

## ภาคผนวก ก.

## สูตรอาหารที่ใช้จำแนกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

1. Basal medium (Ormerod *et al.*, 1961) เป็นส่วนประกอบหลักในอาหารที่ใช้จำแนกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของอาหารสูตร Ormerod (Ormerod medium) ประกอบด้วย

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

## วิธีเตรียม stock solution

- Thiamine-HCl (เข้มข้น 1 ส่วนในล้านส่วน)  
ชั่ง Thiamine-HCl 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ให้หมดก่อนจึงเติมแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 25 จนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร
- Para-aminobenzoic acid (เข้มข้น 1 ส่วนในล้านส่วน)  
ชั่ง Para-aminobenzoic acid 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร
- Nicotinic acid (เข้มข้น 1 ส่วนในล้านส่วน)  
ชั่ง Nicotinic acid 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร
- Biotin (เข้มข้น 0.015 ส่วนในล้านส่วน)  
ชั่ง Biotin 10 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ให้หมดก่อนจึงเติมแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 25 จนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

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

Na <sub>2</sub> S	0.1	กรัม
NaHCO <sub>3</sub>	0.1	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.132	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
Basal medium (องค์ประกอบและความเข้มข้นตามระบุไว้ในข้อ 1.)		
พีเอช	6.8	

บรรจุอาหารใส่หลอดทดสอบหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

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

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.1	กรัม
NaHCO <sub>3</sub>	0.2	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.132	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
Basal medium (องค์ประกอบและความเข้มข้นตามระบุไว้ในข้อ 1.)		
พีเอช	6.8	

บรรจุอาหารใส่หลอดทดสอบหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

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

ประกอบด้วยอาหารเหลวสูตรกลูตามัท-อะซีเตท ที่เติมเจลาตินร้อยละ 12 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับพีเอชเป็น 6.8 บรรจุอาหารใส่หลอดทดสอบหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

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

ใช้ Basal medium เป็นองค์ประกอบหลักและเพิ่มเติมสารต่อไปนี้		
DL-malate	0.426	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.132	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ทดสอบความต้องการวิตามิน 5 ชนิด (วิตามินบี 12, ไบโอดีน, กรดอะมิโนเบนโซอิก, ไทอามีน ชนิดละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดนิโคตินิก 15 ไมโครกรัมต่อลิตร) สูตรอาหารเตรียมได้ โดยเติมวิตามินชนิดที่ต้องการตรวจสอบลงใน Basal medium และเติมวิตามินที่เหลืออีก 4 ชนิด ปรับพีเอชเป็น 6.8 บรรจุอาหารใส่หลอดทดสอบหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 6. อาหารที่ใช้ทดสอบความต้องการสารอาหาร (Watanabe *et al.*, 1981)

แหล่งสารอาหาร (แต่ละชนิด)	0.5	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.132	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
พีเอช	6.8	

บรรจุอาหารใส่ในหลอดทดสอบหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และสารอาหารที่ทดสอบมีดังนี้ อะซิเตท, เบนโซเอท, ซิเตรท, โพรพิโอเนท, แล็กเตท, มาเลท, ซักซิเนท, ทาเทรท, กลูตามัท, กลูโคส, ฟลูคโตส, แมนนิทอล, ซอบิทอล และ กลีเซอรอล

#### 7. Succinate medium

Sodium succinate	1	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.33	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.33	กรัม
NH <sub>4</sub> Cl	0.5	กรัม
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.05	กรัม
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.33	กรัม
NaCl	0.33	กรัม
ยีสต์สกัด	0.02	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
พีเอช	6.8-7.2	

บรรจุอาหารใส่หลอดทดสอบหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ GM medium ประกอบด้วย

Sodium-L-glutamate	3.8	กรัม
DI-malic acid	2.7	กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.5	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.8	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.053	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0012	กรัม
ยีสต์สกัด	2.0	กรัม
Basal medium (องค์ประกอบและความเข้มข้นตามระบุไว้ในข้อ 1.)		
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ฟิเอช	7	

ปรับฟิเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 นอร์มัล กรณีที่เป็นอาหารแข็งเติมผงวุ้น 15 เปอร์เซ็นต์นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ GA medium สำหรับการผลิต PHB ประกอบด้วย

Sodium-L-glutamate	3.8	กรัม
Sodium acetate	3.24	กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.5	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.8	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.053	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0012	กรัม
ยีสต์สกัด	2.0	กรัม
Basal medium (องค์ประกอบและความเข้มข้นตามระบุไว้ในข้อ 1.)		
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ฟิเอช	7	

ปรับพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 นอร์มัล กรณีที่เป็นอาหารแข็งเติม  
ผงวุ้น 15 เปอร์เซ็นต์นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ข

## 1. การย้อมสี Sudan black

## วัสดุอุปกรณ์

## สารละลาย 1 ประกอบด้วย

Sudan black (IV)	0.3	กรัม
Ethanol 60%	100	มิลลิลิตร

## สารละลาย 2 ประกอบด้วย

Safranin	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

## วิธีการ

เตรียม smear ดังนี้ กระจกถ่ายเชื้อจาก broth ใช้ broth 1 loop หยดบนสไลด์ที่สะอาด กระจกใช้จูลินทรีจาก agar ให้นำมาผสมกับน้ำหรือน้ำเกลือ 1 หยด จากนั้นใช้ loop เกลี่ยเชื้อให้แผ่เป็นแผ่นฟิล์มบางๆ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร โดยวน loop ไปทางเดียวกัน ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ จากนั้น Fixation โดยผ่านสไลด์ (ให้รอย smear อยู่ด้านบน) ไปมา 4-5 ครั้งเหนือเปลวไฟของตะเกียง

หยดสารละลาย 1 ปล่อยให้แห้งในอากาศเป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำซบให้แห้ง จากนั้น หยดสารละลาย 2 ทิ้งไว้ 10 วินาที ล้างด้วยน้ำปล่อยให้แห้ง สังเกตเกรนูลสีน้ำเงินถึงดำ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ bright-field objective lens

2. ค่าการดูดกลืนแสงของรงควัตถุสำหรับสังเคราะห์แสงชนิดต่างๆ (Staley *et al.*, 1989)

Bacteriochlorophyll	Characteristic absorption maxima in living cell (nm)
<i>a</i>	375, 590, 805, 830-890
<i>b</i>	400, 605, 835-850, 1020-1030
<i>c</i>	Long wavelength abs. max. 745-755
<i>d</i>	Long wavelength abs. max. 710-740
<i>e</i>	Long wavelength abs. max. 700-710
<i>g</i>	370, 419, 575, 670, 788