ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาทดสอบ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร Proteolytic bacteria

Frazier gelatin medium ที่มี 2%NaCl

NaCl	20.0 g
K_2HPO_4	1.5 g
KH_2PO_4	0.5 g
Gelatin	4.0 g
Dextrose	0.05 g
Peptone	0.1 g
Beef extract	5.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1000 ml
pH	7

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหาร Nutrient Broth ที่มี 2%NaCl

NaCl	20 g
Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Distilled water	1000 ml
pH	6.8 ± 2

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหาร Standard plate count agar (SPCA)

A standard medium corresponding to the PPHA formulation for milk, water, food and dairy products.

Yeast extract	2.5 g
Pancreatic digest of casein	5.0 g
Glucose	1.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1000 ml
pH	7 ± 0.2

ชั่ง SPCA 23.5 กรัม และเติมเกลือ NaCl 20 กรัม ลงในน้ำ 1 ลิตร ต้มให้ละลาย แล้วใส่ในขวดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหาร Tryptic Soy Agar (TSA)

Pancreatic Digest of Casein	15 g
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5 g
Sodium Chloride	5 g
Agar	15 g
Distilled water	1000 ml
pH	7.3 ± 0.2

ชั่ง TSA 40 กรัม ลงในน้ำ 1 ลิตร และเติมเกลือ NaCl 15 กรัม ต้มให้ละลาย แล้วใส่ในขวดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหาร Tryptic Soy Broth (TSB)

Pancreatic Digest of Casein	15 g
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5 g
Sodium Chloride	5 g
Distilled water	1000 ml
pH	7.3±0.2

ชั่ง TSB 30 กรัม ลงในน้ำ 1 ลิตร และเติมเกลือ NaCl 15 กรัม ต้มให้ละลาย แล้วใส่ในขวดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหาร Mueller Hinton Agar (MHA)

Beef extract power	2 g
Acid Digest of Casein	17.5 g
Soluble starch	1.5 g
Agar	15 g
Distilled water	1000 ml
pH	7.3±0.1

ชั่ง MHA 38 กรัม ลงในน้ำ 1 ลิตร และเติมเกลือ NaCl 15 กรัม ต้มให้ละลาย แล้วใส่ในขวดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. อาหาร Mueller Hinton Broth (MHB)

Beef extract power	2 g
Acid Digest of Casein	17.5 g
Soluble starch	1.5 g
Distilled water	1000 ml
pH	7.3±0.1

ชั่ง MHB 21 กรัม ลงในน้ำ 1 ลิตร และเติมเกลือ NaCl 15 กรัม ต้มให้ละลาย แล้วใส่ในขวดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. อาหาร Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose(TCBS)

Yeast extract	5 g
Peptone	10 g
Sodium Citrate	10 g
Bacto oxgall	8 g
Bacto saccharose	20 g
Sodium chloride	10 g
Ferric Citrate	1 g
Bacto brom thymol blue	0.04 g
Thymol blue	0.04 g
Agar	14 g
Distilled water	1000 ml
pH	8.6±0.2

ละลาย TCBS agar 80 กรัม และเติมเกลือ NaCl 15 กรัมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนอาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

9. อาหาร Pseudomonas Agar Base (Code: CM559)

เป็นอาหารที่ใช้สำหรับการคัดเลือกเชื้อ Pseudomonas เมื่อเติม Supplement SR103

Gelatin peptone	16 g
Casein hydrolysate	10 g
Potassium sulphate	10 g
Magnesium chloride	1.4 g
Agar	11 g

Distilled water	1000 ml
pH	7.1±0.2

CFC selective agar supplement (Code: SR103)

Vial contents (each vial is sufficient for 500 ml of medium)

Cetrimide	5 g
Fucidin	5 g
Cephaloridine	25 g

สำหรับการเตรียม Agar Base โดยชั่ง Agar Base (CM559) 24.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติม glycerol 5 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียม supplement CFC SR103 โดยนำ supplement CFC SR103 ที่ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ: ethanol ในอัตราส่วน 1:1 2 มิลลิลิตร ผสมลงใน Agar Base ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วซึ่งมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. น้ำยาทดสอบ Bacteria ย่อยโปรตีน

$HgCl_2$	15 g
HCl	20 ml
Distilled water	100 ml

(คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม สำหรับนักศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ 326-424. 2540)

2. น้ำยาสำหรับหยุดกิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีน

Trichloroacetic acid (TCA)	5 g
Distill water	100 ml

ละลาย TCA ในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตร

3. 1% gelatin solution สำหรับเป็นสับสเตรท

Gelatin 1 g

ชั่ง Gelatin 1 กรัม เติมเกลือ NaCl ตามสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ จากนั้นละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อค่า pH ที่ทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์ โดย pH 7 ใช้ phosphate buffer, pH 8 และ pH 9 ใช้ Tris-HCl buffer

4. สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน

สารละลายชนิดที่ I (reagent I)

Folin A

Na_2CO_3 20 g

NaOH 4 g

ละลาย Na_2CO_3 และ NaOH ในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตร

Folin B

$CuSO_4.5H_2O$ 2.5 g

Sodium citrate 5 g

ละลาย $CuSO_4.5H_2O$ และ Sodium citrate ในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตร

นำ Folin A และ Folin B มาผสมกันในสัดส่วน Folin A 50 มิลลิลิตร และ Folin B 1 มิลลิลิตร (ใช้ทันทีเมื่อผสมเสร็จ)

สารละลาย Folin-Ciocalteu's phenol reagent

Folin-Ciocalteu's phenol reagent 1 ml

Distilled water 1 ml

นำ Folin-Ciocalteu's phenol reagent และ distilled water ผสมให้เข้ากันแล้วใช้ทันที

5. สารละลาย Manganese sulfate

$MnSO_4.H_2O$	364 g

ละลาย $MnSO_4.H_2O$ ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง

6. สารละลาย Alkali-iodide-azide

NaOH	500 g
NaI	135 g
NaN_3	10 g

ละลาย NaOH และ NaI ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร จากนั้นเติม NaN_3 10 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร

7. น้ำแป้ง

Soluble starch powder	2 g
Salicylic	0.2 g
Distilled water	90 ml

ละลาย soluble starch powder ในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร นำไปต้มจนเดือดและเป็นเนื้อเดียวกัน ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น เติมกรด salicylic 0.2 กรัม เพื่อป้องกันการเติบโตของจุลินทรีย์แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

8. สารละลาย Sodium thiosulfate 0.025 N

$Na_2S_2O_3.5H_2O$	6.205 g
NaOH	0.4 g

ละลาย $Na_2S_2O_3.5H_2O$ ในน้ำกลั่นที่ต้มจนเดือดแล้วปล่อยให้เย็น เติม NaOH จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วหาค่ามาตรฐานกับสารละลาย $K_2Cr_2O_7$

9. สารละลาย $K_2Cr_2O_7$

$K_2Cr_2O_7$	1.226 g

นำ $K_2Cr_2O_7$ ไปอบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร

10. น้ำกลั่นปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์

นำน้ำกลั่นมาต้มให้เดือด เพื่อไล่คาร์บอนไดออกไซด์

11. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.02 นอร์มัล

H_2SO_4	2.8 ml
Distilled water	1,000 ml

โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร จะได้กรดเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จากนั้นเจือจาง 200 มิลลิลิตร ของกรด 0.1 นอร์มัล ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากคาร์บอนจนได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร กรดที่ได้ขั้นสุดท้ายนี้เข้มข้นประมาณ 0.02 มิลลิลิตร หาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกโดยไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต 0.02 นอร์มัล

12. สารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต

Na_2CO_3	1.060 g
Distilled water	1,000 ml

อบแห้งโซเดียมคาร์บอเนตที่ 110 องศาเซลเซียส 1.060 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากคาร์บอน 1 ลิตร

13. สารละลายเมทธิลออเรนจ์อินดิเคเตอร์

เมทธิลออเรนจ์	0.05 g
Distilled water	100 ml

ละลายเมทธิลออเรนจ์ 0.05 กรัม ในน้ำกลั่นที่ปราศจากคาร์บอน 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

1. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Norberg and Hofsten, 1969)

วิธีการ

นำตัวอย่างเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร เติม 1% gelatin solution ที่มี 2% NaCl ใน 0.1 M Tris buffer pH 8 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 5% Trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที กรองตะกอนด้วยกระดาษกรอง whatmam No. 1 นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบลงค์ (blank) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของไทโรซีนโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มาเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน

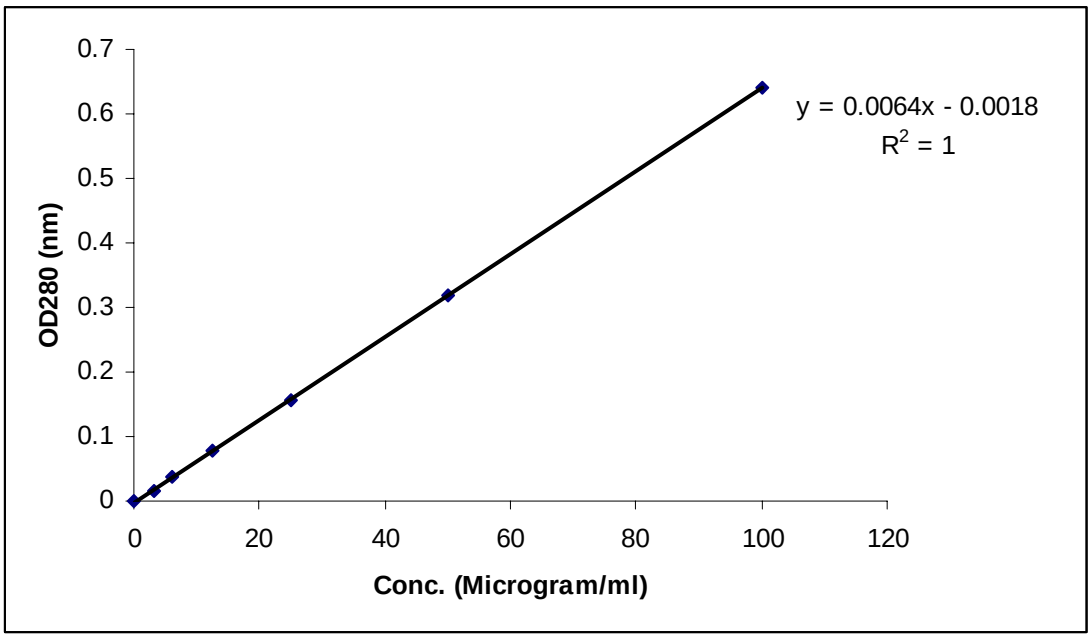
สำหรับชุดควบคุม นำตัวอย่างเอนไซม์มา 1 มิลลิลิตร เติม 5% TCA 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 1% gelatin solution ที่มี 2% NaCl ใน 0.1 M Tris buffer pH 8 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีข้างต้น

2. การทำกราฟมาตรฐานไทโรซีน (ดารณี, 2543)

วิธีการ

ชั่งไทโรซีน 0.01 กรัมนำมาละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้สารละลายไทโรซีนที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเจือจางสาร โดยทำ 2 fold dilution ทำ 5 ความเข้มข้น คือ 50 25 12.5 6.25 และ 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารที่ความเข้มข้นต่างๆไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนและค่าการดูดกลืนแสง ดังรูปที่ 1

โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ย่อยโปรตีน คือ กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนได้เป็นกรดอะมิโนอิสระปริมาณ 1 ไมโครกรัมต่อนาที



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานไทโรซีนโดยใช้ไทโรซีนที่ความเข้มข้น 0 3.125 6.25 12.5 25 50 และ 100 ไมโครกรัม

3. การทำ Well Diffusion Method

วิธีการ

นำเชื้อที่มีอายุ 18 ชั่วโมง ที่ผ่านการปรับความขุ่นด้วย 0.5 McFarland มา swabในจานเพาะเชื้อ (plate) ที่มีอาหาร TSA ที่มี 1.5% NaCl จากนั้นใช้ก้นของ Pasture pitted เจาะลงในอาหารที่ผ่านการ swab ด้วยเชื้อแล้ว เอาวุ้นส่วนที่มีต้องการออกโดยใช้ loop ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยออก ต่อจากนั้นหยดน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth) 70 ไมโครลิตร ลงใน well ที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไม่คว่ำจานเพาะเชื้อ (plate) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method

วิธีการ

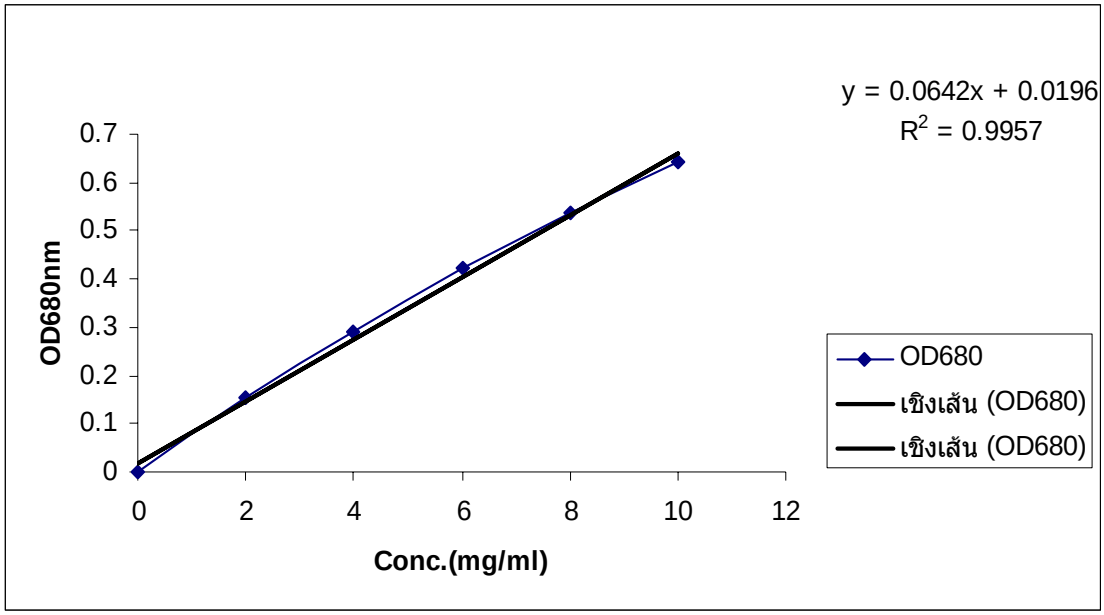
นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนมา 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย (reagent I) ชนิดที่ I (ดูรายละเอียดในภาคผนวก จ) 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องเมื่อครบเวลาเติมสาร Folin-ciocalteu's phenol reagent (ดูรายละเอียดใน

ภาคผนวก จ) 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องเมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบหารปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐาน BSA

5. การทำกราฟมาตรฐาน BSA

วิธีการ

ชั่ง BSA 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้สารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 2 4 6 และ 8 ตามลำดับ นำสารที่ความเข้มข้นต่างๆ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย (reagent I) ชนิดที่ I (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ก) 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องเมื่อครบเวลาเติมสาร Folin-Ciocalteu's phenol reagent (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ก) 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องเมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 นาโนเมตร จากนั้นนำมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (OD680) และความเข้มข้น (mg/ml) ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานโปรตีนโดยใช้ BSA ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6. การวิเคราะห์หา Biochemical Oxygen Demand (BOD)

การเตรียมน้ำสำหรับใช้เจือจาง

นำน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้มากกว่าที่ต้องการ 1 ลิตร ลงในภาชนะที่สะอาดแล้วเติมสารละลาย phosphate buffer $MgSO_4$ $CaCl_2$ และ $FeCl_3$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อ 1 ลิตร แล้วเป่าอากาศด้วยเครื่องเป่าอากาศ เพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้น้ำเจือจางอย่างน้อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

วิธีเจือจางน้ำตัวอย่าง

เลือกเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างในการเจือจางที่คาดว่าค่า BOD อยู่ในช่วงนั้น แล้วเลือกเป็นเซ็นตัวอย่างที่สูงกว่าและต่ำกว่าที่อยู่ติดกันอีก 2 อัน ตามตารางที่ 1 จากนั้นค่อยๆรินน้ำตัวอย่างที่ต้องการ แล้วเติมน้ำสำหรับใช้เจือจางให้ครบ 1 ลิตร ลงในกระบอกตวงขนาด 1 ลิตร พยายามอย่าให้มีฟองอากาศใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน อย่าให้มีฟองอากาศแล้วค่อยๆรินใส่ขวด BOD 3 ขวด ปิดจุก นำไปเก็บในตู้ที่มีอุณหภูมิ 20±1 องศาเซลเซียส 2 ขวด เป็นเวลา 5 วัน จึงนำมาหาค่า DO ส่วนขวดที่เหลือนำไปหาค่า DO ทันที เพื่อหาค่า DO ที่จุดเริ่มต้น

การหาค่า DO

จากตัวอย่างน้ำที่เก็บในขวด BOD ขนาด 300 มิลลิลิตร เติมสารละลาย manganese sulfate 2 มิลลิลิตร ลงใต้ผิวน้ำ แล้วเติมสารละลาย alkali-iodide-azide 2 มิลลิลิตร ลงใต้ผิวน้ำตามลงไปทันที ปิดจุกให้แน่นและเขย่าอย่างแรง โดยการกลับขวดไปมาประมาณ 15 ครั้ง วางให้ตกตะกอนจากนั้นเติมกรด sulfuric เข้มข้นลงไป 2 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนละลายให้หมด ตวงสารละลายที่ได้ 203 มิลลิลิตร ใส่ลงไปใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตรปริมาตรที่ใช้ในการไตเตรทนี้ให้แทนปริมาตรของตัวอย่างจริงเท่ากับ 200 มิลลิลิตร ทั้งนี้เนื่องจากปริมาตรของตัวอย่างน้ำที่ถูกแทนที่ด้วยสารละลาย manganese sulfate 2 มิลลิลิตร และสารละลาย alkali-iodide-azide 2 มิลลิลิตร ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate 0.025 นอร์มัล (N) จนได้สีเหลืองอ่อน แล้วเติมน้ำแป้งลงไป 1 ถึง 2 มิลลิลิตร ไตเตรทต่อจนกระทั่งสีน้ำเงินกลายเป็นไม่มีสี จากนั้นคำนวณค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำของตัวอย่างเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร โดย 1 มิลลิลิตร ของ 0.025 นอร์มัล sodium thiosulfate จะสมมูลกับออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 0.2

มิลลิกรัม ดังนั้น 1 มิลลิลิตรของ sodium thiosulfate จะเท่ากับมิลลิกรัมต่อลิตรของออกซิเจนที่ละลายน้ำ เมื่อใช้ตัวอย่างปริมาตร 200 มิลลิลิตร

การคำนวณหาค่า BOD

การหาค่า BOD หาได้จากสูตร

$$\text{mg/l BOD} = \frac{D_1 - D_2}{P}$$

D_1 = DO ของตัวอย่างน้ำเจือจางภายหลังการเตรียม 15 นาที

D_2 = Do ของตัวอย่างน้ำเจือจางหลังจากบ่ม 5 วัน

P = Decimal fraction ของตัวอย่างน้ำที่ใช้

ตารางที่ 1 ช่วงของค่า BOD และเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างที่ใช้ในการเจือจาง

% ตัวอย่างที่ใช้ในการเจือจาง	ช่วงของ BOD
0.01	20,000-70,000
0.02	10,000-35,000
0.05	4,000-14,000
0.1	2,000-7,000
0.2	1,000-3,500
0.5	400-1,400
1.0	200-700
2.0	100-350
5.0	40-140
10.0	20-70
20.0	10-35
50.0	4-14
100	0-7

7. ความเป็นด่างทั้งหมด (Total alkalinity)

นำน้ำตัวอย่างมา 100 มิลลิลิตร ใส่ลงใน erlenmeyer flask จากนั้นเติมสารละลายเมทธิลออเรนจ์อินดิเคเตอร์ 4-8 หยด ลงในน้ำตัวอย่าง แล้วไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.02 นอร์มัล จนกระทั้งถึงจุดยุติซึ่งสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มอ่อน แต่เนื่องจากการเปลี่ยนสีของสารละลายแยกแยะได้ไม่ชัดเจน การหาจุดยุติของการไตเตรทอาจใช้ pH meter วัด pH ของสารละลายเท่ากับ 4.5 คำนวณค่าความเป็นด่างทั้งหมดตามสูตรคำนวณต่อไปนี้

ค่าความเป็นด่างทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร) =

$$\frac{\text{(ปริมาตรกรดที่ใช้ไตเตรท (มิลลิลิตร))} \times \text{(ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก)} \times (50) \times (1.00)}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}}$$

8. การเตรียมแบคทีเรียสำหรับเลี้ยงในสภาวะจำลอง

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลว FGM ที่มี 2% NaCl pHในอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จากนั้นปรับค่า OD_{660} เท่ากับ 0.5 อัตราส่วนที่ใช้คือ ปริมาตรเชื้อ 14 มิลลิลิตร/น้ำทะเล 5 ลิตร สำหรับเชื้อ *V. harveyi* เลี้ยงในอาหารเหลว TSB ที่มี 2% NaCl และมีขั้นตอนการเตรียมเช่นเดียวกับเชื้อที่คัดเลือกได้

ภาคผนวก ค

Report of Microbial Identification by partial 16S rDNA sequence analysis

Sample Name : W3

---

516 Identification
Homology Search with BLASTn program from NCBI database

Sequences producing significant alignments:		SCORE	EVALUE
AF125317	Pseudomonas sp. pDL01	1023	0.0
DQ237950	Pseudomonas sp. Bxl-1	1023	0.0
DQ211690	Pseudomonas sp. LQG-3	1023	0.0
AY738263	Pseudomonas aeruginosa strain JB2	1023	0.0
DQ187386	Pseudomonas aeruginosa	1023	0.0

BLASTN 2.2.13 [Nov-27-2005]

Reference:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer,
Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman
(1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of
protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

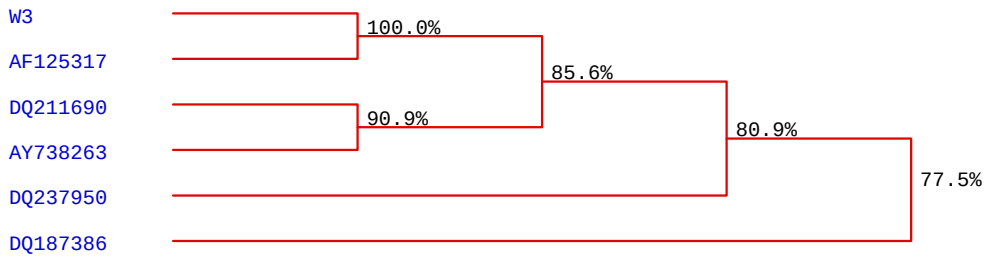
RID: 1145609574-24142-119616472893.BLASTQ4

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS,
GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
3,845,320 sequences; 17,002,546,091 total letters

Query= W3 Length=516

TGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGG
AATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATAC
TGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGAC
TAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAA
CCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGC
ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCC

Alignment and Phylogenic tree by DNASIS V3.7 program
Unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA)



>gi|33337672|gb|AF125317.1| Pseudomonas sp. pDL01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1531

Score = 1023 bits (516), Expect = 0.0
Identities = 516/516 (100%), Gaps = 0/516 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1     TGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  587   TGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTA  646

Query  61    CGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  647   CGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA  706

Query  121   CCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  707   CCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG  766

Query  181   CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  767   CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGA  826

Query  241   TCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  827   TCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCG  886

Query  301   CAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  887   CAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA  946

Query  361   ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  947   ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATG  1006

Query  421   GATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1007  GATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT  1066

Query  481   GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCC  516
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1067  GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCC  1102
```

>gi|78173086|gb|DQ237950.1| Pseudomonas sp. Bxl-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1403

Score = 1023 bits (516), Expect = 0.0

```
 Identities = 516/516 (100%), Gaps = 0/516 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     TGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  539   TGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTA  598

Query  61    CGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  599   CGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA  658

Query  121   CCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  659   CCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG  718


Query  181   CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  719   CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGA  778

Query  241   TCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  779   TCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCG  838

Query  301   CAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  839   CAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA  898

Query  361   ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  899   ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATG  958

Query  421   GATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  959   GATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT  1018

Query  481   GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCC  516
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1019  GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCC  1054


>gi|77168450|gb|DQ211690.1|  Pseudomonas sp. LQG-3 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence Length=1398

 Score = 1023 bits (516),  Expect = 0.0
 Identities = 516/516 (100%), Gaps = 0/516 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     TGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  537   TGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTA  596

Query  61    CGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  597   CGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA  656

Query  121   CCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  657   CCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG  716

Query  181   CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  717   CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGA  776
```

```
Query  241   TCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  777   TCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCG  836

Query  301   CAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  837   CAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA  896

Query  361   ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  897   ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATG  956

Query  421   GATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  957   GATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT  1016

Query  481   GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCC  516
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1017  GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCC  1052
```

>gi|52788431|gb|AY738263.1| Pseudomonas aeruginosa strain JB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1356

```
 Score = 1023 bits (516),  Expect = 0.0
 Identities = 516/516 (100%), Gaps = 0/516 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     TGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  565   TGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTA  624

Query  61    CGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  625   CGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA  684

Query  121   CCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  685   CCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG  744

Query  181   CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  745   CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGA  804

Query  241   TCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  805   TCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCG  864

Query  301   CAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  865   CAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA  924

Query  361   ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  925   ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATG  984

Query  421   GATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  985   GATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT  1044

Query  481   GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCC  516
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1045  GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCC  1080
```

>gi|76365718|gb|DQ187386.1| Pseudomonas aeruginosa 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1430

```
 Score = 1023 bits (516),  Expect = 0.0
 Identities = 516/516 (100%), Gaps = 0/516 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     TGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  553   TGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTA  612

Query  61    CGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  613   CGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA  672

Query  121   CCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  673   CCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG  732

Query  181   CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  733   CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGA  792

Query  241   TCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  793   TCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCG  852

Query  301   CAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  853   CAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA  912

Query  361   ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  913   ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATG  972

Query  421   GATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  973   GATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT  1032

Query  481   GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCC  516
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1033  GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCC  1068
```

```
AF125317. Reports  Pseudomonas sp. PDL01[gi:33337672]
LOCUS       AF125317  1531 bp    DNA     linear   BCT 01-JAN-2005
DEFINITION  Pseudomonas sp. pDL01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   AF125317
VERSION     AF125317.1  GI:33337672
KEYWORDS    .
SOURCE      Pseudomonas sp. pDL01
  ORGANISM  Pseudomonas sp. pDL01
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
            Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1531)
  AUTHORS   Dutta,S.K. and Hou,L.-H.
  TITLE     Novel Pseudomonas sp. from TNT Contaminated soil
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1531)
  AUTHORS   Dutta,S.K. and Hou,L.-H.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (02-OCT-1998) Biology, Howard University, 415 College
            Street, N.W., Washington, DC 20059, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
```

```
     source          1..1531
                     /organism="Pseudomonas sp. pDL01"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="pDL01"
                     /db_xref="taxon:88285"
                     /note="from TNT contaminated soil"
     rRNA            <1..>1531
                     /product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN
        1 tagagtttga tcctggctca gattgaacgc tggcggcagg cctaacacat gcaagtcgag
       61 cggatgaagg gagcttgctc ctggattcag cggcggacgg gtgagtaatg cctaggaatc
      121 tgcctggtag tgggggataa cgtccggaaa cgggcgctaa taccgcatac gtcctgaggg
      181 agaaagtggg ggatcttcgg acctcacgct atcagatgag cctaggtcgg attagctagt
      241 tggtggggta aaggcctacc aaggcgacga tccgtaactg gtctgagagg atgatcagtc
      301 acactggaac tgagacacgg tccagactcc tacgggaggc agcagtgggg aatattggac
      361 aatgggcgaa agcctgatcc agccatgccg cgtgtgtgaa gaaggtcttc ggattgtaaa
      421 gcactttaag ttgggaggaa gggcagtaag ttaatacctt gctgttttga cgttaccaac
      481 agaataagca ccggctaact tcgtgccagc agccgcggta atacgaaggg tgcaagcgtt
      541 aatcggaatt actgggcgta aagcgcgcgt aggtggttca gcaagttgga tgtgaaatcc
      601 ccgggctcaa cctgggaact gcatccaaaa ctactgagct agagtacggt agagggtggt
      661 ggaatttcct gtgtagcggt gaaatgcgta gatataggaa ggaacaccag tggcgaaggc
      721 gaccacctgg actgatactg acactgaggt gcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga
      781 taccctggta gtccacgccg taaacgatgt cgactagccg ttgggatcct tgagatctta
      841 gtggcgcagc taacgcgata agtcgaccgc ctggggagta cggccgcaag gttaaaactc
      901 aaatgaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc
      961 gaagaacctt acctggcctt gacatgctga gaactttcca gagatggatt ggtgccttcg
     1021 ggaactcaga cacaggtgct gcatggctgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta
     1081 agtcccgtaa cgagcgcaac ccttgtcctt agttaccagc acctcgggtg ggcactctaa
     1141 ggagactgcc ggtgacaaac cggaggaagg tggggatgac gtcaagtcat catggccctt
     1201 acggccaggg ctacacacgt gctacaatgg tcggtacaaa gggttgccaa gccgcgaggt
     1261 ggagctaatc ccataaaacc gatcgtagtc cggatcgcag tctgcaactc gactgcgtga
     1321 agtcggaatc gctagtaatc gtgaatcaga atgtcacggt gaatacgttc ccgggccttg
     1381 tacacaccgc ccgtcacacc atgggagtgg gttgctccag aagtagctag tctaaccgca
     1441 aggggacgg ttaccacgga gtgattcatg actggggtga agtcgtaaca aggtagccgt
     1501 aggggaacct gcggctggat cacctcctta a


DQ237950. Reports  Pseudomonas sp. Bxl-1 [gi:78173086]
LOCUS       DQ237950   1403 bp    DNA     linear   BCT 31-OCT-2005
DEFINITION  Pseudomonas sp. Bxl-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   DQ237950
VERSION     DQ237950.1  GI:78173086
KEYWORDS    .
SOURCE      Pseudomonas sp. Bxl-1
  ORGANISM  Pseudomonas sp. Bxl-1
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
            Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1403)
  AUTHORS   Li,X., He,J. and Li,S.
  TITLE     Isolation of profenofos degrading-bacteria
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1403)
  AUTHORS   Li,X., He,J. and Li,S.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (07-OCT-2005) College of Life Science, Nanjing
            Agricultural University, Nanjing Weigang No.1, Nanjing, Jiangsu
            210095, China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1403
                     /organism="Pseudomonas sp. Bxl-1"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="Bxl-1"
```

```
                     /db_xref="taxon:353219"
     rRNA            <1..>1403
                     /product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN
        1 atgcaagtcg agcggatgaa gggagcttgc tcctggattc agcggcggac gggtgagtaa
       61 tgcctaggaa tctgcctggt agtgggggat aacgtccgga aacgggcgct aataccgcat
      121 acgtcctgag ggagaaagtg ggggatcttc ggacctcacg ctatcagatg agcctaggtc
      181 ggattagcta gttggtgggg taaaggccta ccaaggcgac gatccgtaac tggtctgaga
      241 ggatgatcag tcacactgga actgagacac ggtccagact cctacgggag gcagcagtgg
      301 ggaatattgg acaatgggcg aaagcctgat ccagccatgc cgcgtgtgtg aagaaggtct
      361 tcggattgta aagcacttta agttgggagg aagggcagta agttaatacc ttgctgtttt
      421 gacgttacca acagaataag caccggctaa cttcgtgcca gcagccgcgg taatacgaag
      481 ggtgcaagcg ttaatcggaa ttactgggcg taaagcgcgc gtaggtggtt cagcaagttg
      541 gatgtgaaat ccccgggctc aacctgggaa ctgcatccaa aactactgag ctagagtacg
      601 gtagagggtg gtggaatttc ctgtgtagcg gtgaaatgcg tagatatagg aaggaacacc
      661 agtggcgaag gcgaccacct ggactgatac tgacactgag gtgcgaaagc gtggggagca
      721 aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gtcgactagc cgttgggatc
      781 cttgagatct tagtggcgca gctaacgcga taagtcgacc gcctggggag tacggccgca
      841 aggttaaaac tcaaatgaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat
      901 tcgaagcaac gcgaagaacc ttacctggcc ttgacatgct gagaactttc cagagatgga
      961 ttggtgcctt cgggaactca gacacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga
     1021 gatgttgggt taagtcccgt aacgagcgca acccttgtcc ttagttacca gcacctcggg
     1081 tgggcactct aaggagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc
     1141 atcatggccc ttacggccag ggctacacac gtgctacaat ggtcggtaca aagggttgcc
     1201 aagccgcgag gtggagctaa tcccataaaa ccgatcgtag tccggatcgc agtctgcaac
     1261 tcgactgcgt gaagtcggaa tcgctagtaa tcgtgaatca gaatgtcacg gtgaatacgt
     1321 tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccatgggagt gggttgctcc agaagtagct
     1381 agtctaaccg caaggggac ggt


DQ211690. Reports  Pseudomonas sp. LQG-3 [gi:77168450]
LOCUS       DQ211690   1398 bp    DNA     linear   BCT 11-OCT-2005
DEFINITION  Pseudomonas sp. LQG-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   DQ211690
VERSION     DQ211690.1  GI:77168450
KEYWORDS    .
SOURCE      Pseudomonas sp. LQG-3
  ORGANISM  Pseudomonas sp. LQG-3
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
            Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1398)
  AUTHORS   Yang,C.
  TITLE     Isolation of Bacteria from Contaminated Soil
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1398)
  AUTHORS   Yang,C.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (19-SEP-2005) Department of Microbiology, College of
Life
            Science, Tongwei Road 6, Nanjing, Jiangsu Province 210095, P.R.
            China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1398
                     /organism="Pseudomonas sp. LQG-3"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="LQG-3"
                     /db_xref="taxon:349090"
     rRNA            <1..>1398
                     /product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN
        1 tgcaagtcga gcggatgaag ggagcttgct cctggattca gcggcggagg gtgagtaatg
       61 cctaggaatc tgcctggtag tgggggataa cgtccggaaa cgggcgctaa taccgcatac
```

```
      121 gtcctgaggg agaaagtggg ggatcttcgg acctcgcgct atcagatgag cctaggtcgg
      181 attagctagt tggtggggta aaggcctacc aaggcgacga tccgtaactg gtctgagagg
      241 atgatcagtc acactggaac tgagacacgg tccagactaa tacgggaggc agcagtgggg
      301 aatattggac aatgggcgaa agcctgatcc agccatgccg cgtgtgtgaa gaaggtcttc
      361 ggattgtaaa gcactttaag ttgggaggaa gggcagtaag ttaatacctt gctgttttga
      421 cgttaccaac agaataagca ccggctaact tcgtgccagc agccgcggta atacgaaggg
      481 tgcaagcgtt aatcggaatt actgggcgta aagcgcgcgt aggtggttca gcaagttgga
      541 tgtgaaatcc ccgggctcaa cctgggaact gcatccaaaa ctactgagct agagtacggt
      601 agagggtggt ggaatttcct gtgtagcggt gaaatgcgta gatataggaa ggaacaccag
      661 tggcgaaggc gaccacctgg actgatactg acactgaggt gcgaaagcgt ggggagcaaa
      721 caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatgt cgactagccg ttgggatcct
      781 tgagatctta gtggcgcagc taacgcgata agtcgaccgc ctggggagta cggccgcaag
      841 gttaaaactc aaatgaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc
      901 gaagcaacgc gaagaacctt acctggcctt gacatgctga gaactttcca gagatggatt
      961 ggtgccttcg ggaactcaga cacaggtgct gcatggctgt cgtcagctcg tgtcgtgaga
     1021 tgttgggtta agtcccgtaa cgagcgcaac ccttgtcctt agttaccagc acctcgggtg
     1081 ggcactctaa ggagactgcc ggtgacaaac cggaggaagg tggggatgac gtcaagtcat
     1141 catggccctt acggccaggg ctacacacgt gctacaatgg tcggtacaaa gggttgccaa
     1201 gccgcgaggt ggagctaatc ccataaaacc gatcgtagtc cggatcgcag tctgcaactc
     1261 gactgcgtga agtcggaatc gctagtaatc gtgaatcaga atgtcacggt gaatacgttc
     1321 ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc atgggagtgg gttgctccag aagtagctag
     1381 tctaaccgca agggggac
```

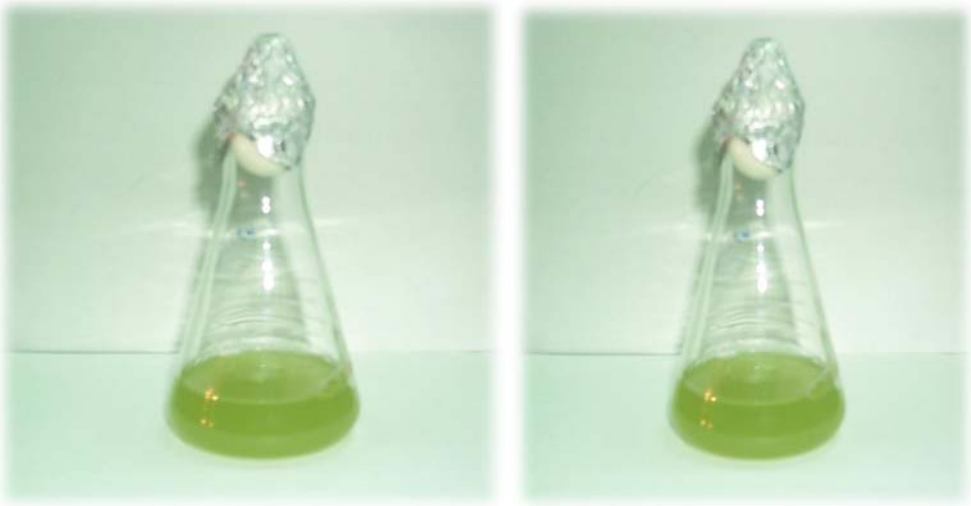
```
AY738263. Reports  Pseudomonas aeruginosa strain JB2 [gi:52788431]
LOCUS       AY738263   1356 bp    DNA     linear   BCT 03-OCT-2004
DEFINITION  Pseudomonas aeruginosa strain JB2 16S ribosomal RNA gene,
partial
            sequence.
ACCESSION   AY738263
VERSION     AY738263.1  GI:52788431
KEYWORDS    .
SOURCE      Pseudomonas aeruginosa
  ORGANISM  Pseudomonas aeruginosa
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
            Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1356)
  AUTHORS   Iwashita,S. and Wood,T.K.
  TITLE     Enhanced Aerobic Degradation of Metal Lubricants Using a 30oC
            Biological Consortium
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1356)
  AUTHORS   Iwashita,S. and Wood,T.K.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (30-AUG-2004) Chemical Engineering, University of
            Connecticut, 191 Auditorium Road, Storrs, CT 06269, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1356
                     /organism="Pseudomonas aeruginosa"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="JB2"
                     /db_xref="taxon:287"
     rRNA            <1..>1356
                     /product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN
        1 ttgaacgctg gcggcaggcc taacacatgc aagtcgagcg gatgaaggga gcttgctcct
       61 ggattcagcg gcggacgggt gagtaatgcc taggaatctg cctggtagtg ggggataacg
      121 tccggaaacg ggcgctaata ccgcatacgt cctgagggag aaagtggggg atcttcggac
      181 ctcacgctat cagatgagcc taggtcggat tagctagttg gtggggtaaa ggcctaccaa
      241 ggcgacgatc cgtaactggt ctgagaggat gatcagtcac actggaactg agacacggtc
      301 cagactccta cgggaggcag cagtggggaa tattggacaa tgggcgaaag cctgatccag
      361 ccatgccgcg tgtgtgaaga aggtcttcgg attgtaaagc actttaagtt gggaggaagg
      421 gcagtaagtt aataccttgc tgttttgacg ttaccaacag aataagcacc ggctaacttc
```

```
      481 gtgccagcag ccgcggtaat acgaagggtg caagcgttaa tcggaattac tgggcgtaaa
      541 gcgcgcgtag gtggttcagc aagttggatg tgaaatcccc gggctcaacc tgggaactgc
      601 atccaaaact actgagctag agtacggtag agggtggtgg aatttcctgt gtagcggtga
      661 aatgcgtaga tataggaagg aacaccagtg gcgaaggcga ccacctggac tgatactgac
      721 actgaggtgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata ccctggtagt ccacgccgta
      781 aacgatgtcg actagccgtt gggatccttg agatcttagt ggcgcagcta acgcgataag
      841 tcgaccgcct ggggagtacg gccgcaaggt taaaactcaa atgaattgac gggggcccgc
      901 acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga agaaccttac ctggccttga
      961 catgctgaga actttccaga gatggattgg tgccttcggg aactcagaca caggtgctgc
     1021 atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgtaacg agcgcaaccc
     1081 ttgtccttag ttaccagcac ctcgggtggg cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg
     1141 gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca tggcccttac ggccagggct acacacgtgc
     1201 tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga
     1261 tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt
     1321 gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc gggcct

DQ187386. Reports  Pseudomonas aeruginosa [gi:76365718]
LOCUS       DQ187386   1430 bp    DNA     linear   BCT 02-OCT-2005
DEFINITION  Pseudomonas aeruginosa 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   DQ187386
VERSION     DQ187386.1  GI:76365718
KEYWORDS    .
SOURCE      Pseudomonas aeruginosa
  ORGANISM  Pseudomonas aeruginosa
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
            Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1430)
  AUTHORS   Hui,L. and Zhong,M.B.
  TITLE     Phenotypic characteristics and phylogenetic analysis of bacteria
            from offshore oil field
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1430)
  AUTHORS   Hui,L. and Zhong,M.B.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (28-AUG-2005) Chemical and Pharmaceutical Institute,
East
            China University of Science and Technology, Meilong Road,
Shanghai
            200237, China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1430
                     /organism="Pseudomonas aeruginosa"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:287"
     rRNA            <1..>1430
                     /product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN
        1 cggcggccta acacatgcaa gtcgagcgga tgaagggagc ttgctcctgg attcagcggc
       61 ggacgggtga gtaatgccta ggaatctgcc tggtagtggg ggataacgtc cggaaacggg
      121 cgctaatacc gcatacgtcc tgagggagaa agtgggggat cttcggacct cacgctatca
      181 gatgagccta ggtcggatta gctagttggt ggggtaaagg cctaccaagg cgacgatccg
      241 taactggtct gagaggatga tcagtcacac tggaactgag acacggtcca gactcctacg
      301 ggaggcagca gtggggaata ttggacaatg ggcgaaagcc tgatccagcc atgccgcgtg
      361 tgtgaagaag gtcttcggat tgtaaagcac tttaagttgg gaggaagggc agtaagttaa
      421 taccttgctg ttttgacgtt accaacagaa taagcaccgg ctaacttcgt gccagcagcc
      481 gcggtaatac gaagggtgca agcgttaatc ggaattactg ggcgtaaagc gcgcgtaggt
      541 ggttcagcaa gttggatgtg aaatccccgg gctcaacctg ggaactgcat ccaaaactac
      601 tgagctagag tacggtagag ggtggtggaa tttcctgtgt agcggtgaaa tgcgtagata
      661 taggaaggaa caccagtggc gaaggcgacc acctggactg atactgacac tgaggtgcga
      721 aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgtcgac
      781 tagccgttgg gatccttgag atcttagtgg cgcagctaac gcgataagtc gaccgcctgg
      841 ggagtacggc cgcaaggtta aaactcaaat gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga
      901 gcatgtggtt taattcgaag caacgcgaag aaccttacct ggccttgaca tgctgagaac
```

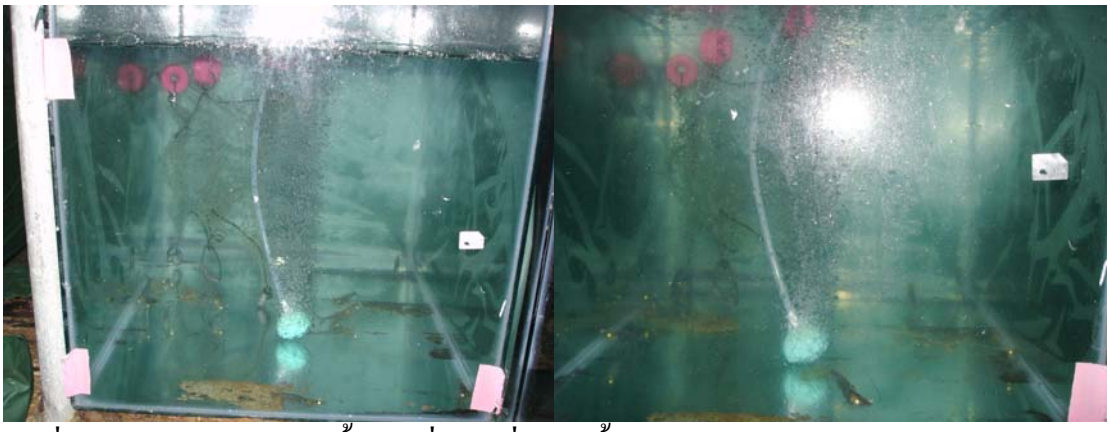
```
 961 tttccagaga tggattggtg ccttcgggaa ctcagacaca ggtgctgcat ggctgtcgtc
1021 agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc ccgtaacgag cgcaaccctt gtccttagtt
1081 accagcacct cgggtgggca ctctaaggag actgccggtg acaaaccgga ggaaggtggg
1141 gatgacgtca agtcatcatg gcccttacgg ccagggctac acacgtgcta caatggtcgg
1201 tacaaagggt tgccaagccg cgaggtggag ctaatcccat aaaaccgatc gtagtccgga
1261 tcgcagtctg caactcgact gcgtgaagtc ggaatcgcta gtaatcgtga atcagaatgt
1321 cacggtgaat acgttcccgg gccttgtaca caccgcccgt cacaccatgg gagtgggttg
1381 ctccagaagt agctagtcta accgcaaggg ggacggttac cacggagtga
```

ภาคผนวก ง

การเลี้ยงกุ้งในสภาวะจำลอง



รูปที่ 33 *Pseudomonas* sp. W3 ในอาหารเหลว FGM ที่มี 2% NaCl เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง



รูปที่ 34 สภาวะจำลองบ่อเลี้ยงกุ้งที่เวลาเริ่มต้นเลี้ยง

รูปที่ 35 สภาวะจำลองบ่อเลี้ยงกุ้งที่วันที่ 4 ของการเลี้ยง

รูปที่ 36 สภาพของกุ้งที่ตายจากชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *V. harveyi* เพียงอย่างเดียว