "มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำปลาพื้นเมือง," กระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ, 2526.

35. Subba Rao, G. N., "Fisheries Products Manual," Thailand FAO Regional Office for Asia and the Far East, pp. 233, Bangkok, 1961.

36. สายสมร ลิปตะศิริ, "การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อบักเตรีที่แยกได้ในน้ำ-ปลาไทย," วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2518.

37. Amano, K. "The Influence of Fermentation to the Nutritive Value of Fish with Special Reference to Fermented Fish Products of Southeast Asia," Intern, Symp. of Fish in Nutrition (Heen, E. and R. Krenzer, eds.) pp. 180-200, Fishing News (Books) Ltd., London, 1962.

38. Kasemsarn, B., "Studies on Fish Sauce Fermentation," MS. Thesis, University of Washington, 1963.

39. ประเสริฐ สายสิทธิ์, "กลิ่นและรสของน้ำปลา," วารสารการประมง, 21(3), 467-473, 2511.

40. Van Veen, A. G., "Fermented and Dried Sea Food Products in Southeast Asia," Fish as food (Borgstrom, G. ed.) , Vol. 3, pp. 227-250, Academic Press, New York, 1965.

41. Liston, J., and J. R. Matches , "Fish, Crustaceans and Precooked Seafoods," Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Speck, Marvin L. ed.), pp. 517, American Public Health Association, Inc., Washington,D.C., 1976.

42. สายพิณ ไชยนันทน์ และ สิทธิพันธุ์ ไชยนันทน์, "การศึกษาบักเตรีที่มีบทบาททำให้เกิดกลิ่นในน้ำปลาไทย," วารสารคณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์, 2(2), 3, 2526.

43. Siebert, G., and A. Schmitt, "Fish Tissue Enzymes and Their Role in the Deteriolative Changes in Fish," Intern. Symp. on the Technology of Fish Utilization (Renzer, R. K. ed.), Fishing News (Books) Ltd., London, 1965.

44. Alm, F., "Scandinavian Anchovies and Herring Tidbits ," Fish as Food (Bergstrom, G. ed.), Vol. 3, pp. 195-217, Academic Press, New York, 1965.

45. Ok, Taing, and others, "Protease Formation by Two Morderately Halophilic Bacillus Strains Isolated from Fish Sauce," Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 29(10),618-621, 1982.

46. สาโรจน์ ประเสริฐศิริวัฒน์, "การเปลี่ยนแปลงของประชากรแบคทีเรียและชีวเคมีในการหมักน้ำปลา," วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย , 2531.

47. Norberg, P., and B.V. Hofsten, "Proteolytic Enzymes from Extremely Halophilic Bacteria," J. Gen. Microbiol., 55, 251-256, 1969.

48. Orejana, F. M., and J. Liston, "Protein and Lipid Hydrolysis in Philippine Fish Sauce (Patis) Prepare from Irradiated and Non-Irradiated Anchovies," Phil. J. Food Sci. and Tech., 3, 17-30, 1979.

49. Jones, N. R., "Browning Reactions in Dried Fish Products," Rec. Advanc. Food Sci., 2, 74-80 ,1962.

50. Orejana, F. M., "Proteolysis and Control Mechanisms in Fish Sauce Fermentation," Ph.D. Thesis, Univ. of Washington, Washington, D.C., 1978.

51. Board, R. G., "A Modern Introduction to Food Microbiology," pp. 36, Blackwell Scientific Publications, London, 1983.

52. Dougan, J., and G.E. Howard, "Some Flavouring Constituents of Fermented Fish Sauce," J. Sci. Food Agric., 26, 887-894, 1975.

53. Sanceda, Norlita G., Tadao Kurata, and Nobukiko Arakawa, "Fractionation and Identification of Volatile Compounds in Patis, a Philippine Fish Sauce," Agric. Biol. Chem., 48(12), 3047-3052, 1984.

54. McIver, Robert C., Roger I. Brooks, and Gary A. Reineccius, "Flavor of Fermented Fish Sauce," J. Agric. Food Chem., 30(6), 1017-1020, 1982.

55. Sanceda, Norlita G., Tadao Kurata, and Nobukiko Arakawa, "Study on the Volatile Compounds of Fish Sauces-Shottsuru, Nampla and Noucman," Agric. Biol. Chem., 50(5), 1201-1208, 1986.

56. Beddows, C. G., A. G. Ardisher, and W.J. bin Daud, "Development and Origin of the Volatile Acid in Budu," J. Sci. Food Agric., 31, 86-92, 1980.

57. Martalich, T., and Y. Schwartz, "Flavor and Micro-organism,"

Adv. in Appl. Microbiol., 12, 35, 1970.

