ภาคผนวก ก

สูตรอาหารที่ใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

1. **อาหารเลี้ยงเชื้อ** (G5 medium) (Watanabe *et al.*, 1981) ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร)

Sodium-L-glutamate	4.0
DL-malic acid	3.5
KH_2PO_4	0.12
K_2HPO_4	0.18
Yeast extract	5.0
Peptone	5.0

ปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5.0 นอร์มัล กรณีที่เป็นอาหารแข็งเติมผงวุ้นร้อยละ 1.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Basal medium (Omerod *et al.*, 1961) เป็นส่วนประกอบหลักในอาหารที่ใช้จำแนกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของอาหารสูตร Omerod

	ความเข้มข้น	ปริมาณที่ใช้
Thiamine-HCl	1 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.1 มิลลิลิตรต่อลิตร
Para-aminobenzoic acid	1 มิลลิกรัมต่อลิตร	1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร
Nicotinic acid	1 มิลลิกรัมต่อลิตร	1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร
Biotin	15 ไมโครกรัมต่อลิตร	1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร

วิธีการเตรียม Stock solution

1. Thiamine-HCl (เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร)

ชั่ง Thiamine-HCl 1 กรัมละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ให้หมดก่อนจึงเติมแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 25 จนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

2. Para-aminobenzoic acid (เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร)

ชั่ง Para-aminobenzoic acid 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

3. Nicotinic acid (เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร)

ชั่ง Nicotinic acid 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

4. Biotin (เข้มข้น 0.015 มิลลิกรัมต่อลิตร)

ชั่ง Biotin 10 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ให้หมดก่อนจึงเติมแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 25 จนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3. **Sulfide medium** (Watanabe *et al.*, 1981)

Na_2S	0.1	กรัม
$NaHCO_3$	0.2	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	0.132	กรัม

Basal medium (องค์ประกอบและความเข้มข้นตามที่ระบุในข้อ 1)

น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
พีเอช	6.8	

บรรจุอาหารใส่หลอดทดสอบหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. **อาหารที่ใช้ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเจลาติน** (Watanabe *et al.*, 1981)

ประกอบด้วยอาหารเหลวสูตร G5 ที่เติมเจลาตินร้อยละ 12 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับพีเอชเป็น 6.8 บรรจุอาหารใส่หลอดทดสอบหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. **อาหารที่ใช้ทดสอบความต้องการวิตามิน** (Watanabe *et al.*, 1981)

ประกอบด้วย Basal medium เป็นองค์ประกอบหลัก และเพิ่มสารอาหารต่อไปนี้

DL-malate	0.426	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	0.132	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ทดสอบความต้องการวิตามิน 5 ชนิด คือ วิตามินบี 12, ไบโอติน, กรดอะมิโนเบนโซอิก, ไทอามิน อย่างละ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดนิโคตินิก 15 ไมโครกรัมต่อลิตร สูตรอาหารเตรียมได้โดยงดเติมวิตามินชนิดที่ต้องการทดสอบลงใน Basal medium และเติมวิตามินที่เหลืออีก 4 ชนิด ปรับพีเอชเป็น 6.8 บรรจุอาหารใส่หลอดทดสอบหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. **สารอาหารที่ใช้ทดสอบความต้องการสารอาหาร** (Watanabe *et al.*, 1981)

สารอาหารที่ทดสอบมีดังนี้ อะซิเตท, โพพิโอเนต, บิวทิเรต, ไพรูเวท, แลคแตท, มาเลท, ซัคซิเนต, ฟูมาเรต, ทาทาเรต, ซิเทรต, กลูตาเมต, เบนโซเอต, กลูโคส, ฟรุคโทส, แมนโนส, แมนิทอล, ซอร์บิทอล, กลีเซอรอล, เมทธานอล, เอทธานอล และไธโอซัลเฟต

สูตรอาหารประกอบด้วย

แหล่งสารอาหาร (ชนิดละ)	0.5	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	0.132	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
พีเอช	6.8	

บรรจุอาหารใส่หลอดทดสอบหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. **อาหารที่ใช้ทดสอบการเคลื่อนที่**

ใช้อาหารสูตร G5 ที่เติมวุ้นร้อยละ 0.2 บรรจุในหลอดทดสอบที่มีแท่งแก้วปลายเปิดบรรจุอยู่ เทอาหารให้ต่ำกว่าหลอดแก้วปลายเปิด นำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. **การหาน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง** (Noparatnarapom *et al.*, 1986)

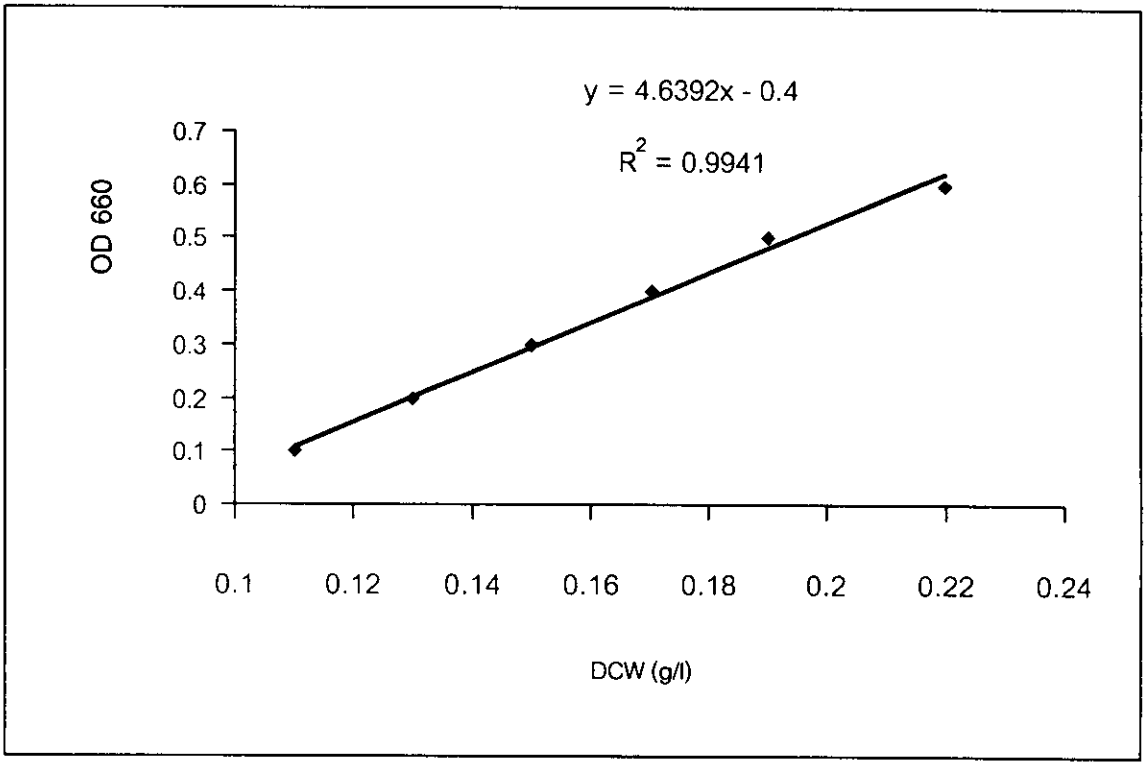
วัสดุอุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ
2. ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 103 องศาเซลเซียส
3. เดซิกเคเตอร์
4. เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง
5. เครื่องเหวี่ยง
6. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

วิธีการวิเคราะห์

1. นำจานเพาะเชื้ออบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมงแล้วนำออกใส่ในเดซิกเคเตอร์ เมื่อเย็นเท่าอุณหภูมิห้อง นำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง ทำซ้ำจนน้ำหนักคงที่
2. เลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในอาหารที่ใช้ทดลองจนเซลล์เจริญสูงสุดนำเซลล์เจือจางด้วยน้ำกลั่น วัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความขุ่นเท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 ส่วน blank เตรียมโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนเดียวกับตัวอย่าง
3. นำเซลล์ที่ระดับความขุ่นต่างๆ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร โดยแต่ละความขุ่นทำ 3 ซ้ำ เหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง
4. นำเซลล์ใส่ในจานเพาะเลี้ยงแล้วอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

5. นำจานเพาะเชื้อ ใส่ในเดซิกเคเตอร์ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งละเอียด ทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่
6. บันทึกค่าความขุ่นกับน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ (กรัมต่อลิตร) และพล็อตกราฟของค่าที่ได้เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณน้ำหนักแห้ง



ภาพผนวกที่ 20 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ที่เลี้ยงในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37°ซ

App. Fig. 20 Standard curve of dry cell weight from *Rhodobacter capsulatus* SS3 cultivated in glutamate-malate+3% NaCl under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°C

2. **ชนิดแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์** (Pfennig, 1969)

วัสดุอุปกรณ์

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

สารเคมี

สารละลายซูโครสเข้มข้นร้อยละ 60 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

วิธีการวิเคราะห์

1. นำเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่อยู่ในระยะเจริญเต็มที่ใส่ในสารละลายน้ำตาลซูโครส (ปริมาณมากพอที่จะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงได้) ผสมให้เซลล์กระจายทั่ว

2. นำสารละลายเซลล์มาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์โดยวิธี Scanning ความยาวคลื่นตั้งแต่ 370-900 นาโนเมตร ใช้สารละลายน้ำตาลซูโครสเป็น blank ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะเป็นตัวบ่งบอกชนิดของแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์

3. **การหาปริมาณการผลิต** ALA **ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง**

การเตรียมกราฟมาตรฐาน ALA (Sasaki *et al.*, 1987)

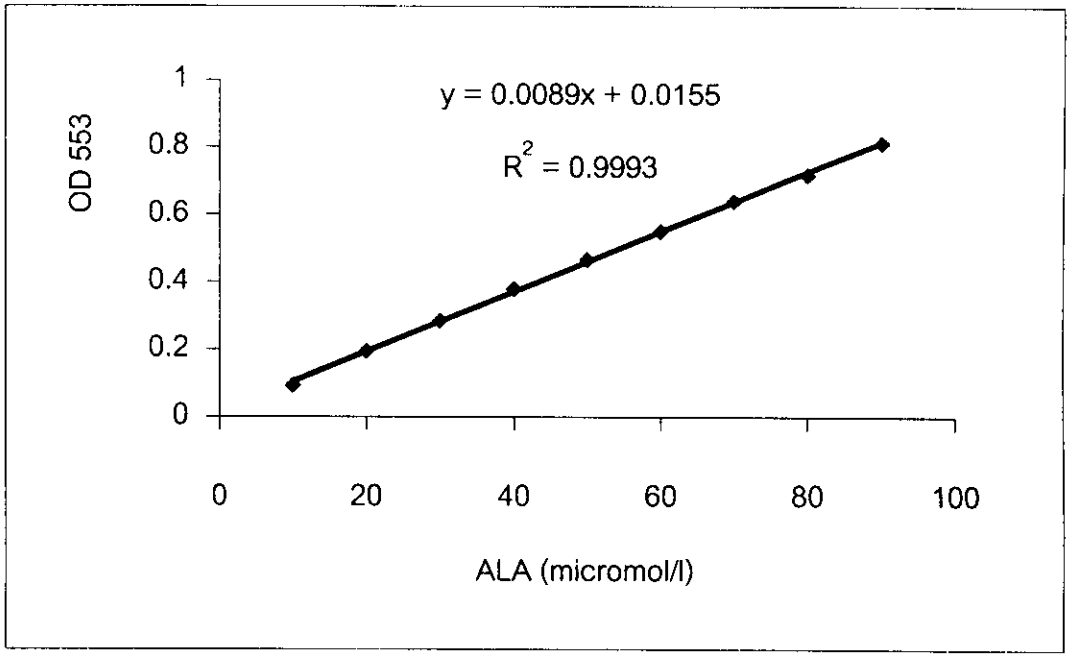
สารเคมี

1. Acetate buffer 1 M pH 7.4
2. Acetylacetone
3. ρ-dimethyl-aminobenzaldehyde (DMAB)
4. Glacial acetic acid
5. 70% perchloric acid

วิธีการวิเคราะห์

1. นำสารละลาย ALA มาตรฐานที่เจือจางอย่างเหมาะสม
2. เติม 1 มิลลิลิตรเติม acetate buffer 1 M (pH 7.4) 2 มิลลิลิตร
3. เติมอะซีติลอะซีโตน 0.05 มิลลิลิตร
4. นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที
5. ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว

6. เติม modified Ehrlish's reagent 3.5 มิลลิลิตร
7. ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 553 นาโนเมตร
8. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ ALA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 553 นาโนเมตร



ภาพผนวกที่ 21 กราฟมาตรฐานในการคำนวณปริมาณ ALA

App. Fig 21. Starndard curve of ALA

4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry *et al.*, 1951)

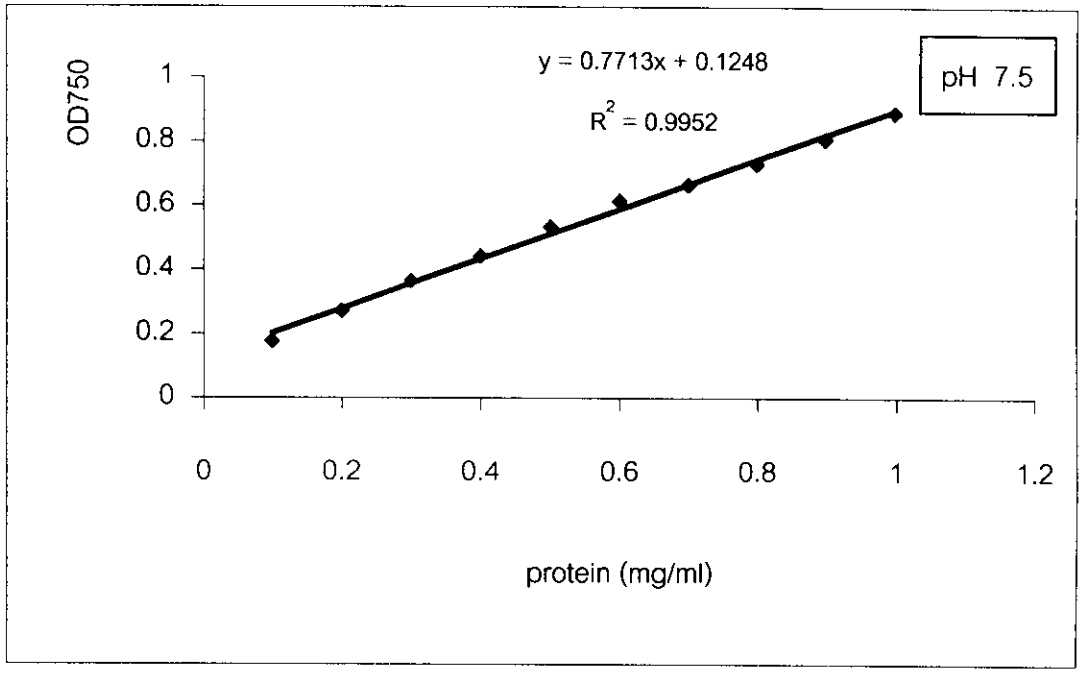
สารเคมี

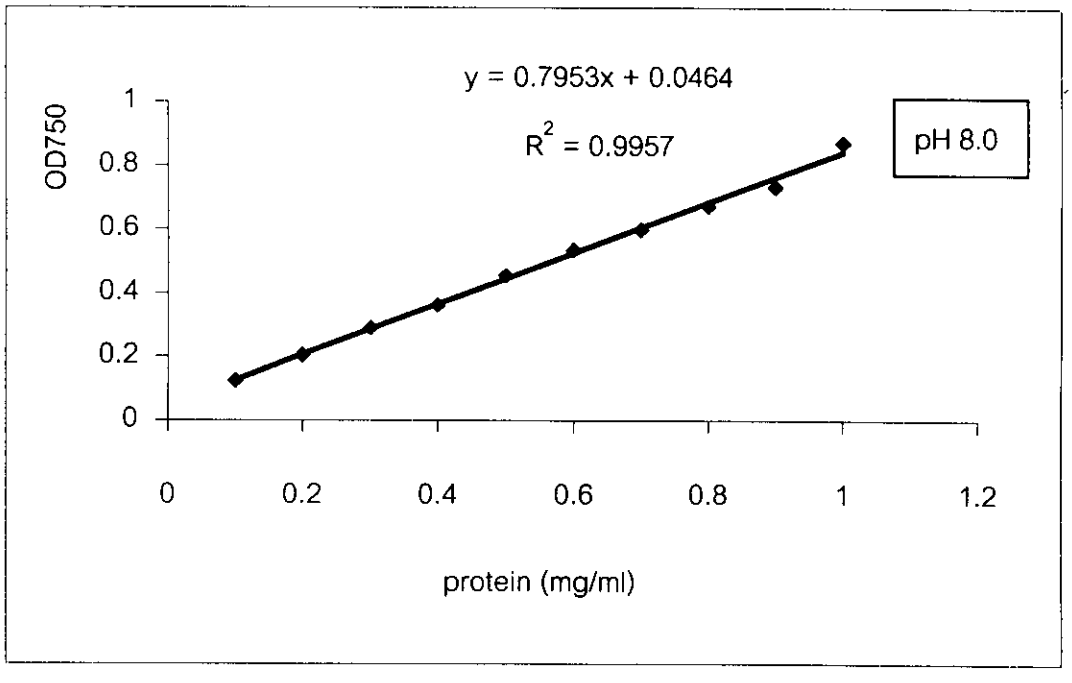
A : 1% $CuSO_4.5H_2O$ ผสม 1% sodium potassium tartrate ผสม 2% Na_2CO_3 in 0.1 M NaOH อัตราส่วน 1 : 1 : 98

B = folin reagent ผสมน้ำอัตราส่วน 1 : 1

วิธีการ

1. นำสารละลายตัวอย่างที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย A 2.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
2. เติมสารละลาย B 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน
3. เตรียมกราฟมาตรฐานโดย
   1.1.1 ชั่ง Bovine Serum Albumin 25 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยบัฟเฟอร์ 25 มิลลิลิตรสารละลายที่ได้ คือ สารละลาย BSA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution
   1.1.2 เตรียมสารละลาย BSA เข้มข้น 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วหาปริมาณโปรตีนตามขั้นตอน ข้อ 1-2
   1.1.3 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร





ภาพผนวกที่ 22 กราฟมาตรฐานโปรตีนในบัฟเฟอร์พีเอช 7.5 และพีเอช 8.0

App. Fig. 22 Standard curve of protein in buffer pH 7.5 and 8.0