รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เจษฎา โพธิรัตน์. 2541. การคัดเลือกเชื้อดีไนตริไฟอิงค์แบคทีเรีย เพื่อลดไนเทรตในน้ำ. วิทยาปฏิบัติ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2544. การกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทางชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย.

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์. ภาควิชาจุลชีววิทยา. 2536. จุลชีววิทยาปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โยธิน สุริยพงศ์. 2542. โครงการตำราวิชาการราชภัฏเฉลิมพระเกียรติ เนื่องในวโรกาสพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมพรรษา 6 รอบ: พื้นฐานทางวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม. นครราชสีมา: โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏนครราชสีมา.

โรงงานอุตสาหกรรม, กรม. 2545. ตำราระบบบำบัดมลพิษน้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย.

สมศักดิ์ วังใน. 2524. จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุธีลา ตุลยะเสถียร, โกศล วงศ์สวรรค์ และ สถิต วงศ์สวรรค์. 2544. มลพิษสิ่งแวดล้อม (ปัญหาสังคมไทย). กรุงเทพมหานคร: รวมสาส์น(1977).

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Alexander, M. 1997. Introduction to soil microbiology. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K., eds. 1996. Current protocols in molecular biology. 3 Vols. New York: Wiley-Liss, Inc.

Beishir, L. 1996. Microbiology in practice: A self-instructional laboratory course. 6th ed. New York: HarperCollins College Publishers.

Bitton, G. 1999. Wastewater microbiology. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, Inc.

Braker, G., Fesefeldt, A., and Witzel, K.-P. 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3769-3775

Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A. H., and Tiedje, J. M. 2000. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific northwest marine sediment communities. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2096-2104

Delwiche, C. C. 1981. Denitrification, nitrification, and atmospheric nitrous oxide. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Casciotti, K. L., and Ward, B. B. 2001. Dissimilatory nitrite reductase genes from autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2213-2221

Conville, P. S., Fischer, S. H., Cartwright, C. P., and Witebsky, F. G. 2000. Identification of *Nocardia* species by restriction endonuclease analysis of amplified portion of the 16s rRNA gene. J. Clin. Microbiol. 38: 158-164

Coyne, M. S., Arunakumari, A., Averill, B. A., and Tiedje, J. M. 1989. Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd_1 and nonheme copper nitrite reductase in denitrifying bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2924-2931

Finegold, S. M., Martin, W. J., and Scott, E. G. 1978. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 5th ed. Saint Louis: Mosby.

Glockner, A. B., Jüngst, A., and Zumft, W. G. 1993. Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome cd_1-free background ($NirS^-$) of *Pseudomonas stutzeri*. Arch.

Microbiol. 160: 18-26 Cited in Hallin, S., and Lindgren, P.-E. 1999. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1652-1657

Grüntzig, V., Nold, S. C., Zhou, J., and Tiedje, J. M. 2001. *Pseudomonas stutzeri* nitrite reductase gene abundance in environmental samples measured by real-time PCR. Appl. Environ. Microbiol. 67: 760-768

Hall, J. B. 1978. Nitrate-reducing bacteria. pp. 296-298. Cited in Schlessinger, D., ed. 1978. Microbiology. USA: American society for microbiology

Hallin, S., and Lindgren, P.-E. 1999. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1652-1657

van Hartingsveldt, J., and Stouthamer, A. H. 1973. Mapping and characterization of mutants of *Pseudomonas aeruginosa* affected in nitrate respiration in aerobic or anaerobic growth. J. Gen. Microbiol. 74: 97-106 Cited in Vollack, K.-U., Xie, J., Härtig, E., Römling, U. and Zumft, W. G. 1998. Localization of denitrification genes on the chromosomal map of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology. 144: 441-448

Jayakumar, D. A., Francis, C.A., Naqvi, S. W. A., and Ward, B.B. 2004. Diversity of nitrite reductase genes (*nirS*) in the denitrifying water column of the coastal Arabian sea. Aquatic Microbial Ecology. 34: 69-78.

Jeter, R. M., Sias, S.R., and Ingraham, J. L. 1984. Chromosomal location and function of genes affecting Pseudomonas aeruginosa nitrate assimilation. J. Bacteriol. 157: 673-677

Kobayashi, M., and Shoun, H. 1995. The copper-containing dissimilatory nitrite reductase involved in the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*. J. Biol. Chem. 270: 4146-4151

Michotey, V., Méjean, V., and Bonin, P. 2000. Comparison of methods for quantification of cytochrome cd_1-denitrifying bacteria in environmental marine samples. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1564-1571

Nei, M., and Li, W.-H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 5269-5273.

van Pelt, C., Verduin, C. M., Goessens, W. H. F., Vos, M. C., Tümmler, B., Segonds, C., Reubsaet, F., Verbrugh, H., and van Belkum, A. 1999. Identification of *Burkholderia* spp. in the clinical microbiology laboratory: Comparison of conventional and molecular methods. J. Clin. Microbiol. 37: 2158-2164

Philippot, L., Mirleau, P., Mazurier, S., Siblot, S., Hartmann, A., Lemanceau, P., and Germon, J. C. 2001. Characterization and transcriptional analysis of *Pseudomonas fluorescens* denitrifying clusters containing the *nar*, *nir*, *nor* and *nos* genes. Biochim. Biophys. Acta. 1517: 436-440

Priemé A., Braker, G., and Tiedje, J. M. 2002. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragment in forested upland and wetland soil. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1893-1900

Schwintner, C., Sabaty, M., Berna, B., Cahors, S., and Richaud, P. 1998. Plasmid content and localization of the genes encoding the denitrification enzymes in two strains of *Rhodobacter sphaeroides*. FEMS Microbiol. Lett. 165: 313-321

Shoun, H.,Kano, M., Baba, I., Takaya, N. and Matsuo, M. 1998. Denitrification by Actinomycetes and purification of dissimilatory nitrite reductase and azurin from *Streptomyces thioluteus*. J. Bacteriol. 180: 4413-4415

Sias, S. R., Stouthamer, A. S., and Ingraham, J. L. 1980. The assimilatory and dissimilatory nitrate reductase of *Pseudomonas aeruginosa* are encoded by different genes. J. Gen. Microbiol. 118: 229-234. Cited in Bitton, G. 1999. Wastewater Microbiology. 2nd ed. USA: Wiley-Liss, Inc.

Smith, G. B., and Tiedje, J. M. 1992. Isolation and characterization of a nitrite reductase gene and its use as probe for denitrifying bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58: 376-384

Tiedje, J. M. 1988. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. pp. 179-244. In: Zehnder, A. J. B. ed. Biology of anaerobic microorganisms. John Wiley & sons, New York. Cited in Bitton, G. 1999. Wastewater Microbiology. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, Inc.

Taroncher-Oldenburg, G. 2003. Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. Appl. Environ. Microbiol. 69: 1159-1171

Ward, B. B., Cockcroft, A. R., and Kilpatrick, K. A. 1993. Antibody and DNA probes for detection of nitrite reductase in seawater. J.Gen. Microbiol. 139: 2285-2293.

Wistreich, G. A., and Lechtman, M. D. 1988. Laboratory exercises in microbiology. 6th ed. New York: Macmillan Publishing Company.

Zumft, W. G. 1992. The denitrifying procaryotes, p. 554-582. In Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H. ed. The Procaryotes. New York: Springer Verlag. Cited in Hallin, S. and Lindgren, P.-E. 1999. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1652-1657

Zumft, W. G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 533-616

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **Nutrient agar** (Schalau)

Nutrient agar	28.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

2. **Nutrient broth** (Difco)

Nutrient broth	8.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

3. **Nitrate agar**

K_2HPO_4	0.5	กรัม
Nacl	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
KNO_3	2.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0

4. **Nitrate broth** (ดัดแปลงจาก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, 2536)

K_2HPO_4	0.5	กรัม
Nacl	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
KNO_3	2.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข.

สารละลาย (Solution) และสารทดสอบ (Reagent)

1. การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเทรต

1.1 การทดสอบไนไทรต์ (Wistreich และ Lechtman, 1988; Beishir, 1996)

1.1.1 สารละลายกรดซัลฟานิลิก

Sulfanilic acid	8.0	กรัม
5 N acetic acid	1.0	ลิตร

1.1.2 α-naphthylamine reagent

α-naphthylamine	5.0	กรัม
5 N acetic acid	1.0	ลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.1.3 กรดอะซีติกความเข้มข้น 5 N (5 N acetic acid)

Acetic acid	294.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	706.0	มิลลิลิตร

วิธีทดสอบ : ปิเปตเชื้อที่บ่มอยู่ในอาหาร nitrate broth 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง หยดสารละลายกรดซัลฟานิลิก 3 หยด และ α-naphthylamine reagent 3 หยด ลงในหลอดทดลอง เขย่าเบาๆ บันทึกผลหลังจากทิ้งไว้ 30 วินาที

ผลบวก (Positive) : เกิดสีแดงหรือสีน้ำตาลแดงขึ้น (อาจมีตะกอนปนด้วย) แสดงว่ามีการรีดิวซ์ไนเทรตไปเป็นไนไทรต์

ผลลบ (Negative) : ไม่เกิดสี อาจเกิดจากไม่มีการรีดิวซ์ไนเทรตไปเป็นไนไทรต์ หรืออาจมีการรีดิวซ์ไนไทรต์ไปเป็นสารอื่นในกระบวนการดีไนทริฟิเคชันจนหมดแล้ว

1.2 การทดสอบไนเทรต (Wistreich และ Lechtman, 1988; Beishir, 1996)

วิธีทดสอบ : เติมผงสังกะสีลงในหลอดทดลองที่ทดสอบไนไทรต์แล้วให้ผลเป็นลบ หลอดละประมาณ 20 มิลลิกรัม

ผลบวก (Positive) : เกิดสีแดงหรือสีน้ำตาลแดงขึ้น (อาจมีตะกอนปนด้วย) แสดงว่าในอาหารยังคงมีไนเทรต สังกะสีที่เติมลงไปจะรีดิวซ์ไนเทรตไปเป็นไนไทรต์ทำให้เกิดสีขึ้น

ผลลบ (Negative) : ไม่เกิดสี แสดงว่าไม่มีไนเทรตเหลืออยู่ในอาหารแล้ว ไนเทรตถูกรีดิวซ์ไปเป็นไนไทรต์ และไนไทรต์ก็ถูกรีดิวซ์ไปเป็นสารอื่นในกระบวนการดีไนทริฟิเคชันจนหมดแล้ว

1.3 การทดสอบแอมโมเนีย (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, 2536)

1.3.1 Nessler's reagent

ละลายโปแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) 50 กรัม ในน้ำกลั่นเย็นปริมาตร 35 มิลลิลิตร เติมสารละลายอิ่มตัวของเมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) ลงไปจนกระทั่งตกตะกอนเล็กน้อย เติมสารละลาย 50% KOH ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงไป แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำส่วนใสไปใช้

วิธีทดสอบ : ปิเปตเชื้อที่บ่มอยู่ในอาหาร nitrate broth 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง หยด Nessler's reagent 2-3 หยด ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน

ผลบวก (Positive) : เกิดตะกอนสีเหลืองถึงสีน้ำตาล แสดงถึงปริมาณแอมโมเนียจากน้อยไปมาก

ผลลบ (Negative) : ไม่เกิดสีเหลืองหรือตะกอนดังกล่าว

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

2.1 การย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, 2536)

2.1.1 Crystal violet

สารละลาย A

Crystal violet (85% dye)	2.0	กรัม
Ethyl alcohol 95%	20.0	มิลลิลิตร

ละลายสีในแอลกอฮอล์จนสีละลายหมด

สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนการใช้ และถ้าสีเข้มเกินไป อาจเจือจางสารละลาย A เป็น 1:10 ก่อนผสมกับสารละลาย B

2.1.2 Safranin O counterstain (stock solution)

Safranin O	2.5	กรัม
Ethyl alcohol 95%	100.0	มิลลิลิตร

ถ้าจะใช้สีในการย้อม ให้เจือจางเป็น 1 : 100 (stock safranin 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร) ถ้ามีตะกอน ให้กรองก่อนใช้ทุกครั้ง

2.1.3 Gram's iodine solution (mordant)

Iodine (crystal)	1.0	กรัม
Potassium iodide (KI)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

ละลาย iodine และ KI ในน้ำกลั่นปริมาณน้อยๆก่อน แล้วเติมน้ำให้ครบ เก็บไว้ในขวดสีชา

วิธีทดสอบ : ทำความสะอาดกระจกสไลด์ และเช็ดให้แห้ง ใช้ลวดเขี่ยเชื้อแตะน้ำ 1-2 ลูป ลงบนกระจกสไลด์ เขี่ยเชื้อเพียงเล็กน้อยแตะลงบนหยดน้ำ แล้วแผ่กระจาย (smear) เชื้อให้ทั่วหยดน้ำ ทิ้งให้รอยสเมียร์แห้งเอง ตรึงรอยสเมียร์ โดยลนผ่านเปลวไฟอ่อนๆ 2-3 ครั้ง หยดสีคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีที่เหลือค้างบนกระจกสไลด์ทิ้ง แล้วชะด้วยสารละลายไอโอดีน (Iodine solution) หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยแผ่เชื้อ ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95% (95% ethanol) ซึ่งใช้เป็น decolorizing agent จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา แต่อย่าให้เกิน 20 วินาที แล้วล้างน้ำทันที โดยให้น้ำผ่านเบาๆ ซับด้วยกระดาษซับ แล้วย้อมทับด้วยการหยดสีซาฟานินโอ (Safanin O) ซึ่งเป็น counter stain ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งให้แห้ง นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.2 การทดสอบออกซิเดส (Oxidase test) (Finegold, Martin และ Scott, 1978)

2.2.1 1% Tetramethyl paraphenylene diamine dihydrochloride (TMPD)

Tetramethyl paraphenylene diamine dihydrochloride	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	10.0	มิลลิลิตร

เติมสี TMPD ลงในน้ำ แล้วทิ้งไว้ 15 นาทีก่อนนำไปใช้ ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ เนื่องจากสีจะเสียสภาพภายใน 2 ชั่วโมง หลังจากเตรียม

วิธีทดสอบ : **หยด** 1% tetramethyl paraphenylene diamine hydrochloride **ลงบน** กระดาษกรองที่ตัดขนาดเท่ากับกระจกสไลด์ **ให้ซึมพอหมาดๆ ใช้ไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อแล้ว** แตะเชื้ออายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง ลากลงบนกระดาษกรองดังกล่าว

ผลบวก (Positive) : เกิดสีม่วงเข้มขึ้นตามรอยลาก ภายใน 5-10 วินาที

ผลลบ (Negative) : ไม่เกิดสีม่วงเข้มขึ้น

2.3 การทดสอบคาทาเลส (Catalase test) (ดวงพร คันธโชติ, 2537)

วิธีทดสอบ : หยดไฮโดรเจนเพอร์รอกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 3% ลงบนกระจกสไลด์ ใช้ลวดเขี่ยเชื้อแตะเชื้อ แล้วแตะลงบนไฮโดรเจนเพอร์รอกไซด์

ผลบวก (Positive) : เกิดฟอง

ผลลบ (Negative) : ไม่เกิดฟอง

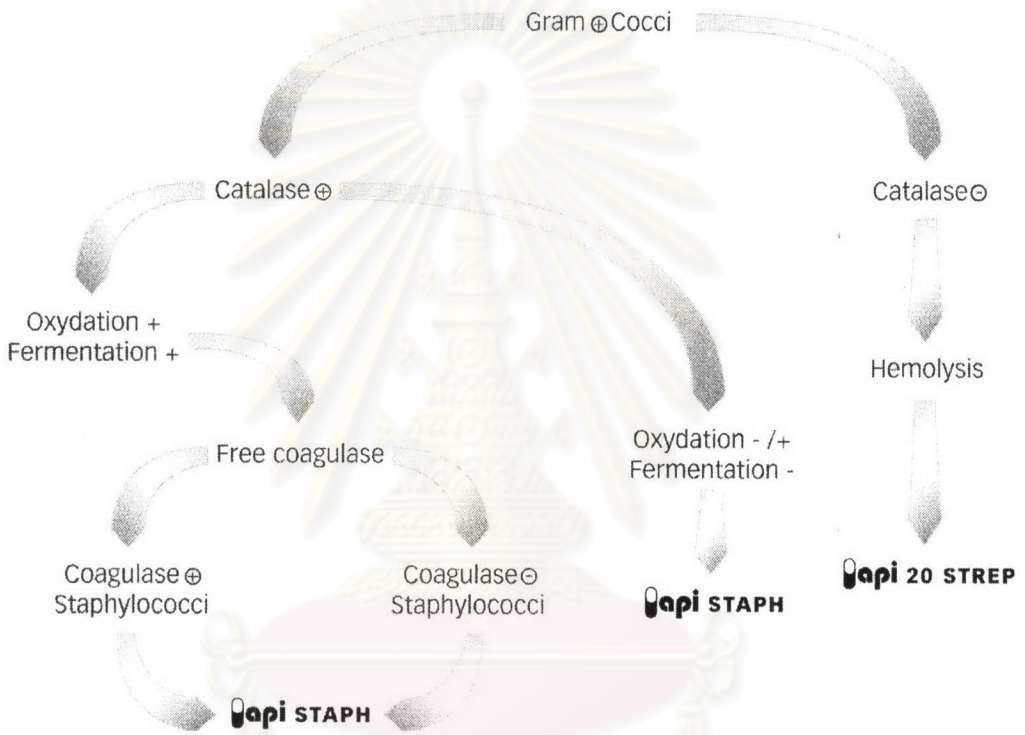
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค.

ชุดทดสอบ (Kit)

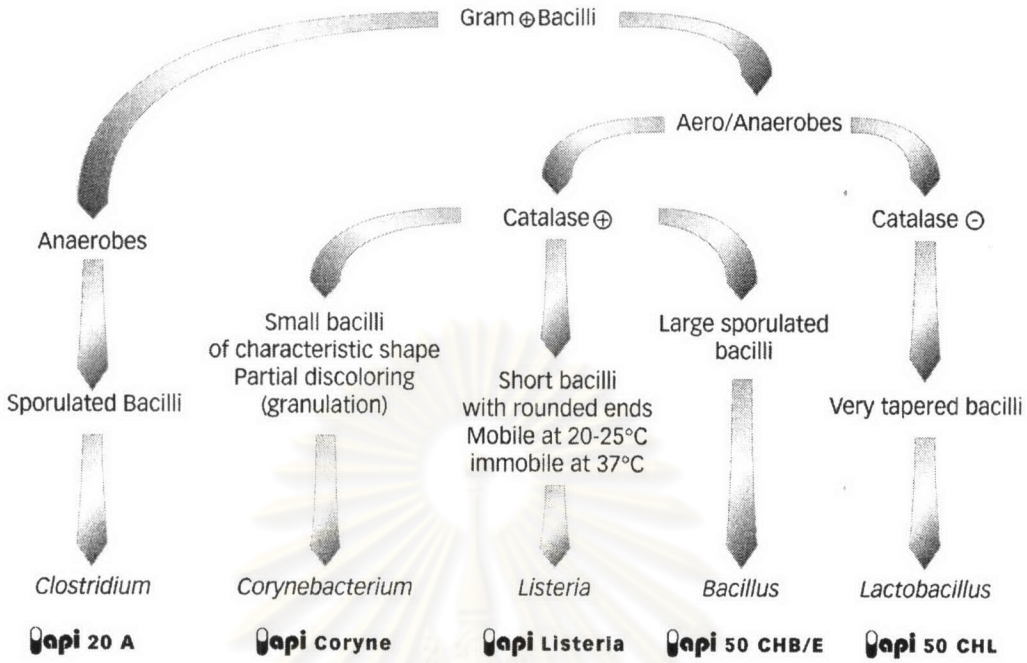
1. ชุดทดสอบ API

การเลือกชุดทดสอบ API สามารถทำได้ โดยดูจากผลการย้อมแกรม การทดสอบออกซิเดส และการทดสอบคาทาเลส ดังสรุปในรูปที่ 47 รูปที่ 48 และรูปที่ 49



รูปที่ 47 ชุดทดสอบ API สำหรับจำแนกแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 48 ชุดทดสอบ API สำหรับจำแนกแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง

รูปที่ 49 ชุดทดสอบ API สำหรับจำแนกแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง

1.1 API 20NE

เป็นชุดที่ใช้ทดสอบ Non-Enteric bacteria ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio* และ *Aeromonas* เป็นต้น

1.1.1 องค์ประกอบใน 1 ชุดทดสอบ

- API 20NE strips
- incubation box
- ampules of AUX Medium
- result sheets

1.1.2 อาหารและสารทดสอบ

- NaCl 0.85% Medium

NaCl	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

- AUX Medium

Ammonium sulphate	2.0	กรัม
Agar	1.5	กรัม
Mineral base	82.8	มิลลิกรัม
Amino acids	250.0	มิลลิกรัม
Vitamins and nutritional substance	35.9	มิลลิกรัม
Phosphate buffer 0.04 M pH 7.1	qsp 1.0	ลิตร

Final pH : 7.0 - 7.2

- JAMES reagent

Compound J2183 (confidential)	0.5	กรัม
HCl 1 N	qsp 1.0	ลิตร

- NIT1 reagent

Sulfanilic acid	0.4	กรัม
Acetic acid	30.0	กรัม
H_2O	70.0	มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- NIT2 reagent

N,N-dimethyl-1-naphthylamine	0.6	กรัม
Acetic acid	30.0	กรัม
H_2O	70.0	มิลลิลิตร

- Zn

Zinc dust	10.0	กรัม

1.1.3 วิธีการทดสอบ

1) streak เชื้อลงบน Nutrient agar plate
2) บ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
3) ถ่ายเชื้อลงใน NaCl 0.85% Medium 2 มิลลิลิตร ให้มีความขุ่น 0.5 McFarland หรือมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เขย่าให้เข้ากัน
4) เติมน้ำลงใน incubation box ใส่ API strip ลงไป
5) ถ่ายเชื้อจาก Nutrient agar plate ลงใน API strip จาก NO3 จนถึง PNG
6) ปิเปตเชื้อจากสารละลาย 0.85% NaCl ใส่ลงใน AUX medium 6-8 หยด (ประมาณ 200 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันดีด้วยปิเปต แล้วใส่ลงใน API strip จาก [GLU] ถึง [PAC]
7) เติม mineral oil ลงใน cupule ที่ชื่อการทดสอบขีดเส้นใต้ไว้ ([GLU], ADH และ URE)
8) ปิดฝา incubation box
9) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง
10) หลังจากการบ่ม ให้อ่าน strip โดยดูจาก Reading Table (ตารางที่ 20) แล้วบันทึกผล spontaneous reaction ทั้งหมด ([GLU], ADH, URE, ESC, GEL, และ PNPG)
11) ตรวจผล NO3 และ TRP ได้ทันที ดังนี้

- NO3 test

เติมสารทดสอบ NIT1 และ NIT2 ลงใน NO3 cupule ทิ้งไว้ 5 นาที ถ้าปรากฏสีแดงขึ้นแสดงว่าให้ผลเป็นบวก ส่วนผลลบ อาจเกิดจากมีการผลิตก๊าซไนโตรเจนขึ้น ให้เติม Zn ลงไป แล้วทิ้งไว้ 5 นาที ถ้ายังคงไม่มีสีเกิดขึ้น ให้บันทึกผลเป็นบวก แต่ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นให้บันทึกผลเป็นลบ

- TRP

เติมสารทดสอบ JAMES ลงใน TRP cupule ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ถ้าเกิดสีชมพูขึ้น ให้บันทึกผลเป็นบวก

12) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ต่อไปอีก 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบผลที่ชัดเจนของ Assimilation test

13) บันทึกผลเป็น + และ – จากนั้นใช้โปรแกรมประมวลผลการจำแนกเชื้อออกมา

ตารางที่ 20 ตารางอ่านผลการทดสอบในชุด API 20NE (Reading Table)

TESTS	SUBSTRATES	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
			NEGATIVE	POSITIVE
NO3	potassium nitrate	reduction of nitrates to nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 MIN colorless	pink-red
		reduction of nitrates to nitrogen	Zn / 5 min pink	colorless
TRP	Tryptophane	indole production	JAMES / immediate Colorless pale green / yellow	pink
GLU	Glucose	acidification	blue to green	yellow
ADH	Arginine	arginine dihydrolase	yellow	orange / pink / red
URE	Urea	urease	yellow	orange / pink / red
ESC	Esculin	hydrolysis (β-glucosidase)	yellow	grey / brown / black
GEL	gelatine (with India ink)	hydrolysis (protease)	no pigment diffusion	diffusion of black pigment
PNPG	p-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	β-galactosidase	colorless	yellow

ตารางที่ 20 (ต่อ)

GLU	glucose	assimilation	transparent	opaque
ARA	arabinose	assimilation	transparent	opaque
MNE	mannose	assimilation	transparent	opaque
MAN	mannitol	assimilation	transparent	opaque
NAG	N-acetyl-glucosamine	assimilation	transparent	opaque
MAL	maltose	assimilation	transparent	opaque
GNT	gluconate	assimilation	transparent	opaque
CAP	caprate	assimilation	transparent	opaque
ADI	adipate	assimilation	transparent	opaque
MLT	malate	assimilation	transparent	opaque
CIT	citrate	assimilation	transparent	opaque
PAC	phenyl-acetate	assimilation	transparent	opaque

1.2 API Staph

เป็นชุดที่ใช้ทดสอบแบคทีเรียในสกุล *Stapylococcus* และ *Micrococcus*

1.2.1 องค์ประกอบใน 1 ชุดทดสอบ

- API STAPH strips
- incubation box
- ampules of API STAPH Medium
- result sheets

1.2.2 อาหารและสารทดสอบ

- Mineral oil
- API STAPH Medium

Yeast extract		0.5	กรัม
Bactopeptone		10.0	กรัม
NaCl		5.0	กรัม
Trace elements		10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	qsp	1.0	ลิตร

pH : 7.0 - 7.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- VP1 reagent

KOH	40.0	กรัม
H_2O	100.0	มิลลิลิตร

- VP2 reagent

α-naphthol	6.0	กรัม
Ethanol	100.0	มิลลิลิตร

- NIT1 reagent

Sulfanilic acid	0.4	กรัม
Acetic acid	30.0	กรัม
H_2O	70.0	มิลลิลิตร

- NIT2 reagent

N,N-dimethyl-1-naphthylamine	0.6	กรัม
Acetic acid	30.0	กรัม
H_2O	70.0	มิลลิลิตร

- ZYM A reagent

Tris-hydroxymethyl-aminomethane	25.0	กรัม
HCl (37%)	11.0	มิลลิลิตร
Sodium lauryl sulfate	10.0	กรัม
H_2O	100.0	มิลลิลิตร

- ZYM B reagent

Fast Blue BB	0.35	กรัม
2-methoxyethanol	100.0	มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1.2 วิธีการทดสอบ

1) streak เชื้อลงบน Nutrient agar plate

2) บ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3) เตรียม Bacterial suspension โดยถ่ายเชื้อลงใน API STAPH Medium ให้มีความขุ่น 0.5 McFarland หรือมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

4) เติมน้ำลงใน incubation box ใส่ API strip ลงไป

5) ถ่ายเชื้อจาก API STAPH Medium ลงใน API strip

6) เติม mineral oil ลงใน cupule ที่ชื่อการทดสอบขีดเส้นใต้ไว้ (ADH และ URE)

7) ปิดฝา incubation box

8) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง

9) ตรวจผล VP, NIT และ PAL ได้ดังนี้

- VP test

เติมสารทดสอบ VP1 และ VP2 ทิ้งไว้ 10 นาที ถ้าเกิดสีม่วงถึงชมพูขึ้น แสดงว่าให้ผลเป็นบวก สีชมพูจางๆ แสดงว่าให้ผลเป็นลบ

- NIT test

เติมสารทดสอบ NIT1 และ NIT2 ทิ้งไว้ 10 นาที ถ้าเกิดสีแดงขึ้น แสดงว่าให้ผลเป็นบวก

- PAL test

เติมสารทดสอบ ZYM A และ ZYM B ทิ้งไว้ 10 นาที ถ้าเกิดสีม่วงขึ้น แสดงว่าให้ผลเป็นบวก

10) ตรวจสอบผลทั้งหมดโดยดูจาก Reading Table (ตารางที่ 21) แล้วบันทึกผล

11) บันทึกผลเป็น + และ – จากนั้นใช้โปรแกรมประมวลผลการจำแนกเชื้อออกมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 21 ตารางอ่านผลการทดสอบในชุด API Staph (Reading Table)

TESTS	SUBSTRATE	REACTIONS/ENZYMES	RESULT	
			NEGATIVE	POSITIVE
0	No substrate	Negative control	red	-
GLU FRU MNE MAL LAC TRE MAN XLT MEL	D-Glucose D-Fructose D-Mannose D-Maltose D-Lactose D-Trehalose D-Mannitol Xylitol D-Melibiose	(Positive control) Acidification due to carbohydrate utilization	red*	Yellow
NIT	Potassium nitrate	Reduction of nitrates to nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 10 min colorless-light pink	red
PAL	β-naphthyl acid phosphate	ALkaline Phosphatase	ZYMA + ZYMB / 10 min yellow	Violet
VP	Sodium pyruvate	Acetyl-methyl-carbinol production (Voges Prosauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min colorless-light pink	violet-pink
RAF XYL SAC MDG NAG	Raffinose Xylose Sucrose α-methyl-D-glucoside N-acetyl-glucosamine	Acidification due to carbohydrate utilization	red	yellow
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	yellow	orange-red
URE	Urea	Urease	yellow	red-violet

* The acidification tests should be compared to the negative (0) and positive (GLU) controls.

When MNE and XLT are preceded or followed by positive tests, then an orange test should be considered negative.

1.3 API Coryne

ใช้ทดสอบ Coryneform bacteria

1.3.1 องค์ประกอบใน 1 ชุดทดสอบ

- API CORYNE strips
- ampoules of GP Medium
- ampoules of Suspension Medium
- 1 McFarland ampoule
- incubation box
- result sheets

1.2.2 อาหารและสารทดสอบ

- Mineral oil
- Suspension Medium
- GP Medium

Cystine	0.5	กรัม
Tryptone	20.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Sodium sulfite	0.5	กรัม
Phenol red	0.17	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH : 7.8

- NIT1 reagent

Sulfanilic acid	0.4	กรัม
Acetic acid	30.0	กรัม
H_2O	70.0	มิลลิลิตร

- NIT2 reagent

N,N-dimethyl-1-naphthylamine	0.6	กรัม
Acetic acid	30.0	กรัม
H_2O	70.0	มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ZYM A reagent

Tris-hydroxymethyl-aminomethane	25.0	กรัม
HCl (37%)	11.0	มิลลิลิตร
Sodium lauryl sulfate	10.0	กรัม
H_2O	100.0	มิลลิลิตร

- ZYM B reagent

Fast Blue BB	0.35	กรัม
2-methoxyethanol	100.0	มิลลิลิตร

- PYZ reagent

Ferric chloride	1.0	กรัม
Preservative	6.0	กรัม
2-methoxyethanol	100.0	มิลลิลิตร

1.1.2 วิธีการทดสอบ

1) streak เชื้อลงบน Nutrient agar plate บ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2) เตรียม Bacterial suspension โดยถ่ายเชื้อลงใน Suspension Medium ให้มีความขุ่นมากกว่า 6 McFarland โดยเทียบกับ McFarland ampoule
3) เติมน้ำลงใน incubation box ใส่ API strip ลงไป
4) ถ่ายเชื้อจาก Suspension Medium ลงใน API strip จาก NIT ถึง GEL
5) ถ่ายเชื้อจาก Suspension Medium ที่เหลือลงใน GP Medium ผสมให้เข้ากันดีแล้วถ่ายลงใน API strip จาก 0 ถึง GLYG
6) เติม mineral oil ลงใน cupule ที่ชื่อการทดสอบขีดเส้นใต้ไว้ (URE และ 0 ถึง GLYG)
7) ปิดฝา incubation box
8) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง
9) หลังจากการบ่ม ให้เติมสารทดสอบดังนี้
   - NIT test : เติมสารทดสอบ NIT1 และ NIT2 อย่างละ 1 หยด
   - PYZ test : เติมสารทดสอบ PYZ 1 หยด

- PyrA, PAL, βGUR, βGAL, αGLU และ βNAG test : เติมสารทดสอบ ZYM A และ ZYM B

10) ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วตรวจสอบผลโดยดูจาก Reading Table (ตารางที่ 22) ถ้าจำเป็นให้ฉายแสง 1000 วัตต์ลงไปที่ strip เป็นเวลา 10 วินาที เพื่อลดสีของสารทดสอบที่มากเกินไป ในหลอด PyrA จนถึง βNAG

11) บันทึกผลการทดสอบทั้งหมดเป็น + และ – จากนั้นใช้โปรแกรมในการประมวลผลการจำแนกเชื้อออกมา

ตารางที่ 22 ตารางอ่านผลการทดสอบในชุด API Coryne (Reading Table)

TESTS	REACTION	RESULTS	
		NEGATIVE	POSITIVE
NIT	nitrate reduction	NIT 1 + NIT 2 / 10 min colorless very pale pink	dark pink red
PYZ	pyrazinamidase	PYZ / 10 min colorless very pale brown very pale orange	brown orange
PyrA	pyrrolidonyl arylamidase	ZYM A + ZYM B (PyrA → βNAG) / 10 min colorless pale orange	orange
PAL	Alkaline phosphatase	colorless beige-pale purple pale orange	purple
βGUR	β-glucuronidase	colorless pale gray pale beige	blue
βGAL	β-galactosidase	colorless beige-pale purple	purple
αGLU	α-glucosidase	colorless beige-pale purple pale green	purple

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 22 (ต่อ)

βNAG	N-acetyl-β-glucosaminidase	colorless beige-pale purple pale brown pale gray	brown
ESC	esculin (β-glucosidase)	colorless / gray	black
URE	urease	yellow orange	red pink
GEL	gelatine (hydrolysis)	no diffusion of black pigment	diffusion of black pigment
0	control (fermentation)	red orange	yellow yellow-orange
GLU	glucose (fermentation)		
RIB	ribose (fermentation)		
XYL	xylose (fermentation)		
MAN	manitol (fermentation)		
MAL	maltose (fermentation)		
LAC	lactose (fermentation)		
SAC	sucrose (fermentation)		
GLYG	glycogen (fermentation)		

2. **ชุดทดสอบปริมาณไนเทรต-ไนโตรเจนและไนไทรต์-ไนโตรเจน** (HACH)

2.1 การทดสอบไนเทรต

ใช้โปรแกรม NITRATE, MR (Medium Range) สำหรับวัดปริมาณไนเทรต-ไนโตรเจนที่อยู่ในช่วง 0 – 0.45 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยวิธี Cadmium Reduction Method

1) ใส่เลขที่โปรแกรมสำหรับวัดไนไทรต์ คือ 3 5 3
2) เมื่อกดปุ่ม ENTER แล้ว หน้าจอจะแสดง "Dial nm to 400" ให้หมุนปุ่มปรับความยาวคลื่นเป็น 400 nm หน้าจอจะแสดง "Zero sample" แล้วแสดงเป็น mg/L NO_3^-- N MR
3) เติมตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร ลงในหลอดใส่ตัวอย่าง และเติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร ลงในหลอดใส่ ตัวอย่างอีกหลอดหนึ่ง เพื่อใช้เป็น blank
4) ใส่ NitraVer 5 ซึ่งเป็นผงทดสอบไนเทรต ลงในหลอด ปิดฝาหลอด
5) กด SHIFT TIMER ระยะการทำปฏิกิริยา (Reaction Period) 1 นาที จะเริ่มต้นขึ้น เขย่าจนสัญญาณของนาฬิกาจับเวลาดังขึ้น

6) กด SHIFT TIMER อีกครั้ง ระยะการทำปฏิกิริยา 5 นาที จะเริ่มต้นขึ้น ถ้าในหลอดมีไนเทรตจะเกิดสีเหลืองอำพันขึ้น
7) เมื่อสัญญาณของนาฬิกาจับเวลาดังขึ้น หน้าจอจะแสดง mg/L NO_3^-- N MR
8) ใส่ blank ลงในช่องใส่หลอดในเครื่อง spectrophotometer จากนั้นปิดฝา
9) กด ZERO หน้าจอจะแสดง Zeroing.... จากนั้นจะแสดง 0.0 mg/L NO_3^-- N MR
10) นำหลอดตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณไนเทรตใส่ในช่องใส่หลอดในเครื่อง ปิดฝา
11) กด READ หน้าจอจะแสดง Reading แล้วผลการวัดปริมาณไนเทรตในรูป mg/L NO_3^-- N จะปรากฏขึ้น

2.2 การทดสอบไนไทรต์

ใช้โปรแกรม NITRITE, LR (Low Range) สำหรับวัดปริมาณไนไทรต์-ไนโตรเจนที่อยู่ในช่วง 0 – 0.300 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยวิธี Diazotization Method

1) ใส่เลขที่โปรแกรมสำหรับวัดไนไทรต์ คือ 3 7 1
2) เมื่อกดปุ่ม ENTER แล้ว หน้าจอจะแสดง "Dial nm to 507" ให้หมุนปุ่มปรับความยาวคลื่นเป็น 507 nm หน้าจอจะแสดง "Zero sample" แล้วแสดงเป็น mg/L NO_2^-- N LR
3) เติมตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดใส่ตัวอย่าง
4) ใส่ NitriVer® 3 ซึ่งเป็นผงทดสอบไนไทรต์ ลงในหลอด ปิดฝาหลอด แล้วเขย่าให้ผงทดสอบละลาย ถ้าในหลอดมีไนไทรต์จะเกิดสีชมพูขึ้น
5) กด SHIFT TIMER ระยะการทำปฏิกิริยา (Reaction Period) 20 นาที จะเริ่มต้นขึ้น
6) เมื่อสัญญาณเตือนของนาฬิกาจับเวลาดังขึ้น หน้าจอจะแสดง mg/L NO_2^-- N LR
7) เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดใส่ตัวอย่าง เพื่อใช้เป็น blank แล้วนำไปใส่ในช่องใส่หลอดในเครื่อง spectrophotometer จากนั้นปิดฝา
8) กด ZERO หน้าจอจะแสดง Zeroing.... จากนั้นจะแสดง 0.000 mg/L NO_2^-- N LR
9) นำหลอดตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณไนไทรต์ใส่ในช่องใส่หลอดในเครื่อง ปิดฝา
10) กด READ หน้าจอจะแสดง Reading แล้วผลการวัดปริมาณไนไทรต์ในรูป mg/L NO_2^-- N จะปรากฏขึ้น

3. QIAquick gel extraction kit (QIAgen)

ตัด gel บริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยมีดที่สะอาดและคม ใส่ลงใน microtube เติม QG buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนัก gel (100 mg ~ 100 µl) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่ง gel ละลายหมด เพื่อช่วยให้ gel ละลายดีขึ้น ให้ผสมโดยใช้ vortex ทุกๆ 2-3 นาที ตรวจสอบสีของสารละลายว่าเป็นสีเหลืองเหมือนสีของบัฟเฟอร์หรือไม่ ถ้าสีเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือสีม่วง แสดงว่า pH สูงขึ้น ให้เติม 3 M Sodium acetate pH 5.0 ปริมาตร 100 µl ลงไป แล้วผสมให้เข้ากัน สีของสารละลายจะกลับมาเป็นสีเหลือง จากนั้นเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนัก gel ลงไปใน microtube ผสมให้เข้ากัน แต่ห้ามปั่นเหวี่ยง (centrifuge) แล้วใส่ตัวอย่างลงใน QIAquick column โดยปริมาตรของตัวอย่างจะต้องไม่เกิน 800 µl (ถ้าเกินให้ทำ 2 รอบ) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอจับกับ membrane ทิ้งส่วนที่ผ่าน column ลงมา แล้วเติม QG buffer อีก 0.5 ml ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เพื่อกำจัด agarose gel ออกให้หมด เติม PE buffer ปริมาตร 0.75 ml แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อล้าง DNA ให้สะอาด ทิ้งส่วนที่ผ่าน column ลงมา แล้วปั่นเหวี่ยง column เปล่าๆอีก 1 นาที ทิ้งส่วนที่ผ่าน column ลงมา นำ column วางลงใน microtube ขนาด 1.5 ml ที่สะอาด เติม EB buffer ปริมาตร 25 µl ลงตรงกลางของ membrane ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะดีเอ็นเอลงมาสู่ microtube แล้วเก็บดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง.
สารที่ใช้ในการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

1. Tris-Cl (Tris(hydroxymethyl)aminomethane), 1 M

ละลาย Tris base 121 กรัม ลงในน้ำ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ด้วย HCl แล้วเติมน้ำให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), 0.5 M (pH 8.0)

ละลาย EDTA 186.1 กรัม ลงในน้ำ 700 มิลลิลิตร ตั้งปั่นบน magnetic stirrer ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. Tris / EDTA buffer (TE buffer)

10 mM Tris-Cl : pH 8.0	10.0	มิลลิลิตร
1 mM EDTA : pH 8.0	2.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ละลาย SDS 100 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร อุ่นบน magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.2 ด้วย HCl เข้มข้น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. Proteinase K, 20 mg/ml

ละลาย proteinase K 20 มิลลิกรัม ในน้ำ 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. NaCl, 5 N

ละลาย NaCl 292.215 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. CTAB/NaCl solution (10% CTAB in 0.7 M NaCl)

ละลาย NaCl 4.1 กรัม ในน้ำ 80 มิลลิลิตร และเติม CTAB 10 กรัม อย่างช้าๆ พร้อมกับให้ความร้อน และคนให้ละลาย ถ้าจำเป็นให้อุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

8. 5x TBE buffer (Stock solution)

Tris-base	54.0	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5 M EDTA	40.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

9. 5x loading buffer (BJ II)

Sucrose	6.2	กรัม
0.5 M EDTA	1.0	มิลลิลิตร
0.05% Bromphenol blue		
น้ำกลั่น	9.0	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันดี เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10. Ethidium bromide, 10 mg/ml (Stock solution)

ละลาย ethidium bromide 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

11. Bovine serum albumin, 20 mg/ml

ละลาย bovine serum albumin 20 มิลลิกรัม ในน้ำ 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

12. **ไพรเมอร์** (Primer) (Braker และคณะ,1998)

Primer	Position	Primer sequence (5'-3')
nirK1F	526-542	GG(A/C)ATGGT(G/T)CC(C/G)TGGCA
nirK5R	1023-1040	GCCTCGATCAG(A/G)TT(A/G)TGG
nirS1F	763-780	CCTA(C/T)TGGCCGCC(A/G)CA(A/G)T
nirS6R	1638-1653	CGTTGAACTT(A/G)CCGGT

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

13. **เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)** (Promega)

MspI

Description C▼CG G
G GC▲C

Storage Condition Store at –20 °C

Storage Buffer 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 50mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mg/ml BSA, 50% glycerol.

Incubation Condition Buffer B. 37 °C

Percent Activity in 4-CORE® Buffer System

A	B	C	D	MULTI-CORE™
75-100%	100%	75-100%	25-50%	25-50%

HhaI

Description G CG▼C
C▲GC G

Storage Condition Store at –20 °C

Storage Buffer 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 50mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mg/ml BSA, 50% glycerol.

Incubation Condition Buffer C. 37 °C

Percent Activity in 4-CORE® Buffer System

A	B	C	D	MULTI-CORE™
50-75%	75-100%	100%	50-75%	75-100%

HaeIII

Description GG▼CC
CC▲GG

Storage Condition Store at –20 °C

Storage Buffer 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 50mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mg/ml BSA, 50% glycerol.

Incubation Condition Buffer C. 37 °C

Percent Activity in 4-CORE® Buffer System

A	B	C	D	MULTI-CORE™
75-100%	75-100%	100%	50-75%	75-100%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวเก็จกาญจน์ สมาธิวุฒิคุณ เกิดเมื่อวันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ. 2522 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต จากภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2542 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2543 ได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ "ผู้ช่วยสอน" ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2544 และได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยหรือค้นคว้าเพื่อทำวิทยานิพนธ์ ในภาคการศึกษาต้น ปีการศึกษา 2545

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย