ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

สูตรอาหารทุกสูตรใช้ผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร

1. Minimal salt – yeast extract medium (MSYM) (ดัดแปลงจาก Nadeau *et al.*, 1994)

$NaNO_3$	4.0	กรัม
KH_2PO_4	1.5	กรัม
$FeCl_3$	0.005	กรัม
$MgSO_4$	0.2	กรัม
$CaCl_2$	0.01	กรัม
$NaHPO_4$	0.5	กรัม
ยีสต์สกัด	0.1	กรัม

การเตรียม Stock สารพารา,พารา′-ดีดีที ชั่งสารพารา,พารา′-ดีดีที 0.25 กรัม ละลายในสารละลายอะซิโตนปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 5000 ส่วนในล้านส่วน) กรองผ่านกระดาษกรองชนิดไนลอนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร ที่ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นเติมในอาหาร MSYM ให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

2. Nutrient Agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

3. Nutrient broth

สูตรและวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2 แต่ไม่เติมวุ้น

ภาคผนวก ข

การเทียบเคียงเชื้อจุลินทรีย์โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี

1. การทดสอบแคตาเลส (Catalase test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3
2. กระจกสไลด์
3. ห่วงเขี่ยเชื้อ

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหาร nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนสไลด์
3. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ เขี่ยเชื้อลงไปแล้วทำการผสมให้เข้ากัน

การวิเคราะห์

ผลบวก เกิดฟองแก๊ส

ผลลบ ไม่มีฟอง

2. การทดสอบออกซิเดส (Oxidase test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. กระดาษกรอง
2. สารละลาย tetramethyl-*p*-phenylenediamine HCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.5
3. เข็มเขี่ยเชื้อ

วิธีการ

1. วางกระดาษกรองที่อิ่มด้วยสารละลาย tetramethyl-*p*-phenylenediamine HCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.5
2. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีออกมาทดสอบ โดยลากโคโลนีไปมาบนกระดาษ

การวิเคราะห์

ผลบวก เกิดสีม่วงเข้มภายใน 10 วินาที

3. การทดสอบ MR (Methyl red test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหารเหลว MR-VP
2. methyl red

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MR-VP บ่มที่อุณหภูมิเป็นเวลา 5 วัน
2. หยด methyl red 5-6 หยดลงไปในอาหารที่มีเชื้อ 5 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์

ผลบวก สีแดง

ผลลบ เหลืองหรือส้ม

4. การทดสอบ VP (Voges-Proskauer (VP) test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหารเหลว MR-VP
2. สารละลาย naphthol ความเข้มข้นร้อยละ 5
3. สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MR-VP บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
2. ถ่ายเชื้อจากข้อ 1 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ
3. เติมสารละลาย naphthol ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร
4. เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

การวิเคราะห์

ผลบวก สีแดงภายใน 5 นาที

ผลลบ สีเหลือง

5. การทดสอบอินโดล (Indole test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหารเหลว Tryptone
2. สารละลาย Kovacs' reagent

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Tryptone
2. บ่มไว้เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย Kovacs' reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงไป

การวิเคราะห์

ผลบวก สีแดงที่ผิวชั้นบน

ผลลบ ไม่เกิดสี ถ้าเป็นสีส้มจัดเป็น variable เนื่องจาก tryptophan ถูกออกซิไดซ์เป็น skatole (methyl indole)

6. การทดสอบการใช้ซิเตรต (Citrate utilization test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหารแข็ง Simmons' Citrate agar
2. เข็มเขี่ยเชื้อ

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง Simmons' Citrate agar โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อทำเชื้อให้เป็นจุด
2. บ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (สูงสุด 7 วัน)

การวิเคราะห์

ผลบวก มีการเจริญอาหารจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

ผลลบ ไม่มีการเจริญ

7. การทดสอบการย่อยเจลาติน (Gelatin liquefaction test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหารเหลว nutrient broth
2. เจลาตินความเข้มข้นร้อยละ 12
3. สารละลาย mercuric chloride

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหาร nutrient broth ที่มีการเติมเจลาตินความเข้มข้นร้อยละ 12 โดยเลี้ยงเชื้อให้เป็นจุดที่เรียกว่า point inoculate บ่มไว้เป็นเวลา 3 วัน
2. เทสารละลาย mercuric chloride ลงไป
3. อ่านผล

การวิเคราะห์

ผลบวก เกิดวงใสรอบบริเวณที่เชื้อเจริญ

ผลลบ ไม่เกิด

8. การทดสอบการย่อยแป้ง

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหารแข็ง nutrient agar ที่มี soluble starch ร้อยละ 0.2
2. สารละลายไอโอดีน

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง nutrient agar ที่มี soluble starch ร้อยละ 0.2 บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม จนเชื้อมีการเจริญเกิดขึ้น
2. เทน้ำยาไอโอดีนลงไป แล้วอ่านผล

การวิเคราะห์

ผลบวก อาหารเป็นสีน้ำเงินแต่รอบๆ โคโลนีไม่มีสี

ผลลบ เป็นสีน้ำเงินหมด

9. การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรต (Nitrate reduction test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหารเหลว nitrate broth
2. sulfinilic acid
3. ∝- naphthylamine
4. ผงสังกะสี

วิธีการ

1. เขี่ยเชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมงลงในอาหารเหลว nitrate broth
2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. หยด sulfinilic acid และ ∝- naphthylamine
4. ถ้าเกิดสีแดงปนตะกอนแสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก
5. ถ้าไม่เกิดให้เติมผงสังกะสีลงไป

การวิเคราะห์

ผลบวก ไม่เกิดสีเนื่องจากไนเตรตถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรต์และไนโตรเจน

ผลลบ ถ้าเกิดสีแดงผลเป็นลบ

10. การทดสอบการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide (H_2S) production test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เข็มเขี่ยเชื้อ
2. อาหารแข็ง triple sugar iron agar (TSI)

วิธีการ

1. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะลงในอาหารแข็ง TSI slant โดยขีดไปขีดมาที่ผิวของพื้นเอียงแล้วแทงลงไปที่ส่วนก้นหลอด
2. บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลทุกวันจนครบ 5 วัน

การวิเคราะห์

ผลบวก - เกิดสีเหลืองเฉพาะที่ก้นหลอดส่วนผิวพื้นเอียงของอาหารจะมีสีแดงแสดงว่าเชื้อใช้ กลูโคสเพียงอย่างเดียว

- มีสีเหลืองเกิดขึ้นที่ผิวพื้นเอียงเนื่องจากเชื้อมีการใช้แลคโตสหรือซูโครสด้วย
- ถ้ามีการผลิต อาหารจะลอยขึ้นจากก้นหลอด ถ้าเชื้อผลิต H_2S จะเกิดสีดำของเฟอรัสซัลไฟด์ตามรอยที่เชื้อเจริญ

11. การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate fermentation test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหาร fermentation carbohydrate medium
2. หลอดดักแก๊ส

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหาร fermentation carbohydrate medium
2. บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
3. ตรวจผลโดยดูการเปลี่ยนสีของอาหารและดูการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส

การวิเคราะห์

ผลบวก - อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แต่ไม่มีแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าเชื้อหมักคาร์โบไฮเดรตได้เฉพาะกรด

- อาหารมีสีเหลืองและแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าเชื้อหมักในคาร์โบไฮเดรตแล้วได้กรดและแก๊ส

ผลลบ - อาหารไม่เปลี่ยนสีคือเป็นสีเขียว

12. การทดสอบการออกซิไดซ์และการหมัก (Oxidation-Fermentation test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหาร Hugh and Leifson's O-F medium
2. พาราฟิน
3. หลอดดักแก๊ส

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหาร Hugh and Leifson's O-F medium ชนิดละ 2 หลอดโดยการแทงตรงลงไปในอาหาร
2. หลอดหนึ่งให้อยู่ในสภาพขาดอากาศโดยเทพาราฟินเหลวปิดผิวหน้าประมาณ 2 เซนติเมตร
3. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 48 ชั่วโมง
4. ดูการเปรียบเทียบสีของอาหารและการเกิดแก๊ส

การวิเคราะห์

อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นเหลือง เฉพาะหลอดที่ไม่ได้เทพาราฟิน แสดงว่าเกิด oxidation แต่ถ้าเกิดเปลี่ยนสีทั้งสองหลอด แสดงว่าเป็น fermentation

สูตรอาหารที่ใช้ในการจำแนกเชื้อ

อาหารทุกสูตรใช้ผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร

1. Nutrient agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

2. Motility test medium

Tryptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	5.0	กรัม

3. Hugh and Leifson's O-F medium (pH 7.1)

Peptone	2.0	กรัม
K_2HPO_4	0.3	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	3.0	กรัม
Bromthymol blue 0.2%	15.0	กรัม

4. Nitrate broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Potassium nitrate	1.0	กรัม

5. Nutrient gelatin medium

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Gelatin	120.0	กรัม

6. Tryptone broth

Tryptone	10	กรัม

7. MR-VP medium

Buffered Peptone	7.0	กรัม
Dipotassium phosphate	5.0	กรัม
Dextrose	5.0	กรัม

pH 6.9 ที่ 25 องศาเซลเซียส

8. Simmons' citrate agar

$MnSO_4$	0.2	กรัม
$(NH_4)H_2PO_4$	1.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม

Sodium citrate	2.0	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
Agar	15.0	กรัม
pH 6.8		

9. Starch agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Potato starch	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

10. Fermentation Carbohydrate medium

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำตาล	10.0	กรัม
(กลูโคส แลกโตส ซูโครส)		
Bromthymol blue 1.6%	4.0	กรัม
pH 6.8-7.0		

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี

1. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3

H_2O_2	3.0	กรัม
H_2O	100	มิลลิลิตร

2. สารละลายเมทิลเรด (Methyl red)

Methyl red	0.8	กรัม
Ethanol 95%	300	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

3. สารละลายทดสอบไนเตรต (Nitrate test solution)

สารละลาย A:

Sulfanilic acid	0.8	กรัม
5 N acetic acid	100	มิลลิลิตร

4. Voges-Proskauer test solution

สารละลาย A (เก็บในขวดสีชา):

Alpha naphthol	10	กรัม
Ethanol 95%	100	มิลลิลิตร

สารละลาย B:

KOH	20	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

5. Bromthymol blue 1.6%

Bromthymol blue	1.6	กรัม
Ethyl alcohol	100	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

ตารางผลการทดลอง

ตารางที่ 9 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน ปริมาณและการลดลงของสารพารา,พารา′-ดีดีที และพีเอชของเชื้อที่คัดเลือกได้

Table 9. Changing of protein, *p,p′*-DDT concentration, residual *p,p′*-DDT and pH of isolated bacteria during grown in MSYM.

Isolated bacteria	hr	[Protein] (μg/ml)	[*p,p′*-DDT] (ppm)	Residual *p,p′*- DDT (%)	pH
SB001A01	0	16.4	25.1	100.0	6.6
	24	22.3	23.2	92.5	6.6
	48	45.2	20.4	81.4	6.6
	72	56.4	19.2	76.6	6.7
	120	58.2	19.2	76.6	6.7
	144	57.4	19.3	76.9	6.7
	192	57.6	18.7	74.7	6.7
	240	57.6	17.3	68.9	6.7
SB02A02	0	16.4	25.1	100.0	6.6
	24	22.3	23.2	93.2	6.6
	48	45.2	20.4	86.7	6.7
	72	56.4	19.2	89.2	6.7
	120	58.2	19.2	87.9	6.7
	144	57.4	19.3	84.8	6.7
	192	57.6	18.7	85.4	6.7
	240	57.6	17.3	80.5	6.7
SB001A10	0	18.2	24.1	100.0	6.6
	24	21.1	22.4	88.8	6.6
	48	40.2	20.9	88.2	6.7
	72	55.1	21.5	73.3	6.7
	96	90.2	21.2	65.5	6.8

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Table 9. (cont.)

Isolated bacteria	hr	[Protein] (μg/ml)	[*p,p′*-DDT] (ppm)	Residual *p,p′*- DDT (%)	pH
SB001A10	120	91.1	20.4	64.9	6.8
	144	80.0	20.6	63.9	6.8
	192	88.2	19.4	61.4	6.8
	240	80.0	19.2	62.6	6.8
SB001A12	0	16.2	26.6	100.0	6.7
	24	40.5	26.0	97.7	6.6
	48	75.1	20.9	78.5	6.7
	72	115.0	17.9	67.5	.7
	96	112.3	19.5	73.4	6.8
	120	114.9	19.0	71.5	6.8
	192	97.1	18.9	71.2	6.8
	240	98.0	18.5	69.8	6.8
SB001B05	0	25.0	25.0	100.0	6.6
	24	24.2	24.2	96.8	6.6
	48	20.8	20.8	83.0	6.6
	72	19.7	19.7	78.8	6.7
	96	19.4	19.4	77.6	6.7
	120	18.3	18.3	73.2	6.8
	144	17.4	17.4	69.6	6.8
	192	16.9	16.9	67.6	6.8
	240	17.0	17.0	67.8	6.8

ตารางที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน ปริมาณและการลดลงของสารพารา,พารา′-ดีดีทีและพีเอชของเชื้อ SB1A10 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ

Table 10. Changing of protein, *p,p′*-DDT concentration, residual *p,p′*-DDT and pH of SB1A10 during grown in MSYM at different temperature.

Temperature	hr	[Protein] (μg/ml)	[*p,p′*-DDT] (ppm)	Residual *p,p′*- DDT (%)	pH
25	0	13.0	25.3	100.0	6.6
	24	13.9	25.5	100.6	6.6
	48	17.4	24.5	96.8	6.6
	72	20.9	21.1	83.2	6.7
	96	31.7	15.6	61.7	6.7
	120	43.4	16.5	65.2	6.7
	144	41.5	16.5	65.2	6.7
	192	40.5	16.6	65.4	6.8
	240	40.0	17.5	69.0	6.8
30	0	10.7	26.3	100.0	6.6
	24	17.0	24.4	93.0	6.6
	48	38.9	16.7	63.6	6.7
	72	67.9	15.7	59.8	6.8
	96	70.9	12.2	46.5	6.8
	120	65.0	15.4	58.7	6.8
	144	68.7	15.9	60.4	6.9
	192	65.0	16.0	61.0	6.9
	240	62.5	16.0	61.0	6.8
37	0	11.5	26.2	100.0	6.6
	24	15.9	25.7	98.1	6.6
	48	42.6	20.4	77.7	6.6
	72	56.7	16.2	61.6	6.7
	96	60.3	18.0	68.5	6.7
	120	57.3	18.8	71.8	6.8
	144	56.1	18.2	69.5	6.8
	192	56.3	17.5	66.6	6.8

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Table 10. (cont.)

Temperature	hr	[Protein] (μg/ml)	[*p,p′*-DDT] (ppm)	Residual *p,p′*- DDT (%)	pH
37	240	56.7	17.4	66.4	6.8
	0	11.9	24.4	100.0	6.6
45	24	11.0	24.2	99.4	6.6
	48	12.5	23.7	97.1	6.6
	72	15.7	22.7	93.2	6.6
	96	24.0	22.0	90.3	6.6
	120	25.1	19.6	80.5	6.6
	144	22.7	19.6	80.5	6.6
	192	20.4	20.0	81.9	6.6
	240	18.2	19.8	81.3	6.6

ตารางที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน ปริมาณและการลดลงของสารพารา,พารา′-ดีดีทีและพีเอชของเชื้อ SB1A10 เมื่อเลี้ยงที่พีเอชต่าง ๆ

Table 11. Changing of protein, *p,p′*-DDT concentration, residual *p,p′*-DDT and pH of SB1A10 during grown in MSYM at different pH.

Initial pH	Hr	[Protein] (μg/ml)	[*p,p′*-DDT] (ppm)	Residual *p,p′*- DDT (%)	pH
Not	0	10.8	27.4	100.0	6.6
Adjust pH	24	15.9	23.7	86.7	6.6
	48	24.5	19.3	70.6	6.7
	72	60.9	17.9	65.4	6.7
	96	71.5	19.3	70.6	6.7
	120	67.5	17.8	65.1	6.7
	144	70.2	17.4	63.4	6.7
	192	64.5	17.3	63.1	6.7
	240	56.8	17.5	64.0	6.7
5.0	0	8.5	25.8	100.0	5.0
	24	6.9	25.0	96.9	5.0
	48	18.9	21.5	83.3	5.0
	72	31.2	21.0	81.6	5.1
	96	52.2	20.4	79.0	5.1
	120	47.5	19.4	75.3	5.1
	144	47.5	19.4	75.1	5.1
	192	37.5	19.5	75.5	5.1
	240	40.9	19.5	75.7	5.1
6.0	0	7.5	24.6	7.5	6.0
	24	8.9	25.5	8.9	6.0
	48	15.9	20.5	15.9	6.0
	72	45.5	19.7	45.5	6.1
	96	47.9	18.9	47.9	6.1
	120	44.2	18.1	44.2	6.1
	144	42.2	17.2	42.2	6.1
	192	43.2	17.3	43.2	6.1

ตารางที่ 11 (ต่อ)

Table 11. (cont.)

Initial pH	hr	[Protein] (μg/ml)	[*p,p′*-DDT] (ppm)	Residual *p,p′*- DDT (%)	pH
6.0	240	40.9	17.5	40.9	6.1
7.0	0	9.2	27.1	100.0	7.0
	24	11.5	25.1	92.7	7.0
	48	24.5	20.4	75.1	7.1
	72	71.5	19.2	70.7	7.1
	96	84.9	16.6	61.3	7.2
	120	81.1	17.0	62.6	7.2
	144	81.1	16.9	62.2	7.2
	192	64.5	16.6	61.1	7.2
	240	71.2	16.6	61.1	7.2
8.0	0	10.2	26.5	100.0	8.0
	24	18.9	25.5	96.0	8.0
	48	31.5	21.1	79.4	8.1
	72	72.5	19.8	74.7	8.1
	96	73.5	19.2	72.5	8.1
	120	70.2	18.7	70.4	8.1
	144	64.5	18.3	68.9	8.1
	192	67.9	18.1	68.1	8.1
	240	65.9	18.2	68.5	8.1
9.0	0	7.2	28.2	0	9.0
	24	6.9	27.2	1.22	9.0
	48	11.5	26.7	7.27	9.0
	72	27.9	25.0	16.67	9.1
	96	51.2	21.6	18.61	9.1
	120	44.2	21.9	17.66	9.1
	144	42.2	21.5	21.16	9.1
	192	40.5	21.5	28.50	9.1
	240	43.5	21.0	32.92	9.1

ตารางที่ 12 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน ปริมาณและการลดลงของสารพารา,พารา′-ดีดีที และพีเอชของเชื้อ SB1A10 เมื่อเลี้ยงในสารอาหารต่าง ๆ

Table 12. Changing of protein, *p,p′*-DDT concentration, residual *p,p′*-DDT and pH of SB1A10 during grown in MSYM with different substrate addition.

substrate	hr	[Protein] (μg/ml)	[*p,p′*-DDT] (ppm)	Residual *p,p′*- DDT (%)	pH
Not addition	0	14.5	23.1	100.0	7.0
substrate	24	18.2	24.0	98.4	7.1
	48	46.7	21.0	94.6	7.1
	72	89.4	15.7	77.6	7.0
	96	97.3	16.0	70.8	7.1
	120	92.6	15.4	64.5	7.1
	144	81.0	13.4	64.5	7.1
	192	76.7	14.5	57.9	7.1
	240	73.2	15.2	64.9	7.1
0.5% glucose	0	15.0	27.9	100.0	6.8
	24	103.8	24.7	88.5	6.5
	48	235.4	22.9	82.1	6.3
	72	327.1	24.5	87.8	6.0
	96	385.4	23.4	83.9	5.9
	120	358.8	23.2	83.0	5.7
	144	367.1	20.8	74.6	5.6
	192	370.4	20.6	73.8	5.6
	240	360.4	20.6	73.8	5.6
0.5% sucrose	0	16.7	23.5	100.0	7.0
	24	75.4	22.9	97.4	6.3
	48	202.1	19.5	82.9	6.1
	72	292.1	17.4	74.0	5.6
	96	328.8	16.9	72.1	5.4
	120	300.4	14.0	59.7	5.3
	144	278.8	16.2	69.1	5.3
	192	283.8	16.7	71.0	5.2
	240	279.9	16.6	70.9	5.2

ตารางที่ 12 (ต่อ)

Table 12. (cont.)

substrate	hr	[Protein] (μg/ml)	[*p,p′*-DDT] (ppm)	Residual *p,p′*- DDT (%)	pH
0.5% succinate	0	14.0	23.0	100.0	7.0
	24	13.9	23.0	100.0	7.1
	48	17.5	22.0	95.6	7.1
	72	19.5	19.7	85.6	7.0
	96	36.4	18.8	82.0	7.0
	120	39.0	19.9	86.5	7.1
	144	39.2	19.7	85.8	7.1
	192	37.5	20.0	86.9	7.0
	240	37.7	20.0	86.9	7.1
0.5% acetate	0	12.7	27.8	100.0	7.0
	24	11.2	27.8	100.0	7.1
	48	16.0	25.4	91.4	7.1
	72	20.2	27.6	99.3	7.1
	96	33.0	24.8	89.2	7.1
	120	33.1	20.8	74.8	7.1
	144	26.9	21.8	78.4	7.1
	192	27.4	23.6	84.9	7.1
	240	25.7	23.6	84.9	7.1
0.5% glycerol	0	16.2	27.1	100.0	7.0
	24	62.8	26.7	98.4	6.7
	48	209.1	25.7	94.6	6.6
	72	237.9	21.1	77.6	6.4
	96	216.3	19.2	70.8	6.3
	120	220.4	17.5	64.5	6.2
	144	212.1	17.5	64.5	6.1
	192	203.8	15.7	57.9	6.1
	240	205.4	17.6	64.9	6.1
0.5% yeast extract	0	14.2	25.6	100.0	6.9
	24	112.9	24.5	95.8	7.6

ตารางที่ 12 (ต่อ).

Table 12. (cont.)

substrate	hr	[Protein] (μg/ml)	[*p,p′*-DDT] (ppm)	Residual *p,p′*- DDT (%)	pH
0.5% yeast extract	48	272.1	21.2	82.7	7.9
	72	442.6	18.1	70.8	7.7
	96	478.0	14.5	56.6	7.9
	120	429.6	14.3	55.9	8.0
	144	464.5	14.0	54.6	8.0
	192	446.3	14.3	56.0	8.0
	240	459.0	14.7	55.3	8.1

ตารางที่ 13 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน ปริมาณและการลดลงของสารพารา,พารา′-ดีดีที และพีเอชของเชื้อ SB1A10 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSMY ผสมดีดีที ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Table 13. Changing of protein, *p,p′*-DDT concentration, residual *p,p′*-DDT and pH of SB1A10 during grown in MSYM with addition *p,p′*-DDT at different concentration

Concentration (ppm)	hr	[Protein] (μg/ml)	[*p,p′*-DDT] (ppm)	Residual *p,p′*- DDT (%)	pH
10	0	16.5	11.6	100.0	7.0
	24	195.5	8.8	68.3	7.7
	48	353.4	6.0	52.2	8.0
	72	385.3	4.6	40.0	8.2
	96	378.9	4.4	37.8	8.2
	120	352.3	4.2	36.3	8.3
	144	368.2	4.3	36.8	8.2
	192	330.7	4.2	36.5	8.2
	240	342.2	4.0	34.6	8.2
15	0	16.5	15.9	100.0	6.9
	24	210.7	14.1	78.2	7.8
	48	433.1	11.0	69.3	8.1
	72	436.6	8.1	50.9	8.2
	96	407.4	7.1	44.3	8.5
	120	393.8	7.5	47.2	8.3
	144	405.7	7.5	47.4	8.3
	192	357.9	7.7	48.1	8.3
	240	405.4	7.1	44.7	8.3
20	0	17.9	19.9	100.0	7.0
	24	73.8	18.7	77.2	7.6
	48	182.9	14.4	72.4	7.8
	72	407.8	15.6	78.2	8.1
	96	442.6	11.8	59.1	8.3
	120	400.6	11.0	55.4	8.0
	144	420.9	11.6	58.1	8.2

ตารางที่ 13 (ต่อ)

Table 13. (cont.)

Concentration (ppm)	hr	[Protein] (μg/ml)	[*p,p′*-DDT] (ppm)	Residual *p,p′*- DDT (%)	pH
20	192	412.5	10.9	54.6	8.2
	240	423.8	10.3	51.8	8.3
25	0	17.9	25.4	100.0	7.0
	24	73.8	25.5	95.9	7.7
	48	182.9	24.5	96.4	7.9
	72	432.8	19.0	74.8	8.0
	96	452.6	15.0	59.2	8.0
	120	400.6	15.7	61.8	8.3
	144	440.9	13.1	51.5	8.3
	192	445.9	15.3	60.5	8.2
	240	437.5	15.1	59.6	8.3

ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐาน

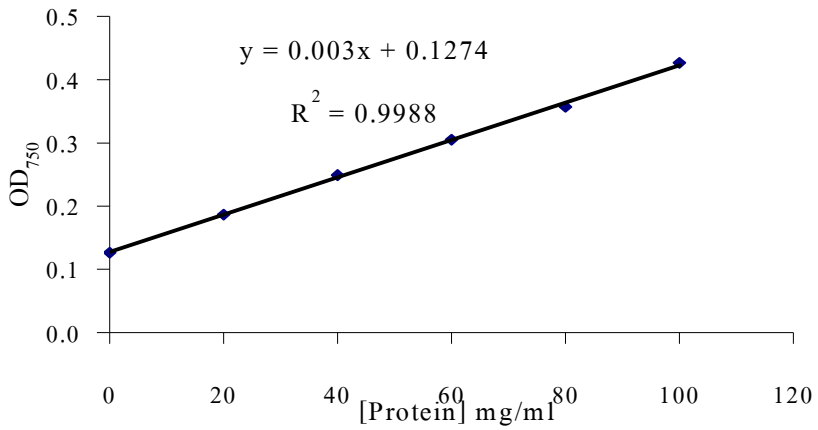
การเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน

เตรียม Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานโปรตีน ทำปฏิกิริยาตามวิธีวิเคราะห์โปรตีนบทที่ 2 ข้อ 5.2 เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร กับ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เตรียมไว้ เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนของตัวอย่างโดยนำเอาค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้แทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 14 ค่าดูดกลืนแสงของ BSA ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Table 14. Optical density of BSA at wave range 750 nanometer at different concentration

[BSA] µg/ml	OD_{750}					Average	SD
0	0.132	0.120	0.135	0.121	0.124	0.126	0.007
20	0.186	0.183	0.190	0.189	0.185	0.187	0.003
40	0.245	0.246	0.247	0.246	0.262	0.249	0.007
60	0.326	0.299	0.296	0.300	0.304	0.305	0.012
80	0.353	0.369	0.350	0.351	0.362	0.357	0.008
100	0.369	0.487	0.485	0.384	0.409	0.427	0.056

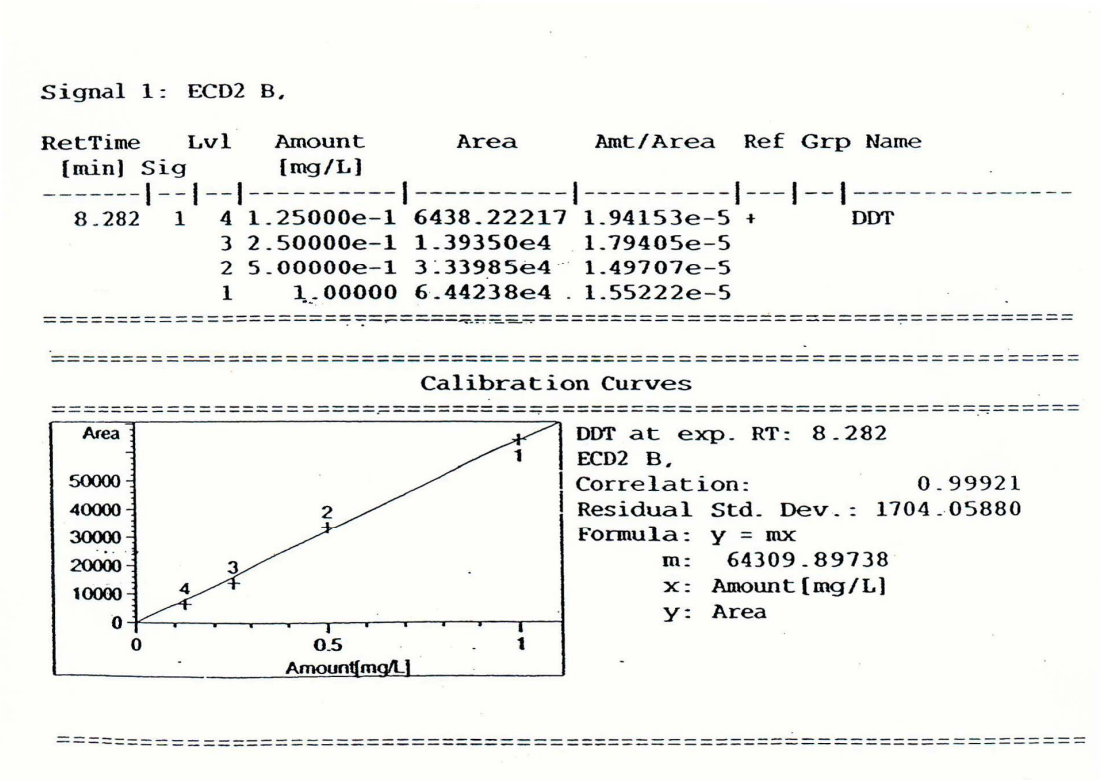


ภาพที่ 22 กราฟมาตรฐาน BSA สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

Figure 22. Standard curve of BSA for protein determination.

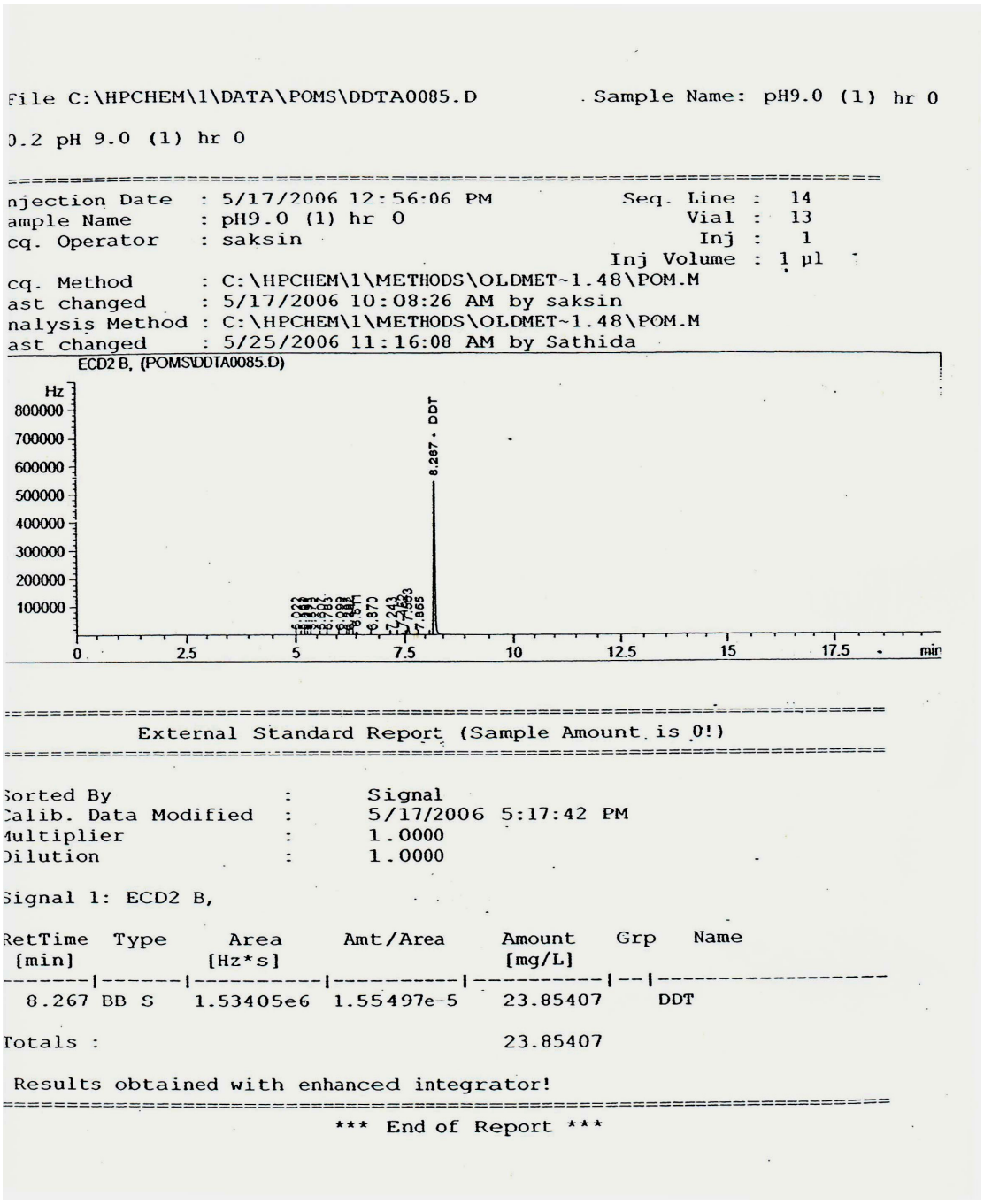
การเตรียมกราฟมาตรฐานสารพารา,พารา′-ดีดีที

เตรียมสารมาตรฐานพารา,พารา′-ดีดีทีที่ความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีทีด้วยเครื่อง GC-μECD ตามวิธีการวิเคราะห์ในบทที่ 2 ข้อ 5.3 เครื่องจะทำการวิเคราะห์และเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นออกมา แสดงในภาพที่ 23 และทำการคำนวณค่าความเข้มข้นอัตโนมัติเมื่อทำการฉีดตัวอย่างพร้อมทั้งแสดงโครมาโตแกรมของสารตัวอย่างดังแสดงในตัวอย่างในภาพที่ 24



ภาพที่ 23 กราฟมาตรฐานของสารพารา,พารา′-ดีดีทีที่ได้จากเครื่อง GC-μECD

Figure 23. Standard curve of *p,p′*-DDT from GC-μECD.



```
File C:\HPCHEM\1\DATA\POMS\DDTA0085.D          Sample Name: pH9.0 (1) hr 0

0.2 pH 9.0 (1) hr 0

==========================================================================
njection Date   : 5/17/2006 12:56:06 PM          Seq. Line :  14
ample Name      : pH9.0 (1) hr 0                    Vial :  13
cq. Operator    : saksin                             Inj :   1
                                                 Inj Volume : 1 µl
cq. Method      : C:\HPCHEM\1\METHODS\OLDMET~1.48\POM.M
ast changed     : 5/17/2006 10:08:26 AM by saksin
nalysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OLDMET~1.48\POM.M
ast changed     : 5/25/2006 11:16:08 AM by Sathida
```



```
==========================================================================
          External Standard Report (Sample Amount is 0!)
==========================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      5/17/2006 5:17:42 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: ECD2 B,

RetTime  Type     Area      Amt/Area     Amount    Grp   Name
 [min]          [Hz*s]                   [mg/L]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  8.267 BB S   1.53405e6  1.55497e-5   23.85407     DDT

Totals :                                23.85407

 Results obtained with enhanced integrator!
==========================================================================
                          *** End of Report ***
```

ภาพที่ 24 โครมาโตแกรมและผลที่แสดงจากการฉีดตัวอย่างในเครื่อง GC-µECD

Figure 24. Chromatogram and result from GC-µECD.

ภาพที่ 25 เครื่อง GC-μECD Hewlett-Packard รุ่น 6890.

Figure 25. GC-μECD Hewlett-Packard model 6890.

ภาคผนวก ง

ผลการจำแนกเชื้อด้วยวิธี 16S rDNA

TTTTGGAAGGACGAATGCTCTTTGAGTTGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAA
GACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTCGAACCGCATGGTTCGATAGTGA
AAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTAC
CAAGGCGACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATACGTGTAAGTAACTGTGCACGTC
TTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACG
GCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTG
TAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC
GCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG
TGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT
ACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT
TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACAACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCC
TTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTG
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGACAATACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTCAAGCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCG
GATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTG
AATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGCCGGTGG
AGTAACCATTGAGCAGCCTGAGTCCGCACCTCCC

ภาพที่ 26 ลำดับเบสดีเอ็นเอของเชื้อ SB1A10

Figure 26. DNA sequences of soil isolate SB1A10.

ตารางที่ 15 การเทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (SB1A10)

Table 15. Identification of isolated bacteria (SB1A10).

Phylogenetic affiliation	Related species	Accession no.	Similarity (%)
Firmicutes	*Staphylococcus haemolyticus* JCSC1435	AP006716.1	99
	Staphylococcus croceolyticus	AY953148.1	99
	Staphylococcus hominis CV21	AJ717375.1	99
	Staphylococcus sp. LMG 21006	AJ316320.1	99
	Staphylococcus lugdunensis strain Inje L2	AY903256.1	99
	Staphylococcus simiae strain CCM 7229	DQ127902.1	98
	Staphylococcus saprophyticus subsp. *saprophyticus* ATCC 15305	AP008934.1	98
	Staphylococcus aureus strain F136	DQ997835.1	98