58. Itoh, H., R. S. Hadioetomo, S. Nikkuni, and N. Okada, "Studies on Lactic Acid Bacteria in Fish Sauces (Part 2) Identification of Salt Tolerance and Acid-Producing Bacteria from Fish Sauces," Rept. Natl. Food Res. Inst., 47, 31-40, 1985.

59. ยงยศ จุฑามาตยางกูร, "การศึกษาสภาวะที่เหมาะสำหรับการเจริญของบักเตรี Pediococcus sp. ที่แยกได้จากน้ำปลา," วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2522.

60. Mittranond, Chananan, "Experimental Fish Sauce Fermentation Using Enzymes and Halophilic Bacterial Cultures," M.S. Thesis, Mahidol Univ., Bangkok, 1983.

61. Baross, J. A., "Halophilic Micro-organisms," Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Speck, Marvin L. ed.), pp. 194-202, American Public Health Association, Inc., Washington, D.C., 1976.

62. Alford, J. A., "Lipolytic Micro-organisms," Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Speck, Marvin L. ed.), pp. 184-189, American Public Health Association, Inc., Washington, D.C., 1976.

63. Smith, Emil L. and others, Principles of Biochemistry : General Aspects, pp. 111, McGraw-Hill Book Company, London, 1983.

64. Buchanan, R. E. and others, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th edition, pp. 269-274., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1974.

65. Kushner, D. J., "Halophilic Bacteria," Advances in Applied Microbiology (Umbreit, Wayne W. and D. Perlman eds.), pp. 73-99, Academic Press, New York, 1968.

66. Embisan, E. A., "A Shortcut to Patis Processing," Small Industry Journal, 10(4), 10-11, 1977.

67. Vardhanabhuti, S., J. Chouvalit, Y. Sombatpanit, and P. Lauhasiri, Acceleration of Nam Pla Fermentation by

Artificial Means, Report No. 1 on Research Project No. 31/4, ASRCT, Bangkok, 1968.

68. Poosaran, N., "Fish Sauce I : Acid Hydrolysis at Ambient Temperature," Songklanakarin J. Sci. Technol., 8(1), 43-46, 1986.

69. Hall, L. A., "Protein hydrolysate Flavor Ingredients for Food," Food Ind., 18(5), 95-98, 1946.

70. Poosaran, N., "Fish Sauce II : Enzyme Hydrolysis," Songklanakarin J. Sci, Technol., 8(2), 205-207, 1986.

71. ชิกิโอ มูรายาม่า, โดมิเนดอร์ ล. คาลเวซ์ และ ประภาส นิตยจินต์, "ผลการค้นคว้าในการทำน้ำปลาโดยการใช้ Proteolytic Enzyme," วารสารประมง, 15(4), 381-393, 2505.

72. Miyazawa, K., Van Le Chuong, K. Ito and F. Matsumoto, "Pronase and Fish Sauce Production," J. Fac. Appl. Biol. Sci., 18(1), 55-63, 1979.

73. Ok, Taing and others, "Study on the Use of Halophilic Bacteria in Production of Fish Sauce," Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 29(10), 623-627, 1982.

74. Dussault, H. P., "An Improved Technique for Staining Red Halophilc Bacteria," J. Bacteriol., 70(6), 484-485, 1955.

75. Willis, A. Trevor, Anaerobic Bacteriology : Clinical and Laboratory Practice, pp. 41-57, Butterworths, London, 1977.

76. Bligh, E. G., and W. J. Dyer, "A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification," Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37(8), 911-917, 1959.

77. Difco Manual, "Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology" Difco Laboratories, Michigan, 1984.

78. Bennett, Reginald W., FDA Bacteriological Analytical Manual, pp. 1-4, Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C., 1978.

79. Thongthai, Chaufah, and Malinee Siriwongpairat, "Changes in

the Viable Bacteria Population, pH, and Chloride Concentration During the First Month of Nam-Pla (Fish Sauces) Fermentation," J. Sci. Soc. Thailand, 4, 73-78, 1978.

80. กฤษณา รุ่งเรืองศักดิ์ และ ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์, ปฏิบัติการและหลักเบื้องต้นในวิชาชีวเคมี, หน้า 108-110, อมรินทร์การพิมพ์, กรุงเทพฯ, 2521.

81. Chayovan, Suphsorn and others, "Fatty Acids and Sensory Acceptance of a Dietary Sodium-Potassium Fish Sauce," J. Agric. Food Chem., 31, 14-17, 1983.

82. Vreeland, R. H., and E. L. Martin, "Growth Characteristics, — Effects of Temperature and Ion Specificity of the Halotolerant Bacterium Halomonas elongata," Can. J. Microbiol., 20, 746-752, 1980.

83. Vreeland, R. H., R. Anderson and R. G. E. Murray, "Cell Wall and Phospholipid Composition and their Contribution to the Salt Tolerance of Halomonas elongata," J. of Bacteriology, 160(3), 873-883, 1984.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ผสมกับน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 15 นาที ยกเว้นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อบางสูตรที่ระบุไว้โดยเฉพาะ

1. Brain heart infusion agar (42)

Calf brains, infusion form	200.0	กรัม
Beef heart, infusion form	250.0	กรัม
โปรติโอสเปปโตน (proteose peptone)	10.0	กรัม
เดกซ์โตรส (dextrose)	2.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	12.5	กรัม

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco โดยชั่งมา 52 กรัม เติมโซเดียมคลอไรด์ตามจำนวนที่ต้องการ ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ ต้มจนละลาย ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2. Complex medium of Dundas (33)

โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	5.0	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	5.0	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	5.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	ตามต้องการ	
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ ต้มจนละลาย ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. Sehgal & Gibbons medium (33)

แคสอะมิโนแอซิด (Casamino acid)	7.5	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10.0	กรัม
โซเดียมซิเตรต ($C_3H_4(OH)(COONa)_3 \cdot 2H_2O$)	3.0	กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	2.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	20.0	กรัม
เฟอรัสคลอไรด์ ($FeCl_2$)	0.023	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	ตามต้องการ	
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ ต้มจนละลาย ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

4. Tryptic soy yeast extract agar

ทริปโตน (tryptone)	15.0	กรัม
ซอยโตน (soytone)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco โดยชั่งมา 40 กรัม เติมผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 5.0 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ตามต้องการ ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ ต้มจนละลายปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5. Tryptone yeast extract agar (46)

ทริปโตน (tryptone)	5.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	2.0	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	ตามต้องการ	
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ ยกเว้นแคลเซียมคลอไรด์ ต้มจนละลาย ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อพร้อมกับแคลเซียมคลอไรด์ หลังจากนั้นจึงค่อยผสมลงไปเขย่าจนละลาย

6. Nutrient agar (16)

บีฟเอกซ์แตรก (beef extract)	3.0	กรัม
เปปโตน (peptone)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	ตามต้องการ	
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ ต้มจนละลาย ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

7. Plate count agar (Standard method agar)

ทริปโตน (tryptone)	5.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	2.5	กรัม
เดกซ์โตรส (dextrose)	1.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco โดยชั่งมา 23.5 กรัม เติมโซเดียมคลอไรด์ตามจำนวนที่ต้องการ ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ ต้มจนละลาย ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

8. Viande-Levure glucose agar (75)

ทริปโตน (tryptone)	10.0	กรัม
บีฟเอกซ์แตรก (beef extract)	2.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
กลูโคส (glucose)	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	ตามต้องการ	
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ ต้มจนละลาย ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (115 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 10 นาที

9. Tryptic soy yeast extract broth

ทริปโตน (tryptone)	17.0	กรัม
ซอยโตน (soytone)	3.0	กรัม
เดกซ์โตรส (dextrose)	2.5	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 5.0 กรัม

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco โดยชั่งมา 30.0 กรัม เติมผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 5.0 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ตามจำนวนที่ต้องการ ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ ต้มจนละลาย ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

10. อาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปส

ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy yeast extract agar เติมโซเดียมคลอไรด์ตามจำนวนที่ต้องการ ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ เติม glycerol tributyrate ลงไป 0.2 เปอร์เซ็นต์ ต้มบน hot plate stirrer จนละลายและไขมันกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ รอให้อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงถึง 40-45 องศาเซลเซียส เทอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวลงในจานแก้วเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งให้อาหารแข็งตัวแล้วจึงนำไปใช้

11. Motility test medium

ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy yeast extract broth และเติมวุ้นผงลงไป 5.0 กรัมต่อลิตร เติมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ ต้มจนละลาย ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.5 บรรจุใส่หลอดทดลอง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

12. Urea broth

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	0.1	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	9.1	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	9.5	กรัม
ยูเรีย (urea)	20.0	กรัม
ฟีนอลเรด (phenol red)	0.01	กรัม

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco โดยชั่งมา 38.7 กรัม เติมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.8 ทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ Millipore filter

13. Tryptic Nitrate Medium (nitrate medium)

ทริปโตส (tryptose)	20.0	กรัม
เดกซ์โตรส (dextrose)	1.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	2.0	กรัม

โปตัสเซียมไนเตรท (KNO_3)	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	250.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	1.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ ต้มจนละลาย ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

14. Triple sugar iron agar

บีฟเอกซ์แตรก (beef extract)	3.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.0	กรัม
เปปโตน (peptone)	15.0	กรัม
โปรติโอสเปปโตน (proteose peptone)	5.0	กรัม
เดกซ์โตรส (dextrose)	1.0	กรัม
แลคโตส (lactose)	10.0	กรัม
ซูโครส (sucrose)	10.0	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
โซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)	0.3	กรัม
ฟีนอลเรด (phenol red)	0.025	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	12.0	กรัม

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco โดยชั่งมา 65.0 กรัม เติมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ ต้มจนละลายปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อเสร็จแล้ววางเอียง (slant) ทิ้งให้อาหารแข็งตัว

15. Methyl red-Voges Proskauer medium (MR-VP medium)

บัฟเฟอร์เปปโตน (buffer peptone)	7.0	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	5.0	กรัม
กลูโคส (glucose)	5.0	กรัม

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco โดยชั่งมา 17.0 กรัม เติมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.9 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

16. อาหารทดสอบการย่อยแป้ง (starch hydrolysis)

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy yeast extract agar ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์อยู่ 25 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) และเติมแป้ง (soluble starch) ลงไป 1.0 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเทลงจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

17. อาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์เจลลาติเนส

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy yeast extract agar ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์อยู่ 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) และเติมเจลลาติน (gelatin) ลงไป 0.4 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเทลงจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

18. อาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy yeast extract agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วทิ้งให้มีอุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส เติมสารละลาย skim milk (เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์) ที่แยกนึ่งฆ่าเชื้อลงไป 50 มิลลิลิตร ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากันโดยให้มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์ เทลงจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

19. Phenol red broth base

บีฟเอกซ์แตรก (beef extract)	1.0	กรัม
โปรติโอสเปปโตน (proteose peptone)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ฟีนอลเรด (phenol-red)	0.018	กรัม

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco โดยชั่งมา 16 กรัม เติมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ ละลายส่วนผสมด้วยน้ำและเติมคาร์โบไฮเดรตที่ต้องการทดสอบ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที และแช่ลงในน้ำเย็นทันทีเพื่อป้องกันน้ำตาลแตกตัว

20. Synthetic medium ของ Vreeland และ Martin (82)

แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	5.0	กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.75	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	4.0	กรัม
เฟอรัสซัลเฟตแอมโมเนียมซัลเฟต ($FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$)	0.04	กรัม
เดกซ์โตรส (dextrose)	2.0	กรัม

ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 5.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 250.0 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำจนละลาย ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

21. Synthetic medium ของ Vreeland และคณะ (83)

แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) 5.0 กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.75 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 4.0 กรัม
เฟอรัสซัลเฟตแอมโมเนียมซัลเฟต ($FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$) 0.04 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) 0.1 กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 5.0 กรัม
กลูโคส (glucose) 2.0 กรัม
โมโนโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate) 8.45 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ 250.0 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำจนละลาย ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

22. Synthetic medium ของ Dundas และคณะ (33)

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	5.0	กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	5.0	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	5.0	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	5.0	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.1	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	5.0	กรัม
เฟอรัสคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	0.005	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	250.0	กรัม
ไลซีน (L-lysine)	0.25	กรัม
อาร์จินีน (L-arginine)	0.5	กรัม
โปรลีน (L-proline)	0.25	กรัม
เวลีน (L-valine)	0.25	กรัม
เมไธโอนีน (L-methionine)	0.1	กรัม
ไอโซลูซีน (L-isoleucine)	0.25	กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลูซีน (L-leucine)	0.25	กรัม
ไทโรซีน (L-tyrosine)	0.1	กรัม
เฟนิลอะลานีน (phenylanine)	0.05	กรัม
กลูตามีน (L-glutamine)	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำจนละลาย ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

23. Medium 73

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	10.0	กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	5.0	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	0.2	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	250.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำจนละลาย ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

24. Complex medium of Dundas (อาหารเหลว)

มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับภาคผนวก ก หมายเลข 2 โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ 250 กรัมและไม่เติมวุ้นผง ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

25. Basal salt medium

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1.0	กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.75	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	0.2	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	250.0	กรัม
กลูโคส (glucose)	2.5	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ เติมแหล่งของไนโตรเจน ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

แหล่งของไนโตรเจนที่เติมลงไปใน basal salt medium เพื่อหาแหล่งของไนโตรเจนที่ให้การเจริญดีที่สุด ได้แก่

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	0.4	เปอร์เซ็นต์
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	0.4	เปอร์เซ็นต์
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	0.4	เปอร์เซ็นต์

กับโปตัสเซียมไนเตรต (KNO_3)	0.2	เปอร์เซ็นต์
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	0.4	เปอร์เซ็นต์
กับโปตัสเซียมไนเตรต (KNO_3)	0.2	เปอร์เซ็นต์
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	1.5	เปอร์เซ็นต์
casein hydrolysate	1.5	เปอร์เซ็นต์
แคสอะมิโนแอซิด (casamino acid)	1.5	เปอร์เซ็นต์
ทริปโตน	1.5	เปอร์เซ็นต์
เปปโตน	1.5	เปอร์เซ็นต์

แหล่งของคาร์บอนที่เติมลงไปใน basal salt medium เพื่อใช้แทนกลูโคสที่น่าสนใจ ได้แก่ กลีเซอรีน (glycerine) 1.0 เปอร์เซ็นต์, กลีเซอรอล (glycerol) 1.0 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ทริปโตนเป็นแหล่งของไนโตรเจน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สีย้อมและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 40 เปอร์เซ็นต์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 400 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน ทิ้งให้เย็นภายใต้ fume hood

2. สารละลายกรดบอริค (boric acid) เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์

ชั่งกรดบอริค (boric acid) 40 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

3. สารละลายของอินดิเคเตอร์ผสม (mixed indicator)

สารละลาย ก.

เมธิลเรด (methyl red)	100	มิลลิกรัม
เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 95 เปอร์เซ็นต์	100	มิลลิลิตร

สารละลาย ข.

บรอมคลีซอลกรีน (bromcresal green)	50	มิลลิกรัม
เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 95 เปอร์เซ็นต์	100	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย ก และสารละลาย ข เข้าด้วยกัน ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1

4. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (M)

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 4 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร นำสารละลายที่เตรียมได้ไป standardize กับสารละลายมาตรฐานของโปตัสเซียมไฮโดรเจนเพทาเลต (potassium hydrogen phthalate) ($C_8H_5KO_4$) ที่มีความเข้มข้น 0.1 M ซึ่งเตรียมโดยการอบโปตัสเซียมไฮโดรเจนเพทาเลตที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาทำให้เย็นใน desicator ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน (ให้อยู่ในช่วงประมาณ 2 กรัม) ละลายด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร คำนวณความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโปตัสเซียมไฮโดรเจนเพทาเลต แล้วนำไปไตเตรตกับสารละลายโซเดียม-

ไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 M ที่เตรียมไว้แล้ว โดยใช้ฟีนอฟทาลีน (phenolpthalein) เป็นอินดิเคเตอร์ จุดสิ้นสุด (end point) สังเกตได้จากสารละลายผสมจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู นำปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่แท้จริงจากสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$ (N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายโปตัสเซียมไฮโดรเจนเพทาเลต; V_1 = ปริมาตรของสารละลายโปตัสเซียมไฮโดรเจนเพทาเลต; N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมได้; V_2 = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้) เก็บสารละลายของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ได้ไว้ในขวดที่มีฝาปิดแน่น

5. สารละลายกรดซัลฟุริค (H_2SO_4) เข้มข้น 0.1 M

ใช้ลูกยางดูดกรดซัลฟุริค (H_2SO_4) เข้มข้น (น้ำหนักโมเลกุล 98.07, ความหนาแน่น 1.84) จำนวน 5.32 มิลลิลิตร นำมาผสมกับน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำสารละลายกรดซัลฟุริคที่เตรียมได้ไป standardize กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (ในข้อ 4) โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ คำนวณหาค่าความเข้มข้นที่แน่นอนจากสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$ ทำนองเดียวกันกับการหาความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ เก็บสารละลายกรดซัลฟุริคที่ได้ไว้ในขวดที่มีฝาปิดแน่น

6. สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

ชั่งโซเดียมคลอไรด์มา 20 กรัม เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 100 มิลลิลิตร กวนให้ละลายหมด นำสารละลายที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บสารละลายดังกล่าวไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. สารละลายกรดอะซีติคเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

ใช้ลูกยางดูดกรดอะซีติคเข้มข้นมา 2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บสารละลายดังกล่าวไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. สารละลายแอมโมเนียมออกซาเลทคริสตอลไวโอเลต (Hucker's ammonium oxalate crystal violet stain)

<u>สารละลาย ก.</u>

คริสตอลไวโอเลต (crystal violet)	3	กรัม
เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 95 เปอร์เซ็นต์	20	มิลลิลิตร

สารละลาย ข.

แอมโมเนียมออกซาเลต (ammonium oxalate)	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย ก และสารละลาย ข เข้าด้วยกัน กรองก่อนนำไปใช้

9. สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine solution)

ไอโอดีน (iodine)	1	กรัม
โปตัสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide)	2	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

บดไอโอดีนและโปตัสเซียมไอโอไดด์ ให้ผสมกันในโกร่งจนเป็นผงละเอียด แล้วใช้น้ำกลั่นประมาณ 200 มิลลิลิตร ล้างเอาส่วนผสมทั้งหมดใส่ในกระบอกตวง เติมน้ำกลั่นจนครบ 300 มิลลิลิตร เก็บสารละลายนี้ใส่ขวดสีชาและเก็บในที่มืด

10. สารละลายอะซีโตนแอลกอฮอล์ (acetone alcohol solution)

เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 95 เปอร์เซ็นต์	400	มิลลิลิตร
อะซีโตน (acetone)	300	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดปิดฝาให้แน่น

11. Ziehl-Neelsen's carbolfuchsin stain

เบสิคฟุคซิน (basic fuchsin)	0.3	กรัม
เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 95 เปอร์เซ็นต์	10.0	มิลลิลิตร
ผลึกฟีนอล (phenol crystals)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	95.0	มิลลิลิตร

ละลายเบสิคฟุคซินด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ และละลายผลึกฟีนอลด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงนำสารละลายทั้งสองมาผสมกัน กรองก่อนนำไปใช้

12. สารละลายมาลาไคท์กรีน (malachite green) 5 เปอร์เซ็นต์

มาลาไคท์กรีน (malachite green)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	95.0	มิลลิลิตร

ละลายมาลาไคท์กรีนในน้ำกลั่นจนหมด ตั้งทิ้งไว้ 2-3 วัน กรองก่อนนำไปใช้

13. สารละลายซาฟรานีน (safranin staining solution)

ซาฟรานีน (safranin)	0.25	กรัม

เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 95 เปอร์เซ็นต์ 10.0 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น 100.00 มิลลิลิตร

ละลายซาฟรานีนด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปเขย่าให้ผสมกัน กรองก่อนนำไปใช้

14. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide solution) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์

สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร

15. สารละลาย tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1.0 กรัม
น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ละลาย tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ด้วยน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปให้ปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

16. สารละลายที่ทดสอบไนไตรท์ (nitrite test solution)

<u>สารละลาย ก.</u>

กรดซัลฟานิลิค (sulfanilic acid) 0.8 กรัม
กรดอะซีติค (acetic acid) เข้มข้น 5 N. 100.0 มิลลิลิตร

<u>สารละลาย ข.</u>

แอลฟาแนฟทิลลามีน (alpha naphthylamine) 0.5 กรัม
กรดอะซีติค (acetic acid) เข้มข้น 5 N. 100.0 มิลลิลิตร

17. สารละลายโคแวค (Kovacs solution)

พาราไดเมธิลอะมิโนเบนซีลดีไฮด์ (para-dimethyl aminobenzaldehyde) 5.0 กรัม
เอมิลหรือบิวธิลแอลกอฮอล์ (amyl or butyl alcohol) 75.0 มิลลิลิตร
กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น (conc.HCl) 25.0 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ใส่ในขวดสีน้ำตาล เก็บไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

18. สารละลายเมธิลเรด (methyl red solution)

เมธิลเรด (methyl red)	1.0 กรัม
เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol)95 เปอร์เซ็นต์	300.0 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	200.0 มิลลิลิตร

ละลายเมธิลเรดในเอธิลแอลกอฮอล์ จนหมดแล้วจึงเติมน้ำกลั่น บรรจุในขวดสีน้ำตาล

19. สารละลายทดสอบ Voges-Proskauer (Voges-Proskauer test reagent)

<u>สารละลาย ก.</u>

แอลฟาแนฟทอล (alpha-naphthol)	5.0 มิลลิลิตร
เอธิลแอลกอฮอล์ (ehtyl alcohol) 95 เปอร์เซ็นต์	100.0 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

<u>สารละลาย ข.</u>

โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)	40.0 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

20. สารละลายอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต (saturated ammonium sulfate solution)

ละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ในน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำไปอุ่นเล็กน้อย ละลายต่อจนถึงจุดอิ่มตัว เก็บสารละลายไว้ในขวดปิดสนิท

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

1. การทำ dilution plating method

ดูดตัวอย่างน้ำปลามา 1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางลงครั้งละ 10 เท่าโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวทำให้เจือจาง จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นใช้วิธี pour plate technique ทำการทดลองซ้ำ 2 ซ้ำในแต่ละ dilution เพื่อหาจำนวนแบคทีเรียโดยการดูดตัวอย่างน้ำปลาที่ทำให้เจือจางแล้วใส่ลงในจานแก้วเพาะเชื้อ (petri dish) ที่ปราศจากเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด (ในข้อ 1.1) ที่กำลังหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เทผสมลงไปจานละ 15-20 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ เพื่อให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอทั่วทั้งจาน ทิ้งให้อาหารแข็งตัว

2. การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ตามหลักการของ Kjeldhahl.

ย่อยน้ำปลาผสมน้ำ (1:9) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรใน Kjeldahl flask ด้วยกรดซัลฟุริคเข้มข้น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยใส่ Selenium จำนวน 1 กรัม เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกริยา (catalyst) ต้มย่อยจนกระทั่งได้น้ำยาใสและย่อยต่อไปอีก 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นถ่ายน้ำยาใสที่ได้ลงในขวดกลั่นให้หมด โดยใช้น้ำกลั่นช่วยล้างจนได้ปริมาตรประมาณ 200 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร แล้วกลั่นแอมโมเนียที่เกิดขึ้นลงในกรดบอริค 4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งมี mixed indicator (methyl red กับ bromcresal green) (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) อยู่ด้วย 4 หยด กลั่นจนกระทั่งปริมาตรของสารในขวดกลั่นเหลือประมาณ 1 ใน 3 ของปริมาตรเดิมไตรเตรตน้ำยาแอมโมเนียที่กลั่นได้ด้วย กรดซัลฟุริค 0.1 โมลาร์ (M) ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) การคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดได้จากสูตร

$$X = YM \times 28$$

เมื่อ X คือ จำนวนกรัมของไนโตรเจนทั้งหมดที่มีในตัวอย่างน้ำปลา 1 ลิตร

Y คือ จำนวนมิลลิลิตรของกรดซัลฟุริค 0.1 M. ที่ใช้ในการไตเตรต

M คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟุริคเป็นโมลต่อลิตร

3. การวิเคราะห์หาปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน (formaldehyde nitrogen)

เตรียมฟอร์มัลดีไฮด์ให้มี pH 9.0 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M ลงไปในน้ำปลาผสมน้ำ (1:9) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จนได้ pH 7.0 แล้วผสมฟอร์มัลดีไฮด์ pH 9.0 ที่เตรียมไว้แล้วลงไปปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปไตเตรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) จนกระทั่งได้ pH 9.0 โดยใช้ pH meter,Suntex Model SP-5A ในการปรับ pH คำนวณหาปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจนจากสูตร

$$X = YM \times 14$$

เมื่อ X คือจำนวนกรัมของฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจนในน้ำปลา 1 ลิตร

Y คือจำนวนมิลลิลิตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M ซึ่งใช้ในการไตเตรต

M คือความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นโมลต่อลิตร

4. การวิเคราะห์หาแอมโมเนียคัลไนโตรเจน (ammoniacal nitrogen)

เติมแมกนีเซียมออกไซด์ 3 กรัมและน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรลงในน้ำปลาผสมน้ำ (1:9) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วกลั่นแอมโมเนียลงในกรดบอริค 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งมี mixed indicator (methyl red และ bromcresal green) อยู่แล้วประมาณ 4 หยด กลั่นจนปริมาตรของสารละลายในขวดกลั่นเหลืออยู่ประมาณ 1 ใน 4 ของปริมาตรเดิม ไตเตรตน้ำยาแอมโมเนียที่กลั่นได้ด้วยกรดซัลฟุริค 0.1 M ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน คำนวณหาปริมาณแอมโมเนียคัลไนโตรเจนจากสูตร

$$X = YM \times 5.6$$

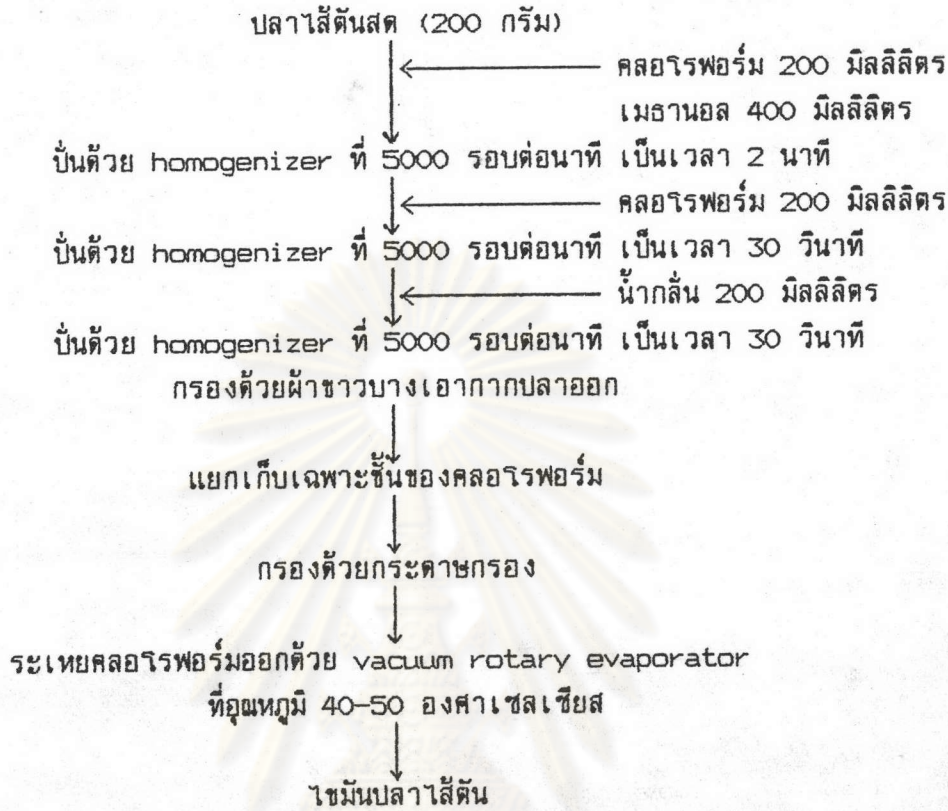
เมื่อ X คือจำนวนกรัมของแอมโมเนียคัลไนโตรเจนในน้ำปลา 1 ลิตร

Y คือจำนวนมิลลิลิตรของกรดซัลฟุริค 0.1 M ที่ใช้ในการไตเตรต

M คือความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟุริคเป็นโมลต่อลิตร

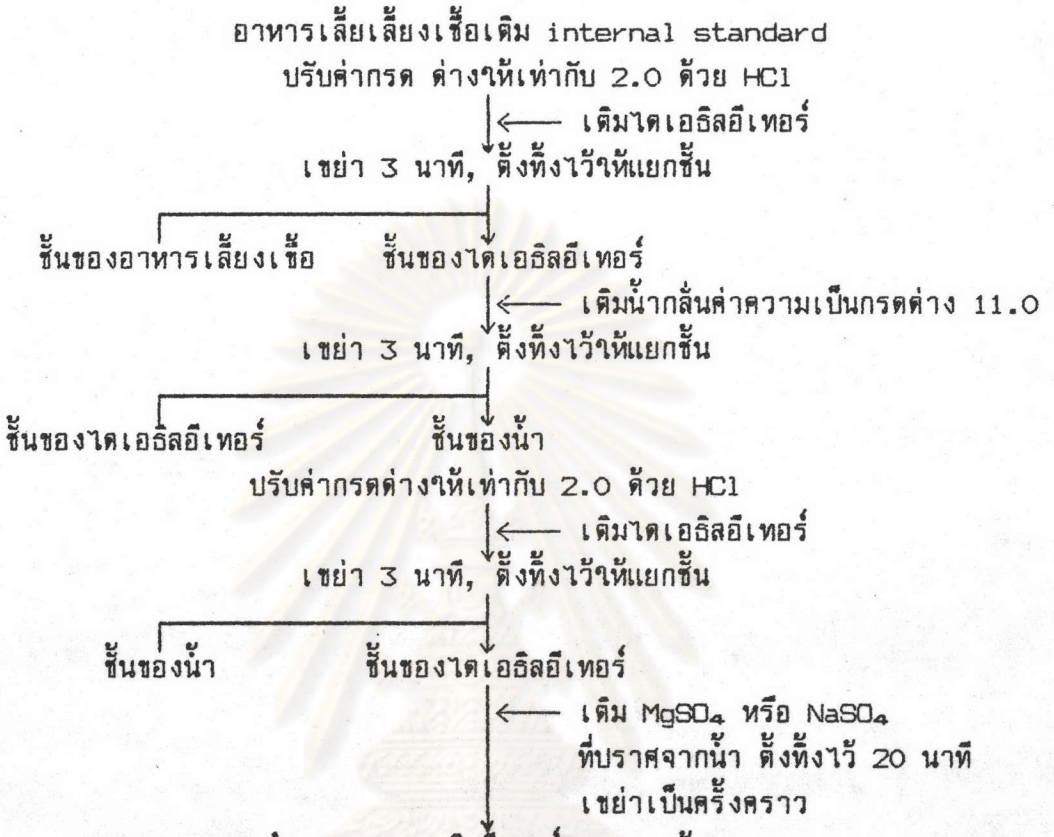
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. แผนผังแสดงขั้นตอนการแยกไขมันจากปลาไส้ตันตามวิธีของ Bligh และ Dyer (76)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. แผนผังแสดงขั้นตอนการสกัดกรดไขมันที่ระเหยได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมไขมันจากปลาไส้ตันตามวิธีของ McIver และคณะ (54)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นายพงษ์เทพ วิไลพันธ์ เกิดเมื่อวันที่ 26 มิถุนายน พ.ศ. 2506 ที่กรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 2) สาขาชีววิทยาจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตบางแสนในปีการศึกษา 2527 ที่อยู่ปัจจุบัน 11/136 หมู่ 5 ต.สวนใหญ่ อ.พิบูลสงคราม อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย