



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารทดสอบชีวเคมีและวิธีการเตรียม

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. Nitrogen Free Agar (NFA) (Döbereiner *et. al.*, 1972)

Dipotassium hydrogen phosphate	0.1	g
Potassium dihydrogen phosphate	0.4	g
Calcium chloride	0.02	g
Magnesium sulphate	0.2	g
Sodium chloride	0.1	g
Ferric chloride	0.01	g
Sodium molybdate dehydrate	0.002	g
Glucose	10.0	g
Agar	18.0	g
Distilled water	1000	ml
pH 6.8		

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน โดยนำไปต้มจนข้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

2. Nitrogen Free broth (NFB)

Dipotassium hydrogen phosphate	0.1	g
Potassium dihydrogen phosphate	0.4	g
Calcium chloride, CaCl_2	0.02	g
Magnesium sulphate, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	g
Sodium chloride, NaCl	0.1	g
Ferric chloride, FeCl_3	0.01	g
Sodium molybdate dihydrate, Na_2MoO_4	0.002	g
Glucose	10.0	g

Distilled water 1000 ml

pH 6.8

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

3. Nitrogen Free semi-solid

Dipotassium hydrogen phosphate	0.1	g
Potassium dihydrogen phosphate	0.4	g
Calcium chloride	0.02	g
Magnesium sulphate	0.2	g
Sodium chloride	0.1	g
Ferric chloride	0.01	g
Sodium molybdate dehydrate	0.002	g
Glucose	10.0	g
Agar	2.0	g
Distilled water	1000	ml
pH 6.8		

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน โดยนำไปต้มจนวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดทดลองนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

4. Nutrient agar (NA)

Beef extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
Agar	18.0	g
Distilled water	1000	ml

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน โดยนำไปต้มจนวุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

5. Nutrient broth (NB)

Beef extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
Distilled water	1000	ml

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

อาหารทดสอบชีวเคมีและวิธีการเตรียม

1. Methyl red – Voges – Proskauer medium (MR - VP)

Peptone	7.0	g
Dextrose	5.0	g
Dipotassium phosphate	5.0	g
Distilled water	1000	ml

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน ถ่ายใส่หลอดๆ ละ 5 ml นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

2. Tryptone broth

Tryptone	10.0	g
Distilled water	1000	ml

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน ถ่ายใส่หลอดๆ ละ 10 ml นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

3. Motility test medium

Beef extract	3.0	g
Peptone	10.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Agar	2.0	g
Distilled water	1000	ml
pH 7.3		

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน โดยนำไปต้มจนข้นละลาย แบ่งใส่หลอดทดลอง นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

4. Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200.0	g
Dextrose	20.0	g
Agar	18.0	g
Distilled water	1000	ml

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน โดยนำไปต้มจนข้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

5. Oxidative fermentative basal medium (OF basal medium)

Tryptone	2.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Dipotassium phosphate	5.0	g
Bromthymol blue	2.0	g
Distilled water	1000	ml
pH 6.8		

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน โดยนำไปต้มจนข้นละลาย แบ่ง basal medium ตามจำนวนชนิดน้ำตาล เติมน้ำตาลชนิดต่างๆ ตามสัดส่วน แบ่งใส่หลอดทดลอง 3 ml นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 10 นาที

6. Starch agar medium

Peptone	5.0	g
Beef extract	3.0	g
Sodium chloride	3.0	g
Soluble starch	20.0	g
Agar	18.0	g
Distilled water	1000	ml
pH 7.2		

ละลายวุ้นในน้ำกลั่นปริมาตร 300 ml ต้มจนละลายจากนั้นละลาย beef extract และ peptone ในน้ำกลั่น 200 ml นำส่วนผสมทั้งสองรวมกัน ปรับปริมาตรเป็น 1000 ml ละลาย soluble starch ลงในส่วนผสมทั้งหมด นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

7. Glucose Yeast extract Calcium carbonate (GYC)

D-glucose	50.0	g
Yeast extract	10.0	g
Calcium carbonate	30.0	g
Agar	25.0	g
Distilled water	1000	ml

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน โดยนำไปต้มจนวุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

8. Simmon's citrate agar

Manganese sulfate	0.2	g
Ammonium dihydrogen phosphate	1.0	g
Dipotassium phosphate	1.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Sodium citrate	2.0	g
Bromthymol blue	0.08	g
Agar	18.0	g
Distilled water	1000	ml
pH 6.9		

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน โดยนำไปต้มจนวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดทดลอง นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

9. Urea broth

Yeast extract	0.1	g
Monopotassium phosphate	0.091	g
Disodium phosphate	0.095	g
Urea	20.0	g
Phenol red	0.01	g
Distilled water	1000	ml
ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 0.5 ml ไม่ต้องฆ่าเชื้อ		

10. Triple sugar iron agar (TSI)

Peptone	20.0	g
Beef extract	3.0	g
Yeast extract	3.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Lactose	10.0	g
Sucrose	10.0	g
Glucose	1.0	g
Ferrous ammonium sulfate	0.2	g
Sodium thiosulfate	0.2	g
Phenol red	0.025	g
Agar	13.0	g
Distilled water	1000	ml

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน โดยนำไปต้มจนน้ำตาลละลาย แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 10 ml
 หนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที วาง
 ให้เย็นแข็งตัวในลักษณะ agar deep หรือ agar tall ในกรณีที่ต้องการทดสอบการสร้าง H₂S จาก
 ferrous sulfate อย่างเดียว ถ้าต้องการทดสอบความสามารถในการเฟอร์เมนต์น้ำตาลทั้ง 3 ชนิด ต้อง
 ทำเป็นอาหารเอียงให้ผิวหน้าอาหารมีความชันน้อย

ภาคผนวก ข

การดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ

การย้อมสีแกรม

Crystal violet stain

Crystal violet (Gentian violet)	0.5	g
Distilled water	100	ml

Gram iodine solution

Iodine	1.0	g
Potassium iodide	2.0	g
Distilled water	300	ml

Decolourizer

95% Ethanol	250	ml
Acetone	250	ml

Safranin O stain

Safranin O	2.5	g
95% Ethanol	100	ml

เจือจาง 5 – 10 เท่าก่อนนำไปใช้

วิธีการย้อมสีแกรม

เกลี่ยเชื้อในหยดน้ำที่อยู่บนแผ่นสไลด์ ปล่อยให้แห้ง ตีด้วยความร้อนโดยผ่านเปลวไฟ หยด crystal violet บริเวณที่มีเชื้อเป็นเวลา 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ หยดทับบริเวณที่มีเชื้อด้วย Gram iodine solution เป็นเวลา 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ เท decolourizer ผ่านอย่างรวดเร็ว ล้างออกด้วยน้ำ หยด safranin O บริเวณที่มีเชื้อเป็นเวลา 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำ

สารเคมี (reagent) ที่ใช้ทดสอบ

1. 3% Hydrogen peroxide solution

H ₂ O ₂	3.0	g
Distilled water	100	ml

2. Kovac's solution

<i>p</i> – dimethyl – amino benzaldehyde	5.0	g
Amyl or butyl alcohol	75	ml
HCl	25	ml

ผสม *p* – dimethyl – amino benzaldehyde กับ alcohol ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 – 60°C เป็นเวลา 5 นาที ขณะปล่อยให้เย็นริน HCl ลงไป เขย่าให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาใส่ไว้ในตู้เย็น

3. Lugol's iodine

Iodine	5.0	g
Potassium iodide	10.0	g
Distilled water	100	ml

ละลาย potassium iodide ในน้ำกลั่นจนหมด ค่อยๆ เติมผลึกไอโอดีนลงไปละลายจนหมด เติมน้ำให้สารละลายเจือจาง 5 เท่า

4. Methyl red solution

Methyl red	0.8	g
95% Ethanol	300	ml
Distilled water	100	ml

ละลาย methyl red ใน 95% ethanol จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่น

5. Tetra – methyl – *p* – phenylene hydrochloride solution

Tetra – methyl – <i>p</i> – phenylene hydrochloride solution	10.0	g
Distilled water	100	ml

ละลาย Tetra – methyl – *p* – phenylene hydrochloride solution ในน้ำกลั่น นำสารละลายใส่ขวดสีชา เก็บในตู้เย็น ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินไม่สามารถใช้ในการทดสอบได้

6. Voges – Proskauer test solution

Solution A:

Alpha naphthol	10.0	g
95% Ethanol	100	ml

ละลาย Alpha naphthol ใน 95% Ethanol เก็บในขวดสีชา

Solution B:

KOH	20.0	g
Distilled water	100	ml

ละลาย KOH ในน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา

7. 3% Potassium hydroxide (KOH)

Potassium hydroxide	3.0	g
Distilled water	100	ml

ละลาย KOH ในน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

1. การทดสอบแคตาเลส (Catalase test)

เลี้ยงเชื้อบน nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยด 3% H₂O₂ ลงบนแผ่นสไลด์ ใช้หวงถ่ายเชื้อ เชื้อเชื้อลงไปผสมกับสารละลายให้เข้ากัน

การอ่านผล

ผลบวก เกิดฟองก๊าซ

ผลลบ ไม่มีฟองก๊าซ

2. การทดสอบออกซิเดส (Oxidase test)

เลี้ยงเชื้อบน nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ไม้จิ้มฟันเช็ดโคโลนีของเชื้อมาลากบนกระดาษกรองที่อ้อมตัวด้วย 0.5% tetramethyl – *p* – phenyldiamine HCl

การอ่านผล

ผลบวก เกิดสีม่วงเข้มภายใน 10 วินาที

ผลลบ ไม่เกิดสี

3. การทดสอบ MR (Methyl red test)

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MR-VP ปริมาตร 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หยด methyl red solution 5 – 6 หยด ลงในอาหาร

การอ่านผล

ผลบวก เกิดสีแดงสด

ผลลบ เกิดสีเหลืองหรือสีส้ม

4. การทดสอบ VP (Voges – Proskauer test)

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MR-VP ปริมาตร 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อประมาณ 1 ml ใส่ในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ เติม 5% α – naphthol solution ปริมาตร 0.6 ml และ 40% KOH ปริมาตร 0.2 ml เขย่าให้เข้ากัน

การอ่านผล

ผลบวก เกิดสีแดงภายใน 5 นาที

ผลลบ เกิดสีเหลือง

5. การทดสอบอินโดล (Indole production test)

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว tryptone บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน Kovac's reagent ปริมาตร 0.5 ml ลงไป

การอ่านผล

ผลบวก เกิดสีแดงที่ผิวชั้นบน

ผลลบ ไม่เกิดสี

6. 3% Potassium hydroxide test

หยด 3% KOH ลงบนแผ่นสไลด์ ใช้หัวหยดเชื้อเขี่ยโคโลนีโดยเทคนิคปลอดเชื้อ นำมาผสมกับ KOH เป็นเวลา 1 นาที ค่อย ๆ เขกหัวหยดเชื้อขึ้นลง

การอ่านผล

แกรมลบ มีลักษณะเป็นสายเหนียวติดหัวหยดเชื้อขึ้นมา

แกรมบวก ไม่มีลักษณะดังกล่าว

7. การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test)

เพาะเชื้อใน motility test medium โดย แทงตรงๆ เพียงครั้งเดียวประมาณ 2/3 ของส่วนสูงอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผล ถ้าให้ผลลบบ่มต่อไปอีก 1 – 2 สัปดาห์ สังเกตผลการเปลี่ยนแปลงเป็นระยะ

การอ่านผล

ผลบวก มีการเจริญของเชื้อออกมาจนรอยที่แทง หรือไม่มีการเจริญที่ชัดเจนจากรอยที่แทงแต่อาหารขุ่นกว่าเดิมทั้งหมด

ผลลบ มีการเจริญของเชื้ออย่างชัดเจนบริเวณรอยแทง โดยเห็นขอบเขตของเชื้อที่เจริญอย่างชัดเจน

8. การทดสอบการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis test)

เพาะเชื้อบนอาหาร starch medium บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทสารละลายไอโอดีนลงบนอาหาร

การอ่านผล

ผลบวก อาหารเป็นสีน้ำเงิน แต่บริเวณรอบที่เชื้อเจริญไม่มีสี

ผลลบ อาหารเป็นสีน้ำเงินทั้งหมด

9. การทดสอบการย่อยคาร์โบไฮเดรต

เพาะเชื้อใน OF medium ที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ โดย แทะตรงๆ เพียงครั้งเดียวประมาณ 2/3 ของส่วนสูงอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การอ่านผล

ผลบวก อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง

ผลลบ อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นมีน้ำเงินหรือไม่เปลี่ยนสี

10. การทดสอบยูรีเอส (Urease test)

เพาะเชื้อลงในอาหาร urea broth โดยใส่เชื้อปริมาณมากๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C ตรวจสอบผลทุก 15, 30, 60 นาที กระทั่ง 4 ชั่วโมง

การอ่านผล

ผลบวก อาหารเปลี่ยนเป็นสีบานเย็นหรือสีชมพู

ผลลบ อาหารไม่เปลี่ยนสี

11. การทดสอบการใช้ซิเตรท (Citrate utilization test)

เพาะเชื้อลงบน Simmon's citrate agar โดยการใช้เข็มเขี่ยทำเป็นจุด บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การอ่านผล

ผลบวก มีการเจริญของเชื้อและอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

ผลลบ ไม่มีการเจริญของเชื้อและสีอาหารไม่เปลี่ยนแปลง

12. Triple Sugar Iron (TSI) test

เพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงลักษณะซิกแซกและแท่ง loop ลงถึงก้น บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 - 24 ชั่วโมง

การอ่านผล (ปฏิกิริยาบนผิวหน้าอาหารเอียง/ปฏิกิริยาส่วนก้นหลอด, slant/butt)

K/A = มีการเฟออร์เมนต์ glucose เพียงอย่างเดียว

K/K, K/N, N/N = ไม่เฟออร์เมนต์ทั้ง glucose, lactose และ sucrose

A/A = เฟออร์เมนต์ glucose, lactose และ/หรือ sucrose (เฟออร์เมนต์น้ำตาลอย่างน้อย 2 ชนิด)

A/A G, H₂S = เฟออร์เมนต์ glucose, lactose และ/หรือ sucrose ให้ก๊าซและ H₂S

A/A G = เฟออร์เมนต์ glucose, lactose และ/หรือ sucrose ให้ก๊าซ

ภาคผนวก ก

ผลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ

ตาราง 8 ผลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ

การทดสอบ	ไอโซเลท								
	AT3	AT3	AT3	AT3	AT3	AT3	AT3	AT3	AT3
	L1	L2	L3	L4	S1	S2	S3	R1	R2
Gram' s stain	-	-	-	+	-	-	-	-	+
3% KOH	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Size (µm)	0.5x1.5	0.5x1	0.5x2	1.5x5	0.5-1	0.5-1	0.5x1	0.5x1	1.5x5
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	-	-	-	-	+	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Motility test	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Starch	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Mannitol	-	+	-	-	+	-	+	-	-
Rhamnose	+	+	+/-	+/-	+	+	+	-	+/-
Arabinose	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Glucose	+	+	-	-	+	+	+	-	-
NFA	Cl	Y	Cl	W	Cl	Cl	W	Cl	Cl
NA	Y	Y	Y	Cr-br	Y	Y	Y	W	Y
PDA	Y	Y	Y	W	Y	Y	Y	W	Y
GYC	Y	Y	Y	Cr	Y	Y	Y	Y	Y
ARA	0.52	0.54	0.37	0.51	0.43	0.55	0.58	0.71	0.63

ตาราง 8 (ต่อ)

การทดสอบ	ไอโซเลต								
	AT3	AT3	AT3	AT3	C2H	C2H	C2H	C2H	C2H
	R3	R4	R5	R6	L1	L2	L3	S1	S2
Gram' s stain	-	-	-	+	-	-	-	-	-
3% KOH	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Size (µm)	0.5x2	0.5x1	0.5x1.5	1.5x5	0.5x1.5	0.5x1.5	0.5x1	0.5x1	0.5x1.5
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility test	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	+	+	-	+	+	-	-	-
Rhamnose	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	-	+	+	+	+	+	+	+	+
NFA	W	W	W	W	W	Cl	Cl	Cl	W
NA	P	Y	W	Cr-br	W	Y	Y	Y	W
PDA	P	Y	W	Cr	W	Y	Y	Y	Y
GYC	P	Y	W	Cr	Y	Cr	Y	Y	Y
ARA	0.39	0.50	0.48	0.53	1.50	838.26	0.51	0.52	0.37

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 8 (ต่อ)

การทดสอบ	ไอโซเลต								
	C2H	C2H	C2H	C2H	C2H	C7H	C7H	C7H	C7H
	S3	R1	R2	R3	R4	L1	L2	L3	L4
Gram' s stain	+	+	-	-	-	-	+	-	-
3% KOH	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Shape	Cocci	Cocci	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Size (µm)	0.5x0.5	0.5x0.5	0.5x1	0.5x1	0.5x1	0.5x1	1.5x5	0.5x1	0.5x1
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	-	-	+	+	-	+	+	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	-	-	-	-	-	+	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Motility test	-	-	+	+	+	+	-	+	+
Starch	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	+	+	-	-	-	+	-
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	-	-	+	+	+	+	+	+	+
NFA	W	W	Cl	Cl	Cl	Cl	W	Cl	Cl
NA	Y	Y	Y	Y	Y	W	Cr-br	W	Y
PDA	Y	Y	W	W	Y	W	Cr	W	Y
GYC	Y	Y	W	W	Y	W	Cr	W	Y
ARA	0.59	0.65	0.68	0.79	0.69	1.78	0.45	0.86	1.61

ตาราง 8 (ต่อ)

การทดสอบ	ไอโซเลต								
	C7H	C7H	C7H	C7H	C7H	C7H	C7H	C7H	C32M
	L5	S1	S2	S3	S4	R1	R2	R3	L1
Gram' s stain	-	-	+	+	+	-	-	-	-
3% KOH	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Size (µm)	0.5-1	0.5x2	0.5x5	0.5x1	0.5x1	0.5x1.5	0.5x1	0.5x1	0.5x1.5
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Motility test	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Glucose	+	-	-	-	+	+	+	+	+
NFA	Cl	P	Cl	W	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl
NA	Y	P	Y	W	Cr	Y	W	W	Y
PDA	Y	P	Y	Cr	W	Y	W	W	Y
GYC	Y	P	W	Y	Or	Y	W	W	Y
ARA	0.58	0.34	0.49	0.55	0.77	0.84	1.91	0.63	2.14

ตาราง 8 (ต่อ)

การทดสอบ	ไอโซเลต								
	C32M	C32M	C32M	C32M	C32M	C32M	C32M	C32M	C34M
	L2	L3	S1	S2	S3	R1	R2	R3	L1
Gram' s stain	-	+	-	-	-	-	-	-	-
3% KOH	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Size (µm)	0.5x1	1.5x5	0.5x1	0.5x1	0.5x1.5	0.5x1	0.5x1	0.5x1	0.5x1
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	-	-	-	-	-	-	-	-	+
VP	-	-	+	-	+	+	-	-	+
Motility test	+	-	-	-	+	-	+	-	-
Starch	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	-	-	-	+	+	+	-	+
Rhamnose	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Arabinose	+	-	+	-	+	+	+	-	+
Glucose	+	-	+	+	+	+	+	+	+
NFA	W	W	Cl	Cl	W	Cl	W	Cl	Cl
NA	Y	Cr-br	Y	Y	W	Y	Y	Y	Y
PDA	Y	W	Y	Y	W	Y	Y	Y	Y
GYC	Y	Cr	Y	Y	W	Y	Y	Y	Y
ARA	1.09	0.62	0.57	1.22	0.55	0.50	0.78	0.93	0.74

ตาราง 8 (ต่อ)

การทดสอบ	ไอโซเลต								
	C34M	C34M	C34M	C34M	C34M	C34M	C34M	C34M	C34M
	L2	L3	L4	S1	S2	S3	R1	R2	R3
Gram' s stain	-	-	+	-	-	-	-	-	+
3% KOH	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Size (µm)	0.5x1	0.5x1	1.5x5	0.5x1	0.5x1	0.5x1	0.5x1	0.5x1	1.5x5
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	+	-	+	-	-	-	+	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	-	-	-	+	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Motility test	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Starch	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Mannitol	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	+	+	-	-	+	+	+	+	-
Arabinose	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Glucose	+	+	-	+	+	+	+	+	-
NFA	W	Cl	W	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	W
NA	Y	Y	Cr-br	Y	Y	Y	Y	Y	Cr-br
PDA	Y	Y	W	Y	Y	Y	Y	Y	W
GYC	Y	Y	Cr	Y	Y	Y	Y	Y	Cr
ARA	0.53	0.55	0.90	1.28	0.54	1.53	1.05	1.42	0.54

ตาราง 8 (ต่อ)

การทดสอบ	ไอโซเลต								
	C13L	C13L	C13L	C13L	C13L	C13L	C13L	C13L	C15L
	L1	L2	L3	S1	S2	S3	R1	R2	L1
Gram' s stain	+	-	-	-	-	+	+	+	+
3% KOH	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Size (µm)	1x5	0.5x1	0.5x1	0.5x1	0.5x1	0.5x1	1x5	0.5x1	1x5
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	-	-	-	-	+	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Motility test	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Starch	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Mannitol	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Glucose	-	+	+	+	+	-	-	-	-
NFA	W	W	Y	W	Cl	W	W	W	W
NA	W	Y	Y	Y	W	W	W	W	W
PDA	W	Y	Y	Y	W	W	W	W	W
GYC	W	Y	Y	Y	W	W	W	W	W
ARA	0.55	0.63	0.60	0.59	0.62	0.47	0.55	0.51	0.53

ตาราง 8 (ต่อ)

การทดสอบ	ไอโซเลท								
	C15L	C15L	C15L	C15L	C15L	W1	W1	W1	W1
	L2	S1	S2	R1	R2	L1	L2	L3	L4
Gram' s stain	-	+	-	-	-	+	-	-	-
3% KOH	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Size (µm)	0.5x1	1x5	0.5x1	0.5x1	0.5x1	1.5x5	0.5-1	0.5x1.5	1x2
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	+	-	-	+	-	-	-	-	+
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	-	-	+	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Motility test	+	-	+	+	-	-	+	+	+
Starch	-	+	-	-	-	+	-	-	+
Mannitol	+	-	-	+	+	-	-	+	-
Rhamnose	+	+	+	+	+	+/-	+	-	+
Arabinose	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Glucose	+	-	+	+	+	-	+	+	-
NFA	W	W	Cl	W	Y	W	Cl	W	W
NA	Y	W	W	Y	Y	Cr-br	Y	W	W
PDA	Y	W	W	Y	Y	W	Y	W	Cr
GYC	Y	W	W	Y	Y	Cr	Y	Y	W
ARA	0.59	0.50	0.62	0.57	0.66	0.48	0.51	0.75	0.58

ตาราง 8 (ต่อ)

การทดสอบ	ไอโซเลต								
	W1	W1	W1	W1	W1	W1	W1	W2	W2
	S1	S2	S3	S4	R1	R2	R3	L1	L2
Gram' s stain	-	+	-	-	-	-	-	-	+
3% KOH	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Size (µm)	0.5x2	1.5x5	0.5x1	0.5x2	0.5-1	0.5x1	0.5x1	0.5x1	0.5-1
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	-	-	-	-	-	+	+	-	-
VP	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Motility test	+	-	+	+	+	+	-	-	+
Starch	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Mannitol	-	-	+	-	-	-	-	+	+
Rhamnose	-	+/-	+	+/-	+	+	-	+	+
Arabinose	+	-	+	-	+	+	-	+	+
Glucose	+	-	+	-	+	+	-	+	-
NFA	Y	W	Cl	Cl	Cl	Cl	W	Y	Y
NA	Y	Cr-br	W	Y	Y	W	W	Y	Y
PDA	Y	W	W	Y	Y	W	W	Y	Cr
GYC	Y	Cr	W	Y	Y	W	W	Y	Or
ARA	0.47	0.48	0.78	0.38	0.53	0.62	0.98	0.66	0.46

ตาราง 8 (ต่อ)

การทดสอบ	ไอโซเลท							
	W2	W2	W2	W2	W2	W2	W2	W2
	L3	S1	S2	S3	S4	R1	R2	R3
Gram' s stain	-	-	+	-	-	-	+	-
3% KOH	-	-	+	-	-	-	+	-
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Size (µm)	0.5x2	0.5x1	1x5	0.5x1	0.5x2	0.5x1	1.5x5	0.5-1
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	-	-	-	-	+	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	-	+	-	-	-	-	-	-
VP	-	+	-	-	-	+	-	-
Motility test	+	-	-	-	+	+	-	+
Starch	-	-	+	-	-	-	+	-
Mannitol	-	-	-	+	-	+	-	-
Rhamnose	-	-	+	+	-	+	+/-	+
Arabinose	+	+	-	+	+	+	-	+
Glucose	+	+	-	+	+	+	-	+
NFA	Y	Cl	W	Y	W	Cl	W	Cl
NA	Y	Y	W	Y	W	W	Cr-br	Y
PDA	Y	Y	W	Y	W	Cr	W	Y
GYC	Y	Y	W	Y	Br	W	Cr	Y
ARA	0.44	0.92	0.54	0.63	0.41	0.52	0.50	0.50

หมายเหตุ

Gram's stain (การติดสีแกรม)

+ แกรมบวก

- แกรมลบ

3% KOH (3% Potassium hydroxide test)

+ แกรมบวก

- แกรมลบ

Shape (รูปร่าง)

Rod ลักษณะเป็นแท่ง

Cocci ลักษณะกลม

Size (μm)

ขนาดของเซลล์แบคทีเรีย หน่วยเป็น μm

Catalase test

+ เกิดฟองก๊าซ

- ไม่มีฟองก๊าซ

Oxidase test

+ เกิดสีม่วงเข้มภายใน 10 วินาที

- ไม่เกิดสี

Indole (Indole production test)

+ เกิดสีแดงที่ผิวชั้นบน

- ไม่เกิดสี

MR (Methyl red test)

+ เกิดสีแดงสด

- เกิดสีเหลืองหรือสีส้ม

VP (Voges – Proskauer test)

+ เกิดสีแดงภายใน 5 นาที

- เกิดสีเหลือง

Motility test (การทดสอบการเคลื่อนที่)

+ มีการเคลื่อนที่

- ไม่มีการเคลื่อนที่

Starch (Starch hydrolysis test, การทดสอบการย่อยแป้ง)

- + อาหารเป็นสีน้ำตาล แต่บริเวณรอบที่เชื้อเจริญไม่มีสี
- อาหารเป็นสีน้ำตาลทั้งหมด

สีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NFA (Nitrogen free agar), NA (Nutrient agar), PDA (Potato dextrose agar) และ GYC (Glucose yeast extract medium)

Y (yellow) = สีเหลือง

Cr (cream) = สีครีม

Br (brown) = สีน้ำตาล

W (white) = สีขาว

P (pink) = สีชมพู

Cl (Clear) = สีใส

Or (orange) = สีส้ม

ARA (acetylene reduction assay)

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส หน่วย $\text{nmol C}_2\text{H}_4/\text{tube/day}$

ภาคผนวก ง

การเตรียมสารละลาย Standard McFarland และสารเคมีที่ใช้ศึกษาด้านอนุชีววิทยา

การเตรียมสารละลาย Standard McFarland (Dorothy, 1972)

ผสม 1% sulfuric acid (H_2SO_4) และ 1% barium chloride (BaCl_2) ตามอัตราส่วน

ตาราง 9 เปรียบเทียบความขุ่นของ McFarland เบอร์ต่างๆ กับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย

McFarland No.	1% BaCl_2 (ml)	1% H_2SO_4 (ml)	Aprox. cell density ($\times 10^8$)
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	9.0	30

ผสมสารละลาย 1% aqueous barium chloride (BaCl_2) และ 1% aqueous sulfuric acid (H_2SO_4) ในหลอดทดลองฝาเกลียว โดยใช้ปริมาตรดังตาราง ผสมให้เข้ากันและปิดฝาเกลียวให้สนิท สามารถเก็บได้นาน 6 เดือน การเปรียบเทียบความขุ่นให้ใช้กระดาศขาวที่ขีดเส้นตรงสีดำวางเป็นฉากด้านหลังและดูเส้นสีดำที่เห็นมีความชัดเจนเท่ากัน

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาด้านอนุชีววิทยา

(1) 50X TAE (Tris acetate EDTA) buffer

Tris-base	242	g
Glacial acetic acid	57.1	ml
0.5 M EDTA	100	ml
pH 8.0		

ละลาย Tris-base และ 0.5 M EDTA ในน้ำกลั่น จากนั้นเติม Glacial acetic acid (ทำในตู้ควั่น) คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

(2) 0.5 M Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)

EDTA	186.1	g
NaOH	20	g
pH 8.0		

ละลาย EDTA และ NaOH ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml คนให้ละลาย ปรับ pH 8.0 ซึ่ง EDTA จะละลายหมดพอดี ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

(3) Ethidium bromide (EtBr)

5mM EtBr	60	μl
TAE buffer	250	ml

ละลาย EtBr ใน 1X TAE buffer ผสมให้เข้ากัน เก็บให้พ้นแสงที่ 4°C

(4) TE (Tris-EDTA) buffer

Tri HCl	500	μl
0.5 M EDTA	100	μl
pH 8.0		

ละลาย Tri HCl และ 0.5 M EDTA ใน deionized water ปรับปริมาตรเป็น 50 ml นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

สารเคมีทดสอบปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry

1. Reagent A: 5% (w/v) Na_2CO_3

Na_2CO_3	5.0 g
Distilled water	100 ml

หึ่ง Na_2CO_3 5 g ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 ml

2. Reagent B

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
Na-K tartrate	1.0 g

หึ่ง Na-K tartrate 1 g ละลายในน้ำกลั่น เติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g ปรับปริมาตรเป็น 100 ml

3. Reagent C

Reagent A	50 ml
Reagent B	2 ml

ผสมให้เข้ากันแล้วใช้ทันที

4. Reagent D

Folin-ciocalteau reagent
น้ำกลั่น

เจือจาง Folin-ciocalteau reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

5. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

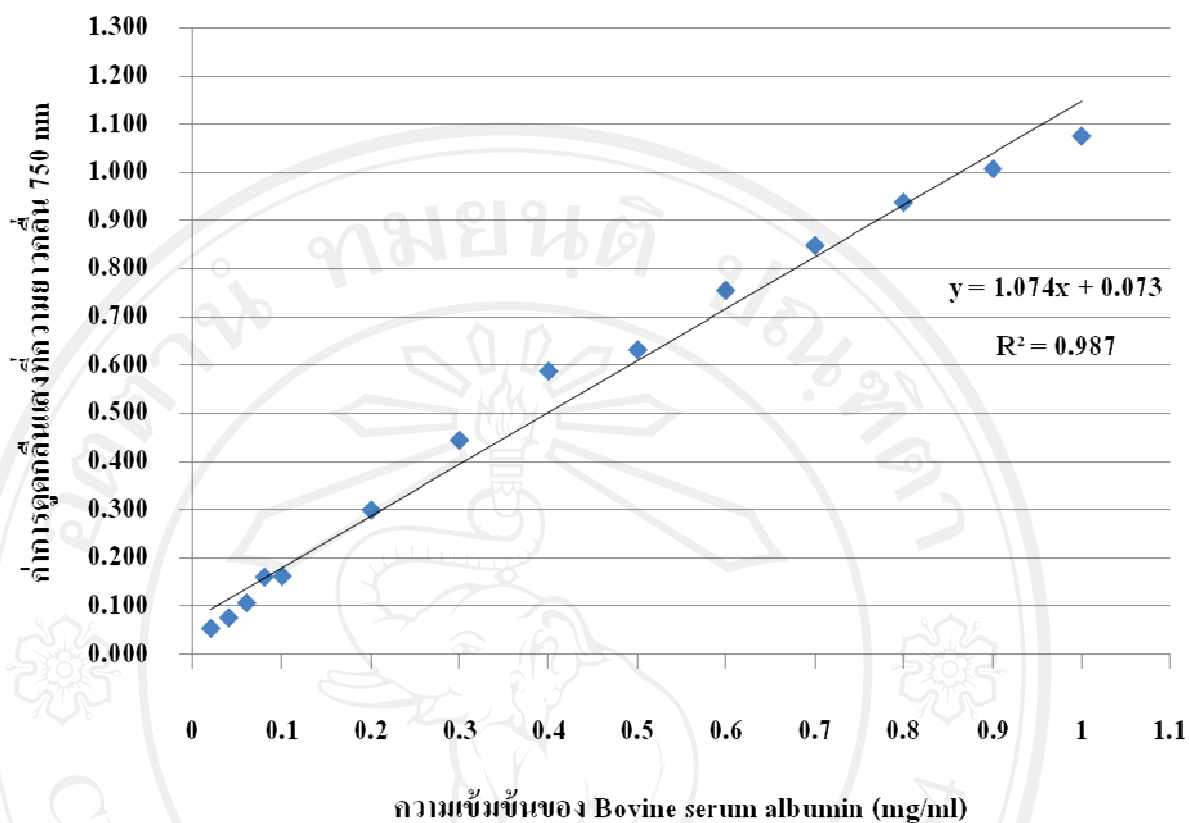
เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.000 – 0.800 mg/ml

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

1. นำเซลล์แบคทีเรียที่เจริญในอาหาร nitrogen free semi-solid ไปปั่นเหวี่ยง เก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น
2. ปรับปริมาตรให้เป็น 0.5 ml ด้วยน้ำกลั่น เติม 1 N NaOH ปริมาตร 0.5 ml ต้มที่ 100°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ตะกอนของเชื้อละลายหมด
3. เติมสารละลาย C ปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากันตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
4. เติมสารละลาย D ปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader spectrophotometer รุ่น Spectra MR (Dynex Technologies) ที่ความยาวคลื่น 750 nm และคำนวณปริมาณโปรตีน ในหน่วย mg/ml

ตาราง 10 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

ความเข้มข้นของ BSA (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm			
	1	2	3	เฉลี่ย
0.00	0.000	0.001	0.000	0.000
0.02	0.050	0.056	0.055	0.054
0.04	0.082	0.067	0.078	0.076
0.06	0.104	0.115	0.101	0.107
0.08	0.165	0.134	0.182	0.160
0.10	0.148	0.165	0.173	0.162
0.20	0.300	0.317	0.281	0.299
0.30	0.462	0.408	0.464	0.445
0.40	0.578	0.592	0.594	0.588
0.50	0.591	0.651	0.655	0.632
0.60	0.735	0.769	0.763	0.756
0.70	0.803	0.864	0.881	0.849
0.80	0.927	0.927	0.962	0.939
0.90	1.020	1.025	0.980	1.008
0.10	1.082	1.123	1.024	1.076



ภาพ 18 กราฟมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

ตาราง 11 ปริมาณโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ปริมาณ yeast extract (%)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm					เฉลี่ย	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
		1	2	3	4	5		
AT3R1	0	0.153	0.218	0.190	0.215	0.173	0.190	0.19
	0.005	0.213	0.212	0.243	0.217	0.221	0.221	0.34
	0.01	0.288	0.252	0.276	0.263	0.255	0.267	0.55
	0.05	0.365	0.489	0.379	0.425	0.360	0.403	1.18
C2HL2	0	0.300	0.310	0.316	0.307	0.281	0.303	0.72
	0.005	0.303	0.378	0.352	0.349	0.352	0.347	0.92
	0.01	0.362	0.313	0.421	0.352	0.377	0.365	1.01
	0.05	0.508	0.600	0.615	0.720	0.515	0.592	2.06

ตาราง 11 (ต่อ)

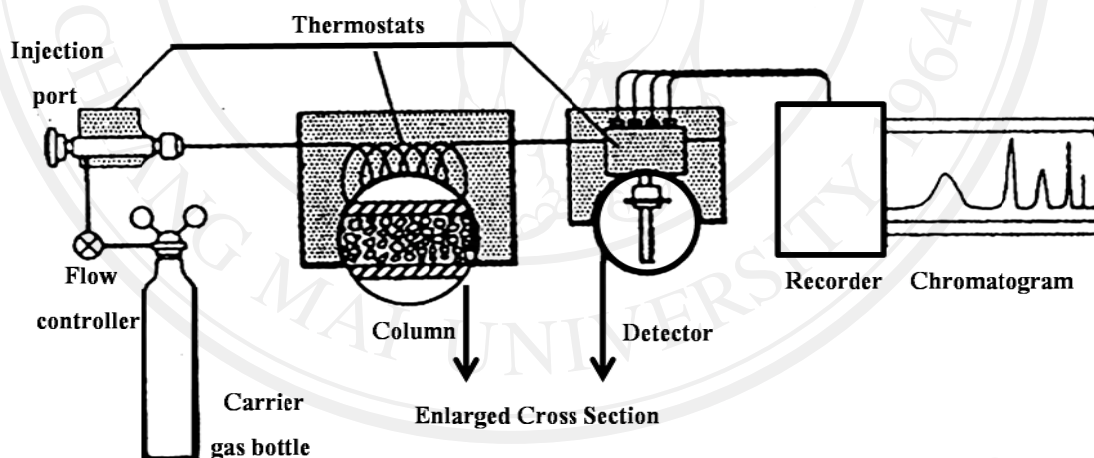
ไอโซเลท	ปริมาณ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm					เฉลี่ย	ปริมาณโปรตีน
	yeast extract							
	(%)	1	2	3	4	5		(mg/ml)
C7HL1	0	0.217	0.230	0.194	0.245	0.195	0.216	0.31
	0.005	0.179	0.249	0.187	0.203	0.239	0.241	0.29
	0.01	0.258	0.313	0.226	0.260	0.223	0.264	0.54
	0.05	0.270	0.269	0.379	0.327	0.448	0.339	0.88
C32ML2	0	0.172	0.189	0.182	0.177	0.179	0.180	0.14
	0.005	0.198	0.194	0.208	0.198	0.207	0.201	0.24
	0.01	0.273	0.269	0.267	0.258	0.262	0.266	0.54
	0.05	0.323	0.255	0.341	0.303	0.314	0.307	0.74
C34MR1	0	0.200	0.266	0.210	0.237	0.239	0.230	0.38
	0.005	0.179	0.202	0.233	0.225	0.253	0.218	0.32
	0.01	0.263	0.243	0.347	0.264	0.273	0.278	0.60
	0.05	0.387	0.376	0.371	0.413	0.433	0.396	1.15

ภาคผนวก จ

หลักการของ Gas chromatography และการคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ในโตรจีเนสของ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือก

หลักการของ Gas chromatography

Gas Chromatography (GC) เป็นเทคนิคสำหรับแยกสารตัวอย่างที่เป็นสารผสม โดยเปลี่ยนสารผสมให้เป็นไอที่อุณหภูมิหนึ่ง แล้วให้ไอของสารเหล่านั้นผ่านเข้าไปยัง column ที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ (stationary phase) โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือ carrier gas องค์ประกอบของสารผสมที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่และการกระจายตัวผ่านเฟสคงที่ต่างกันจะแยกออกจากกัน องค์ประกอบภายในเครื่อง GC แสดงในภาพ 18



ภาพ 19 องค์ประกอบภายในของเครื่อง Gas chromatograph

ในการวิเคราะห์ สารผสมตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าที่ sample injection port (ดังรูปที่ 10.1) สารผสมจะถูกให้ความร้อนจนกลายเป็นไอแล้วถูกพาเข้าไปใน column ด้วยเฟสเคลื่อนที่ องค์ประกอบของสารผสมจะแยกออกจากกันเมื่อเคลื่อนผ่าน column และถูกตรวจวัดโดย detector สัญญาณการตรวจวัดที่ได้จาก detector จะถูกบันทึกและแสดงออกมาในรูปของ chromatogram ซึ่งในการวิเคราะห์ด้วย Gas chromatography สามารถตรวจวัดได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยในเชิง

คุณภาพสามารถหาชนิดของสารได้จากการเปรียบเทียบกับค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานที่ศึกษา ส่วนในเชิงปริมาณสามารถคำนวณความเข้มข้นของสารได้จากการเปรียบเทียบพื้นที่หรือความสูงของ peak กับ peak ของสารละลายมาตรฐานที่ศึกษา

Retention time (RT) คือ เวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ในการเคลื่อนที่ผ่าน column นับจากเวลาเริ่มต้นของการวิเคราะห์ถึงตำแหน่งเวลาที่ detector อ่านค่าสัญญาณสูงสุด (peak) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารแต่ละชนิดในสภาวะการวิเคราะห์เดียวกันทั้งชนิดของ column และอุณหภูมิที่ใช้ ค่า retention time ของสารชนิดเดียวกันที่วิเคราะห์ได้ควรจะตรงกันหรือมีค่าใกล้เคียงกันมากที่สุด ดังนั้น การตรวจพิสูจน์ชนิดของสารองค์ประกอบใด ๆ ในของผสมตัวอย่างสามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบค่า retention time ระหว่างสารองค์ประกอบในของผสมตัวอย่าง (unknown) กับสารองค์ประกอบมาตรฐาน

สูตรการคำนวณกิจกรรมไอโซเมอร์ในโครมาโทกราฟีของแก๊ส

$$ARA = \frac{10^6 \times B \times V}{X \times 22.4 \times A} \quad \text{หน่วย nmol C}_2\text{H}_4/\text{tube/day}$$

เมื่อ A = พื้นที่ของกราฟที่เกิดจากก๊าซ ethylene มาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว
 B = พื้นที่ของกราฟที่เกิดจากก๊าซตัวอย่างที่ retention time เดียวกับก๊าซมาตรฐาน
 X = ปริมาตรของภาชนะที่ใช้เจือจางก๊าซ ethylene มาตรฐาน
 V = ปริมาตรของบรรยากาศที่ใส่ปัมป์ในภาชนะ

ตาราง 12 กิจกรรมของเอนไซม์ในโตรจีนัสที่ความเข้มข้นของ yeast extract ในระดับที่แตกต่างกันของแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือก

ไอโซเลท	ปริมาณ	พื้นที่ของกราฟที่เกิดจากก๊าซตัวอย่างที่ retention time						ARA
	yeast	เปรียบกับก๊าซมาตรฐาน						(nmol/mg protein/h)
	extract (%)	1	2	3	4	5	เฉลี่ย	
AT3R1	0	686	820	804	641	607	711.6	52.9
	0.005	597	533	522	400	573	525.0	22.1
	0.01	384	821	413	748	580	589.2	15.1
	0.05	489	697	352	442	758	547.6	6.5
C2HL2	0	18585	18899	17510	17856	16907	17951.4	354.1
	0.005	27465	24660	27948	26707	24843	26324.6	403.8
	0.01	21366	21978	25338	22003	23543	22845.6	320.9
	0.05	3185	3939	3419	3673	3003	3443.8	23.6
C7HL1	0	438	616	579	414	440	497.4	22.5
	0.005	5217	4652	4413	3931	3244	4291.4	208.7
	0.01	332	444	335	332	382	365.0	9.6
	0.05	412	772	411	674	664	586.6	9.4
C32ML2	0	1413	540	992	603	603	830.2	81.8
	0.005	828	1523	759	1479	1348	1187.4	69.3
	0.01	439	685	505	393	529	510.2	13.2
	0.05	456	378	709	389	370	460.4	8.8
C34MR1	0	543	553	545	760	682	616.6	23.0
	0.005	533	443	617	595	571	551.8	24.1
	0.01	476	666	503	881	767	658.6	15.4
	0.05	478	468	480	416	451	458.6	5.6

ภาคผนวก ข

ค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 660 nm เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เลี้ยงในโตรเจนที่คัดเลือก

ตาราง 13 ค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียไฮโซเลท AT3R1 ในอาหาร NFB ที่มี yeast extract ปริมาณ 0% และ 0.005%

ชั่วโมง ที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm							
	Yeast extract (0%)				Yeast extract (0.005%)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.104	0.105	0.104	0.104	0.102	0.101	0.102	0.102
6	0.125	0.126	0.124	0.125	0.151	0.148	0.152	0.150
12	0.133	0.134	0.134	0.134	0.206	0.207	0.204	0.206
18	0.142	0.141	0.142	0.142	0.262	0.261	0.263	0.262
24	0.160	0.146	0.161	0.156	0.294	0.275	0.285	0.285
30	0.152	0.152	0.152	0.152	0.295	0.301	0.294	0.297
36	0.154	0.156	0.155	0.155	0.313	0.318	0.311	0.314
42	0.156	0.160	0.157	0.158	0.330	0.334	0.328	0.331
48	0.162	0.163	0.157	0.161	0.340	0.338	0.342	0.340
54	0.160	0.159	0.158	0.159	0.357	0.342	0.345	0.348
60	0.161	0.146	0.162	0.156	0.351	0.347	0.352	0.350

ตาราง 14 ค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรีย *ไอโซเลท C2HL2* ในอาหาร NFB ที่มี yeast extract ปริมาณ 0% และ 0.005%

ชั่วโมง ที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm							
	Yeast extract (0%)			เฉลี่ย	Yeast extract (0.005%)			เฉลี่ย
	1	2	3		1	2	3	
0	0.104	0.103	0.103	0.103	0.112	0.106	0.096	0.105
6	0.133	0.134	0.137	0.135	0.171	0.169	0.188	0.176
12	0.151	0.151	0.153	0.152	0.342	0.350	0.349	0.347
18	0.169	0.167	0.169	0.168	0.471	0.458	0.451	0.460
24	0.183	0.184	0.185	0.184	0.554	0.561	0.565	0.560
30	0.176	0.212	0.177	0.188	0.688	0.692	0.690	0.690
36	0.190	0.192	0.192	0.191	0.741	0.734	0.724	0.733
42	0.196	0.200	0.198	0.198	0.771	0.730	0.719	0.740
48	0.198	0.208	0.206	0.204	0.759	0.765	0.756	0.760
54	0.205	0.210	0.209	0.208	0.763	0.758	0.741	0.754
60	0.212	0.215	0.210	0.212	0.756	0.769	0.761	0.762

ตาราง 15 ค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียไอโซเลต C7HL1 ในอาหาร NFB ที่มี yeast extract ปริมาณ 0% และ 0.005%

ชั่วโมง ที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm							
	Yeast extract (0%)			เฉลี่ย	Yeast extract (0.005%)			เฉลี่ย
	1	2	3		1	2	3	
0	0.104	0.104	0.105	0.104	0.103	0.104	0.104	0.104
6	0.124	0.126	0.121	0.124	0.178	0.178	0.178	0.178
12	0.124	0.129	0.130	0.128	0.202	0.201	0.202	0.202
18	0.131	0.132	0.125	0.129	0.225	0.224	0.225	0.225
24	0.137	0.137	0.139	0.138	0.241	0.235	0.238	0.238
30	0.142	0.143	0.140	0.142	0.243	0.240	0.234	0.239
36	0.146	0.144	0.146	0.145	0.245	0.243	0.235	0.241
42	0.148	0.150	0.147	0.148	0.247	0.246	0.238	0.244
48	0.154	0.151	0.153	0.153	0.255	0.253	0.232	0.247
54	0.151	0.156	0.157	0.155	0.239	0.238	0.275	0.251
60	0.156	0.157	0.154	0.156	0.249	0.252	0.255	0.252

ตาราง 16 ค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรีย *Pseudomonas* (C32ML2) ในอาหาร NFB ที่มี yeast extract ปริมาณ 0% และ 0.005%

ชั่วโมง ที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm							
	Yeast extract (0%)			เฉลี่ย	Yeast extract (0.005%)			เฉลี่ย
	1	2	3		1	2	3	
0	0.110	0.105	0.107	0.107	0.111	0.104	0.108	0.108
6	0.116	0.112	0.121	0.116	0.123	0.095	0.127	0.115
12	0.126	0.132	0.127	0.128	0.140	0.106	0.141	0.129
18	0.138	0.129	0.134	0.134	0.146	0.174	0.148	0.156
24	0.144	0.141	0.145	0.143	0.156	0.236	0.154	0.182
30	0.158	0.162	0.167	0.162	0.171	0.239	0.169	0.193
36	0.162	0.164	0.171	0.166	0.184	0.221	0.186	0.197
42	0.175	0.163	0.168	0.169	0.199	0.209	0.211	0.206
48	0.169	0.178	0.176	0.174	0.216	0.189	0.222	0.209
54	0.178	0.180	0.173	0.177	0.225	0.187	0.227	0.213
60	0.172	0.174	0.181	0.176	0.221	0.197	0.221	0.213

ตาราง 17 ค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียไอโซเลต C34MR1 ในอาหาร NFB ที่มี yeast extract ปริมาณ 0% และ 0.005%

ชั่วโมง ที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm							
	Yeast extract (0%)			เฉลี่ย	Yeast extract (0.005%)			เฉลี่ย
	1	2	3		1	2	3	
0	0.114	0.109	0.105	0.109	0.104	0.118	0.105	0.109
6	0.161	0.166	0.175	0.167	0.207	0.218	0.231	0.219
12	0.227	0.228	0.226	0.227	0.376	0.378	0.347	0.367
18	0.249	0.250	0.254	0.251	0.479	0.492	0.482	0.484
24	0.260	0.258	0.257	0.258	0.561	0.539	0.532	0.544
30	0.275	0.270	0.269	0.271	0.636	0.587	0.601	0.608
36	0.268	0.278	0.279	0.275	0.691	0.695	0.683	0.690
42	0.269	0.285	0.284	0.279	0.710	0.738	0.751	0.733
48	0.283	0.281	0.281	0.282	0.751	0.750	0.761	0.754
54	0.287	0.285	0.285	0.286	0.771	0.762	0.758	0.764
60	0.307	0.273	0.277	0.286	0.767	0.782	0.761	0.770

ภาคผนวก ข

ผลวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตาราง 18 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่เจริญบนอาหาร NFA โดยวิธี spread plate หลังจากทำการเพิ่มจำนวนในอาหาร NFB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Log CFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.781 ^a	26	.030	2.739	.001
Intercept	4006.313	1	4006.313	365400.413	.000
Sugarcane	.551	8	.069	6.278	.000
Part	.072	2	.036	3.275	.045
Sugarcane x Part	.158	16	.010	.903	.570
Error	.592	54	.011		
Total	4007.686	81			
Corrected Total	1.373	80			

a. R Squared = .569 (Adjusted R Squared = .361)

หมายเหตุ

Sugarcane = พันธุ์อ้อย

Part = ตำแหน่งใบ ลำต้น และราก

ตาราง 19 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยเฉลี่ยจากทั้งส่วนใบ ลำต้นและรากของอ้อย โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

Duncan^{a, b}

Sugarcane	N	Subset			
		1	2	3	4
W2	9	6.8752			
W1	9	6.9300	6.9300		
C13L	9		7.0057	7.0057	
C15L	9		7.0249	7.0249	7.0249
C2H	9		7.0250	7.0250	7.0250
C32M	9			7.0756	7.0756
C7H	9			7.1048	7.1048
AT3	9				7.1197
C34M	9				7.1347
Sig.		.272	.083	.078	.054

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square (Error) = .011.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = .05.

หมายเหตุ

Sugarcane = พันธุ์อ้อย

AT3 = อ้อยพันธุ์อุทุมพร 3

W1 และ W2 = อ้อยป่า

C2H และ C7H = อ้อยเขียวพันธุ์มะลิขาทกลุ่มท่อนพันธุ์ที่มีคลอโรฟิลล์ในใบปริมาณสูง

C32M และ C34M = อ้อยเขียวพันธุ์มะลิขาทกลุ่มท่อนพันธุ์ที่มีคลอโรฟิลล์ในใบปริมาณปานกลาง

C13L และ C15L = อ้อยเขียวพันธุ์มะลิขาทกลุ่มท่อนพันธุ์ที่มีคลอโรฟิลล์ในใบปริมาณต่ำ

ตาราง 20 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยเฉลี่ยจากส่วนใบ ลำต้น และราก
ของอ้อยทุกสายพันธุ์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

Duncan^{a, b}

Part	N	Subset	
		1	2
ROOS	27	7.0049	
STEMS	27	7.0196	7.0196
LEAVES	27		7.0741
Sig.		.608	.061

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square (Error) = .011.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 27.000.

b. Alpha = .05.

ตาราง 21 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยเฉลี่ยจากส่วนใบ ลำต้น และรากของอ้อยพันธุ์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

Duncan^{a, b}

Treatment	N	Subset								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
W2R	3	6.8630								
W2S	3	6.8670	6.8670							
W1S	3	6.8850	6.8850	6.8850						
W2L	3	6.8957	6.8957	6.8957	6.8957					
C15R	3	6.9067	6.9067	6.9067	6.9067	6.9067				
W1R	3	6.9453	6.9453	6.9453	6.9453	6.9453	6.9453			
C13R	3	6.9537	6.9537	6.9537	6.9537	6.9537	6.9537	6.9537		
W1L	3	6.9597	6.9597	6.9597	6.9597	6.9597	6.9597	6.9597		
C2HS	3	6.9940	6.9940	6.9940	6.9940	6.9940	6.9940	6.9940	6.9940	
C13S	3	6.9977	6.9977	6.9977	6.9977	6.9977	6.9977	6.9977	6.9977	
C32MR	3	7.0190	7.0190	7.0190	7.0190	7.0190	7.0190	7.0190	7.0190	7.0190
C15S	3	7.0193	7.0193	7.0193	7.0193	7.0193	7.0193	7.0193	7.0193	7.0193
C7HR	3	7.0300	7.0300	7.0300	7.0300	7.0300	7.0300	7.0300	7.0300	7.0300
C2HL	3	7.0397	7.0397	7.0397	7.0397	7.0397	7.0397	7.0397	7.0397	7.0397

ตาราง 21 (ต่อ)

Duncan ^{a, b}

Treatment	N	Subset								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
C2HR	3	7.0413	7.0413	7.0413	7.0413	7.0413	7.0413	7.0413	7.0413	7.0413
AT3S	3	7.0443	7.0443	7.0443	7.0443	7.0443	7.0443	7.0443	7.0443	7.0443
C13L	3	7.0657	7.0657	7.0657	7.0657	7.0657	7.0657	7.0657	7.0657	7.0657
C34MR	3		7.0733	7.0733	7.0733	7.0733	7.0733	7.0733	7.0733	7.0733
C32MS	3			7.0833	7.0833	7.0833	7.0833	7.0833	7.0833	7.0833
AT3L	3				7.1033	7.1033	7.1033	7.1033	7.1033	7.1033
C7HS	3					7.1130	7.1130	7.1130	7.1130	7.1130
C32ML	3						7.1243	7.1243	7.1243	7.1243
C15L	3						7.1487	7.1487	7.1487	7.1487
C34ML	3							7.1583	7.1583	7.1583
C7HL	3								7.1713	7.1713
C34MS	3								7.1723	7.1723
AT3R	3									7.2113
Sig.		.056	.052	.062	.051	.052	.056	.055	.094	.070

ตาราง 21 (ต่อ)

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square (Error) = .011.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

หมายเหตุ

AT3L, AT3S และ AT3R = ส่วนใบ ลำต้นและรากของอ้อยพันธุ์อุ้มทอง 3 ตามลำดับ

W1L, W1S และ W1R = ส่วนใบ ลำต้นและรากของอ้อยป่า W1 ตามลำดับ

W2L, W2LS และ W2R = ส่วนใบ ลำต้นและรากของอ้อยป่า W2 ตามลำดับ

C2HL, C2HS และ C2HR = ส่วนใบ ลำต้นและรากของอ้อยเขียว C2H ตามลำดับ

C7HL, C7HS และ C7HR = ส่วนใบ ลำต้นและรากของอ้อยเขียว C7H ตามลำดับ

C32ML, C32MS และ C32MR = ส่วนใบ ลำต้นและรากของอ้อยเขียว C32M ตามลำดับ

C34ML, C34MS และ C34MR = ส่วนใบ ลำต้นและรากของอ้อยเขียว C34M ตามลำดับ

C13LL, C13LS และ C13LR = ส่วนใบ ลำต้นและรากของอ้อยเขียว C13L ตามลำดับ

C15LL, C15LS และ C15LR = ส่วนใบ ลำต้นและรากของอ้อยเขียว C15L ตามลำดับ

ตาราง 22 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของกิจกรรมของเอนไซม์ในโตรจีเนสที่ความเข้มข้นของ yeast extract ในระดับที่แตกต่างกัน

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: ARA					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1550056.622(a)	19	81581.927	355.421	.000
Intercept	714430.658	1	714430.658	3112.499	.000
isolate	937886.274	4	234471.569	1021.502	.000
yeast	243942.375	3	81314.125	354.254	.000
isolate x yeast	368227.973	12	30685.664	133.686	.000
Error	18362.880	80	229.536		
Total	2282850.160	100			
Corrected Total	1568419.502	99			

a. R Squared = .988 (Adjusted R Squared = .986)

หมายเหตุ

Isolate = แบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือก ได้แก่ AT3R1, C2HL2, C7HL1, C32ML2 และ C34MR1

Yeast extract = ปริมาณ yeast extract ได้แก่ 0%, 0.005%, 0.01% และ 0.05%

ตาราง 23 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติกิจกรรมของเอนไซม์ในไตรจีเนสที่ความเข้มข้นของ yeast extract ในระดับที่แตกต่างกัน โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test
Duncan^{a,b}

combination	N	Subset						
		1	2	3	4	5	6	7
0.05% C34MR1	5	5.6200						
0.05% AT3R1	5	6.5200						
0.05% C32ML2	5	8.8200						
0.05% C7HL1	5	9.4000						
0.01% C7HL1	5	9.6000						
0.01% C32ML2	5	13.2400						
0.01% AT3R1	5	15.1600						
0.01% C34MR1	5	15.4200						
0.005% AT3R1	5	22.0600						
0% C7HL1	5	22.4600						
0% C34MR1	5	22.9600						
0.05% C2HL2	5	23.6000						
0.005% C34MR1	5	24.1400						

ตาราง 23 (ต่อ)

combination	N	Subset						
		1	2	3	4	5	6	7
0% AT3R1	5		52.9200					
0.005% C32ML2	5		69.3000	69.3000				
0% C32ML2	5			81.7800				
0.005% C7HL1	5				208.6600			
0.01% C2HL2	5					320.9000		
0% C2HL2	5						354.1000	
0.005% C2HL2	5							403.8200
Sig.		.116	.091	.197	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square (Error) = 229.536.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

b. Alpha = .05.

หมายเหตุ

0% AT3R1, 0.005% AT3R1, 0.01% AT3R1 และ 0.05% AT3R1

= กิจกรรมของเอนไซม์ในไตรจีเนสของแบคทีเรียไอโซเลท AT3R1 ที่มี yeast extract ปริมาณ 0%, 0.005%, 0.01% และ 0.05% ตามลำดับ

0% C2HL2, 0.005% C2HL2, 0.01% C2HL2 และ 0.05% C2HL2

= กิจกรรมของเอนไซม์ในไตรจีเนสของแบคทีเรียไอโซเลท C2HL2 ที่มี yeast extract ปริมาณ 0%, 0.005%, 0.01% และ 0.05% ตามลำดับ

0% C7HL1, 0.005% C7HL1, 0.01% C7HL1 และ 0.05% C7HL1

= กิจกรรมของเอนไซม์ในไตรจีเนสของแบคทีเรียไอโซเลท C7HL1 ที่มี yeast extract ปริมาณ 0%, 0.005%, 0.01% และ 0.05% ตามลำดับ

0% C32ML2, 0.005% C32ML2, 0.01% C32ML2 และ 0.05% C32ML2

= กิจกรรมของเอนไซม์ในไตรจีเนสของแบคทีเรียไอโซเลท C32ML2 ที่มี yeast extract ปริมาณ 0%, 0.005%, 0.01% และ 0.05% ตามลำดับ

0% C34MR1, 0.005% C34MR1, 0.01% C34MR1 และ 0.05% C34MR1

= กิจกรรมของเอนไซม์ในไตรจีเนสของแบคทีเรียไอโซเลท C34MR1 ที่มี yeast extract ปริมาณ 0%, 0.005%, 0.01% และ 0.05% ตามลำดับ

ภาคผนวก ฅ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือก

GGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCCGTAGCATACGGAGTGGCAGACGGGTG
AGTAACACGTGGGGATCTGCCCCGATGGTACGGAATAATTCCGGGAAACTGGGACTAA
TACCGTATGAGCCCGCAAGGGGAAAGATTTATCGCCATCGGATGAACCCGCGTCAGA
TTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGA
GGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATG
AAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCCGACGAAGATAATGACGGTAGTCGGAGA
AGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTT
GCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGTTAAGTCAGGGGTGAA
AGCCTGGAGCTCAACTCCAGAACTGCCCTTGATACTGGCGATCTCGAGTCCGGAAGA
GGTAAGTGGAAGTGCAGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACCA
GTGGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGAGGCTAGCCGTT
GGTGAGCATGCTCATCAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGCCTCCCGCCTGGGGAGTA
CGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCTTTGACATGCCCTGGA
CAGTTACCAGAGATGGTTTCTTCTCTTCGGAGCCAGGGACACAGGTGCTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTCG
CCCTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGC
GAGGAAGGTGAAGATGACCTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACG
TGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCGAACTCGCGAGGGTGAGCAAATCTCCAA
AAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCT
AGTAATCGTGGATCAGCACGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGC
CCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGCGCTAACCAGCAAGGGGGC
AGGCGACCACGGTAGGGTCAGCGACTGGGG

ภาพ 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนของยีน 16S rRNA ของเบคทีเรียไอโซเลท AT3R1

GGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAGGTCCTTCGGGGCCTAGTGGCGCAC
 GGGTGCCTAACGCGTGGGAATCTGCCCCCTTGCTTCGGAATAACAGTTAGAAATGACT
 GCTAATACCGGATGATGACTTCGGTCCAAAGATTTATCGGCAAGGGATGAGCCCGCG
 TAGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCGACGATCCTTAGCTGGTC
 TGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
 CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGA
 GTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCAGGGATGATAATGACAAGTAC
 CTTGGAGGAATAAGCTCCGGCTAATTCGCTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGGAGGGA
 GCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCTATTTCAAGTC
 AGAGGTGAAAGCCCGGAGCTCAAATTCGGAAGTGCCTTTGAAACTAGATAGCTAGAA
 TCCTGGAGAGGTGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAA
 GAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGACAGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAG
 CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATAA
 CTAGCTGTCCGGGTTTCATGGAATTTGGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCC
 TGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCTGCACAAG
 CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCGTTTGACA
 TCCTCATCGCGTTTACCAGAGATGGTTTACTTCAGTTCGGCTGGATGAGTGACAGGTG
 CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC
 GCAACCCTCGTCCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAAGGAAACCGCCGGT
 GATAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACACGCTGG
 GCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGCAGCAAGCACGCGAGTGTGAGC
 TAATCTCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGG
 CGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCAGGCCTTG
 TACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGATTCACTCGAAGGCGTTGAGCTAACC
 CGCAAGGGAGGCAGGCGACCACAGTGGGTTTAGCGACTGGGGTGAAGTCGTACAAA
 GTAGCCG

ภาพ 21 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท C2HL2

CAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCTACCAGGGGAGCGTCACACAGGTGAGT
 AACGCGTGGAACGTACCATTTGCTACGGAATAACTCACGGAACTTGTGCTAATAC
 CGTATGTGCCCCGAAAGGGGAAAGATTTATCGGCAAATGATCAGCCCGCGTTGGATTA
 GCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTCAGAGGA
 TGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
 GGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAA
 GGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAG
 AAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAACGTTGT
 TCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCACGTATGCGGGCTAATAAGTCGAGGGTGAAATC
 CCGGGGCTCAACCTCGAAACTGCCTTTGATACTGTTAGTCTTGAGTATGGTAGAGGTG
 AGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGC
 GAGGACGGCTCACTGGACCATTACTGACGCTGAGGTGTGAAAGCGTGGGGAGCAAA
 CACGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCATAAACGATGAATGTTAGCCGTTGGGGA
 GTTTACTCTTCGGTGGCGCAGATAACGCATTAAACATTCCGCGTGGGGAGTACGGTC
 GCAAGATTAAAACTCTAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTG
 GTTTAATTTGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATATCGATCGCGCTT
 AGTGGAGACACTATCTTTCAGTTTGGGTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTC
 GTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCC
 TTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAG
 GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGC
 TACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAG
 CCATCTCAGTTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTA
 ATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGT
 CACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCAGGC
 GACCACGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCTTAGGGGAA
 CC

ภาพ 22 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต C7HL1

AACGGGCGGCAGCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGAGGAGCTTGCTCCTCGA
 TTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGGACAACG
 TTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCG
 GACCTCACGCTATTAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCC
 TACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGA
 GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGA
 AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTCTGTAAGCACTT
 TAAGTTGGGAGGAAGGGCTCATAGCGAATATCCTGTGAGGTTTTTGACGTTACCAAC
 AGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAG
 CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGGCGCGCGTAGGTGGCTTGATAAAGTTGGAA
 TGTGAAATCCCCCGGGCTCAACCCTGGGAACCTGCATCCAAAACTGTCTTGGCTTA
 GAGTGCCGGTAGAAGGGTAGTGGAATTTTCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
 TGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTACCTGGACTGACACTGACACTGAGGTG
 CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA
 TGTCAACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTG
 ACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCG
 CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCC
 TTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAGCTCAGACACAG
 GTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGA
 GCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGC
 CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGC
 CAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAACCGCGAGGTG
 GAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGT
 GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAACGTCACGGTGAATACGTTCCCGGG
 CCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTGCTCCAGAAGTAGCTAGTC
 TAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAC
 AAGGAGCCCGAAGGCC

ภาพ 23 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท *Pseudomonas*
 (C32ML2)

GGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAACCCCTTCGGGGTTAGTGGCGCACGGGTG
CGTAACGCGTGGAATCTGCCCTTTGCTTCGGAATAACAGTTAGAAATGACTGCTAA
TACCGGATGATGTCTTCGGACCAAAGATTTATCGGCAAAGGATGAGCCCGCTAGGA
TTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCGACGATCCTTAGCTGGTCTGAGA
GGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATG
AAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTTTTACCAGGGATGATAATGACAGTACCTGGAGA
ATAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGAGCTAGCGTT
GTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAAGTAGGCGGTTACTCAAGTCAGAGGTGAAA
GCCCCGGGGCTCAAACCCGGAAGTGCCTTTGAACTAGGTGACTGGAATCTTGAGAG
GCGAGTGGAATTCCCAGTG TAGAGGTGAAATTCGTAGATATCCGGAAGAACACCAGT
GGCGAAGGCGACTCGCTGGACAAGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTG GGGGAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATAACTAGCTGTCCG
GGCACTTGGTGTTTGGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCCTGGGGAGTAC
GGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCTGCACAAGCGGTGGAGCA
TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCTTTGACATCCCGCGCTA
CACAGAGAGATTTGTGGTTCCCTTCGGGGACGCGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTC
GTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCC
TTAGTTGCCATCATTAGGTTGGGCACTCTAAGGAACTGCCGGTGATAAGCCGGAGG
AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACAGGCTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGCGGTGACAGTGGGCAGCAAGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGC
CGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCAGGCCTTGACACACCGCCCGT
CACACCATGGGAGTTGGATTCACTCGAAGGCGTTGAGCTAACCCGCAAGGGAGGCA
GGCGACCACAGTGGGTTTAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGCC

ภาพ 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต C34MR1

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล

นางสาวอัมพิกา เมืองทอง

วัน เดือน ปี

11 กรกฎาคม 2528

ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษา 2546 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจาก
โรงเรียนเฉลิมขวัญสตรี จังหวัดพิษณุโลก

ปีการศึกษา 2550 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การนำเสนอผลงานทางวิชาการระหว่างการศึกษา

นำเสนอผลงานรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง การแยกและการหาลักษณะเฉพาะของแบคทีเรีย
เอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนในอ้อย (Isolation and Characterization of Endophytic Nitrogen Fixing
Bacteria in Sugarcane) การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ครั้งที่ 2 (The 2nd CMU Graduate Research Conference) วันศุกร์ที่ 26 พฤศจิกายน 2553 ณ บัณฑิต
วิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved