

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1.1 Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml

pH 7.0

1.2 Nutrient Broth (NB)

Beef extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
Distilled water	1,000	ml

pH 7.0

2. อาหารเลี้ยงเชื้อรา

2.1 Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato (Infusion form)	200.0	g
Dextrose	20.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml

pH 5.0

2.2 Potato Dextrose Broth (PDB)

Potato (Infusion form)	200.0	g
Dextrose	20.0	g
Distilled water	1,000	ml

pH 5.0

ภาคผนวก ข

อาหารที่ใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

1. Motility Test Medium		
Tryptone	10.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Agar	5.0	g
Distilled water	1,000	ml
2. Nitrate Broth (Difco)		
Bacto-Beef extract	3.0	g
Bacto-Peptone	5.0	g
Potassium nitrate	1.0	g
Distilled water	1,000	ml
3. Nutrient Gelatin Medium		
Beef extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
Gelatin	120.0	g
Distilled water	1,000	ml
4. Tryptone Broth		
Tryptone	10.0	g
Distilled water	1,000	ml
5. Starch Agar		
Beef extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
Potato starch	10.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml
6. Simmon's Citrate Agar		
MnSO ₄	0.2	g
(NH ₄)H ₂ PO ₄	1.0	g
K ₂ HPO ₄	1.0	g
NaCl	5.0	g
Sodium citrate	2.0	g
Bromthymol blue	0.08	g
Bacto-Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml
7. Litmus Milk (Difco)		
Bacto-Skimmed milk	100.0	g
Bacto-Litmus	0.75	g
Distilled water	1,000	ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที ทำให้เย็นทันที

8. Christensen's Urea Medium : Basal medium ประกอบด้วย

Peptone	1.0	g
Glucose	1.0	g
K ₂ HPO ₄	2.0	g
NaCl	5.0	g
Bacto-Agar	20.0	g
Distilled water	1,000	ml

ต้มส่วนผสมทั้งหมดจนละลาย ปรับ pH ให้เป็น 6.8 เติม phenol red (0.04%) ปริมาตร 20 ml นำไป autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งเย็นลงประมาณ 50°C เติมสารละลาย urea (20%) ที่ปลอดเชื้อด้วยการกรองแล้วในปริมาณ 10 ml เขย่าให้เข้ากัน ใช้ปิเปตปลอดเชื้อ อาหารบรรจุลงในหลอดทดสอบ นำไปวางเอียงบนสันหนังสือเพื่อทำ agar slant

9. Phenol Red Broth Base

Bacto beef extract	1.0	g
Bacto proteose peptone No. 3	10.0	g
NaCl	5.0	g
Bacto phenol red	18	mg
Sugar (under test)	10	g
Distilled water	1,000	ml

pH 6.8-7.0

การเตรียมน้ำตาลแต่ละชนิดสำหรับการทดสอบ ควรใส่หลอดดักแก๊ส (Durham tube) บรรจุอาหารในปริมาณ 6 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave ที่ 10 ปอนด์ เป็นเวลา 10 นาที เมื่อเสร็จสิ้นการฆ่าเชื้อให้ยกออกแช่น้ำเย็นทันที เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำตาลแต่ละชนิดสลายตัว

ภาคผนวก ค
สีย้อมและน้ำยาเคมี

1. Crystal violet (1% aqueous solution)		
Crystal violet	1.0	g
Distilled water	1,000	ml
2. Safranin		
Safranin O	0.5	g
Ethanol 95%	10.0	ml
Distilled water	1,000	ml
3. Malachite green		
Malachite green	5.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Agar	5.0	g
Distilled water	1,000	ml
4. Gram's Iodine		
Iodine	1.0	g
Potassium iodide	2.0	g
ผสมสารทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน ใช้โกรองบดสารให้เข้ากัน เติมน้ำครั้งละน้อยๆ จนกระทั่งสารทั้งสองละลายหมด เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 300 ml กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 3 บรรจุในขวดสีชา		
5. Kovac's solution		
Para-Dimethyl-Amino Benzaldehyde	5.0	g
Amyl or butyl alcohol	75	ml
HCl, concentrated	25.0	ml
ละลาย Para-Dimethyl-Amino Benzaldehyde ลงใน amyl or butyl alcohol ที่อุณหภูมิ 50°C ใน waterbath นานประมาณ 5 นาที เมื่อสารละลายเริ่มเย็นลง ให้ค่อยๆ ริน HCl ผสมลงไป เขย่าให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C		
6. Hydrogen Peroxide (3%)		
H ₂ O ₂	3.0	ml
H ₂ O	97.0	ml
7. Nitrate Test Solution (Solution A)		
Sulphanilic acid	8.0	g
5 N Acetic acid	100	ml
ละลาย sulphanilic acid ใน 5N acetic acid โดยใช้ความร้อน (waterbath)		
Nitrate Test Solution (Solution B)		
α-Naphthylamine	5.0	g
5 N Acetic acid	100	ml

ภาคผนวก ง

การศึกษาลักษณะและคุณสมบัติทางชีวเคมีในการจำแนกแบคทีเรียระดับสกุล

1. การย้อมสีแกรม

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษามา streak ลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ทำ smear เชื้อลงบนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งสไลด์ให้แห้ง ทำ heat fix ทำการย้อมสี Gram ด้วยการหยดสี crystal violet ทับริย smear ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีย้อมออกด้วยน้ำประปา หยดสาร Gram iodine บนรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปา ล้างสีย้อมออกด้วย 95% ethanol ด้วยการหยด ethanol ลงบนรอย smear ที่ละหยด จนกว่าจะไม่เห็นสีย้อมหลุดตามมา ล้างด้วยน้ำประปา หยดสี safranin บนรอย smear ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำประปา ซับให้แห้งด้วยกระดาษ tissue paper นำไปดูลักษณะการติดสี Gram ภาพได้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

2. การย้อมสี endospores

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษามา streak ลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 36-48 ชั่วโมง ทำ smear เชื้อลงบนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งสไลด์ให้แห้ง ทำ heat fix ทำการย้อมสี endospores ด้วยการหยดสี malachite green ลงบนรอย smear นำสไลด์ไปวางบนไอน้ำเดือดนาน 5 นาที โดยต้องเติมสี malachite green ลงบนรอย smear อย่างสีให้แห้งล้างสีย้อมออกด้วยน้ำประปา หยดสาร Gram iodine บนรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปา ล้างสีย้อมออกด้วย 95% ethanol ด้วยการหยด ethanol ลงบนรอย smear ที่ละหยด จนกว่าจะไม่เห็นสีย้อมหลุดตามมา ล้างด้วยน้ำประปา หยดสี safranin บนรอย smear ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำประปา ซับให้แห้งด้วยกระดาษ tissue paper นำไปดูลักษณะการติดสี Gram ภาพได้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

3. การทดสอบ Catalase Test

หยดสาร 3% H₂O₂ และน้ำกลั่นลงบนสไลด์สะอาดจุดละหยดโดยแยกจากกัน ไขลูบแตะเชื้อแบคทีเรีย ทำ smear ลงในหยด H₂O₂ และลงในหยดน้ำ สังเกตผลทดสอบ ผลบวกมีฟองแก๊สเกิดขึ้นในหยด H₂O₂ ผลลบไม่เกิดฟองแก๊ส

4. การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility Test)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย stab ลงในอาหาร motility test medium บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หยดสาร 3% H₂O₂ และน้ำกลั่นลงบนสไลด์สะอาดจุดละหยดโดยแยกจากกัน ไขลูบแตะเชื้อแบคทีเรีย ทำ smear ลงในหยด H₂O₂ และลงในหยดน้ำ สังเกตผลทดสอบ ผลบวกมีฟองแก๊สเกิดขึ้นในหยด H₂O₂ ผลลบไม่เกิดฟองแก๊ส

5. การทดสอบ Indole Test

ใช้ลูบเขี่ยเชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวลงในอาหาร tryptone broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หยด Kovac's reagent ปริมาณ 3-4 หยด เขย่าหลอดเบาๆ สังเกตผลการทดสอบ ผลบวกจะเห็นวงแหวนสีแดงที่ผิวชั้นบนของอาหาร tryptone broth ผลลบจะไม่มีสีที่วงแหวน

6. การทดสอบ Starch Hydrolysis Test

ใช้ลูบ streak เชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหาร Starch Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รดผิวหน้าด้วย iodine solution สังเกตผลการทดสอบ ผลบวกจะเห็นวงใสรอบๆ โคโลนี ส่วนที่เหลือของอาหารจะเป็นสีน้ำเงิน ผลลบจะเห็นผิวหน้าอาหารทั้งหมดเป็นสีน้ำเงิน

7. การทดสอบ Nitrate Reduction Test

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหาร Nitrate Broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยดสารละลาย Salifanilic acid และ α -naphthylamine สังเกตผลการทดสอบ ผลบวกเป็นตะกอนอาหารสีแดง หรือในกรณีไม่มีสี เมื่อเติมผงสังกะสีลงไปก็ยังไม่เกิดสีแดง ผลลบเมื่อเติมผงสังกะสีลงไปจะเกิดสีแดง

8. การทดสอบ Gelatin Liquefaction Test

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยว แทงลงในบนอาหาร Nutrient Gelatin บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำหลอดไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที สังเกตผลการทดสอบ ผลบวก อาหาร nutrient gelatin จะเหลว ผลลบอาหาร nutrient gelatin จะไม่เหลว

9. การทดสอบ Urease Test

ใช้ลูป streak เชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหาร urea agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตผลการทดสอบ ผลบวกอาหารเปลี่ยนเป็นสีบายนีล ผลลบอาหารไม่เปลี่ยนสี

10. การทดสอบ Citrate Utilization Test

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหาร Simmon's Citrate agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตผลการทดสอบ ผลบวกอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ผลลบอาหารไม่เปลี่ยนสี

11. การทดสอบการเจริญใน Litmus Milk

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหาร Litmus milk บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตผลการทดสอบ ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีขาว แสดงว่าเกิดการ reduction ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพู แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างกรด ถ้าอาหารเกิดการตกตะกอน และจับเป็นก้อนโปรตีน เนื่องจากเป็นกรด แสดงว่าเกิด acid curd และถ้าเชื้อสลายโปรตีนได้ อาหารจะใสปนสีม่วงอ่อน แสดงว่าเกิดการกระบวนกร peptonization

12. การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการสร้างกรดจาก น้ำตาลบางชนิด

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหาร PRBB (Phenol Red Broth Base) ที่มีน้ำตาล glucose, lactose, xylose, manitol และ arabinose บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตผลการทดสอบ ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียใช้น้ำตาลได้กรดเกิดขึ้น (A) ถ้าพบว่ามีแก๊สในหลอดดักแก๊สด้วย แสดงว่าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้กรดและแก๊ส (AG) ถ้าอาหารไม่เปลี่ยนสี หรือเป็นสีชมพู แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดนั้นได้

ภาคผนวก จ

การคำนวณ

1. การคำนวณ % Similarity

$$\% \text{ Similarity} = a/a+b \times 100$$

a = จำนวนผลการทดสอบที่ให้ผลการทดสอบเหมือนกัน

b = จำนวนผลการทดสอบที่ให้ผลการทดสอบต่างกัน

ตัวอย่าง : การคำนวณของเชื้อแบคทีเรีย isolate S32
ผลการทดสอบ

เชื้อแบคทีเรีย	คุณสมบัติทางชีวเคมี											% Similarity*
	Motility	Starch	Nitrate	Gelatin	Citrate	Catalase	Lactose	Glucose	Xylose	Manitol	Arabinose	
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	-	A	A	A	A	91
Isolate S32	+	+	+	+	+	+	-	-	A	A	A	

หมายเหตุ : + = positive; - = negative; A = acid; A/G = acid and gas

การคำนวณ % Similarity

$$a = 10$$

$$b = 1$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Similarity} &= a/a+b \times 100 \\ &= 10/(10+1) \times 100 \\ &= 91\% \end{aligned}$$

% similarity มีค่า = 91% หมายความว่า เชื้อแบคทีเรีย isolate S32 เทียบเคียง
ได้กับเชื้อ *Bacillus subtilis*

การแปลผล :

% similarity = 65-85% ถือได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่อยู่ใน Genus เดียวกัน

% similarity = 86-100% ถือได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่อยู่ใน Genus และ
species เดียวกัน