

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและการทดสอบ

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด ปรับพีเอชให้มีค่าตามต้องการด้วย 1M HCl และ 1 M NaOH ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1. อาหารแบคทีเรีย (Kato *et al.*, 1988)

1.1 Basal medium

NaNO ₃	2.0	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	2.0	กรัม
KH ₂ PO ₄	1.0	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	กรัม
yeast extract	1.0	กรัม
mineral solution	10.0	มิลลิลิตร
vitamin solution	10.0	มิลลิลิตร
agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.0, เติม vitamin solution หลังการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมเมทานอลก่อนใช้งานตามความเข้มข้นที่ต้องการ

1.2 Metal solution

CaCl ₂ ·2H ₂ O	40.0	มิลลิกรัม
H ₃ BO ₃	50.0	มิลลิกรัม
CuSO ₄ ·5H ₂ O	4.0	มิลลิกรัม

KI	10.0	มิลลิกรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	20.0	มิลลิกรัม
MnSO ₄ ·4·7H ₂ O	40.0	มิลลิกรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	40.0	มิลลิกรัม
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	10.0	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

เตรียมเสร็จแล้วเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

1.3 Vitamin solution

biotin	0.2	มิลลิกรัม
calcium pantothenate	0.5	มิลลิกรัม
thiamin HCl	0.5	มิลลิกรัม
p-aminobenzoic acid	0.5	มิลลิกรัม
nicotinic acid	0.5	มิลลิกรัม
pyridoxin HCl	1.0	มิลลิกรัม
riboflavin	0.5	มิลลิกรัม
folic acid	0.2	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

เตรียมเสร็จกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

เติม metal solution 10 มล. (ข้อ 1.2) ลงใน basal medium (ข้อ 1.1) แล้วนำไปฆ่าเชื้อจากนั้น

เติม vitamin solution 1 มล. (ข้อ 1.3) และเติมเมทานอลตามที่ต้องการผสมให้เข้ากัน (ในกรณีที่ใช้ basal medium 1000 มล.)

2. อาหารเหลวเมทานอล (Kato *et al.*, 1988)

ใช้สูตรเดียวกับ Methanol agar แต่ไม่ใส่ agar

3. อาหารแข็ง Nutrient

beef extract	3.0	กรัม
peptone	5.0	กรัม
agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับพีเอชเป็น 6.8 – 7.0

4. อาหารเหลว Nutrient

ใช้สูตรเดียวกับ Nutrient agar แต่ไม่ใส่ agar

5. อาหารแข็ง LB

Bacto tryptone	10	กรัม
Bacto yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

6. อาหารเหลว LB

ใช้สูตรเดียวกับอาหารแข็ง LB แต่ไม่ใส่ agar

LB medium เป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* ในงานวิจัยนี้ได้มีการเติม ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

อาหารที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา

1. Nitrate broth

KNO ₃	0.2	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
Agar	1.7	กรัม

ใส่หลอดทดสอบ 15 มิลลิลิตร นำเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที

2. MR-VP broth

Peptone	7.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	5.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับพีเอช ซึ่งเมื่อนำเชื้อแล้วให้มีพีเอช เป็น 6.9 ตวงใส่หลอดทดสอบละ 5 มิลลิลิตร นำเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที

3. Simmon citrate agar

Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	2.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
MgSO ₄	0.2	กรัม
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	1.0	กรัม

Brom thymol blue	0.08	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนประกอบต่าง ๆ ปรับพีเอชเป็น 6.9 ต้มจนวุ้นละลาย ใส่หลอดทดสอบ นึ่งมาเชื้อ แล้ววางเอียงทำสแลนทให้อาหารแข็งตัว

4. Triple Sugar Iron Agar

Beef extract	3.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Peptone	20.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
FeO ₃ SO ₄ หรือ		
Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ 6H ₂ O	0.2	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Na ₂ SO ₄	0.2	กรัม
Phenol red	0.024	กรัม
Agar	13.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.3 ต้มจนละลายเข้ากัน แบ่งใส่หลอดทดสอบมาเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ไอที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที ทำสแลนทในลักษณะให้มี deep butt

5. Nutrient agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับพีเอชเป็น 6.8 หนึ่งชั่วโมงด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที

6. Starch agar

Soluble starch	10	กรัม
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร
Nutrient agar	1	ลิตร

ละลายแป้งจนหมดในน้ำ ผสมกับ Nutrient agar ที่กำลังหลอมเหลว นำไปหนึ่งชั่วโมงด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที เทลงจานแก้ว

7. Fermentation Glucose medium

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Brom thymol blue	4.0	กรัม

ปรับพีเอช เป็น 6.8-7.0

ควรเตรียมหลอดทดสอบที่ใส่หลอดดักแก๊สไว้แล้วไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180 องศา

เซลล์เชื้อ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงเตรียมอาหารที่จะนำไปทำการทดสอบ ใส่หลอดละประมาณ 6 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที รีบยกออกมาแช่ในน้ำเย็น ทั้งนี้เพื่อป้องกันน้ำตาลแตกตัวเพราะอาจจะเสียคุณสมบัติของน้ำตาลไป

8. อาหารสำหรับทดสอบการสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต

Basal medium

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
Yeast extract	0.2	กรัม

ปรับพีเอชให้เป็น 7 ก่อนเติม brom cresol purple (0.04 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 นาที

Carbohydrate solution

ละลายน้ำตาลในน้ำกลั่นปริมาตรไม่ควรเกิน 10 มิลลิลิตร โดยคำนวณให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วฆ่าเชื้อโดยวิธีการกรองผ่านเมมเบรน ที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร แล้วผสมกับ basal medium ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วจึงแบ่งใส่หลอดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลอดละ 3-5 มิลลิลิตร

การทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี และเซลล์ของแบคทีเรีย

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี

เมื่อทำการแยกเชื้อด้วยวิธีเทเพลท แบคทีเรียแต่ละเซลล์เจริญเป็นโคโลนี มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า แบคทีเรียชนิดเดียวกันจะมีรูปลักษณะของโคโลนีเหมือนกัน และแตกต่างจากแบคทีเรียต่างชนิด ลักษณะนี้จึงถูกนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งของการจำแนกชนิดแบคทีเรีย รูปลักษณะของโคโลนีที่ต้องบันทึกเพื่อใช้ในการจำแนกคือ

รูปร่าง (Form)

Punctiform	จุดกลม เส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 1 มิลลิเมตร
Circular	กลม ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลางเกิน 1 มิลลิเมตร
Filamentous	ลักษณะเป็นเส้นแผ่กระจายออก หรือสานกัน
Irregular	รูปร่างไม่แน่นอน เส้นขอบคดโค้ง
Rhizoid	เส้นขอบไม่เรียบ แตกออกคล้ายรากไม้
Spindle	คล้ายรูปกระสวย มักเกิดอยู่ภายในเนื้ออาหาร

ความสูง (Elevation)

Flat	โคโลนีแบนราบ ไม่มีความสูง
Raised	โคโลนีหนาราบ หรือเป็นชั้น ๆ
Convex	โคโลนีสูงโค้งคล้ายกระจกนูน
Pulvinate	โคโลนีสูงโค้งคล้ายเบาะรองนั่ง
Umbonate	โคโลนีโค้งตรงกลางนูนเป็นชั้นที่สอง

ขอบของโคโลนี (Margin)

Entire	ขอบโคโลนีเรียบ
Undulate	ขอบโคโลนีเป็นริ้ว

Lobate	ขอบโคโลนีเป็นร่องลึก
Erose	ขอบโคโลนีคล้ายหนามแหลมยื่นออกไป
Filamentous	เป็นเส้นยื่นออกไปโดยรอบ
Curled	เป็นวงรีวเส้นขนานรอบโคโลนี

2. การย้อมสีแบบแกรม

วิธีปฏิบัติ

1. ทำความสะอาดสไลด์และเช็ดให้แห้ง
2. เตรียมรอยสเมียร์ละครึ่งเซลล์ด้วยความร้อน
3. หยดสี crystal violet ให้ทั่วรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที
4. เทสีที่เหลือที่ค้างบนสไลด์ลงในอ่างน้ำ แล้วชะด้วยสารละลายไอโอดีน หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ทั่วรอยสเมียร์ และทิ้งไว้นาน 1 นาที
5. เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95 % หรือแอลกอฮอล์อะซิโตน จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา แต่อย่าให้เกิน 20 วินาที แล้วล้างน้ำทันทีโดยให้น้ำผ่านเบา
6. ชับด้วยกระดาษซับ แล้วย้อมทับด้วยสี safranin O ให้ทั่วรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที
7. เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งไว้ให้แห้ง
8. นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. การย้อมสีเอนโดสปอร์

วิธีปฏิบัติ

1. นำสไลด์ที่เตรียมเชื้อแล้วนำไปวางไว้ในน้ำเดือด
2. หยดสารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์มาลาไคท์ กรีน (malachite green) ในน้ำกลั่น ประมาณ 10 นาที (ระวังอย่าให้สีมาลาไคท์กรีนแห้งต้องเติมสีตลอดเวลา)
3. ล้างด้วยน้ำประปา 10 วินาที ชับน้ำให้แห้ง
4. ย้อมทับด้วยสีซาฟรานิน (safranin-O) 30 วินาที ล้างด้วยน้ำประปาเบา ๆ ชับให้แห้ง
5. ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เอนโดสปอร์ติดสีเขียว ตัวเซลล์ติดสีแดง

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารและการวิเคราะห์

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารและการวิเคราะห์

1. การเก็บตัวอย่างและเตรียมสารสกัดจากเซลล์

แยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (Bench-Top Centrifuge, CR 3i, France) ที่ความเร็ว 7500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสสำหรับวิเคราะห์เมทานอลที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.5 จากนั้นเตรียมเซลล์แขวนลอยด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.5 ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม glass bead ขนาด 0.1 มิลลิลิตร (Biospec Product, Japan) ปริมาณ 1 ใน 3 ของเซลล์แขวนลอย นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ทำสลับกันครบ 3 ครั้ง หลังจากผ่านการทำให้เซลล์แตกแล้วจะต้องเก็บสารสกัดเซลล์ในอ่างน้ำแข็งตลอดเวลา แยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ และโปรตีนทั้งหมดของเซลล์

2. การวิเคราะห์การเจริญ

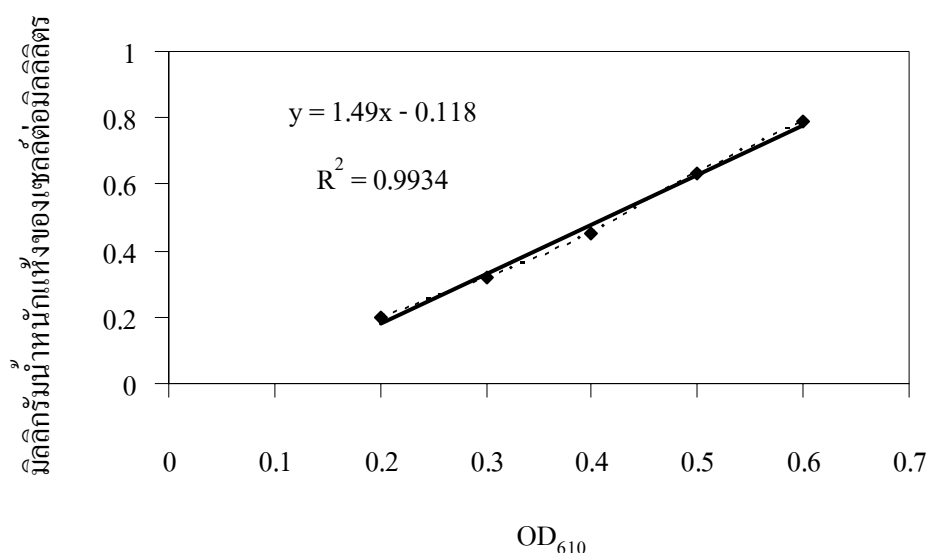
การวัดความขุ่น

วิเคราะห์การเจริญของเซลล์โดยการวัดความขุ่นของเซลล์แขวนลอยด้วยเครื่อง spectrophotometer (Shimadzu UV-1600/1700 series, Japan) ที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร

การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วปั่นล้างเซลล์และเตรียมเซลล์แขวนลอยด้วยน้ำกลั่น วัดความขุ่นของเซลล์แขวนลอยที่เตรียมขึ้นแล้วจึงอาจให้มีความขุ่นในช่วง 0.2-0.6 จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ มากรองผ่านเมมเบรน ขนาดของรู 0.02 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงหรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ ทิ้งให้เย็น

ใน dessicator นำไปชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน แล้วห้กลบด้วยน้ำหนักของแผ่นเมมเบรน จะได้ค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์ เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอยที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร (OD_{610}) กับน้ำหนักแห้งของเซลล์



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นของเซลล์แขวนลอยที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร (OD_{610}) กับน้ำหนักแห้งของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัส TE1

2. การวิเคราะห์เมทานอล (Murdanoto *et al.*, 1997)

สารเคมี

สารละลายเมทานอลมาตรฐาน 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร)

การวิเคราะห์

วิเคราะห์เมทานอล โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี (Shimadzu GC-9A, Japan) พร้อมเครื่องบันทึก chromatopac (Shimadzu C-R3A, Japan) ใช้คอลัมน์แก้วขนาด 4 มล. ID x 1 เมตร บรรจุด้วย PEG 20 M เคลือบบน Shimalite อุณหภูมิคอลัมน์ 80 องศาเซลเซียส อุณหภูมิอินเจก

เตอร์ 150 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิตัวจับสัญญาณ 150 องศาเซลเซียส มี FID (flame ionization detector) เป็นเครื่องตรวจจับ

3. การวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมดของเซลล์ (Bradford, 1976)

หลักการ

การวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ ใช้วิธีของ Bradford ซึ่งใช้สีย้อม Coomassie เป็นตัวจับกับโปรตีน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีน้ำตาลเข้มเป็นสีฟ้าหรือสีน้ำเงิน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

สารเคมี

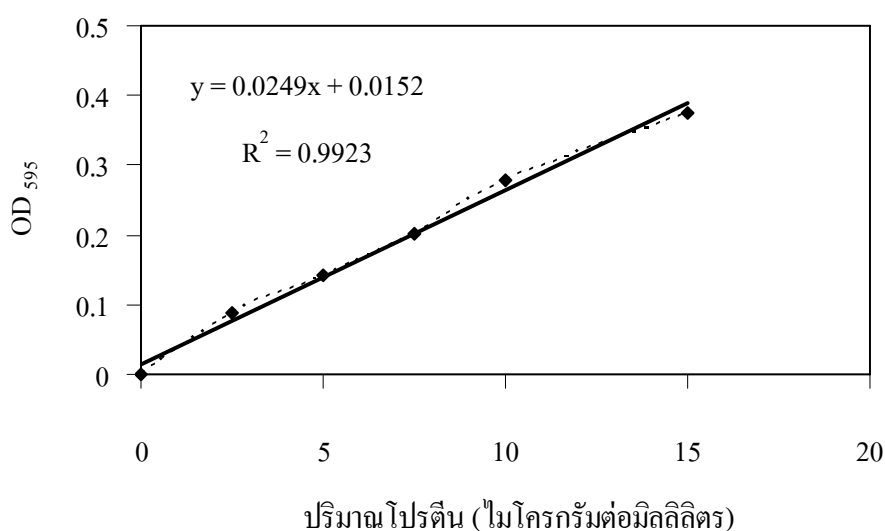
1. dye reagent concentrated (Coomassie Plus™-The Better Bradford Assay Kit, USA)
2. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) จากความเข้มข้นเริ่มต้น 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้นดังตารางดังต่อไปนี้

ตารางผนวกที่ ข1 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) จากความเข้มข้นเริ่มต้น 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ

Vial	Volume of Diluent	Volume and Source of BSA	Final BSA Concentration
A	2,370 µl of Stock	30 µl of Stock	25 µg/ml
B	4,950 µl of Stock	50 µl of Stock	20 µg/ml
C	3,970 µl of Stock	30 µl of Stock	15 µg/ml
D	2,500 µl of Stock	2,500 of vial B dilution	10 µg/ml
E	2,000 µl of Stock	2,000 of vial D dilution	5 µg/ml
F	1,500 µl of Stock	1,500 of vial E dilution	2.5 µg/ml
G	5,000 µl of Stock	0	0 µg/ml = blank
H	2,000 µl of Stock	2,000 of vial C dilution	7.5 µg/ml

การวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ใส่ลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 800 ไมโครลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ
2. เติม dye reagent concentrated ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu UV-1600/1700 series, Japan)
4. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสง คำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน ถ้าตัวอย่างมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าช่วงกราฟมาตรฐาน ต้องเจือจางให้อยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

4. การวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ (Nash, 1953)

หลักการ

การวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ด้วย acetylacetone ทำให้เกิดสารที่มีสีเหลือง ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตรได้

สารเคมี

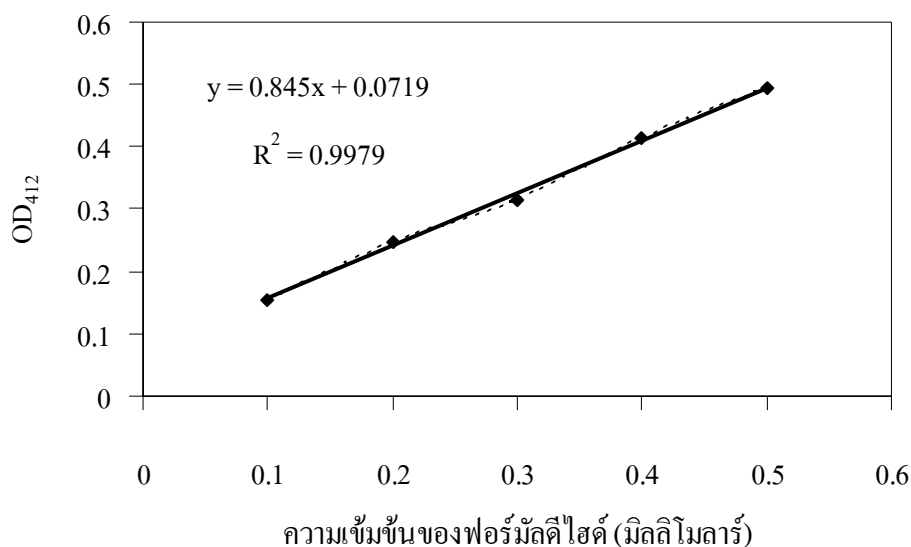
1. สารละลายฟอร์มาลดีไฮด์มาตรฐานความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิโมลาร์
2. สารละลายฟอร์มาลดีไฮด์มาตรฐาน จากความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิโมลาร์ เจือจางให้มีความเข้มข้นดังตารางดังต่อไปนี้

ตารางผนวกที่ ข2 การเตรียมสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์มาตรฐาน จากความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิโมลาร์ เจือจางให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ

Vial	Volume of Diluent	Volume and Source of BSA	Final BSA Concentration
A	0.95 ml	0.05 ml of Stock	0.5 mM
B	0.96 ml	0.04 ml of Stock	0.4 mM
C	0.97 ml	0.03 ml of Stock	0.3 mM
D	0.98 ml	0.02 ml of Stock	0.2 mM
E	0.99 ml	0.01 ml of Stock	0.1 mM
F	1 ml	0	0 = blank

การวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างและสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์มาตรฐาน ใส่ลงในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ
2. เติม Nash' reagent ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์(Shimadzu UV-1600/1700 series, Japan)
4. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์กับค่าการดูดกลืนแสง คำนวณปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์จากกราฟมาตรฐาน ถ้าตัวอย่างมีปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์สูงกว่าช่วงกราฟมาตรฐาน ต้องเจือจางให้อยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้



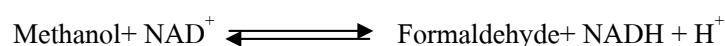
ภาพผนวกที่ ข3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร

5. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

5.1 กิจกรรมของเอนไซม์ *methanol dehydrogenase* (Arfman *et al.*, 1990)

หลักการ

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ *methanol dehydrogenase* เป็นการวิเคราะห์ปริมาณ NADH ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาต่อไปนี้



ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย

โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

พีเอช 6.7	0.5	มิลลิลิตร
DTT ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์	10	ไมโครลิตร
NADH ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์	50	ไมโครลิตร
ฟอร์มาลดีไฮด์ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์	0.1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	0.33	มิลลิลิตร
สารละลายเอนไซม์	10	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	1	มิลลิลิตร

การวิเคราะห์

1. นำส่วนผสมของปฏิกิริยาทั้งหมดยกเว้นฟอร์มาลดีไฮด์ ผสมให้เข้ากัน
2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ที่ลดลงต่อหน่วยเวลา

($\Delta A_{340}/\text{min}$)

4. เจือจางเอนไซม์ด้วย potassium phosphate buffer 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.7 และใช้ potassium phosphate buffer 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.7 แทนเอนไซม์เป็นตัวเปรียบเทียบ

การคำนวณ

กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) = $(a / 6.22 \times 10^3) \times (1/b) \times c \times d$ เมื่อ

$$a = \Delta A_{340}/\text{min}$$

b = ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้

c = ปริมาตรทั้งหมดของส่วนผสมของปฏิกิริยา

d = dilution factor

6.22×10^3 = extinction coefficient of NADH (M) at 340 nm

หมายเหตุ DTT = Dithiothreitol

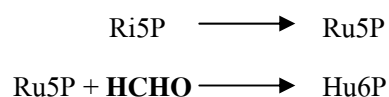
NADH = β nicotinamide adenine dinucleotide

หนึ่งยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ซึ่งเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ NADH 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่ 50 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ให้แสดงเป็นหน่วยยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

5.2 กิจกรรมของเอนไซม์ 3-hexulose-6-phosphate synthase (Arfman *et al.*, 1992)

หลักการ

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 3-hexulose 6-phosphate syntase เป็นการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังต่อไปนี้



หมายเหตุ

Ri5P = Ribose-5-phosphate

PRI = phosphoriboisomerase

หนึ่งยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการใช้ฟอर्मาลดีไฮด์ 1 ไมโครโมล ต่อนาที

ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย

โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 7.5	0.05	มิลลิลิตร
MgCl ₂ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์	0.05	มิลลิลิตร
Ri5P ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์	0.05	มิลลิลิตร
PRI (100 U/ml)	0.05	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	0.15	มิลลิลิตร
สารละลายเอนไซม์	0.05	มิลลิลิตร
ฟอर्मาลดีไฮด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	0.1	มิลลิลิตร
HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	0.5	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	1.0	มิลลิลิตร

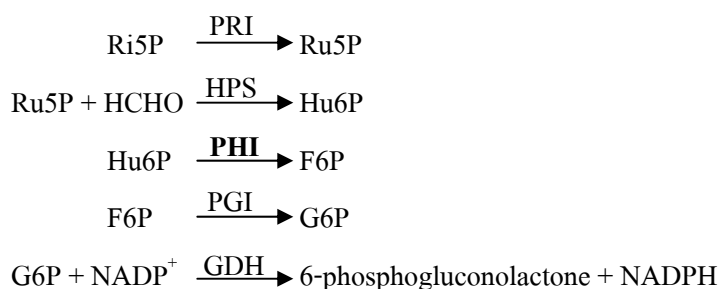
การวิเคราะห์

1. นำส่วนผสมของปฏิกิริยาทั้งหมด HCl ผสมให้เข้ากัน
2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาด้วย HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์
3. นำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอर्मาลดีไฮด์ตามวิธีในข้อ 4 และคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์
4. เจือจางเอนไซม์ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 7.5 และใช้น้ำกลั่นแทน Ri5P เป็นตัวเปรียบเทียบ

5.3 กิจกรรมของเอนไซม์ Phospho-3-hexuloisomerase (PHI) (Arfman *et al.*, 1992)

หลักการ

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PHI เป็นการวิเคราะห์เอนไซม์ PHI จากปฏิกิริยาดังต่อไปนี้



อัตราการเกิดปฏิกิริยาการรีดักชันของ NADP เป็นสัดส่วนโดยตรงกับกิจกรรมของเอนไซม์ PRI

หมายเหตุ

- F6P = Fructose-6-phosphate
- G6P = Glucose-6-phosphate
- PGI = Phosphoglucoisomerase
- GDH = Glucosephosphatedehydrogenase

หนึ่งยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ซึ่งเร่งปฏิกิริยาที่ทำให้ NADH ถูกรีดิวซ์ไป 1 ไมโครโมล จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ glucose-6-phosphate ได้เป็น 6-phosphogluconate โดยอาศัยเอนไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenase ต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย

โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ พีเอช 7.5	0.05	มิลลิลิตร
MgCl ₂ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์	0.025	มิลลิลิตร
Ri5P ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์	0.05	มิลลิลิตร
NADH ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์	0.025	มิลลิลิตร
PRI (100 U/ml)	0.029	มิลลิลิตร
PGI (110 U/ml)	0.29	มิลลิลิตร
GDH (250 U/ml)	0.12	มิลลิลิตร
HPS (100 U/ml)	0.29	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	0.65	มิลลิลิตร
สารละลายเอนไซม์	0.05	มิลลิลิตร
ฟอร์มาลดีไฮด์ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์	0.05	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	1	มิลลิลิตร

การวิเคราะห์

1. นำส่วนผสมของปฏิกิริยาแขวนฟอร์มาลดีไฮด์ ผสมให้เข้ากันตามปริมาตรที่ได้กำหนดไว้
2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นต่อหน่วยเวลา ($\Delta A_{340}/\text{min}$)

6. โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A (x มิลลิลิตร) กับสารละลาย B (y มิลลิลิตร) ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A: KH₂PO₄ 27.2 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร

สารละลาย B: K₂HPO₄ 45.6 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร

ตารางผนวกที่ ข3 การเตรียมโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

พีเอช	X (มล.)	Y (มล.)	พีเอช	X (มล.)	Y (มล.)
5.7	93.5	6.5	6.9	45.0	55.0
5.8	92.0	8.0	7.0	39.0	61.0
5.9	90.0	10.0	7.1	33.0	67.0
6.0	87.7	12.3	7.2	28.0	72.0
6.1	85.0	15.0	7.3	23.0	77.0
6.2	81.0	18.5	7.4	19.0	81.0
6.3	77.5	22.5	7.5	16.0	84.0
6.4	73.5	26.5	7.6	13.0	87.0
6.5	68.5	31.5	7.7	10.5	90.5
6.6	62.5	37.5	7.8	8.5	91.5
6.7	56.5	43.5	7.9	7.0	93.0
6.8	51.0	49.0	8.0	5.3	94.7

ภาคผนวก ก**ตารางตรวจเอกสาร**

ภาคผนวก ค

ตารางตรวจเอกสาร

ตารางผนวกที่ ค1 ช่วงอุณหภูมิในการเจริญของจุลินทรีย์

แบคทีเรีย	อุณหภูมิในการเจริญ (°C)		
	ต่ำสุด	เหมาะสม	สูงสุด
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4	25-30	40
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.5	30-37	46
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	10	28-30	37
<i>Micrococcus luteus</i>	10	30	45
<i>Lactobacillus plantarum</i>	15	30-35	45
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	15	37	40
<i>Streptococcus thermophilus</i>	20	40-45	50
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	27-30	60	65-70
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	30	35-36	38.5
<i>Thermus aquaticus</i>	40	70-72	79

ที่มา: นงลักษณ์ และ ปรีชา (2544)

ตารางผนวกที่ ค2 ลักษณะการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์

Type	Energy source	Carbon source	Members
Photolithotroph (Photoautotroph)	light	CO ₂	Photosynthetic
Photoheterotroph	light	organic matter	Sulfur bacteria
Chemolithotroph (Chemoautotroph)	inorganic matter	CO ₂	Purple photosynthetic bacteria
Chemoheterotroph	organic matter	organic matter	Hydrogen bacteria most of organism

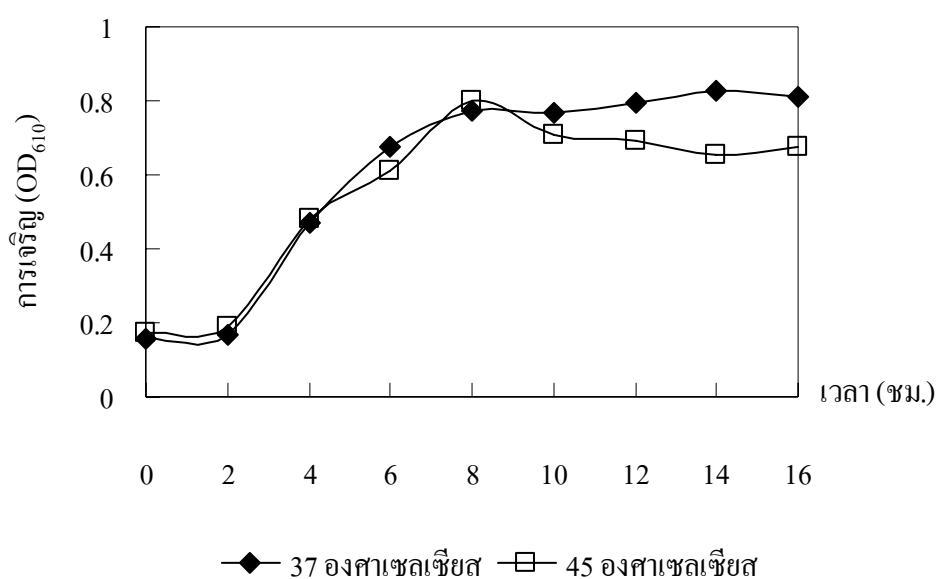
ที่มา: นงลักษณ์ และ ปรีชา (2544)

ภาคผนวก ง

ผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ๑1 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส CM1 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

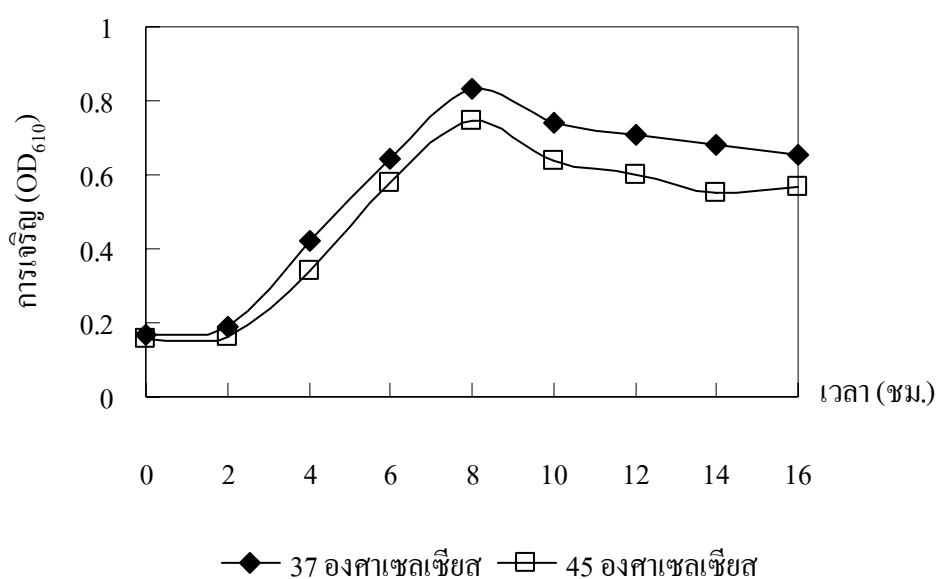
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.157	0.166	0.470	0.675	0.771	0.767	0.796	0.828	0.812
45	0.175	0.187	0.481	0.612	0.802	0.709	0.691	0.655	0.676



ภาพผนวกที่ ๑1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส CM1 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ ๑2 ค่าการเจริญ (OD₆₁₀) ของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส CM3 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

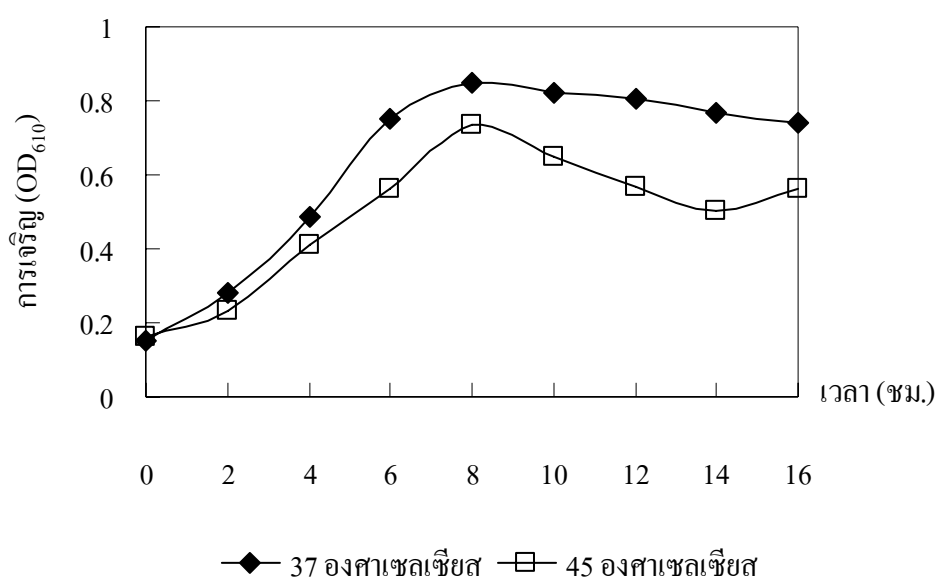
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD ₆₁₀)								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.165	0.187	0.419	0.643	0.834	0.739	0.706	0.681	0.652
45	0.155	0.162	0.340	0.581	0.744	0.639	0.600	0.552	0.567



ภาพผนวกที่ ๑2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD₆₁₀) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส CM3 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 33 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส CM4 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

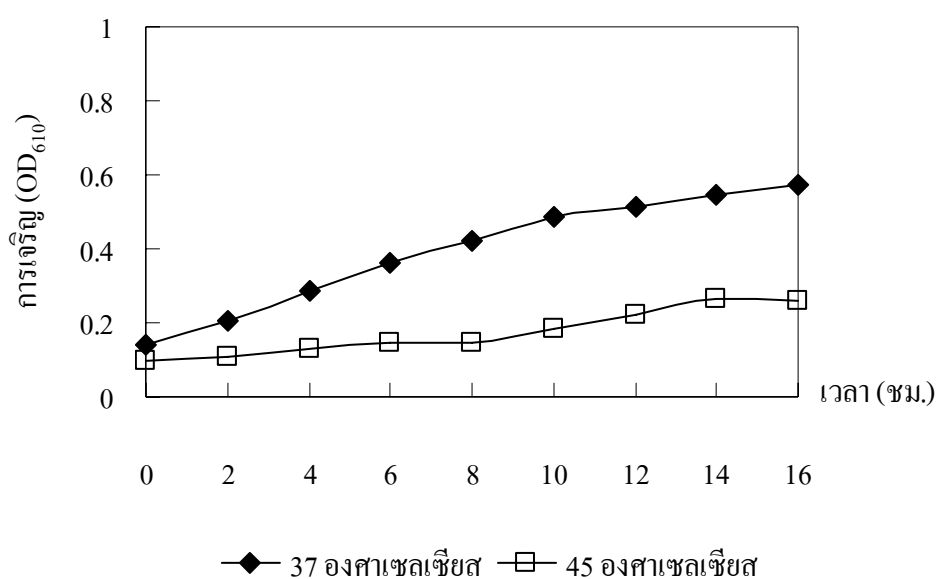
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.154	0.281	0.485	0.753	0.846	0.824	0.808	0.765	0.741
45	0.163	0.233	0.410	0.561	0.735	0.648	0.567	0.504	0.563



ภาพผนวกที่ 33 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส CM4 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 4 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส D2 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

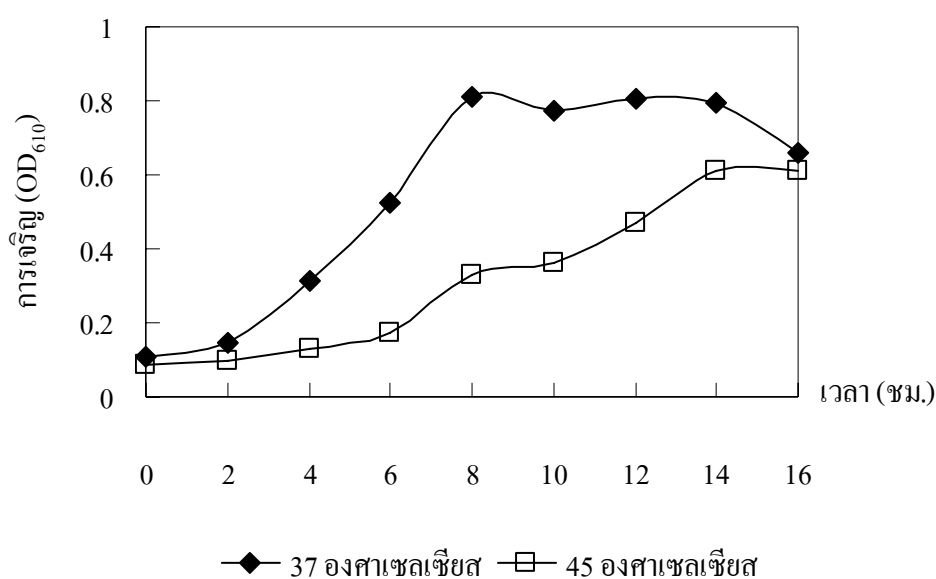
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.141	0.205	0.287	0.360	0.422	0.487	0.513	0.546	0.571
45	0.098	0.110	0.129	0.145	0.147	0.182	0.224	0.263	0.257



ภาพผนวกที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส D2 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ ๓5 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส D4 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

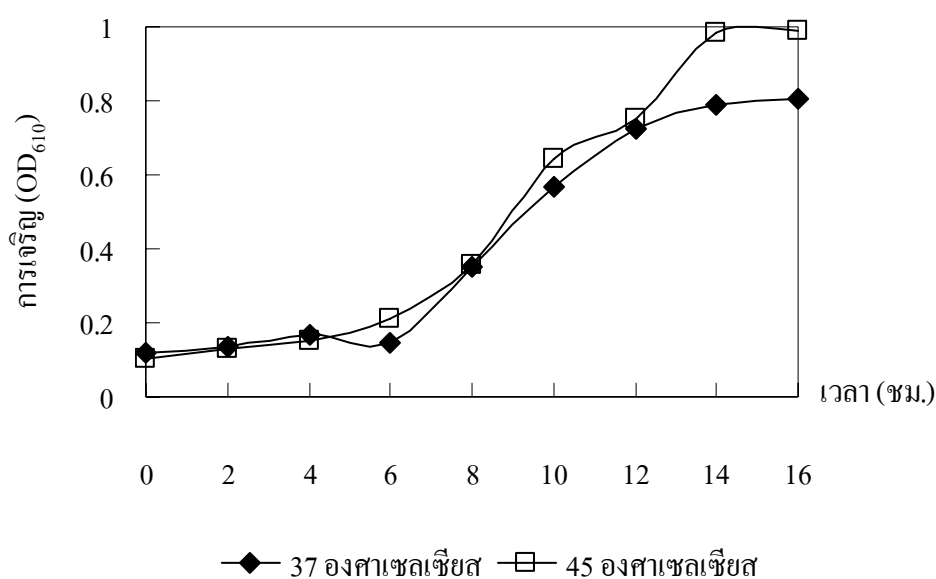
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.109	0.145	0.313	0.523	0.813	0.771	0.805	0.792	0.657
45	0.087	0.095	0.128	0.175	0.332	0.361	0.468	0.611	0.613



ภาพผนวกที่ ๓5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส D4 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 6 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส D5 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

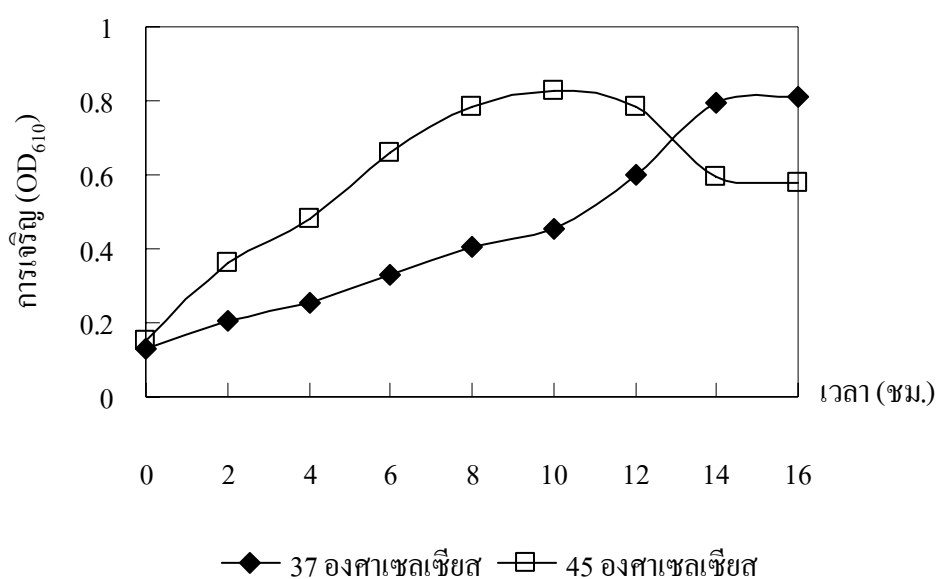
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.119	0.137	0.166	0.147	0.350	0.568	0.724	0.789	0.804
45	0.101	0.131	0.154	0.210	0.356	0.642	0.752	0.985	0.991



ภาพผนวกที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส D5 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ ๓7 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส D6 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

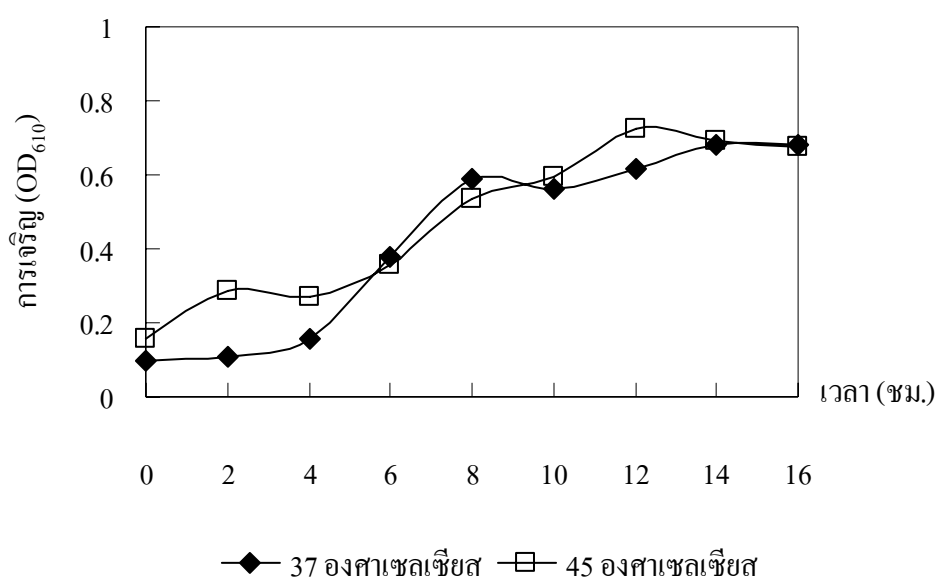
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.131	0.203	0.256	0.332	0.404	0.453	0.600	0.796	0.812
45	0.152	0.364	0.482	0.657	0.784	0.826	0.786	0.594	0.581



ภาพผนวกที่ ๓7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส D6 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 8 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส D7 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

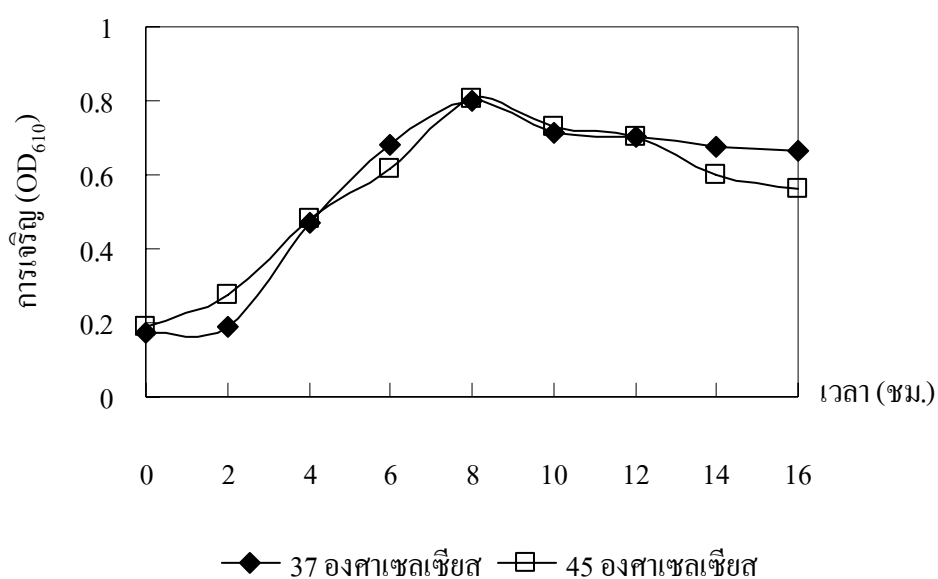
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.095	0.106	0.157	0.376	0.587	0.562	0.614	0.682	0.679
45	0.157	0.284	0.271	0.356	0.535	0.596	0.723	0.691	0.675



ภาพผนวกที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส D7 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ ๑๙ ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส KA1 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

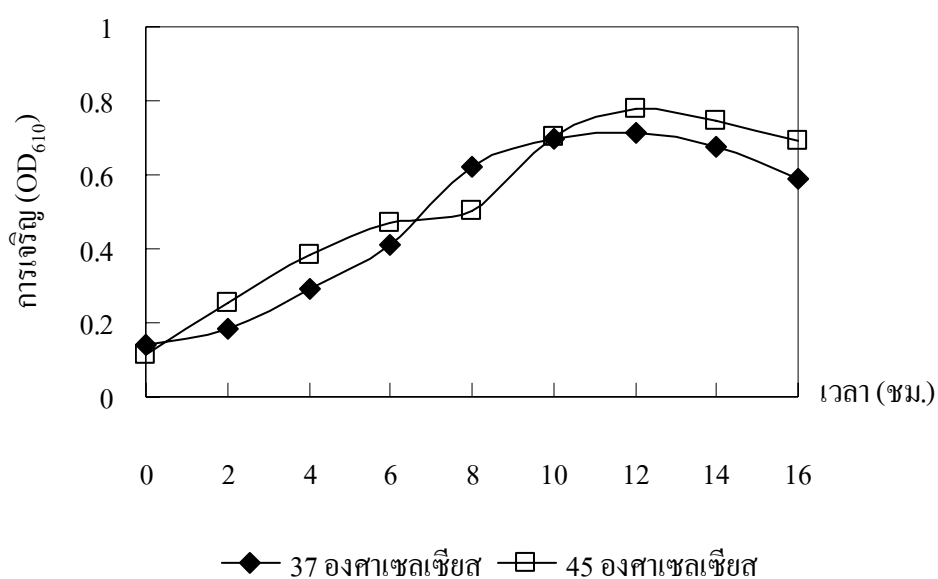
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.175	0.187	0.470	0.680	0.798	0.715	0.701	0.673	0.664
45	0.188	0.276	0.482	0.615	0.803	0.730	0.701	0.598	0.560



ภาพผนวกที่ ๑๙ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส KA1 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 10 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียหัต KA2 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

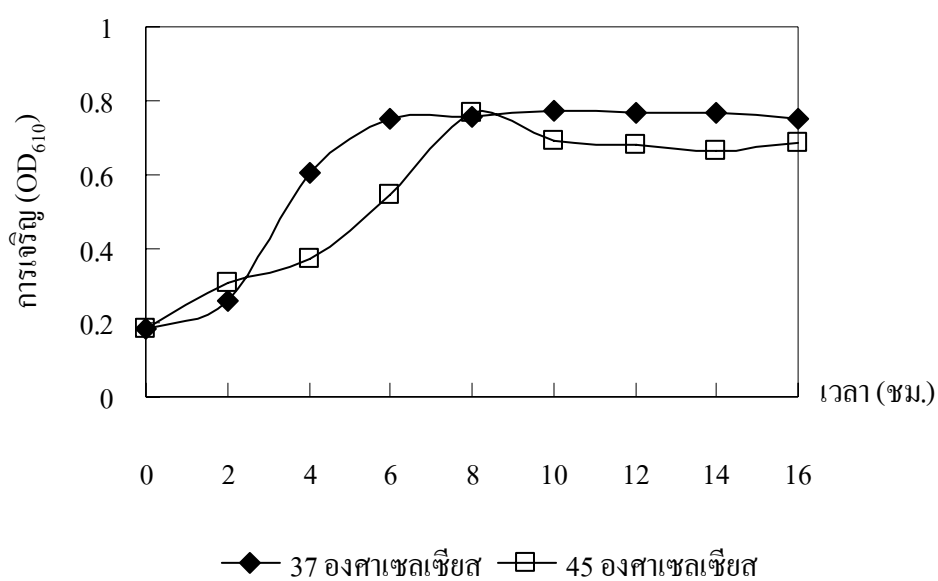
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.139	0.183	0.294	0.411	0.623	0.695	0.714	0.673	0.591
45	0.115	0.256	0.386	0.469	0.502	0.703	0.776	0.747	0.691



ภาพผนวกที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียหัต KA2 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 11 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัต KA5 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

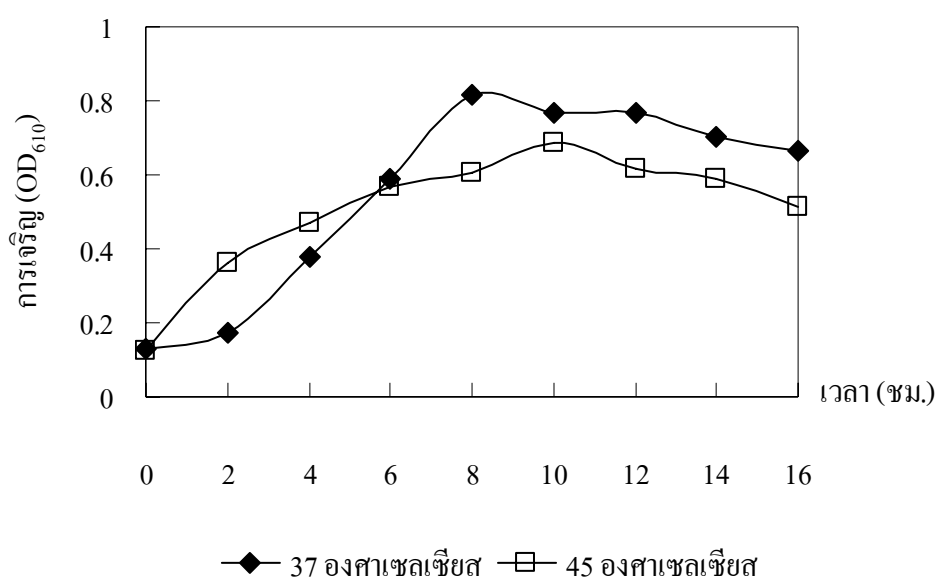
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.182	0.260	0.607	0.749	0.758	0.774	0.769	0.767	0.752
45	0.186	0.308	0.371	0.545	0.768	0.692	0.679	0.665	0.684



ภาพผนวกที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัต KA5 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 12 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัด KB5 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

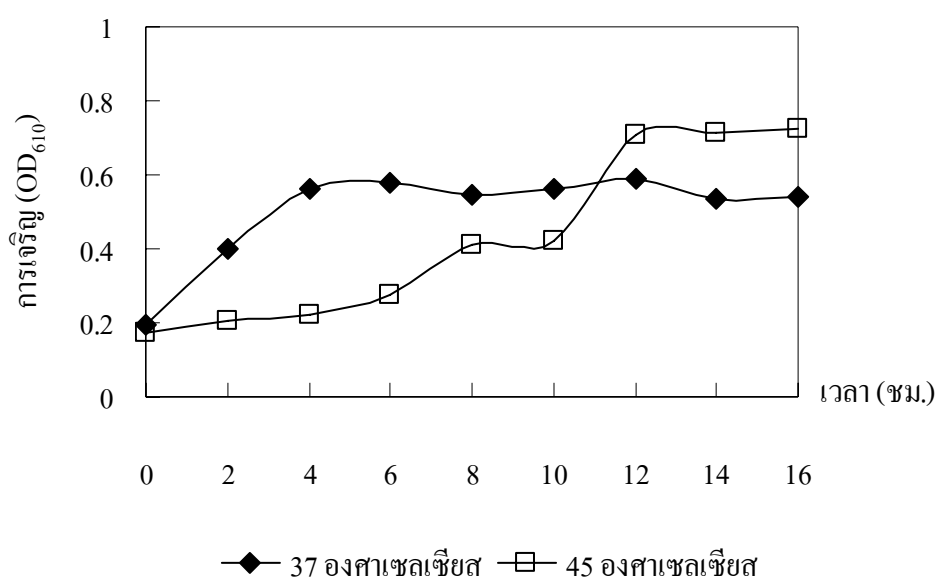
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.130	0.171	0.379	0.588	0.817	0.767	0.769	0.704	0.667
45	0.127	0.364	0.471	0.568	0.604	0.684	0.618	0.590	0.516



ภาพผนวกที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัด KB5 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 13 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัต SB2 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

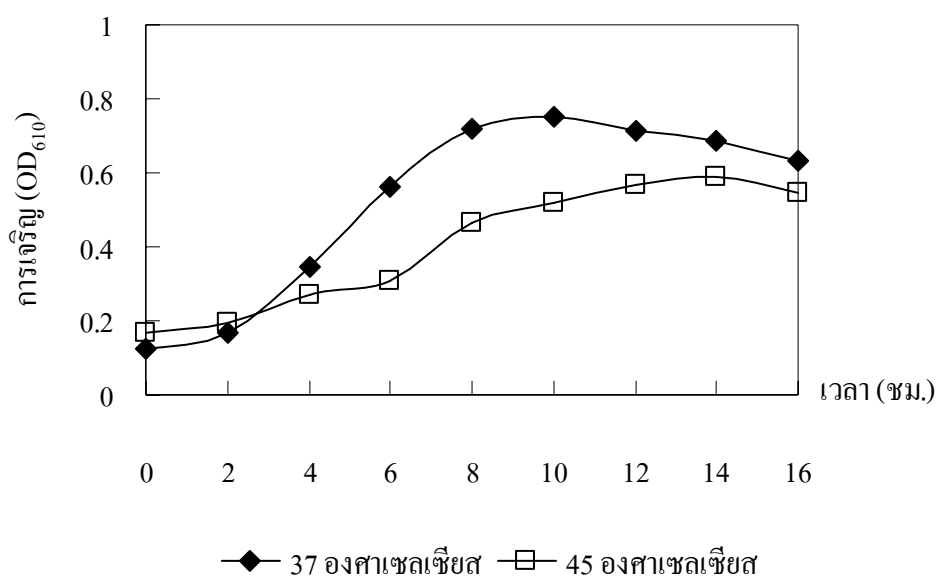
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.192	0.401	0.562	0.577	0.548	0.563	0.591	0.536	0.540
45	0.171	0.208	0.219	0.276	0.411	0.420	0.709	0.711	0.724



ภาพผนวกที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัต SB2 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 14 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัต SB4 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

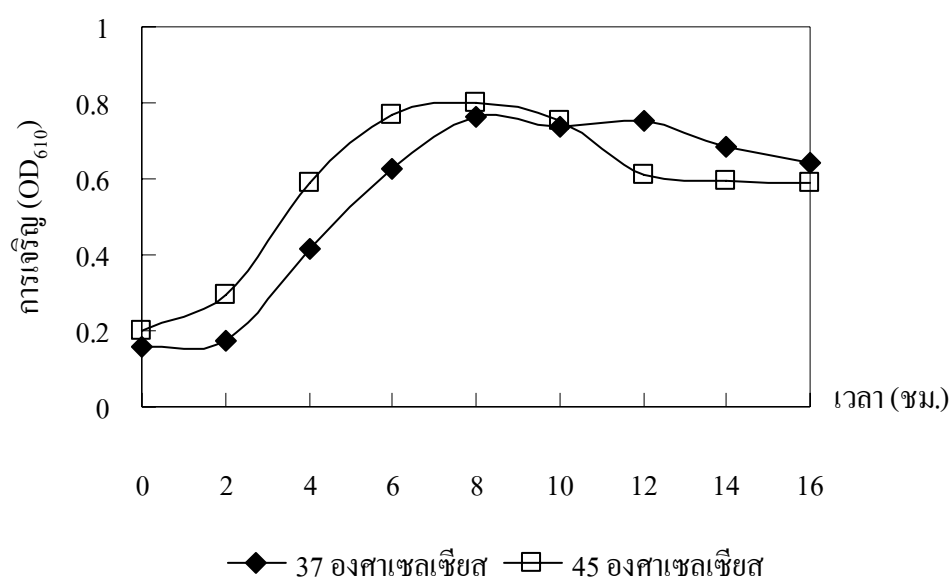
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.123	0.170	0.344	0.560	0.717	0.749	0.714	0.685	0.632
45	0.170	0.194	0.272	0.310	0.466	0.518	0.565	0.588	0.546



ภาพผนวกที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัต SB4 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 15 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัต SB6 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

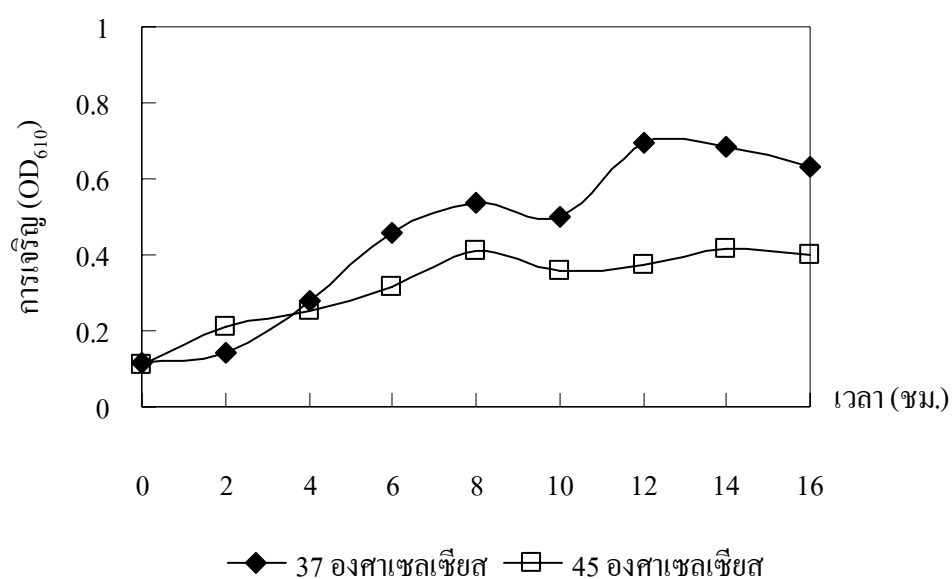
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.157	0.173	0.417	0.626	0.764	0.738	0.751	0.683	0.640
45	0.199	0.294	0.587	0.768	0.802	0.755	0.613	0.594	0.590



ภาพผนวกที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัต SB6 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 16 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัด SD1 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

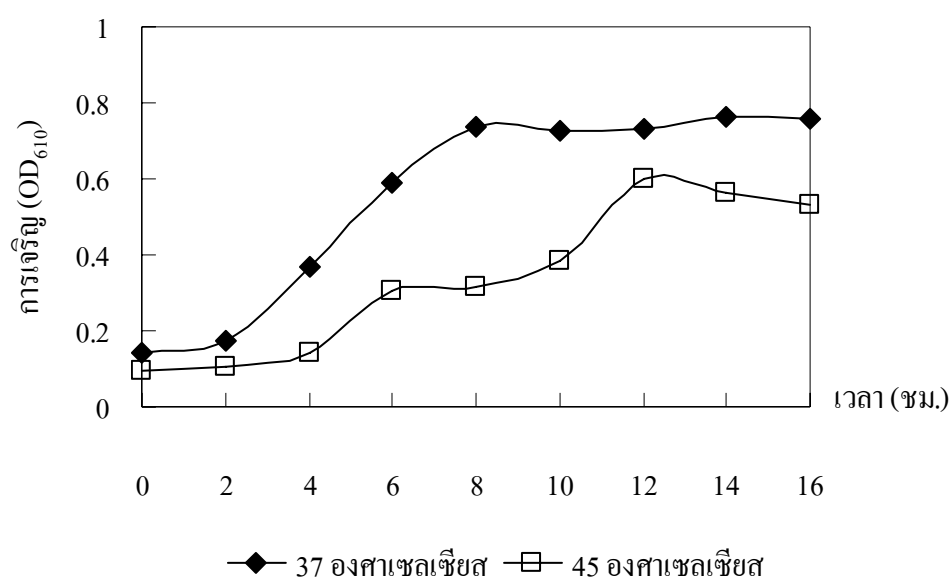
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.116	0.140	0.279	0.457	0.535	0.502	0.694	0.685	0.629
45	0.108	0.209	0.254	0.318	0.413	0.360	0.373	0.418	0.400



ภาพผนวกที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัด SD1 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 17 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัต SD2 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

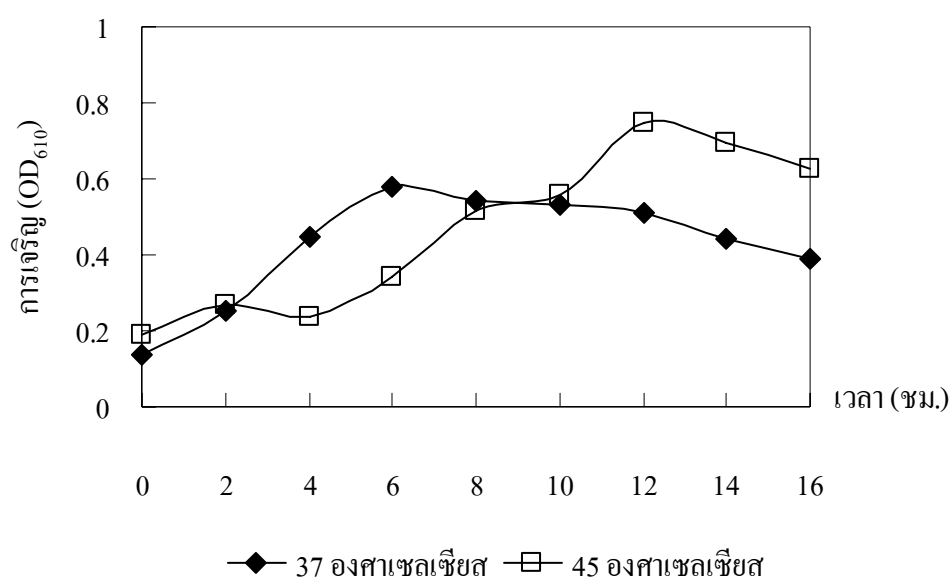
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.143	0.172	0.366	0.590	0.737	0.726	0.733	0.761	0.758
45	0.097	0.106	0.143	0.307	0.318	0.382	0.599	0.565	0.532



ภาพผนวกที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัต SD2 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 18 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียห้ำ TA4 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

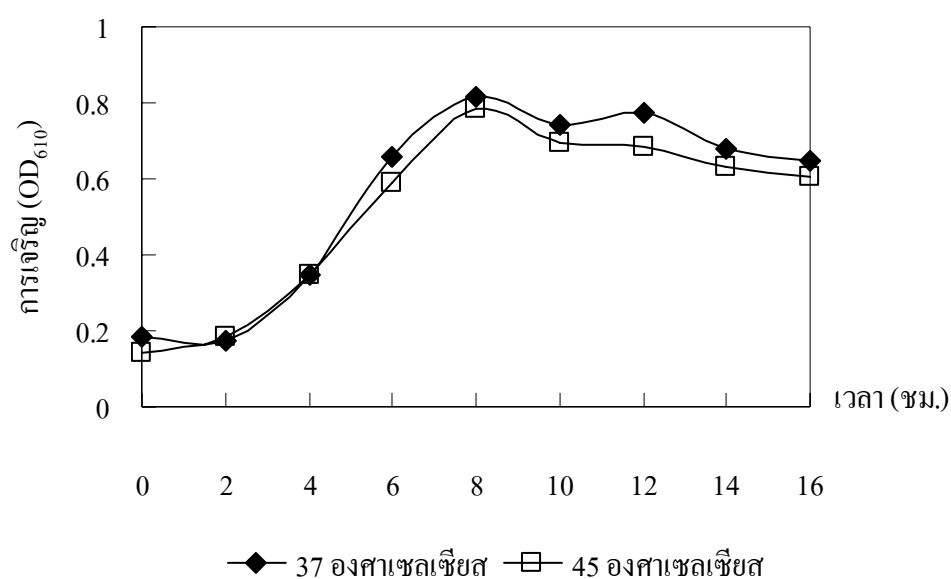
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.135	0.252	0.445	0.578	0.542	0.530	0.512	0.444	0.391
45	0.190	0.266	0.238	0.342	0.517	0.558	0.746	0.693	0.628



ภาพผนวกที่ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียห้ำ TA4 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 19 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียห้ำ TB1 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

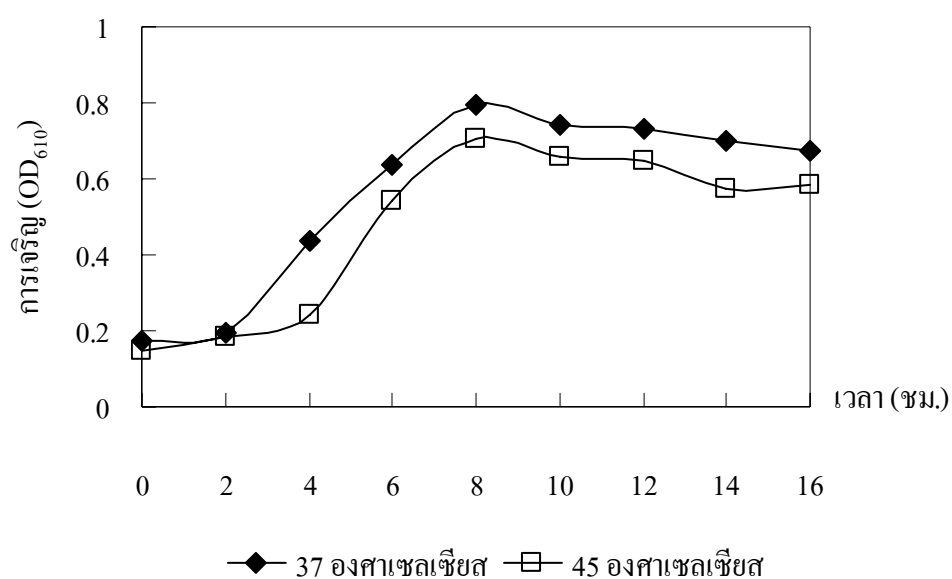
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.182	0.175	0.349	0.657	0.816	0.742	0.774	0.681	0.649
45	0.142	0.185	0.348	0.590	0.783	0.695	0.686	0.631	0.606



ภาพผนวกที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียห้ำ TB1 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 20 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียห้ำ TB2 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

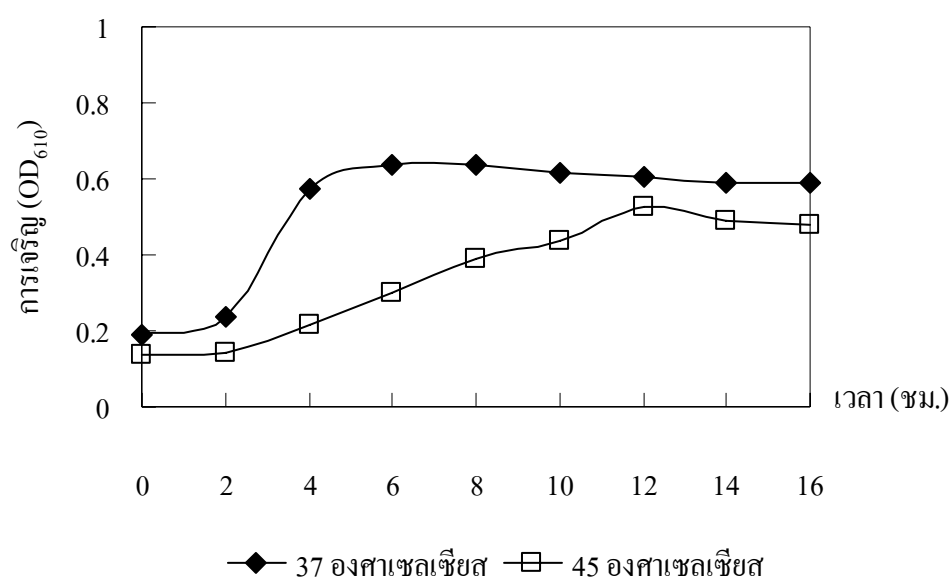
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.176	0.193	0.436	0.635	0.795	0.742	0.730	0.699	0.676
45	0.149	0.182	0.241	0.540	0.707	0.659	0.648	0.576	0.583



ภาพผนวกที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียห้ำ TB2 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 21 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียห้ำ TB3 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

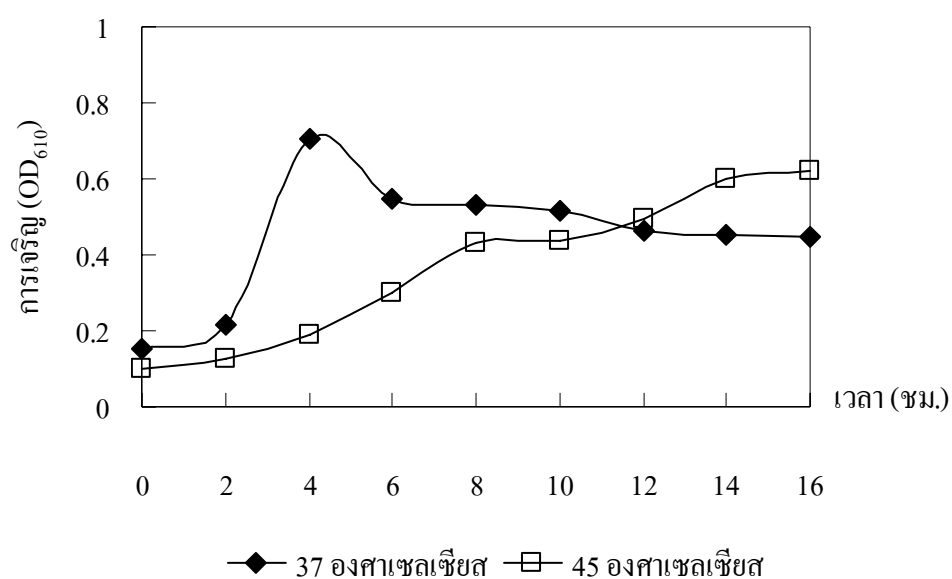
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.188	0.236	0.574	0.637	0.639	0.617	0.604	0.587	0.591
45	0.137	0.140	0.216	0.302	0.392	0.439	0.525	0.492	0.481



ภาพผนวกที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียห้ำ TB3 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 22 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียรหัส TD2 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

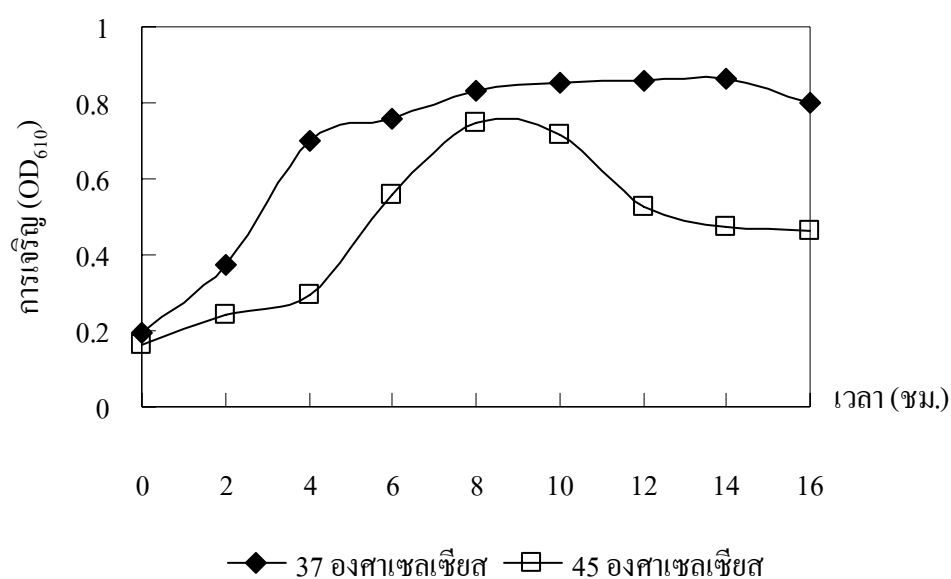
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.151	0.215	0.704	0.549	0.531	0.514	0.461	0.452	0.448
45	0.101	0.127	0.187	0.302	0.431	0.436	0.497	0.599	0.620



ภาพผนวกที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียรหัส TD2 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 23 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัต TE1 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

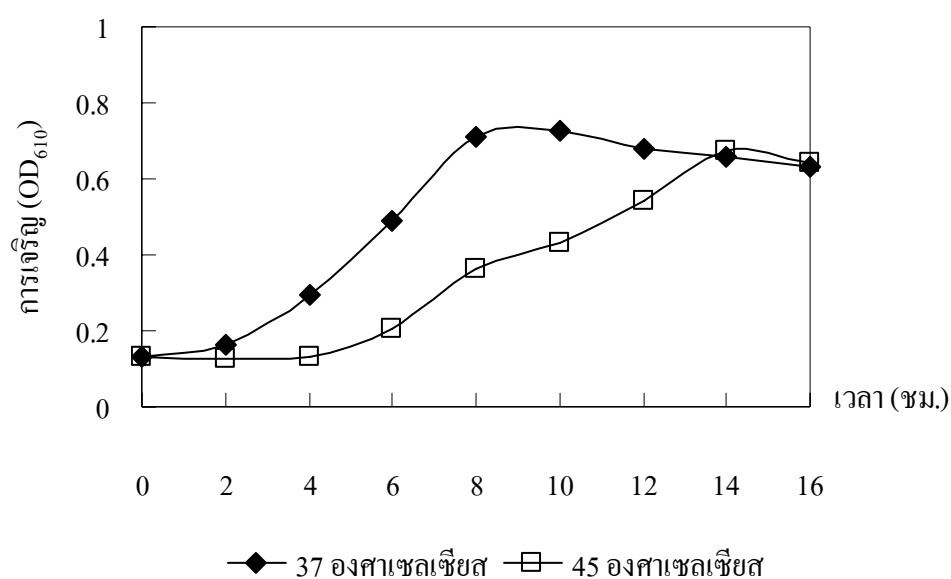
อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.197	0.374	0.702	0.758	0.830	0.855	0.859	0.862	0.801
45	0.162	0.240	0.295	0.556	0.748	0.717	0.526	0.473	0.461



ภาพผนวกที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัต TE1 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 24 ค่าการเจริญ (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัส TE2 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

อุณหภูมิ (°C)	การเจริญ (OD_{610})								
	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชม.)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0.134	0.162	0.293	0.490	0.709	0.728	0.681	0.657	0.634
45	0.131	0.127	0.129	0.207	0.365	0.430	0.542	0.675	0.641



ภาพผนวกที่ 24 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญ (OD_{610}) กับเวลาของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียหัส TE2 ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส