



ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยพระเชตุвр

## สารเคมีและวิธีการเตรียม

### 1. สีย้อมแกรม

#### 1.1 Ammonium oxalate crystal violet

ละลาย crystal violet 2 กรัม ใน 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร  
เติม 1 เปอร์เซ็นต์ ammonium oxalate ปริมาตร 80 มิลลิลิตร

#### 1.2 Gram's iodine

ละลาย potassium iodide 2 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นเติม  
crystal iodine 1 กรัม เก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันการถูกออกซิไดซ์โดยแสง

#### 1.3 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol

#### 1.4 Safranin solution

ละลาย safranin 2.5 กรัม ใน 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

### 2. สีย้อมสปอร์

#### 2.1 Malachite green solution

ละลาย Malachite green 5 กรัม ในน้ำกลั่น 95 มิลลิลิตร

#### 2.2 Safranin solution

เตรียมตามวิธีการในข้อ 1.4

### 3. สารละลายไอโอดีน

ละลาย potassium iodide 2 กรัม ใน 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 300 มิลลิลิตร  
เติม crystal iodine 1 กรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันการถูกออกซิไดซ์  
โดยแสง

## 4. 3เปอร์เซ็นต์ hydrogen peroxide solution

ละลาย hydrogen peroxide 3 กรัม ในน้ำกลั่น 97 มิลลิลิตร บรรจุในขวดสีชาและเก็บไว้ในตู้เย็น สารละลายนี้ต้องเตรียมเสร็จใหม่ๆ ไม่ควรเก็บสารละลาย 3เปอร์เซ็นต์ hydrogen peroxide ใช้นานเกินไป

## 5. Tetra-methyl-para-phenylene diamine hydrochloride solution

ละลาย Tetra-methyl-para-phenylene diamine hydrochloride 10 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดสีชาและเก็บในตู้เย็น สารละลายนี้ต้องเตรียมเสร็จใหม่ๆ ไม่ควรเก็บสารละลาย ใช้นานเกินไป

## 6. Voges-Proskauer test reagent

## 6.1 5เปอร์เซ็นต์ alpha naphthol

ละลาย alpha naphthol 5 กรัม ลงใน 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol 100 มิลลิลิตรจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเก็บใสขวดสีชา

## 6.2 40เปอร์เซ็นต์ potassium hydroxide solution

ละลาย potassium hydroxide (KOH) 40 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

## 7. Nitrate test solution

## 7.1 Solution A

ละลาย sulphanilic acid 0.8 กรัม ลงใน 5 N acetic acid 100 มิลลิลิตรโดยให้ความร้อนเพื่อช่วยให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

## 7.2 Solution B

ละลาย alpha-naphthylamine 0.5 กรัม ลงใน 5 N acetic acid 100 มิลลิลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน

### บัฟเฟอร์ (buffer) และสารละลาย (solution)

#### 8. Ethidium bromide solution

เตรียม ethidium bromide solution ให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml โดยละลาย ethidium bromide 100 mg ลงในน้ำกลั่น 100 ml แล้วเก็บให้พ้นแสง

#### 9. TE buffer

ประกอบด้วยความเข้มข้นสุดท้ายของ 10 mM Tris HCl (pH 8.0) และ 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA (pH 8.0) ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ 15 นาที

#### 10. 10x Tris Acetate EDTA (TAE) Buffer

ละลาย Tris-base 48.4 กรัม Glacial acetic acid 11.5 มิลลิกรัม 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 มิลลิกรัมผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิตรทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ 15 นาที

### อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

#### 11. Nutrient broth (NB)

ผสม peptone 5.0 กรัม beef extract 3 กรัม น้ำกลั่น 1000 มิลลิตร ปรับให้มี pH 7 โดยการเตรียมเป็น nutrient agar (NA) ให้เติมวุ้นลงไป 15เปอร์เซ็นต์ ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ 15 นาที

#### 12. Diluted nutrient broth (DNB)

ผสม peptone 0.005 กรัม beef extract 0.003 กรัม กับน้ำกลั่น 1000 มิลลิตร ปรับให้มี pH 7 โดยการเตรียมเป็นอาหารแข็งในเติมวุ้น 15 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ 15 นาที

#### 13. Starch agar

ผสม yeast extract 5 กรัม tryptone 10 กรัม soluble starch 10 กรัม agar 15 กรัม กับน้ำกลั่น 1000 มิลลิตร ปรับให้มี pH 7 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ 15 นาที

#### 14. Carbohydrate fermentation medium

ผสม tryptone 10 กรัม yeast extract 10 กรัม K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 กรัม Carbohydrate source 10 กรัม bromthymol blue 0.08 กรัม กับน้ำกลั่น 1000 มิลลิตร ปรับให้มีความเป็นกรดเบสในช่วง pH 6.8-7.0 บรรจุใส่หลอดทดสอบที่ใส่หลอดดักแก๊สไว้ภายในหลอดด้วย แล้วทำให้

ปราศจากเชื้อด้วยหนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

#### 15. MR-VP medium

ผสม peptone 7 กรัม dipotassium phosphate 5 กรัม dextrose 5 กรัม กับน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับให้ pH 7 บรรจุใส่หลอดทดสอบ แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ 15 นาที

#### 16. Nitrate medium

ผสม peptone 5.0 กรัม beef extract 3 กรัม potassium nitrate 1 กรัม น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับให้มีความเป็นกรดเบสในช่วง pH 6.8-7.0 บรรจุใส่หลอดทดสอบที่ใส่หลอดดักแก๊สไว้ภายในหลอดด้วย แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ 15 นาที

#### 17. Gelatin Medium

ผสม gelatin 100 กรัม glucose 5 กรัม bacto yeast nitrogen base 6.7 กรัม กับน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับให้ pH 7 แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ 15 นาที

#### 18. Simmon's citrate agar

ผสม  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 กรัม  $(NH_4)_2HPO_4$  1 กรัม  $K_2HPO_4$  1 กรัม sodium citrate 2 กรัม NaCl 5 กรัม agar 15 กรัม bromthymol blue 0.08 กรัม กับน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับให้มีความเป็นกรดเบสในช่วง pH 6.8-7.0 บรรจุใส่หลอดทดสอบ แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ 15 นาที

#### 19. Oxidative-Fermentative medium (O-F medium)

ผสม peptone 2 กรัม NaCl 5 กรัม  $K_2HPO_4$  0.3 กรัม agar 3 กรัม 0.2เปอร์เซ็นต์ bromthymol blue 15 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายที่ 1000 ml ปรับให้ pH 7 ต้มอาหารทดสอบเพื่อละลาย agar จากนั้นบรรจุใส่หลอดทดสอบ แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ 15 นาที

#### 20. Urea agar

ผสม urea 20 กรัม NaCl 5 กรัม  $KH_2PO_4$  2 กรัม peptone 1 กรัม glucose 1 กรัม phenol red 0.012 กรัม agar 15 กรัม กับน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร เตรียมแยกโดยผสมสารต่างๆ ยกเว้น agar กับน้ำ 100 ml แล้วให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่าน filter (0.22  $\mu m$ ) แล้วละลาย agar กับน้ำกลั่น 900 ml ตากหากแล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยหนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ

121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ 15 นาที แล้วผสมทั้ง 2 ส่วนเข้าด้วยกันจากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองปราศจากเชื้อ

#### 21. TSB medium

ผสม pancreatic digest of casein 17 กรัม NaCl 5 กรัม pancreatic digest of soybean meal 3 กรัม  $K_2HPO_4$  2.5 กรัม glucose 2.5 กรัม กับน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยหนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ 15 นาที แล้วผสมทั้ง 2 ส่วนเข้าด้วยกันจากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองปราศจากเชื้อ

#### 22. NB+15เปอร์เซ็นต์ glycerol

ผสม peptone 0.5 กรัม beef extract 0.3 กรัม น้ำกลั่น 95 มิลลิลิตร แล้วเติม glycerol 15 มิลลิลิตร ให้ละลายเข้ากันดี ปรับให้มี pH 7 ดูดอาหาร 1.5 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ cryo tube ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ 15 นาที

#### วิธีการทดสอบและอ่านผล

#### 23. การย้อมสีแกรม

เลี้ยงกล้าเชื้อบน 24 ชั่วโมง ใช้ห่วงเปียเชื้อ (loop) เชื้อเชื้อมา smear บนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งให้แห้ง fix รอย smear โดยผ่านเปลวไฟไปมา จากนั้นย้อมด้วย crystal violet นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดแล้วหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมนาน 1 นาที เมื่อครบเวลาเทไอโอดีนทิ้ง แล้วล้างด้วย 95เปอร์เซ็นต์ ethanol ประมาณ 15-20 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำ ซับให้แห้งแล้วย้อมด้วย Safranin-O นาน 1 นาที ครบเวลาเททิ้งแล้วล้างให้สะอาดด้วยน้ำ ซับให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูลักษณะสัณฐานวิทยา ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

#### 24. การย้อมสี endospore

เลี้ยงกล้าเชื้อให้มีอายุประมาณ 48 ชั่วโมง เชื้อเชื้อมา smear บนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งให้แห้ง fix รอย smear โดยผ่านเปลวไฟไปมา จากนั้นย้อมด้วย malachite green วางสไลด์บนไอน้ำเดือดหรือผ่านเปลวไฟจนสังเกตเห็นว่าสีร้อนนาน 5-10 นาที ระวังอย่าให้สีแห้งโดยการเติมสีระหว่างให้ความร้อน เมื่อครบเวลา ทิ้งให้สไลด์เย็นแล้วล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วย้อมด้วย Safranin-O นาน 1 นาที ครบเวลาเททิ้งแล้วล้างให้สะอาดด้วยน้ำ ซับให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูลักษณะ endospore ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า โดยจะสังเกตเห็น endospore ติดสีเขียว ส่วน vegetative cell จะติดสีแดง

### 25. การทดสอบการย่อยแป้ง (starch degradation)

เตรียมกล้าเชื้อบนอาหาร NA อายุประมาณ 24 ชั่วโมง ใช้ loop เชี่ยกล้าเชื้อแล้วลากเป็นเส้นตรงบน starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการย่อยแป้งโดยหยดสารละลายไอโอดีนจนทั่วจานเพาะเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบรอยเชื้อ แสดงว่าให้ผลบวก ถ้าไม่เกิดบริเวณใสและไอโอดีนเปรียบเป็นสีม่วงเข้มแสดงว่าให้ผลลบ

### 26. การเลี้ยงเชื้อในสภาวะไม่มีออกซิเจน (anaerobic growth)

เตรียมกล้าเชื้อบนอาหาร NA อายุประมาณ 24 ชั่วโมง ใช้ loop เชี่ยกล้าเชื้อแล้วลากลงในอาหารทดสอบ 2 plate แยกป่ม โดย 1 plate ในสภาวะ aerobic ในตู้บ่ม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง อีก 1 plate บ่ม ในสภาวะ anaerobic โดยใช้ anaerobic jar บ่ม 24-48 ชั่วโมง แล้วสังเกตผลถ้ามีเชื้อขึ้นใน plate ที่บ่ม aerobic แต่ไม่ขึ้นใน plate ที่บ่ม anaerobic jar แสดงว่าเชื้อไม่มีความสามารถในการเจริญในสภาวะ anaerobic ผลเป็นลบ ถ้าเจริญได้ก็ให้ผลเป็นบวก

### 27. การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate fermentation test)

เตรียมกล้าเชื้อบนอาหาร NA อายุประมาณ 24 ชั่วโมง ใช้ loop เชี่ยกล้าเชื้อแล้วจุ่มลงในอาหารทดสอบ บ่ม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง ถ้าเชื้อใช้น้ำตาลแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เติมลงไปได้ จะสร้างกรดแล้วเปลี่ยนสี indicator บรวมโมลอบลูในอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลืองผลเป็นบวก และถ้าเกิดช่องว่างของอากาศในหลอดดักแก๊ส ผลการสร้างแก๊สเป็นบวก

### 28. การทดสอบแคทาเลส (catalase test)

เตรียมกล้าเชื้อบนอาหาร NA อายุประมาณ 24 ชั่วโมง ใช้ loop เชี่ยกล้าเชื้อแล้วป้ายบนแผ่นสไลด์สะอาด แล้วหยด 3เปอร์เซ็นต์  $H_2O_2$  จนท่วมก้อนเชื้อ สังเกตผลในทันที เกิดฟองแก๊สให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดให้ผลลบ

### 29. การทดสอบออกซิเดส (oxidase activity)

เตรียมกล้าเชื้อบนอาหาร NA อายุประมาณ 24 ชั่วโมง ใช้ loop เชี่ยกล้าเชื้อแล้วป้ายบนแผ่นกระดาษกรองสะอาด ที่หยด 1 เปอร์เซ็นต์ tetra-methyl-para-phenylene diamine hydrochloride solution พอหมาดๆ สังเกตผลภายใน 10 วินาที ถ้าเกิดมีสีม่วงเข้มเกิดขึ้นแสดงว่าผลเป็นบวก

### 30. การทดสอบ VP (Voges-Proskauer test)

เตรียมกล้าเชื้อบนอาหาร NA อายุประมาณ 24 ชั่วโมง ใช้ loop เขี่ยกล้าเชื้อแล้วจุ่มลงในอาหารทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยหยดสารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ alpha naphthol สังเกตการเปลี่ยนแปลงผลบวกจะเกิดวงเวียงสีแดงด้านบน ผลลบคือไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

### 31. การทดสอบรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction test)

ขั้นตอนการทดสอบคือเลี้ยงเชื้อให้เจริญในอาหาร NB ที่มี  $\text{KNO}_3$  0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีหลอดดักแก๊ส (durham tube) บรรจุอยู่ด้วย เมื่อมีการสลายตัวของ  $\text{NO}_3^-$  จะสามารถทดสอบ  $\text{NO}_2^-$  ที่เกิดขึ้นโดยหยด sulfanilic acid ก่อนแล้วตามด้วย  $\alpha$ -naphthylamine การรวมตัวระหว่าง sulfanilic acid และ  $\text{NO}_2^-$  จะได้ diazonium salt (diazotized sulfanilic acid) จะรวมตัวกับ  $\alpha$ -naphthylamine (หรือใช้ N,N dimethyl-1-naphthylamine แทนได้) เกิดสีแดงของ water-soluble azo dye ถือว่าผลทดสอบเป็นบวก เพราะว่ามี  $\text{NO}_2^-$  ถ้าไม่เกิดสีแดงแสดงว่า  $\text{NO}_3^-$  อาจจะถูกรีดิวซ์ไปเป็น  $\text{NH}_3$  หรือเป็น  $\text{N}_2$  โดยกระบวนการ denitrification หรือ  $\text{NO}_3^-$  ไม่ถูกรีดิวซ์ ต้องทดสอบต่อด้วยเติมผงสังกะสี ซึ่งจะรีดิวซ์  $\text{NO}_3^-$  ไปเป็น  $\text{NO}_2^-$  ทำให้เกิดสีแดง นั่นแสดงว่ามี  $\text{NO}_3^-$  อยู่ในอาหารทดสอบคือเชื้อไม่ได้รีดิวซ์  $\text{NO}_3^-$  นั้นเอง การเกิดสีแดงเมื่อเติมผงสังกะสีจึงให้ผลเป็นลบ แต่ถ้าเติมผลสังกะสีแล้วไม่เกิดสีแดงแสดงว่าเชื้อมีการรีดิวซ์  $\text{NO}_3^-$  ไปเป็นสารอื่นแล้วจึงให้ผลเป็นบวก และถ้าสังเกตว่าเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊สแสดงว่าผลเป็นบวกเช่นกัน แต่ต้องเป็นพวกที่เป็น nonfermentor เท่านั้น ถ้าเป็นพวก fermentor ในหลอดดักแก๊สอาจเป็น  $\text{H}_2$  หรือ  $\text{CO}_2$  จะให้ผลบวกผิดพลาด จึงต้องทำการทดลองต่อโดยเติมผงสังกะสีแล้วบ่มต่อไปอีกประมาณ 48 ชม. แล้วจึงอ่านผลเหมือนกับขั้นตอนการเติมผงสังกะสีดังกล่าวมาแล้ว

### 32. การทดสอบยูเรียเอส (urea degradation)

เตรียมกล้าเชื้อบนอาหาร NA อายุประมาณ 24 ชั่วโมง ใช้ loop เขี่ยกล้าเชื้อแล้ว stab ลงในอาหารทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง สังเกตการณ์เปลี่ยนสีของอาหารทดสอบ ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นบานเย็น แสดงว่าเป็นผลบวก อาหารไม่เปลี่ยนสีเป็นผลลบ

### 33. การย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction)

เตรียมกล้าเชื้อบนอาหาร NA อายุประมาณ 24 ชั่วโมง ใช้ loop เขี่ยกล้าเชื้อแล้ว stab ลงในอาหารทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยนำอาหารทดสอบไปแช่ตู้เย็น เชื้อที่ทำให้ผลบวกจะทำให้อาหารทดสอบมีลักษณะเหลว

#### 34. การทดสอบการใช้ซิเตรท (citrate utilization)

เตรียมกล้าเชื้อบนอาหาร NA อายุประมาณ 24 ชั่วโมง ใช้ loop เชี่ยกล้าเชื้อแล้วลากบนผิวอาหารทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง ถ้าอาหารทดสอบเปลี่ยนจากเขียวเป็นน้ำเงินแสดงว่าเป็นผลบวก อาหารไม่เปลี่ยนสี (เขียว) เป็นผลลบ

