สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดแยกและการจัดจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสจากผลไม้เขตร้อน

นาย เบญจะ พิมพ์ชัยศรี

นาย ปิยะศักดิ์ คำเซ่ง

ลก.
ว379ก
2550
เลขหมู่ 83748
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี 15 ก.ย. 2551
b 11977898
i

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Screening and Identification of Bacterial Cellulose Producer from Tropical Fruits

Mr.Benja Pimchaisri

Mr.Piyasak Cumsang

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

For the Degree of Bachelor of Science

Industrial Microbiology Program

Department of Applied Biology, Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อเรื่อง การคัดแยกและการจัดจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสจากผลไม้เขตร้อน

นักศึกษา เบญจะ พิมพ์ชัยศรี 47050515

ปิยะศักดิ์ คำเซ่ง 47050887

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดวงใจ โอชัยกุล

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ขออนุมัติทำโครงงานพิเศษนี้ โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ	รศ. ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ	ดร. จิตติ ท่าไว	

.....

รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การคัดแยกและการจัดจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสจากผลไม้เขตร้อน

นักศึกษา เบญจะ พิมพ์ชัยศรี 47050515

ปิยะศักดิ์ คำเซ่ง 47050887

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2550

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดวงใจ โอชัยกุล

บทคัดย่อ

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลสจากผลไม้เน่าเสีย พบแบคทีเรียเซลลูโลสในตะขบและมะละกอ คัดเลือกไอโซเลทที่สร้างเซลลูโลสได้สูงจากมะละกอและตะขบอย่างละ 20 ไอโซเลท มาศึกษาความสามารถในการหมักเซลลูโลสในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า พบว่าไอโซเลทจากตะขบมี 3 ไอโซเลทที่ให้ปริมาณเซลลูโลสสูงในสภาวะนิ่ง ได้แก่ ไอโซเลท T01 T07 และ T11 โดยให้ปริมาณเซลลูโลส 0.3620± 0.0154 0.3508± 0.0176 และ 0.4416± 0.0376 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการหมักในสภาวะเขย่าของเชื้อเหล่านี้ให้ปริมาณเซลลูโลสค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในสภาวะนิ่ง ไอโซเลทจากมะละกอมี 3 ไอโซเลทที่ให้ปริมาณเซลลูโลสสูงในสภาวะนิ่ง คือ ไอโซเลท P06 P09 และ P10 โดยให้ปริมาณเซลลูโลส 0.5485± 0.0635 0.4749±0.0139 และ 0.4786±0.0543 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นคัดเลือกไอโซเลทที่ผลิตเซลลูโลสได้สูงในสภาวะนิ่ง ได้แก่ T01 T07 T11 T12 P06 P08 P09 และ P10 มาศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะรูปร่าง การติดสีแกรม การทดสอบชีวเคมีต่างๆ พบว่าลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ของเชื้อส่วนใหญ่มีลักษณะกลมนูน สีครีม ผิวเรียบ ติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคตาเลส ไม่สามารถออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดอะซิติก ยกเว้นไอโซเลท T07 และ T12 ส่วนใหญ่เป็นออกซิเดทีฟ ทดสอบเมทธิลเรดเป็นบวก ไม่สามารถสร้างสารอะซิโตอินจากการใช้น้ำตาลกลูโคส ไม่สามารถสร้างสารอินโดลจากทริปโตเฟน ไม่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นคาร์บอนได้ และสร้างไฮดรอกซีอะซิโตนจากกลีเซอรอลได้

จากการนำไอโซเลท P09 และ T11 ไปจัดจำแนกโดยใช้เทคนิค 16s rDNA พบว่าไอโซเลททั้งสองเป็น *Gluconacetobacter nataicola*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Screening and Identification of Bacterial Cellulose Producer from Tropical Fruits
Student	Mr. Benja Pimchaisri 47050515
	Mr. Piyasak Cumsang 47050887
Program	Industrial Microbiology
Department	Applied Biology
Academic Year	2007
Special Project advisor	Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul

ABSTRACT

Screening and selection of bacterial cellulose were from rotting fruits : calabura (*Muntingia calabura* L.) and papaya (*Carica papaya* L.). Twenty isolated from each fruit which screen were selected as high cellulose producer. These isolated were further tested for their cellulose production under static and shake flask conditions. Three isolated from calabura : T01, T07 and T11 could produce cellulose 0.3620±0.0154 0.3508±0.0176 and 0.4416±0.0376 g/100ml. from static conditions, respectively. Under shake flask conditions, the yield of cellulose were lower this static conditions. P06, P09 and P10 were isolated from papaya and gave the high yield of cellulose in static conditions. P06, P09 and P10 could produce cellulose 0.5485±0.0635 0.4745±0.0139 and 0.4786±0.0543 g/100ml. from static conditions, respectively. Six isolated which gave the high yield of cellulose (T01 T07 T11 P06 P09 and P10) were studied on morphological and physiological. The colony on GEY Agar were white, round and smooth, gram negative, rod shape, catalase positive, could not oxidize ethanol to acetic acid except T07 and T12, oxidative microorganisms, could not produce acetoin from glucose, no indole and hydrogen sulfide production. Glucose was carbon source and could produce hydroxyl acetone from glycerol.

P09 and P11 were identified by partial 16s rDNA sequence analysis, they were *Gluconacetobacter nataicola*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความอนุเคราะห์จากรศ.ดวงใจ โอชัยกุล อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางในการทำโครงงานพิเศษ และตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ซึ่งทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณ ดร. จิตติ ท่าไว กรรมการสอบโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่ให้คำปรึกษา ให้วิชาความรู้ตลอดเวลาที่ผ่านมา

ขอขอบคุณ คุณพยอม เกียรติกำจร คุณอนิทัศน์ ทองจันทร์และนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษเป็นอย่างดี กรุณาให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับใช้ในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้อง ตลอดจนเพื่อนๆ ทุกคนที่มีส่วนในการช่วยสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษนี้จนสำเร็จไปได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเส้นใยเซลลูโลสได้	4
2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ	5
2.3 ผลไม้	6
2.3.1 การปนเปื้อนผลไม้จากจุลินทรีย์	8
2.4 เทคนิคที่ใช้ในการแยกเชื้อจากจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ	8
2.4.1 การเจือจางลงตามลำดับ (serial dilution)	8
2.4.2 เทคนิค Streak plate	9
2.4.3 เทคนิค Spread plate	11
2.4.4 เทคนิค Pour plate	11
2.5 การจัดจำแนกจุลินทรีย์	11
2.5.1 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี	11
2.5.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	12
2.5.1.2 การติดสีแกรม	12
2.5.1.3 การทดสอบแคตาเลส (Catalase Test)	12
2.5.1.4 การทดสอบออกซิเดส (Oxidase Test)	13
2.5.1.5 การทดสอบเมทิลเรด-เมทิลคาร์บินอล (Methyl Red-Voges Proskauer Test)	14
2.5.1.6 การทดสอบการสร้างอินโดล (Indole Test)	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5.2 การทดสอบด้าน Molecular	15
2.5.2.1 Nucleic Acid Hybridization	15
2.5.2.2 วิธีการ Molecular subtyping	15
2.5.2.3 เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)	16
2.5.2.4 Agarose gel Electrophoresis	19
2.5.2.5 Hybridization	20
2.5.2.6 Southern Blot Hybridization	21
2.5.2.7 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	23
2.5.2.8 DNA sequencing	23
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	25
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	27
3.1 จุลินทรีย์	27
3.2 สารเคมี	27
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ	27
3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง	27
3.5 วิธีการทดลอง	28
3.5.1 การคัดเลือกแบคทีเรียเซลลูโลสจากผลไม้เน่าเสีย	28
3.5.2 ขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อและทำให้เชื้อบริสุทธิ์	28
3.5.3 การเก็บรักษาเชื้อที่แยกได้	28
3.5.4 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้	29
โดยศึกษาการหมักเซลลูโลสในสภาวะต่างๆ	
3.5.4.1 หมักในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า	29
3.5.4.2 วิธีการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสที่ผลิตได้	29
3.5.5 การจัดจำแนกเชื้อที่แยกได้	30
3.5.5.1 ศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางชีวเคมี	30
3.5.5.2 การจัดจำแนกทางชีวโมเลกุลโดยใช้เทคนิค 16s rDNA	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลอง	36
4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียเซลลูโลสจากผลไม้เน่าเสีย	36
4.2 ศึกษาความสามารถในการสร้างเซลลูโลสของเชื้อที่แยกได้ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า	58
4.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียเซลลูโลส	63
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	67
เอกสารอ้างอิง	69
ภาคผนวก ก	71
ภาคผนวก ข	74
ภาคผนวก ค	76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

3.1 แสดงตัวอย่างการแปรผลและบันทึกผลการทดสอบ Oxidative fermentative 31
3.2 แสดงตัวอย่างการแปรผลและบันทึกผลการทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ 33
3.3 แสดงตัวอย่างการแปรผลและบันทึกผลการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต 33
4.1 แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากตะขบและมะละกอที่เน่าเสีย 38
4.2 แสดงลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียเซลลูโลส ที่แยกได้จากตะขบและมะละกอ 48
4.3 ปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกได้จากตะขบในอาหาร HS medium ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า 59
4.4 ปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกได้จากมะละกอในอาหาร HS medium ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า 60
4.5 ผลการทดสอบทางชีวเคมีในการจัดจำแนกแบคทีเรียเซลลูโลส 64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	วิถีการสังเคราะห์เซลลูโลสของแบคทีเรีย	4
2.2	โครงสร้างของ cellulose synthase operon	5
2.3	การสร้างเซลลูโลสในเซลล์ของแบคทีเรีย	6
2.4	การเจือจางลงตามลำดับ	9
2.5	เทคนิค Simple streak	10
2.6	เทคนิค Cross streak	10
2.7	สาย DNA เกลียวคู่พันกับโปรตีนและหดตัวเป็นสายโครมาตีนจนเห็นเป็นโครโมโซมในระยะเมตาเฟส	16
2.8	หลักการและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR	17
2.9	แถบดีเอ็นเอที่แยกบนแผ่นวุ้นโดยวิธี agarose gel electrophoresis และย้อมด้วยสี ethidium bromide ถ่ายภาพภายใต้แสง ultraviolet	19
2.10	agarose gel electrophoresis นำไปส่องในแสงอัลตราไวโอเลต ethidium bromide ที่ย้อมติดดีเอ็นเออยู่จะเรืองแสงสีส้ม	20
2.11	Hybridization	21
2.12	การเคลื่อนย้ายชิ้นดีเอ็นเอจาก agarose gel ไปสู่แผ่น nitrocellulose	22
2.13	Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (1)	23
2.14	Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (2)	24
4.1	ปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกได้จากตะขบในอาหาร HS medium ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า	61
4.2	ปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกได้จากมะละกอในอาหาร HS medium ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

แบคทีเรียอะซิติก (Acetic acid bacteria, AAB) เป็นแบคทีเรียแกรมลบหรือ gram variable รูปร่างรี ท่อนยาว ต้องการอากาศในการเจริญเติบโตโดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้าย สามารถใช้สับสเตรทได้หลายชนิด เช่น น้ำตาลกลูโคส เอทานอล แลคเตท กลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียอะซิติกสามารถพบในธรรมชาติ เนื่องจากมีความสามารถทนกรดได้ดีและใช้สับสเตรทได้หลายชนิด แบคทีเรียอะซิติกเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มหนึ่งที่เป็นสาเหตุทำให้น้ำเน่าเสีย มีการนำกรดอะซิติกมาใช้เป็นสารถนอมอาหารได้ (De Ley และคณะ, 1984)

เซลลูโลสเป็นสารที่มีความสำคัญกับอุตสาหกรรมหลายประเภท ซึ่งเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลสส่วนใหญ่สกัดได้จากแหล่งที่มาจากธรรมชาติโดยเฉพาะพืช บางครั้งมีข้อจำกัดในการผลิต ได้เซลลูโลสที่ไม่บริสุทธิ์ หรือวิธีการทำให้บริสุทธิ์มีความยุ่งยาก เชื้อแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในระดับอุตสาหกรรมได้แก่เชื้อ *Acetobacteraceae* สายพันธุ์ที่สำคัญและใช้ในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสกันอย่างกว้างขวางคือ *A. xylinum* , *A. pasteurianus* , *A. hansenii* , *A. sucrofermantans* และ *A. acetigenum* สำหรับ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* เซลล์มีลักษณะรูปร่างรีจนถึงเป็นท่อน อาจเป็นท่อนโค้งหรือท่อนตรง เซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสาย ขนาดเซลล์กว้างประมาณ 0.6-0.8 ไมครอน ยาวประมาณ 1.0-1.4 ไมครอน และอาจจะพบในลักษณะกลม ยืดยาว (elongation) บวม (swollen) รูปทรงกระบอก (clop shape) หรือเป็นเส้นสาย (filamentous) เคลื่อนที่ได้โดยแฟลกเจลลารอบๆเซลล์หรือแฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์หรือไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) โคโลนีของเชื้อ *Acetobacter* sp. มีสีชมพูเนื่องจากมีการสังเคราะห์สารพอร์ไฟรินส์ ต้องการอากาศ (aerobic) มีเมแทบอลิซึมจากการหายใจด้วยออกซิเจน โดยออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (terminal electron acceptor) ในกระบวนการเปลี่ยนอากาศให้เป็นพลังงาน (Gossele และ Swings, 1985) เป็นพวกเคโมออร์กาโนโทรฟิค (chemoorganotrophic) สร้างเอนไซม์แคตะเลส (catalase positive) สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือที่ pH ประมาณ 5.4-6.3 และอุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส ไม่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) และสามารถออกซิไดซ์เอธานอลเป็นกรดอะซิติก ออกซิไดซ์กรดอินทรีย์ประเภทอะซิเตท (acetate) และแลคเตท (lactate) เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นสารประเภทเอธานอล กลีเซอรอล แลคเตท กลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟรุกโทส ซูโครส แลคโทส และอะราบิโนส สามารถสร้างกรดจากเอธานอลและยังสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีเอธานอลและโพรพานอล อุณหภูมิที่สามารถทำลายเชื้อได้คือ 60-70 องศาเซลเซียส (inactivated temperature) แบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปจากแหล่งต่างๆ เช่น ผัก ผลไม้ ไวน์ น้ำผลไม้ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (krieg และ holt, 1984) ผลไม้เน่าเสีย เช่น มะม่วง ฝรั่ง สับปะรด ละมุด (Lapuz และคณะ, 1967) ดอกไม้ ถั่ว ดิน (Seto และคณะ, 1997; Toyosaki และคณะ, 1995) อ้อย (CoronelและJohnson, 1986) น้ำผึ้ง นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อได้จากน้ำเสีย (activated sludge) (DienemaและZevenhuizen, 1971)

Toyosaki และคณะ (1995) ได้ศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียเซลลูโลสสายพันธุ์ *Acetobacter* sp. โดยแยกจากแหล่งธรรมชาติ เช่น ผลไม้ อ้อย ดอกไม้ ถั่ว และดิน พบว่าตัวอย่างที่เก็บได้ในประเทศญี่ปุ่น 547 ตัวอย่าง ตรวจพบแบคทีเรียเซลลูโลส 126 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่แยกได้จากผลไม้เน่าเสียจะมีสัดส่วนในการผลิตเซลลูโลสได้สูง (มากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์) สำหรับตัวอย่างดินไม่พบแบคทีเรียเซลลูโลส *Acetobacter* sp.

Chenzhu และ Zenrong (2000) ศึกษาการคัดเลือก การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเซลลูโลส *Acetobacter xylinum* ที่ให้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด พบว่าจากการเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศจีน 150 ตัวอย่าง พบแบคทีเรียเซลลูโลส 26 สายพันธุ์ และพบว่าสายพันธุ์ Ax – 1 และสายพันธุ์ AC – II มีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสสูงสุด คือได้ปริมาณเซลลูโลส 16 กรัมต่อลิตร และ 14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากน้ำตาลซูโครส 50 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน และต่อมาได้จัดจำแนกพบว่าเป็นสายพันธุ์ *Acetobacter pasteurianus subsp xylinum* และ *Acetobacter hansenii* ตามลำดับ

โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแบคทีเรียที่สร้างเซลลูโลสชนิดต่างๆจากผลไม้เน่าเสียในเขตร้อน เช่น ลูกตะขบ สับปะรด องุ่น ส้ม กล้วย มะม่วง และ ทดสอบความสามารถในการหมักเซลลูโลสในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าของแบคทีเรียเซลลูโลสที่แยกได้ และคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อที่หมักเซลลูโลสได้สูงมาจำแนกชนิดของสายพันธุ์ ซึ่งอาจจะได้สายพันธุ์ใหม่ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อน หรือเป็นสายพันธุ์ที่เคยมีรายงานไว้แล้วแต่คัดแยกได้จากผลไม้ในประเทศไทย และสามารถนำจุลินทรีย์ที่แยกได้มาพัฒนาสายพันธุ์หรือใช้ผลิตเซลลูโลสในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสจากผลไม้เน่าเสียในเขตร้อน เช่น ลูกตะขบ สับปะรด องุ่น ส้ม กล้วย มะม่วง และมะละกอ

2.นำเชื้อที่ได้มาทดสอบความสามารถในการหมักเซลลูโลสในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

3.คัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อที่หมักเซลลูโลสได้สูงมาจำแนกชนิดของสายพันธุ์โดยการดูลักษณะการในเจริญอาหารเลี้ยงเชื้อ และทดสอบทางชีวเคมีบางประการพร้อมทั้งส่งจุลินทรีย์ไปจัดจำแนกตามหน่วยงานต่างๆ เช่น สวทช.

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. จากการแยกและจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส อาจจะได้สายพันธุ์ใหม่ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อน หรือเป็นสายพันธุ์ที่เคยมีรายงานไว้แล้วแต่คัดแยกได้จากผลไม้ในประเทศไทย

2. สามารถนำจุลินทรีย์ที่แยกได้มาใช้ผลิตเซลลูโลสในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

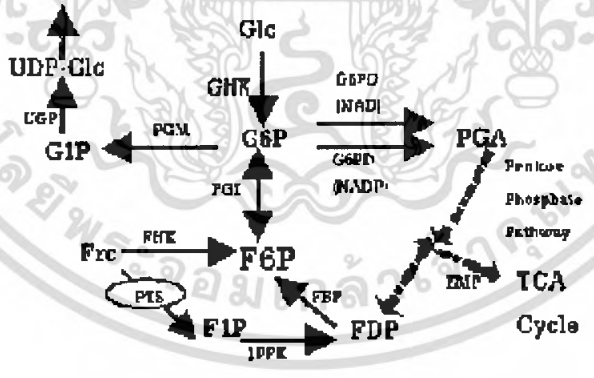
บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเส้นใยเซลลูโลสได้ (Bacterial cellulose)

ในปัจจุบันนี้ พบแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตเส้นใยเซลลูโลสได้ เช่น แบคทีเรียใน Genus Acetobacter เช่น *Acetobacter xylinum* โดยเส้นใยเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรีย มีโครงสร้างและคุณสมบัติเฉพาะที่แตกต่างจากเส้นใยเซลลูโลสจากพืช ในขณะนี้ได้มีการศึกษาถึงการนำเส้นใยเซลลูโลสจากแบคทีเรียมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมต่าง ๆ และได้มีการวิจัยถึงการเพิ่มผลผลิตในระดับอุตสาหกรรมเพื่อให้เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค

เชื้อ *Acetobacter* สามารถผลิตเส้นใยเซลลูโลส โดยเส้นใยเหล่านี้จะเจริญอยู่บริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (liquid culture) ซึ่งถ้าเปรียบเทียบโครงสร้างและ วิถีของการสังเคราะห์ พบว่าเส้นใยจากแบคทีเรียจะประกอบด้วยเส้นใยเล็ก ๆมากมายเชื่อมกันเป็นร่างแห ซึ่งต่างจากเส้นใยจากพืช

การสังเคราะห์เส้นใยเซลลูโลสจากแบคทีเรียมีวิถี ดังแสดงในภาพที่ 2.1

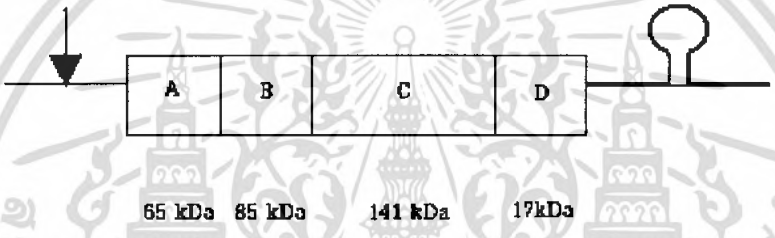


รูปที่ 2.1 วิถีการสังเคราะห์เซลลูโลสของแบคทีเรีย
ที่มา : http:/www.gpo.or.th

ได้มีการศึกษาถึงขบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสจากแบคทีเรียและพบว่าน้ำตาลกลูโคสจะถูกเมแทบอไลท์ผ่านทาง pentose phosphate pathway โดย cellulose pathway จะแยกออกที่ glucose-6-phosphate (G6P) และตัว direct precursor ของการสังเคราะห์เซลลูโลสก็คือ UDP-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

glucose ซึ่งการสังเคราะห์ UDP-glucose จาก G6PD นั้น จะประกอบด้วย 2 ขั้นตอนด้วยกันโดย พบว่าการทำงานของเอนไซม์ phosphoglucose isomerase จะแตกต่างกันไป เอนไซม์นี้มีกิจกรรมการทำงานสูง เมื่อแหล่งคาร์บอนคือ น้ำตาล fructose UDP-glc จะถูก polymerized ไปเป็นเซลลูโลส และ เซลลูโลสจะถูกปล่อยสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจะมีลักษณะเป็นเส้นใยเจริญอยู่บริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเส้นใยนี้จะประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 4 ชนิด ซึ่งจะถูกควบคุมโดย cellulose synthase operon (ภาพที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ cellulose synthase operon

ที่มา : http:/www.gpo.or.th

โดยยีนส์ที่ควบคุมการสังเคราะห์เซลลูโลสคือ bcs A, bcs B, bcs C และ bcs D ได้มีการทดลองพบว่ายีนส์ bcs A, B และ C มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ส่วนยีนส์ bcs D นั้นจะมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์เซลลูโลสจากแบคทีเรียซึ่งผลของการทดลองพบว่าถ้าทำให้ยีนส์ bcs D ลดกิจกรรมการทำงานลง พบว่าจะทำให้การสังเคราะห์เซลลูโลสลดลงถึง 40 เปอร์เซนต์

2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter* คือ การเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการให้อากาศและมีการเขย่าจะให้ผลดีที่สุด สำหรับการสร้างเซลลูโลสจะเกิดขึ้นในเซลล์ของแบคทีเรียและเส้นใยเหล่านี้จะถูกขับออกมาทางรูของเซลล์เมมเบรน (ภาพที่ 2.3) โดยในการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* นี้ใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร และจะให้เซลลูโลสสูงถึง 9 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลส ของเชื้อ *Acetobacter* นั้นได้ทำการเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่ง (static) และสภาวะที่มีการเขย่า (agitation) พบว่าการเลี้ยงแบบสภาพนิ่งจะทำให้เส้นใยเจริญและจับตัวกันแน่น ทำให้สภาพอาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดสูงกว่าการเลี้ยงแบบเขย่า นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มกรดคาร์บอนิกจะช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตดีในช่วงของ lag phase และยังช่วยเพิ่มการผลิตเซลลูโลสด้วย การเพิ่มกรดแลคติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยให้เชื้อสังเคราะห์ ATP ได้ดีขึ้น โดยจะไปเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ lactate dehydrogenase และ TCA cycle นอกจากนี้ปัจจัยอื่น ได้แก่ ชนิดของใบพัดในถังหมัก ความเร็วรอบในการกวน ปริมาณอากาศและ พีเอชก็มีผลต่อการเลี้ยง cellulose ด้วย

รูปที่ 2.3 การสร้างเซลลูโลสในเซลล์ของแบคทีเรีย
ที่มา : http:/www.gpo.or.th

2.3 ผลไม้

ส่วนใหญ่เกิดจากรังไข่เจริญขึ้นหลังได้รับการปฏิสนธิแล้ว แต่ผลบางชนิดเกิดโดยไม่มีการปฏิสนธิ เช่น กล้วยหอม แตงโม พวกนี้จะไม่มีเมล็ด

ผลไม้สามารถจำแนกได้หลายวิธีด้วยกัน

1. จำแนกตามประเภทของผล

1. ผลเดี่ยว คือ ผลที่เกิดจากรังไข่อันเดียวที่อยู่ภายในดอกเดียวหรือดอกเดี่ยว ถ้าในรังไข่มีออวุลเดียวก็จะเจริญเติบโตเป็นผลเดี่ยวที่มีเมล็ดเดียว เช่น มะม่วง พุทรา มะพร้าว มะยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มะปรางมะกอก ฯลฯ แต่ถ้าในรังไข่หนึ่งมีหลายออวุล ก็จะเจริญเป็นผลเดียวที่มีหลายเมล็ด เช่น องุ่น แตงโม แตงกวา ละมุด ส้ม มะนาว ฯลฯ

2. ผลกลุ่ม คือ ผลที่เกิดจากกลุ่มของรังไข่ซึ่งอยู่ภายในดอกดอกเดียว รังไข่แต่ละอันมาจากเกสรตัวเมียอันหนึ่ง และจะเจริญเป็นผลในลักษณะเป็นกลุ่มหรือ กระจุก เช่น กระดังงา จำปี จำปา การะเวก นมแมว ลูกจาก แต่มีผลกลุ่มบางชนิดรวมเป็นผลผลเดียว เช่นน้อยหน่า สตรอเบอรี ฝักบัว เป็นต้น

3. ผลรวม คือผลที่เกิดจากรังไข่ของดอกช่อ โดยแต่ละดอกมีหนึ่งรังไข่ซึ่งจะเจริญรวมกันเป็นผลเพียงผลเดียวและจะมีบางส่วนของดอกเจริญไปเป็นส่วนของผลด้วย เช่น ขนุน สาเก ลูกยอ มะเดื่อและสับปะรด เป็นต้น

2. จำแนกตามสภาพดินฟ้าอากาศที่พืชเจริญได้ดี แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ

1.ผลไม้เขตร้อน เช่น กล้วย มะม่วง มังคุด

2.ผลไม้เขตกึ่งร้อน เช่น ส้ม ลำไย ลิ้นจี่

3.ผลไม้เขตอบอุ่น เช่นแอปเปิ้ล สาลี่ ท้อ

3. รายละเอียดผลไม้

1. ตะขบ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Muntingia calabura L.*

ชื่อวงศ์ ELAEOCARPACEAE

ชื่อสามัญ Calabura, Jamaican Cherry, Manila Cherry

ลักษณะทั่วไป ไม้ต้นขนาดกลาง สูงไม่เกิน 20 เมตร ไม่ผลัดใบ เรือนยอดเป็นชั้นคล้ายฉัตรแตกกิ่งก้านขนานกับพื้นดิน แผ่กว้างเป็นชั้น ๆ

2. มะละกอ

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Carica papaya L.*

ชื่อวงศ์: CARICACEAE

ชื่อสามัญ: Papaya

ลักษณะทั่วไป: ไม้ล้มลุกอายุสั้น ระบบรากดีทั้งระบบรากแก้ว และรากแขนง อวบน้ำ ลำต้นกลวง และไม่ค่อยแตกกิ่งก้านสาขาเหมือนไม้ชนิดอื่น ดอกเจริญออกมาตามซอกใบเหนือก้าน ผลมีรูปร่างแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 การปนเปื้อนผลไม้จากจุลินทรีย์

นอกจากผลไม้จะมีการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลงหรือสารเคมีแล้ว ยังมีการปนเปื้อนของจุลิน ทรีย์ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม โดยอาจมาจากดิน น้ำ หรือปุ๋ย (Brackett, 2000) ชนิดของแบคทีเรียที่มักพบในดินและทำให้เกิดโรค คือ *Bacillus, Clostridium* และ *Listeria* โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อน เช่น *Clostridium botulinum* และ *Clostrtidium perfringens* บริเวณพื้นที่ที่ใช้เลี้ยงสัตว์มักมีจุลินทรีย์ ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปะปนออกมากับสิ่งขับถ่ายของสัตว์ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในมนุษย์ ดังนั้น การใช้ปุ๋ยคอกบำรุงพืชอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนสู่อาหาร เช่น มีการตรวจพบแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* และ *Escherichia coli* O157:H7 ที่ใบและรากของผลไม้ที่ปลูกโดยการใช้ปุ๋ยคอก นอกจากนี้ยังพบว่า *Salmonella, Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* สามารถรอดชีวิตอยู่ในปุ๋ยคอกได้เป็นระยะเวลานาน ผลไม้ต่างชนิดกันจะมีจำนวนและชนิดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนต่างกัน จำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนเริ่มต้นจะบ่งถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยหากมีจุลินทรีย์เริ่มต้นปนเปื้อนในวัตถุดิบมาก จะทำให้ผลไม้มีคุณภาพที่ด้อยลงและมีอายุการเก็บที่สั้นกว่าปกติ

2.4 เทคนิคที่ใช้ในการแยกเชื้อจากจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ

2.4.1 การเจือจางลงตามลำดับ (serial dilution)

การเจือจางลงตามลำดับเป็นวิธีที่ทำให้ตัวอย่างมีจำนวนของจุลินทรีย์น้อยลง เพื่อง่ายต่อการนับและการคัดแยก

1. ชั่งตัวอย่างที่จะตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์(ที่เป็นของแข็ง) หนัก 25 กรัมใส่ในบีกเกอร์ (ซึ่งปิดปากด้วยแผ่นอลูมิเนียมและอบฆ่าเชื้อแล้ว) หรือถ้าตัวอย่างเป็นของเหลวให้ใช้ ปิเปตดูดตัวอย่างปริมาตร 25 มิลลิลิตรใส่ใน น้ำกลั่น หรือบัฟเฟอร์ หรือสารละลายเปปโตน 1 เปอร์เซ็นต์ หรือน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ อย่างใดอย่างหนึ่ง ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ความเข้มข้นเป็น 1/10 หรือ 10^{-1} หรืออาจใช้ตัวอย่างหนัก 11 กรัม(ของแข็ง) หรือ 11 มิลลิลิตร (ของเหลว) ใส่ในน้ำกลั่น หรือ น้ำเกลือปริมาตร 99 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ ความเข้มข้นเป็น 1/10 หรือ 10^{-1}

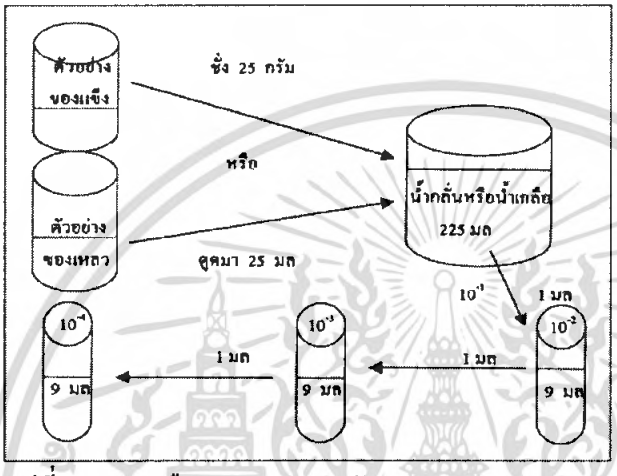
2. ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างในข้อ 1 ซึ่งมีความเข้มข้น 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 10^{-2}

3. ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างในข้อ 2 ซึ่งมีความเข้มข้น 10^{-2} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 10^{-3}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างในข้อ 3 ซึ่งมีความเข้มข้น 10^{-3} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 10^{-4}

5. ถ้าต้องการเจือจางตัวอย่างลงไปอีกให้ดำเนินการโดยใช้วิธีการที่ผ่านมาจนได้ความเข้มข้น หรือความเจือจางในระดับที่ต้องการ ภาพรวมของขั้นตอนการเจือจางลงตามลำดับดังภาพ 2.4



รูปที่ 2.4 การเจือจางลงตามลำดับ

ที่มา http://www.sci.tsu.ac.th

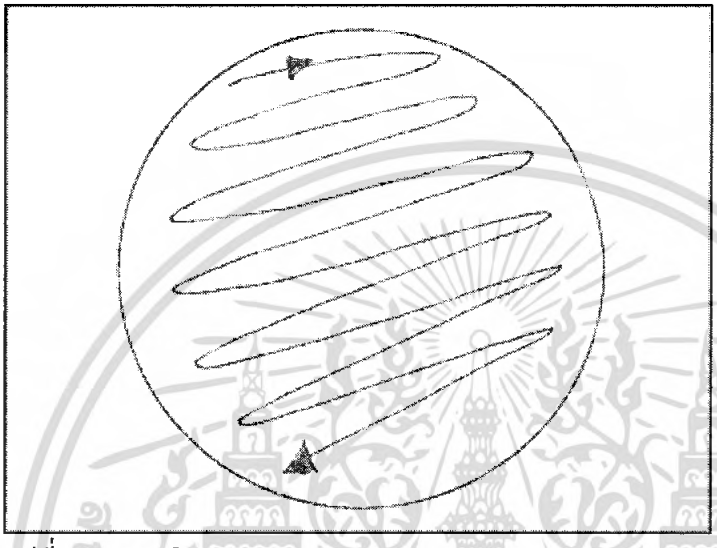
2.4.2 เทคนิค Streak plate

Streak plate คือการใช้ห่วงเขี่ยเชื้อลากเชื้อ (streak) ไปมาบนผิวหน้าอาหารแข็ง (อย่างแผ่วเบาโดยไม่แซะผิวอาหารให้เป็นร่องลึก) เพื่อให้เซลล์เชื้อที่อยู่รวมกัน แยกแต่ละเซลล์ออกจากกัน โดยแต่ละเซลล์จะเติบโตบนอาหารแข็งและเพิ่มจำนวนเซลล์จนมองเห็นเป็นกลุ่มเซลล์ที่อยู่รวมกัน ซึ่งเรียกว่าโคโลนี (colony)

ในการแยกเชื้อผสม ซึ่งมีเชื้อหลายชนิดที่มีรูปร่างแตกต่างกันอยู่รวมกันนั้น อาจนำเชื้อไปลากบนจานอาหารได้โดยตรงดังวิธีการในภาพที่ 2.5 ซึ่งเป็นการแยกเชื้อแบบลากไปมาบนจานอาหารแข็ง จนเต็มจานอาหาร วิธีนี้เรียกว่าซิมเพิล สตรีก (simple streak) แต่ในบางครั้งเชื้อที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์มักแยกออกจากกันยาก จึงต้องแยกโดยการลากเชื้อให้ข้ามไปมา ดังภาพที่ 2.6 ซึ่งเรียกว่าวิธี ครอส สตรีก (cross streak) เป็นการลากเชื้อที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์ในแนวที่ 1 ไปมา 2 - 3 เส้น จากนั้นเผาห่วงเขี่ยเชื้อให้ร้อนแดงและทิ้งให้เย็น แล้วนำมาลากผ่านแนวที่ 1 จำนวน 1 เส้น แล้วลากลงมาเรื่อย ๆ 4 - 5 เส้น โดยไม่ซ้ำรอยเดิม จากนั้นเผาห่วงเขี่ยเชื้อให้ร้อนแดงอีกครั้ง แล้วทิ้งให้เย็น จากนั้นนำห่วงเขี่ยเชื้อมาลากผ่านรอยเชื้อในแนวที่สอง 1 ครั้ง แล้วลากไปมาอีก 4-5 เส้น ที่ไม่ซ้ำกัน ซึ่งเป็นการลากเชื้อแนวที่ 3 จากนั้นนำห่วงไปเผาฆ่าเชื้อให้ร้อนแดง ทิ้งให้เย็น จากนั้น

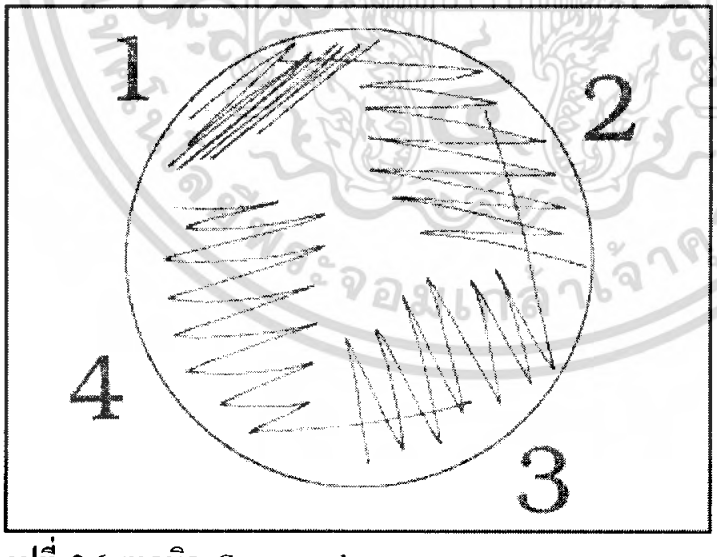
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อลากผ่านแนวเชื้อที่ 3 จำนวน 1 ครั้ง จะได้แนวเชื้อที่ 4 ให้ลากไปมา อีก 4 - 5 เส้น จนเต็มจานอาหาร จากนั้นนำจานไปบ่มเพาะเชื้อ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จะพบเชื้อ เติบโตตามแนวที่ลากไว้ อาจเห็นเชื้อโคโลนีเดี่ยว ๆ ในแนวที่ 3 และมีเชื้อโคโลนีเดี่ยว ๆ ในแนวที่ 4



รูปที่ 2.5 เทคนิค Simple streak

ที่มา http://www.sci.tsu.ac.th



รูปที่ 2.6 เทคนิค Cross streak

ที่มา http://www.sci.tsu.ac.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 เทคนิค Spread plate

การตรวจนับจำนวนโดยวิธีนี้มีหลักการคล้ายคลึงกับวิธีเขย่าจาน โดยทุกขั้นตอนต้องใช้เทคนิคปราศจากเชื้อเช่นเดียวกัน และต้องเจือจางตัวอย่างลงตามลำดับเหมือนกัน ต้องลงรายการต่าง ๆ ที่ฝาจานเช่นเดียวกัน ต้องเพาะบ่มเชื้อในลักษณะเดียวกัน และตรวจนับจำนวนวิธีเดียวกัน แต่วิธีนี้แตกต่างจากวิธีเขย่าจาน คือ

1. ต้องเทอาหารเลี้ยงเชื้อใส่จานอาหารไว้ล่วงหน้าอย่างน้อย 24 ชั่วโมง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ

1.1 ให้ผิวหน้าอาหารแข็งแห้ง ไม่มีความชื้น ถ้าผิวหน้าอาหารเปียก จะทำให้โคโลนีของเชื้อที่เติบโตบนจานอาหารเกิดการแผ่ลามไปมาระหว่างโคโลนี จึงอาจไม่เห็นเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ให้ตรวจนับปริมาณเชื้อได้ แต่จะเห็นเป็นโคโลนีเดียวกันที่แผ่ลามเกือบทั่วไป

1.2 เพื่อทราบว่าอาหารที่นำไปใช้ตรวจนับปริมาณเชื้อนั้น ไม่มีเชื้ออื่นใดปนเปื้อนลงไป ดังนั้นก่อนการใส่ตัวอย่างที่เจือจางแล้วลงบนจาน ต้องสังเกตว่ามีจุลินทรีย์ใดเติบโตบนจานอาหารหรือไม่ ถ้ามีห้ามนำจานอาหารนั้นมาใช้

2. ปริมาตรของตัวอย่างที่ใส่ในแต่ละจาน ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร

3. ใช้แท่งแก้วงอจุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนไฟฆ่าเชื้อ 1-2 ครั้ง และทิ้งให้เย็น จากนั้นนำไปกวาดตัวอย่างที่ใส่บนจานอาหาร ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร

2.4.4 เทคนิค Pour plate

เป็นวิธีที่นอกจากจะแยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์แล้วยังสามารถตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อได้ด้วย วิธีการนี้ต้องทำ Serial dilution ก่อน จึงจะสามารถนับจำนวน จุลิน ทรีย์ต่อหน่วยปริมาตรได้ หลักการทำ Pour plate คือการนำเอาตัวอย่างที่ต้องการแยกหรือเพาะเลี้ยงมาผสมกับวุ้นหลอมเหลวในอาหารเลี้ยงเชื้อปล่อยให้วุ้นแข็งตัวก่อน แล้วนำไปบ่มอุณหภูมิที่กำหนดโคโลนีของจุลินทรีย์จะเจริญบนหรือในอาหารวุ้น

2.5 การจัดจำแนกจุลินทรีย์

2.5.1 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมี

มีหลายวิธี ได้แก่ การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส การทดสอบ Oxidative-fermentative การทดสอบเมทธิลเรด การทดสอบ VP การทดสอบการสร้างอินโดล การทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ และการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.5.1.2 การติดสีแกรม

การย้อมสีวิธีนี้มีความสำคัญที่สุด และใช้กันอย่างแพร่หลาย สามารถใช้ศึกษารูปร่าง ลักษณะและการจัดเรียงตัวของเซลล์ และทำให้จำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 ชนิด คือ แบคทีเรีย แกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ โดยผลจากการย้อมสี จะพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต และแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของซาฟรานิน

กลไกการติดสีแกรมของแบคทีเรียเกี่ยวข้องกับโครงสร้างและองค์ประกอบของผนังเซลล์ ในแบคทีเรียแกรมลบจะมีสารพวกไขมันที่มากกว่าของแบคทีเรียแกรมบวก และยังมีชั้นของผนังเซลล์บางกว่าด้วย ในกระบวนการย้อมสี เมื่อล้างออกด้วยแอลกอฮอล์ จะไปละลายไขมัน ทำให้รูเปิดของผนังเซลล์กว้างขึ้น จึงยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ของสีคริสตัลไวโอเลต-ไอโอดีนคอมเพล็กซ์หลุดออกมา เมื่อย้อมสีซาฟรานินจึงติดสีแดงของซาฟรานิน

แต่ในแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยกว่าและมีความซับซ้อนขององค์ประกอบที่ผนังเซลล์น้อยกว่า เมื่อล้างสีด้วยแอลกอฮอล์ เซลล์จะเหี่ยว เพราะเกิดการสูญเสียน้ำ เยื่อหุ้มเซลล์มีรูขนาดเล็กลง สารประกอบโมเลกุลใหญ่ของสีละลายออกมาไม่ได้ เซลล์ยังคงติดสีม่วง เมื่อย้อมทับด้วยซาฟรานิน จึงย้อมไม่ติดสีแดง

บางครั้งการย้อมสีแกรม อาจมีปัญหาทำให้ผลการย้อมไม่เป็นไปตามทฤษฎีเช่น แบคทีเรียแกรมบวกในบางสภาพอาจให้ผลแตกต่างในการย้อมคือไม่ติดสีแกรมบวก หรืออายุของเชื้อ ถ้าเชื้อแก่ แบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดอาจสูญเสียความสามารถในการติดสีคริสตัลไวโอเลต ทำให้ติดสีแกรมลบแทน หรือขึ้นกับสภาพแวดล้อมของแบคทีเรีย หรือขึ้นอยู่กับวิธีการเกลี่ยเชื้อ วิธีการย้อมสี และคุณภาพของสีที่ใช้ เป็นต้น

วิธีการย้อมสีแบบแกรม มีประโยชน์ในการจำแนกแบคทีเรียออกเป็นแกรมบวกและแกรมลบ แต่สำหรับจุลินทรีย์ชนิดอื่นจะติดสีย้อมชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น เช่น ยีสต์ ติดสีแกรมบวก (นงลักษณ์และปรีชา, 2547)

2.5.1.3 การทดสอบแคตาเลส (Catalase Test)

การทดสอบเอนไซม์แคตาเลสได้มีการใช้มานานในการแยกแบคทีเรีย staphylococci ออกจาก streptococci และใช้ในการแยกแบคทีเรียอื่นๆด้วย

Mcleod และ Gordon ได้แบ่งแบคทีเรียตามความสามารถในการสร้างแคตาเลส ส่วนพวกที่ไม่สามารถสร้างแคตาเลสมักมีแนวโน้มว่าจะตาย ถ้าในอาหารไม่มีน้ำตาล หรือไม่ก็เป็นเพราะมันสร้าง H_2O_2 หรือเกิด H_2O_2 สะสมจากการที่เชื้อถูกแสงและอากาศ สาร H_2O_2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นสารพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต จึงมีข้อแนะนำว่าควรจะเก็บ stock culture ไว้ในที่อากาศจำกัดและมืด

กลไกการทำงานของแคตาเลส

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2\,H_2O + O_2\uparrow$$

ถ้ามีการสร้างฟองออกซิเจน (O_2) ถือว่าได้เป็นผลบวก ได้มีการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ H_2O_2 ในการทดสอบแคตาเลส โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 1.5-30 พบว่า ความเข้มข้นระหว่างร้อยละ 0.5-5.0 ให้ผลดีและ 1 หยดของ H_2O_2 ร้อยละ 3 ให้ผลดีที่สุด และในการทดสอบต้องใช้เชื้ออายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง เพราะแคตาเลสจะมีอยู่เฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น ดังนั้น การอ่านผลลบผิดพลาด (false negative) สามารถเกิดขึ้นได้ถ้าใช้เชื้ออายุมาก ข้อควรระวังอีกอย่างคือ ห้ามเอาเชื้อที่เลี้ยงบน blood containing medium เพราะในอาหารนี้จะมีแคตาเลสวัตถุประสงค์ของการทดสอบ คือ ศึกษาดูความสามารถของแบคทีเรียในการสลาย H_2O_2 โดยเอนไซม์แคตาเลส ถ้าได้จะทำให้เกิดฟองแก๊สขึ้น ซึ่งเป็นแก๊สออกซิเจน

2.5.1.4 การทดสอบออกซิเดส (Oxidase Test)

การทดสอบออกซิเดสใช้ในการจัดจำแนกสกุลต่างๆของแบคทีเรีย การพบเอนไซม์ออกซิเดสเกิดจากการฉีดสารละลายผสมของ α -naphthol และ p-phenylene diamine เข้าไปในสัตว์จะเกิดสีน้ำเงินขึ้น ซึ่งเป็นสีของ indophenol blue ปฏิกิริยานี้เรียกว่า nadi reaction ต่อมามีการศึกษาในพืชด้วย พบว่าเป็น intracellular enzyme เรียกว่า indophenol oxidase หรือ respiratory enzyme (cytochrome oxidase = cytochrome C oxidase) ซึ่งไซโตโครมชนิดนี้ประกอบด้วย ไซโตโครม เอ และ เอ 3 พบใน aerobic respiratory bacteria รวมทั้งพวก enterobacteriaceae สำหรับพวก obligate anaerobic bacteria จะไม่มี cytochrome oxidase system จึงไม่สามารถเจริญในที่มีออกซิเจน

ไซโตโครมจะประกอบด้วยฮีม (heme) ซึ่งมีธาตุเหล็ก ทำให้อยู่ในสภาพรีดักชันออกซิเดชัน ดังสมการ

$$2\ \text{reduced cytochrome C} + 2H^+ + \frac{1}{2}O_2 \xrightarrow{\text{cytochrome}} 2\ \text{reduced cytochrome C} + H_2O$$

วิธีการตรวจสอบออกซิเดส มี 2 วิธี

1. วิธีของ Kovacs ควรใช้ tetramethyl-p- phenylene diamine ซึ่งจะถูกออกซิไดส์โดยไซโตโครม ซี ได้สารสีม่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วิธีของ Gaby และ Hadley แล้วดัดแปลงโดย Ewing และ Johnson สารทดสอบใช้ dimethyl-p-phenylene diamine และ α- naphthol

ข้อควรระวัง สารทดสอบต้องใหม่ และจะถูกออกซิไดส์โดยออกซิเจนในอากาศ ต้องเก็บในขวดสีน้ำตาล สำหรับสิ่งมีชีวิตที่มีไซโตโครม ซี เล็กน้อย จะเกิดสีม่วงหรือน้ำเงินหลังจากเวลาตรวจสอบ เรียกว่าเป็น weak-positive หรืออาจเป็น auto oxidation ก็ได้ วัตถุประสงค์ของการทดสอบ คือ เพื่อให้ทราบวิธีการตรวจสอบออกซิเดสที่ใช้มากในการจัดจำแนกสกุลของแบคทีเรีย

2.5.1.5 การทดสอบเมทิลเรด-เมทิลคาร์บินอล (Methyl Red-Voges Proskauer Test)

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตกรดปริมาณมากๆ จากน้ำตาลกลูโคสและให้ผลผลิตที่เรียกว่า อะซิโตอิน(acetoin) หลักการทดสอบนี้ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae

แบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกจะสามารถผลิตกรดอินทรีย์มากมายหลายชนิด เช่น *Escherichia coli* จะผลิตกรดแลคติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เป็นต้น ส่วนกลุ่มที่สองจะให้ butylenes glycol เช่น *Klebsiella* sp. และ *Enterobacter* sp. ผลิตกรดอินทรีย์บ้าง และผลิตให้ 2, 3 -butanediol เป็นผลผลิตหลัก

MR Test ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียกลุ่มที่ให้กรด เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อที่จะผลิตและรักษาความเป็นกรดของอาหารเลี้ยงเชื้อจากการใช้กลูโคสไว้ให้มีค่าพีเอชต่ำกว่า 4.4 ซึ่งปริมาณกรดที่แบคทีเรียผลิตมากๆ นี้สามารถเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีแดง

VP Test เป็นการตรวจสอบการมีอยู่ของสารอะซิโตอิน (acetylmethyl carbinol หรือ acetoin) ซึ่งเป็นผลผลิตที่มีพีเอชเป็นกลาง และเป็นสารตัวกลางในการผลิต butylenes glycol

2.5.1.6 การทดสอบการสร้างอินโดล (Indole Test)

การทดสอบความสามารถในการสร้างอินโดล ใช้แยกแบคทีเรีย *Escherichia* ออกจาก *Klebsiella-Enterobacter* สิ่งมีชีวิตจะสร้างสารอินโดลจากกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophane) โดย tryptophanase ในอาหารทดสอบจะต้องมีทริปโตเฟน ซึ่งกรดอะมิโนชนิดนี้อาจจะไม่มีในอาหาร เปปโตนทั่วๆไปก็ได้ ดังนั้นจึงนิยมใช้เคซีนไดเจส (casein digest) หรือทริปโตนก็ได้ อาหารที่ใช้ควรมีส่วนผสมของเคซีนไดเจสหรือทริปโตนร้อยละ 1 และไม่จำเป็นต้องใส่อาหารอื่นๆลงไปอีก ถ้าแบคทีเรียที่ทดสอบเจริญได้ ถ้าไม่สามารถเจริญได้ก็จำเป็นต้องใส่อาหารที่ช่วยให้แบคทีเรียนั้นเจริญได้ แต่ข้อควรระวังคือ ในอาหารทดสอบจะต้องไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีน้ำตาลกลูโคสเพราะจะไปยับยั้งการสร้างอินโดล ออกซิเจนก็มีอิทธิพลต่อการสร้างอินโดล เช่น พวก facultative organism (*E. coli*) จะสร้างอินโดลมากขึ้นเมื่อมีการบ่มในที่มีอากาศ

การทดสอบการสร้างอินโดลมีหลายวิธี เช่น วิธีของ Ehrlich-Boehme ใช้ p-dimethylaminobenzaldehyde-HCl ละลายในแอลกอฮอล์ และเติมโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต จะเกิดสีแดงถ้ามีอินโดล ต่อมา Kovacs ได้ดัดแปลงวิธีของ Ehrlich-Boehme โดยใช้ เอมิลแอลกอฮอล์ แทนเอทิลแอลกอฮอล์ ซึ่งวิธีของ Kovacs ปัจจุบันยังคงนิยมใช้อยู่

ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นในการทดสอบการสร้างอินโดล คือ สาร pyrrole (indole = benzopyrrole) ในสารละลายเอซิดแอลกอฮอล์อย่างอ่อนที่มี p-dimethylaminobenzaldehyde ใช้ความร้อนเป็นตัวเร่งจะเกิดสีม่วงแดง ถ้าไม่ใช้ความร้อนต้องใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น

2.5.2 การทดสอบด้าน Molecular

2.5.2.1 Nucleic Acid Hybridization

คือเทคนิคที่อาศัยการจับกันระหว่างโมเลกุลของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอของ จุลินทรีย์เป้าหมายกับโพรบดีเอ็นเอซึ่งมีลำดับของกรดนิวคลีอิคเข้าคู่กับดีเอ็นเอที่เป็นเป้าหมาย โดยทั่วไปโพรบดีเอ็นเอจะมีความยาวประมาณ 15 -30 นิวคลีโอไทด์ ความจำเพาะของวิธีการนี้ขึ้นอยู่กับลำดับของกรดนิวคลีอิคที่โพรบ ในขั้นแรกจะต้องทำให้เซลล์จุลินทรีย์แตกออก และทำให้กรดนิวคลีอิคบริสุทธิ์ เพื่อที่จะได้จับคู่กันกับโพรบ เพื่อเกิดการจับกันได้ไฮบริด (Hybrid) เทคนิคที่ใช้ตรวจหาไฮบริดนี้มีความคล้ายคลึงกันกับการตรวจหาสารประกอบของแอนติเจน-แอนติบอดี

แบบไฮบริไดเซชั่นโดยตรงจะใช้โพรบดีเอ็นเอที่ติดฉลากจับกับกรดนิวคลีอิคในตัวอย่าง โพรบที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีและสารเรืองแสงสามารถดูได้โดยตรง ถ้าเป็นแบบทางอ้อมสามารถใช้เอนไซม์ติดฉลากกับโพรบ

วัสดุที่นำมารองรับอาจจะเป็นแผ่นเมมเบรนไนลอนหรือไนโตรเซลลูโลส มีชุดทดสอบหลายชนิดที่ออกจำหน่ายเช่น Gene-Trek ซึ่งใช้โพรบที่จำเพาะกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหาร และจำเพาะกับ Ribosomal RNA ในแบคทีเรียและใช้การดูสี (Colorimetric) ในการตรวจหาไฮบริดที่จำเพาะ อย่างไรก็ตามการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ยังจำเป็นอยู่เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจ

2.5.2.2 วิธีการ Molecular subtyping

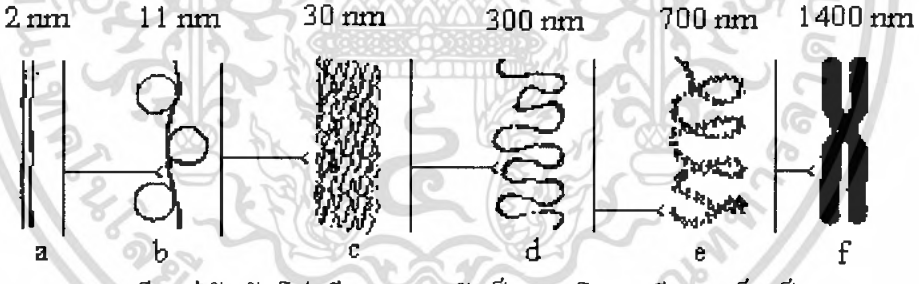
วิธีการนี้จะสามารถแยกสายพันธุ์ต่าง ๆ ของจุลินทรีย์ที่เป็นสปีชีส์เดียวกัน ทำให้ได้ข้อมูลที่มีประโยชน์ในการทำอนุกรมวิธานหรือดูการระบาดของเชื้อ วิธีการใช้สารนิวคลีอิคจะมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อที่ดีกว่าวิธีการจำแนกชนิดแบบ Phenotype เนื่องจากเซลล์ของจุลินทรีย์จะไม่ได้รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม เพราะลำดับนิวคลิโอไทด์ของดีเอ็นเอจะไม่เปลี่ยนแปลงในขณะที่เชื้อเจริญ

2.5.2.3 เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลาย ๆ ด้าน จนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น



รูปที่ 2.7 สาย DNA เกลียวคู่พันกับโปรตีนและหดตัวเป็นสายโครมาตีนจนเห็นเป็นโครโมโซมในระยะเมตาเฟส

ที่มา : Freifelder(1985)

2.5.2.3.1 หลักการของ PCR

ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA poloymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอและการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

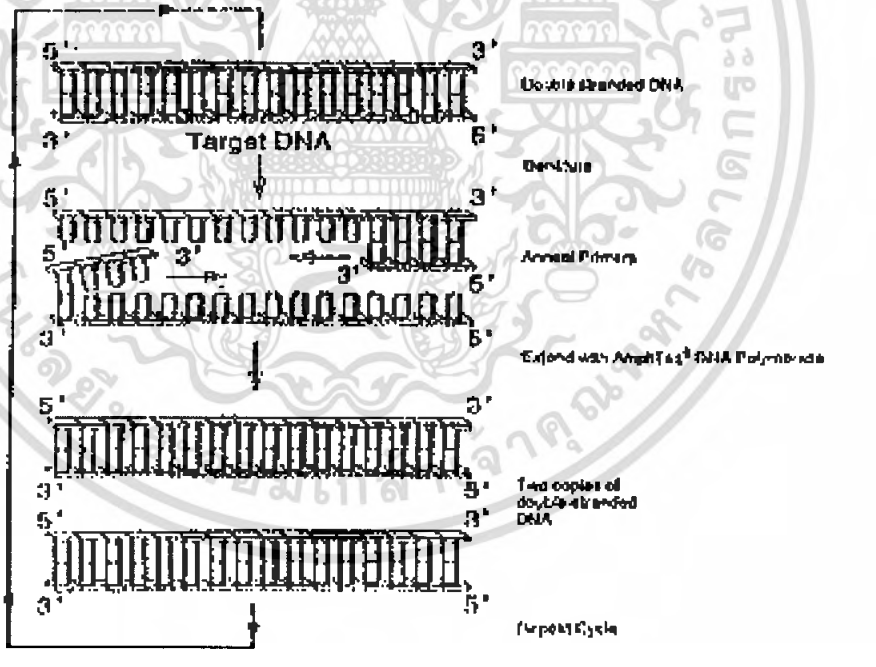
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

(primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นที่ 1 เรียกว่า ดีเนเจอร์ริ่ง(denaturing) เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95° ซ

ขั้นที่ 2 เรียกว่า แอนเนลลิ่ง(annealing) เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 13-14 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60° ซ

ขั้นที่ 3 เรียกว่า เอ็กเทนชัน(extension) เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5 ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งเอ็นไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยา ตลอดทั้งสามขั้นตอน



รูปที่ 2.8 หลักการและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR

ที่มา : PE applied Biosystems

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
83748

ที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอไม่ได้น้อยกว่า 100,000 เท่า

2.5.2.3.2 สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา PCR

เนื่องจากการทำ PCR เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ในหลอดทดลอง จึงต้องมีการเติมสารเคมีและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ สารเคมีที่ต้องใช้ปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้

1.Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

2. DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์

3. Primer เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการสร้างไพเมอร์จำเพาะ

4. PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุมูลแมกนีเซียม (Mg^{++}) อยู่ด้วย

5. Template คือดีเอ็นเอต้นแบบหรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะ

สารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะผสมกันไว้ในหลอดทดลองเล็กปริมาตรสาร 20-100 ไมโครลิตร เมื่อนำหลอดส่วนผสมไปใส่ไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า DNA thermal cycle (นิยมเรียกว่าเครื่อง PCR) ที่ปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่กำหนด จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นในหลอด เมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ผลผลิตดีเอ็นเอ ขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก

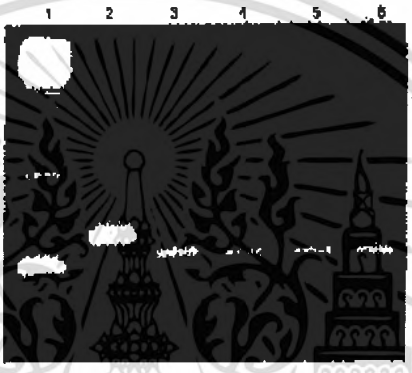
2.5.2.3.3 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine)

เครื่อง Thermal cycler หรือ PCR machine เป็นเครื่องที่จำเป็นในการทำ PCR ซึ่งเครื่องนี้มีอยู่หลายแบบและหลายระบบขึ้นกับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัทผู้ผลิต ข้อสำคัญคือต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลาย ๆ รอบได้ตั้งโปรแกรมการทำงานได้และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนัก ระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้นคือ denaturing annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.3.4 การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

ดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิตจะต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาแยกหาดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (Agarose gel) โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ ซึ่งจะเรืองแสงเมื่อเจอกับแสงอุลตร้าไวโอเลต ซึ่งจะเห็นแถบดีเอ็นเอเรืองแสงบนแผ่นวุ้น (ภาพที่ 9)



รูปที่ 2.9 แถบดีเอ็นเอที่แยกบนแผ่นวุ้นโดยวิธี agarose gel electrophoresisและย้อมด้วยสี ethidium bromide ถ่ายภาพภายใต้แสง ultraviolet

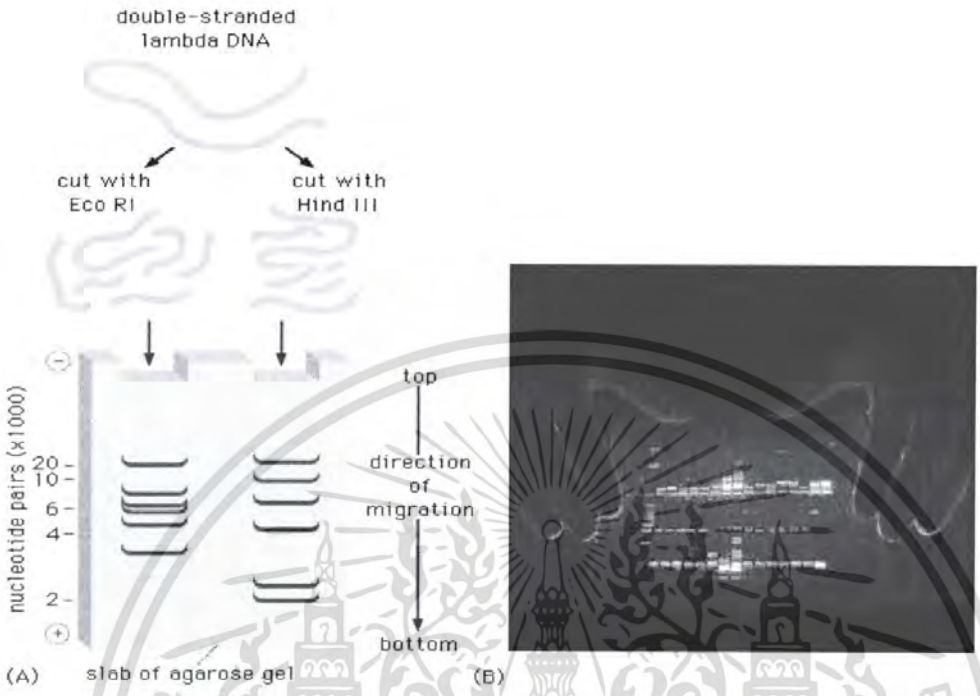
ที่มา : http://web.ku.ac.th/schoolnet/snet4/genetics/pcr.htm

การสร้างรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ(Recombinant DNA) และการตัดต่อพันธุกรรมนั้น จะสำเร็จได้ต้องอาศัยหลักการพื้นฐานและเทคนิคหลาย ๆ อย่างมาประกอบกัน เทคนิคที่ได้รวบรวมไว้ในบทความนี้เป็นเพียงเทคนิคพื้นฐานเท่านั้น ในบางงานอาจต้องใช้เทคนิคเฉพาะที่ไม่ได้กล่าวถึงไว้ในที่นี้ ขอให้ผู้สนใจได้ค้นคว้าศึกษาเพิ่มเติมจากแหล่งอื่น

2.5.2.4 Agarose gel Electrophoresis

Agarose gel electrophoresis เป็นเทคนิคการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันออกจากกันด้วยสนามไฟฟ้า ทั้งนี้เพราะดีเอ็นเอมีประจุลบจากหมู่ฟอสเฟต ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ซึ่งมีมวลมากก็จะมีจำนวนประจุลบมากขึ้นด้วย ดังนั้นเมื่อพิจารณาสัดส่วนของประจุต่อมวลดีเอ็นเอแล้วจะเป็นค่าคงที่ agarose gel electrophorcsis แยกดีเอ็นเอออกจากกันได้โดยอาศัยแรงเสียดทานการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ แรงเสียดทานนี้ขึ้นอยู่กับรูปร่างและขนาดของดีเอ็นเอ โดยที่ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างอัดแน่นอย่าง supercoiled DNA จะมีแรงเสียดทานน้อย จึงเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า circular DNA และดีเอ็นเอรูปร่างเป็นแท่ง ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเหมือนกัน อย่างชิ้นดีเอ็นเอรูปแท่งนั้น ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ซึ่งมีแรงเสียดทานการเคลื่อนที่มากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 agarose gel electrophoresis นำไปส่องในแสงอัลตราไวโอเลต ethidium bromide ที่ย้อมติดดีเอ็นเออยู่จะเรืองแสงสีส้ม

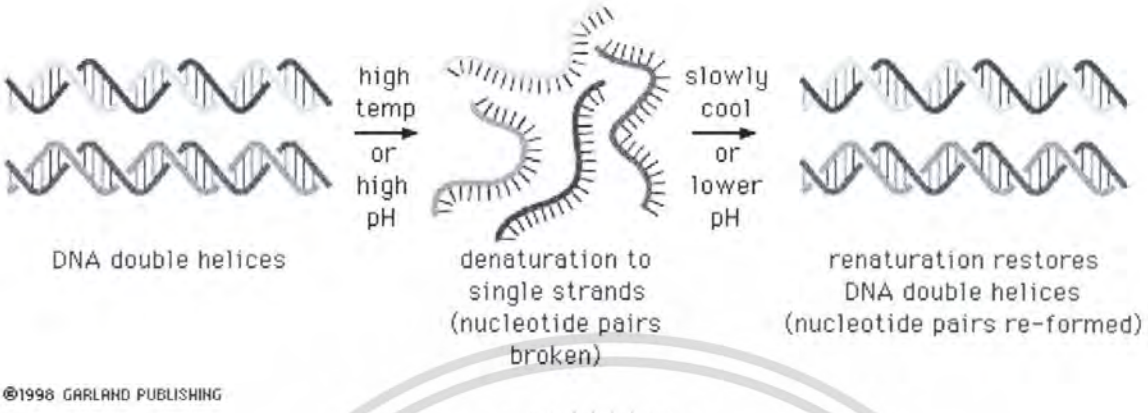
ที่มา : http://www.csu.edu.au/faculty/health/biomed/subjects/molbol/DNA technology.htm

ดังนั้นเมื่อตัดดีเอ็นเอเป็นชิ้น ๆ ด้วย restriction endonuclease เราจึงสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันได้ด้วย agarose gel electrophoresis กระทำโดยเตรียม agarose gel ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม หยดสารละลายดีเอ็นเอลงในช่องบน agarose gel แล้วเปิดสนามไฟฟ้าดีเอ็นเอจะวิ่งจากขั้วลบเข้าหาขั้วบวก เมื่อได้เวลาที่เหมาะสมปิดสนามไฟฟ้า แล้วย้อมดีเอ็นเอใน agarose gel ด้วยสี acridine เช่น ethidium bromide แล้วนำไปส่องในแสงอัลตราไวโอเลต ethidium bromide ที่ย้อมติดดีเอ็นเออยู่จะเรืองแสงสีส้ม เป็นแถบดีเอ็นเอซึ่งมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

2.5.2.5 Hybridization

Hybridization เป็นเทคนิคที่อาศัยคุณสมบัติเรื่องการจับคู่เบสอย่างจำเพาะของดีเอ็นเอ (G:C, A:T) พันธะไฮโดรเจนที่เชื่อมระหว่างคู่เบสถูกทำลายได้ง่าย ๆ ด้วยความร้อน หรือการเพิ่ม pH ของสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.11 Hybridization

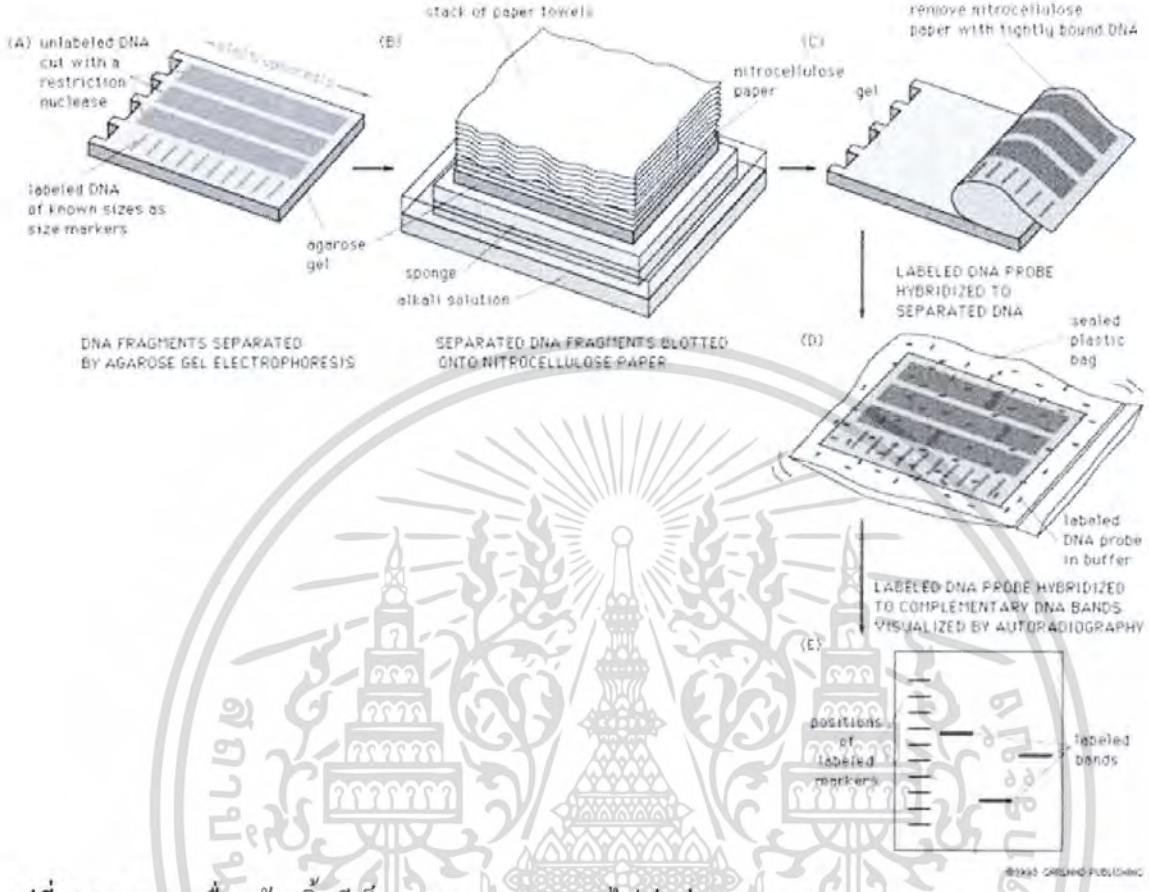
ที่มา : http://www.csu.edu.au/faculty/health/biomed/subjects/molbol/DNA technology.htm

เมื่อพันธะไฮโดรเจนถูกทำลายดีเอ็นเอจะคลายเกลียว เปลี่ยนสภาพโมเลกุลจากดีเอ็นเอรูปร่างเกลียวคู่เป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว เรียกว่าเกิด denaturation ของดีเอ็นเอ เมื่อลดอุณหภูมิ หรือลด pH ของสารละลายดีเอ็นเอลงสู่สภาพเดิม สายดีเอ็นเอจะกลับมาเข้าคู่กันใหม่ โดยอาศัยการจับคู่เบสอย่างจำเพาะ DNA probe คือ ดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ซึ่งติดฉลากกัมมันตรังสีไว้ DNA probe มีคุณสมบัติที่สำคัญคือ ความสามารถจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจได้อย่างจำเพาะ ทำให้เราสามารถติดตามชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจนั้นได้โดยอาศัยกัมมันตภาพรังสีที่ติดอยู่กับ DNA probe

2.5.2.6 Southern Blot Hybridization

เมื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันออกจากกันด้วย agarose gel electrophoresis แล้ว หากต้องการทำhybridization เพื่อตรวจหาว่าดีเอ็นเอชิ้นที่มียีนที่ต้องการศึกษาอยู่ในตำแหน่งใดของ electrogram เราจำเป็นที่จะต้องย้ายดีเอ็นเอที่แยกแล้วนั้นออกจาก agaroes gel ไปสู่แผ่น nitrocellulose ซึ่งมีความคงทนมากกว่า ทั้งนี้เพราะว่าระหว่างการ hybridization จะต้องมีการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้ดีเอ็นเอแยกสายก่อนที่จะจับคู่เบสใหม่กับ DNA probe ความร้อนที่ใช้นี้สามารถทำลาย agaroes gel ให้หลอมละลายหายไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



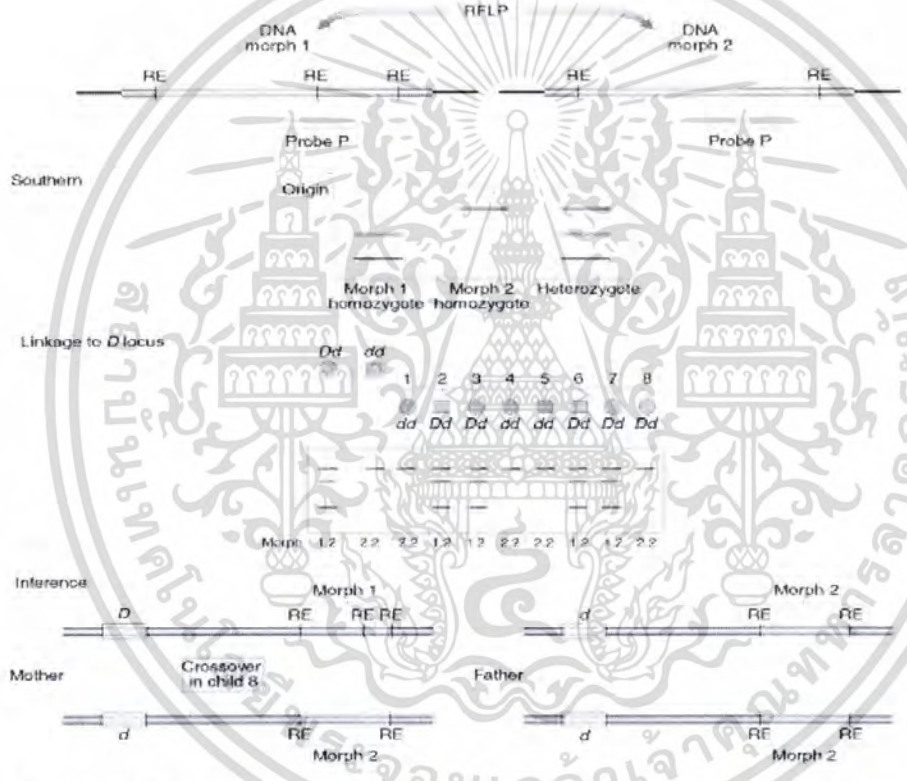
รูปที่ 2.12 การเคลื่อนย้ายชิ้นดีเอ็นเอจาก agarose gel ไปสู่แผ่น nitrocellulose
ที่มา : http://www.thirawat.com/ge/DNAevid.html

การเคลื่อนย้ายชิ้นดีเอ็นเอจาก agarose gel ไปสู่แผ่น nitrocellulose ทำโดยการวางแผ่น nitrocellulose ไว้บน agarose gel ที่แช่สารละลายบัฟเฟอร์อยู่ แล้ววางกระดาษซับหลาย ๆ ชั้นบนแผ่น nitrocellulose อีกทีหนึ่ง แผ่นกระดาษซับที่แห้งจะดูดซับสารละลายบัฟเฟอร์ที่อยู่ข้างล่างให้เคลื่อนที่ขึ้น ชะผ่าน agarose gel และแผ่น nitrocellulose สู่กระดาษซับ ในขณะที่เคลื่อนที่สารละลายบัฟเฟอร์จะชะเอาชิ้นดีเอ็นเอให้หลุดออกจาก agarose gel ไปเกาะติดกับแผ่น nitrocellulose ไปด้วย โดยวิธีนี้เราจึงสามารถย้ายชิ้นดีเอ็นเอจาก agarose gel ไปสู่ nitrocellulose ได้ วิธีการนี้เรียกว่า southern blot และถ้านำ DNA probe มาจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่ย้ายมาอยู่บน nitrocellulose อย่างจำเพาะ ต่ออีกทีหนึ่ง วิธีการทั้งหมดที่ประกอบด้วย agarose gel electrophoresis, southern blot และ hybridization จะเรียกว่า southern blot hybridization

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.7 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อจำแนกความแตกต่างเพื่อระบุบุคคล โดยมีหลักการที่ว่า ในระหว่าง restriction endonuclease site ของแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งมาจากสายพันธุ์ที่ต่างกัน อาจมี mutation หรือลำดับดีเอ็นเอซ้ำ ๆ ที่ทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วย restriction endonuclease เดียวกันมีขนาดแตกต่างกัน เมื่อแยกดีเอ็นเอแล้วตรวจด้วย DNA probe ที่จำเพาะ จะทำให้ได้ลักษณะของ restriction fragment ที่แตกต่างกัน



รูปที่ 2.13 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (1)

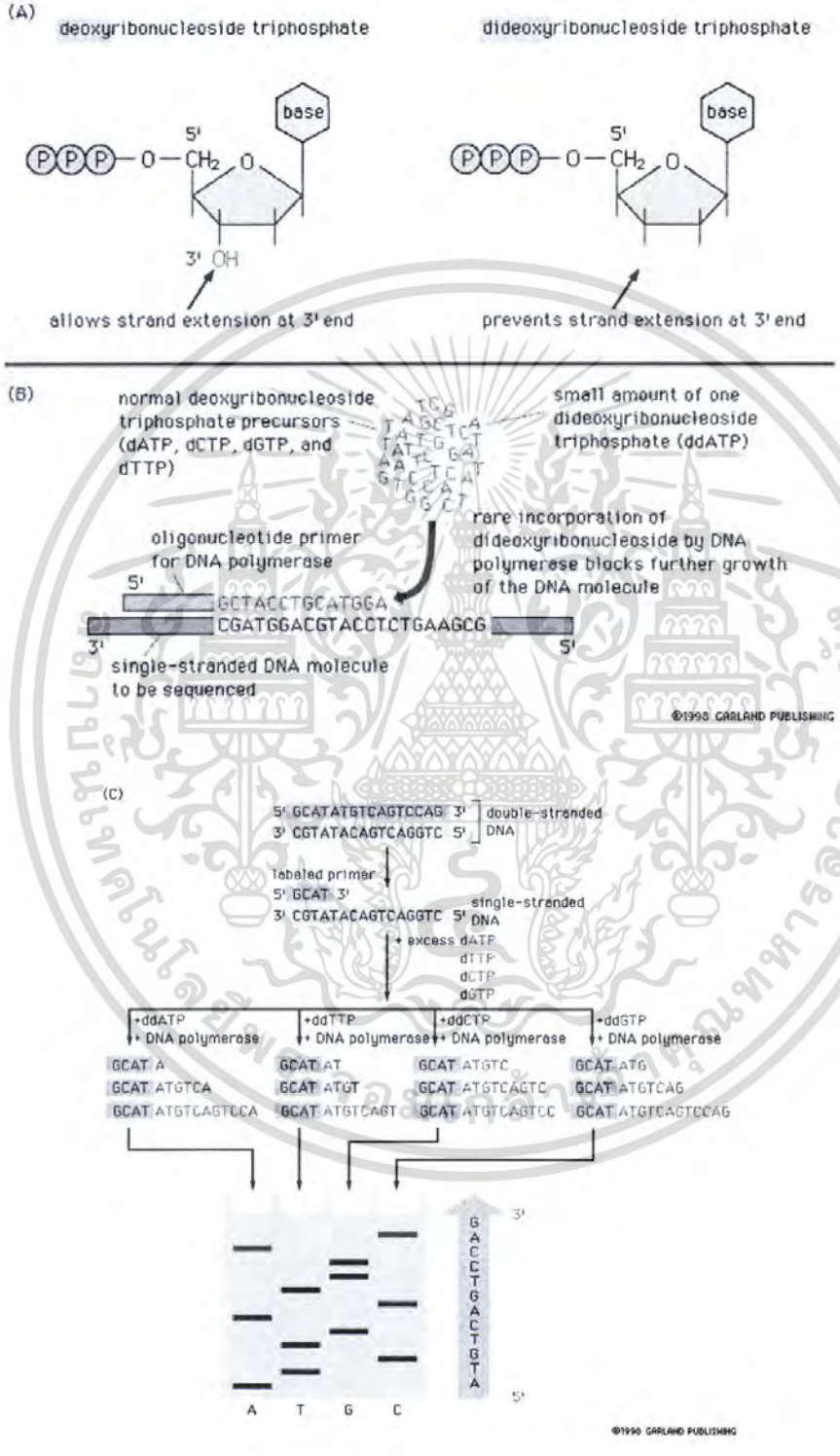
ที่มา : http://www.student.chula.ac.th/~49371019/restriction__fragment__length__p.htm

ด้วยการศึกษา Restriction fragment length polymorphism ทำให้ทราบได้ว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์มี genotype เป็นแบบใด

2.5.2.8 DNA sequencing

การศึกษาลำดับเบสบนสายดีเอ็นเออาศัยหลักการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ที่ว่า การทำงานของเอนไซม์นี้ต้องการ DNA template, 3′-OH primer และ deoxyribonucleotside triphosphate ทั้ง 4 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.14 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (2)

ที่มา : http://www.student.chula.ac.th/~49371019/restriction__fragment__length__p.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอกระทำโดยใช้ dideoxyribonucleosidetriphosphate ๔ ชนิด แต่ละชนิดใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ 4 ปฏิกิริยา แต่ละปฏิกิริยาจะหยุดสังเคราะห์ดีเอ็นเอเมื่อมาถึงจุดที่ต้องใช้ dideoxyribonucleoside triphosphate แต่ละชนิด ดังนั้นแต่ละปฏิกิริยาจึงได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันตามแต่ตำแหน่งของเบสที่หยุดปฏิกิริยาไว้ เมื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากกันด้วย gel electrophoresis ก็จะสามารถอ่านลำดับเบสของดีเอ็นเอได้โดยดูตำแหน่งที่เบสหยุดในแต่ละปฏิกิริยา

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Toyosaki และคณะ (1995) ได้ศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียเซลลูโลสสายพันธุ์ *Acetobacter* sp. โดยแยกจากแหล่งธรรมชาติ เช่น ผลไม้ ถั่ว อ้อย ดอกไม้ และดิน พบว่าตัวอย่างที่เก็บได้ในประเทศญี่ปุ่น 547 ตัวอย่าง ตรวจพบแบคทีเรียเซลลูโลส 126 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่แยกได้จากผลไม้เน่าเสียจะมีสัดส่วนในการผลิตเซลลูโลสได้สูงสุด (มากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์) สำหรับตัวอย่างดินไม่พบแบคทีเรียเซลลูโลส *Acetobacter* sp.

Chenzhu และ Zenrong (2000) ศึกษาการคัดเลือก การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเซลลูโลส *Acetobacter xylinum* ที่ให้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด พบว่าจากการเก็บตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติในประเทศจีน 150 ตัวอย่าง พบแบคทีเรียเซลลูโลส 26 สายพันธุ์ และพบว่าสายพันธุ์ Ax – 1 และสายพันธุ์ Ac – II มีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสสูงสุด คือได้ปริมาณเซลลูโลส 16 กรัมต่อลิตร และ 14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากน้ำตาลซูโครส 50 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน และต่อมาได้จัดจำแนกพบว่าเป็นสายพันธุ์ *Acetobacter pasteurianus* subsp *xylinum* และ *Acetobacter hansenii* ตามลำดับ

Gonzalez และคณะ (2005) ศึกษาการประยุกต์ใช้วิธีทางชีววิทยาโมเลกุลในการแยกสปีชีส์และสายพันธุ์ของแบคทีเรียอะซิติกที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักไวน์ พบว่าแบคทีเรียอะซิติกที่เกิดขึ้น ถูกจัดจำแนกในระดับสปีชีส์และสายพันธุ์โดยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล เช่น วิธี Restriction fragment Length Polimorfism (RFLP) of amplified 16 S rDNA และ amplification by polymerase chain reaction of Enterobacterial Repetive Intergenic Consenses (ERIC - PCR) รวมทั้ง Repetitive Extragenic Palindromic (REP – PCR)

Gonzalez และคณะ (2006) ศึกษาการประยุกต์ใช้วิธีทางชีววิทยาโมเลกุลสำหรับจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติก พบว่ามีการค้นพบสปีชีส์ใหม่ๆ ของแบคทีเรียอะซิติกโดยวิธีทางชีวโมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเฉพาะวิธี RFLP – PCR of the 16 S rRNA เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเนื่องจากสามารถทำได้รวดเร็วและน่าเชื่อถือ

Lisdiyanti และคณะ (2003) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้จากแหล่งต่างๆในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่าสายพันธุ์ของแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้มี 331 สายพันธุ์ สายพันธุ์ของ *Acetobacter* , *Gluconoacetobacter* และ *Kozakia* สามารถเจริญได้ดีในอาหาร enriched medium ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส กรดอะซิติก เอทานอล แต่ละสายพันธุ์ของ *Asaia* และ *Frateuria* ถูกยับยั้งด้วยกรดอะซิติก, สายพันธุ์ *Acetobacter* sp. จะพบมากในอาหารหมัก สายพันธุ์ของ *Gluconobacter* พบมากในผลไม้และดอกไม้ สายพันธุ์ *Gluconacetobacter* พบมากในอาหารหมักและสายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ Asaia พบมากในดอกไม้ สายพันธุ์ของ *Kozakia baliensis* แยกได้จากน้ำตาลโตนด และ ragi ในประเทศอินโดนีเซีย รวมทั้ง 16 สายพันธุ์ของ *Frateuria aurantia* แยกได้จากผลไม้และดอกไม้ในประเทศอินโดนีเซีย ในการแยกเชื้อครั้งนี้ไม่พบ *Acidomonas*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 จุลินทรีย์

3.1.1 *Acetobacter xylinum* TISTR 976

3.2 สารเคมี

3.2.1 แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

3.2.2 กรดอะซิติก

3.2.3 ไซคลอเฮกซาไมด์

3.2.4 กลูโคส

3.2.5 เปปโตน

3.2.6 กรดซิตริค

3.2.7 วุ้น

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 อาหารสูตร Hestrin α Schram (HS medium)

3.3.2 อาหารสูตร GEY Agar

3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

3.4.1 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

3.4.2 เครื่องชั่งต่ำแหน่งละเอียด

3.4.3 ตู้ถ่ายเชื้อ

3.4.4 ตู้อบลมร้อน

3.4.5 ตู้อบไมโครเวฟ

3.4.6 ตู้บ่มเชื้อ

3.4.7 ตู้เย็น

3.4.8 หม้อนึ่งความดันไอ

3.4.9 ขวดรูปชมพู่

3.4.10 จานเพาะเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.11 ลวดเขี่ยเชื้อ

3.4.12 หลอดฝาเกลียว

3.4.13 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.4.14 ที่วางหลอดทดลอง

3.4.15 ปิเปต

3.4.16 บีกเกอร์

3.4.17 แท่งแก้ว

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การคัดเลือกแบคทีเรียเซลลูโลสจากผลไม้เน่าเสีย

โดยนำผลไม้ที่เน่าเสีย ได้แก่ ตะขบ มะละกอ มะดัน ชมพู่ มะม่วง ลองกอง แอปเปิล และแตงโม 10 กรัมใส่ในอาหาร HS medium ปริมาณ 90 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ผลไม้ชนิดหนึ่งทำ 3 ซ้ำ จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} และนำความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับมา spread plate บนอาหาร GEY Agar เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน เลือกโคโลนีของเชื้อที่มีลักษณะขุ่นขาว และนูนแข็งและใช้ลูปเขี่ยเชื้อลงในหลอดอาหาร HS medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน เก็บ 50 ไอโซเลท ต่อผลไม้ 1 ชนิด เพื่อทำการศึกษาต่อไป

3.5.2 ขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อและทำให้เชื้อบริสุทธิ์

นำไอโซเลทของเชื้อที่เก็บได้จากข้อ 3.5.1 มาทำให้บริสุทธิ์ โดย Cross Streak Plate ในอาหาร GEY Agar เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในหลอดอาหาร HS medium ทำซ้ำขั้นตอนเดิม จนแน่ใจว่าสายพันธุ์ที่ได้เป็นสายพันธุ์ที่บริสุทธิ์ จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ Streak ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร GEY Agar slant เพื่อเป็นเชื้อเริ่มต้นในการศึกษาขั้นต่อไป

3.5.3 การเก็บรักษาเชื้อที่แยกได้

จุลินทรีย์ที่แยกและทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์แล้ว จะเก็บในอาหาร 3 ลักษณะด้วยกัน คือ

1) เก็บในอาหารเหลว HS medium ที่ 4 องศาเซลเซียส

2) เก็บในอาหารแข็ง GEY Agar (slant) ที่ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) เก็บในอาหาร HS medium ที่เติม glycerol 15 % เก็บที่ -80 องศาเซลเซียส

3.5.4 ศึกษาความสามารถในการสร้างเซลลูโลสของเชื้อที่แยกได้ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

3.5.4.1 หมักในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการหมักเซลลูโลสทั้งในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า โดยนำเชื้อเริ่มต้นจากอาหารแข็งเอียง มา corss streak บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ให้ได้โคโลนีเดี่ยว นำโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนี ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรอาหาร HS medium ปริมาณ 90 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า โดยสภาวะนิ่งทำโดยนำฟลาสก์วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) สำหรับสภาวะเขย่านำไปวางในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ใช้ความเร็วในการเขย่า 100 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลลูโลส เปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้และคัดเลือกไอโซเลทของเชื้อ 2-3 ไอโซเลทต่อ 1 ชนิดของผลไม้ที่ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูง เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.5.4.2 วิธีการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสที่ผลิตได้

นำเซลลูโลสที่เชื้อผลิตได้นำออกจากฟลาสก์ มาล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้ง จากนั้นเติม สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ นำไปให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอ จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นอีกหลายๆครั้ง จนหมดความเป็นด่างนำเซลลูโลสที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน(ประมาณ 12 ชั่วโมง) ด้วยตู้อบลมร้อน ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง (น้ำหนักที่ได้/ปริมาตรอาหารที่ใช้) เพื่อหาปริมาณของเซลลูโลสที่ผลิตได้ (krusong และคณะ 1995)

ปริมาณของเซลลูโลสที่ผลิตได้ = น้ำหนักแห้งของเซลลูโลส + น้ำหนักของกระดาษกรอง – น้ำหนักกระดาษกรอง
(กรัมต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.5 การจัดจำแนกเชื้อที่แยกได้

3.5.5.1 ศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางชีวเคมี

นำสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่หมักเซลลูโลสได้สูงมาใช้ในการจัดจำแนก โดยดูลักษณะรูปร่าง การติดสีย้อม ลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆ

3.5.5.1.1 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรม

1. เกลี่ยเชื้อบนสไลด์ที่มีหยดน้ำให้กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆไม่ให้หนาแน่นมากเกินไป
2. ตรึงเชื้อให้ติดแน่นกับสไลด์ โดยการนำสไลด์ผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง
3. หยดสีคริสตัลไวโอเลต ให้ทั่วรอยเกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที และล้างด้วยน้ำสะอาด
4. หยดสารละลายไอโอดีนบนรอยเกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสารละลายไอโอดีนทิ้งด้วยน้ำสะอาด
5. ล้างสีออกด้วยแอลกอฮอล์ 95% ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที ล้างด้วยน้ำสะอาด
6. หยดสีซาฟานินบนรอยเกลี่ยให้ทั่ว ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ล้างน้ำ และซับน้ำให้แห้ง
7. ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ และตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

- ถ้าเซลล์ติดสีม่วงแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก
- ถ้าเซลล์ติดสีแดงแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ

3.5.5.1.2 การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส (Catalase test) (ดวงใจ.2535)

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ แตะลงบนสไลด์ที่สะอาด จากนั้นหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนเชื้อที่แตะไว้ สังเกตผลการเกิดฟองถ้ามีการเกิดฟองแสดงว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีการสร้างเอนไซม์แคตาเลสได้

- เกิดฟอง บันทึกผลเป็นบวก
- ไม่เกิดฟอง บันทึกผลเป็นลบ

3.5.5.1.3 การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอทานอล (ดวงใจ.2535)

1. เลี้ยงเชื้อบนอาหารอาหารทดสอบการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอทานอล (ภาคผนวก ก หมายเลข 7) โดย streak ที่ผิวหน้าของอาหาร
2. นำหลอดเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน
3. ตรวจสอบ ผลบวกจะแสดงโดยอาหารจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.5.1.4 การทดสอบ Oxidative fermentative (O/F test) (รำพึง.2545)

1. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา ซึ่งมีอายุ 24-28 ชั่วโมง ปลูกเชื้อแบบปักตรง (Stab inoculation) ตลอดความลึกของอาหารทดสอบ oxidative-fermentative (ภาคผนวก ก หมายเลข 6) เชื้อละ 2 หลอด

2. สำหรับหลอดที่ 2 รีบเทพาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อปิดทับผิวหน้าของอาหารเหลวให้หนาประมาณ 1 นิ้ว เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาพไร้อากาศ ส่วนหลอดที่ 1 ไม่ต้องเทพาราฟินปิดทับเพื่อให้เชื้อนี้อยู่ในสภาพมีอากาศ

3. นำหลอดเชื้อทั้ง 2 ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจผลทุกวันเป็นเวลา 7 วัน เชื้อที่เป็น fermentative จะสร้างกรดในอาหารทั้ง 2 หลอด หรือเฉพาะหลอดที่มีพาราฟินปิดทับ ส่วนเชื้อที่เป็น oxidative จะสร้างกรดเฉพาะหลอดที่ไม่ปิดทับด้วยพาราฟิน ซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ คือ บรอมไธมอลบลู จากสีเขียวเป็นสีเหลืองดังการเปลี่ยนแปลงต่อไปนี้

ตารางที่ 3.1 แสดงตัวอย่างการแปรผลและบันทึกผลการทดสอบ Oxidative fermentative

การเปลี่ยนสีของบรอมไธมอลบลู		ชนิดของปฏิกิริยา	การบันทึกผล
หลอดไม่ปิดพาราฟิน	หลอดที่ปิดพาราฟิน		
เหลือง	เขียว	oxidative	+/-
เหลือง	เหลือง	fermentative	+/+
ฟ้าหรือเขียว	เหลือง	fermentative	-/+
ฟ้าหรือเขียว	เขียว	No action on glucose	-/-

3.5.5.1.5 การทดสอบเมทธิลเรด (Methylred test) (รำพึง.2545)

1. ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหาร MR-VP broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) จำนวน 2 หลอด

2. บ่มเชื้อแบคทีเรียที่ปลูกลงใน MR-VP broth ที่อุณหภูมิห้องหรือ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน

3. ตรวจผลเมื่อครบ 2 วัน โดยแบ่งอาหารมาประมาณ 2-3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดขนาดเล็ก จากนั้นหยดสารละลายเมทธิลเรดประมาณ 1-2 หยด แล้วสังเกตผล

- เปลี่ยนเป็นสีแดง ให้ผลเป็นบวก
- เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ให้ผลเป็นลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ถ้าเป็นสีส้ม ให้บ่มต่ออีก 2 วัน แล้วนำเชื้อมาทดสอบใหม่

3.5.5.1.6 การทดสอบ VP (Voqes-Proskauer (VP) test) (รำพึง.2545)

1. ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหาร MR-VP broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) จำนวน 2 หลอด

2. บ่มเชื้อแบคทีเรียที่ปลูกลงใน MR-VP broth ที่อุณหภูมิห้องหรือ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน

3. ตรวจผลเมื่อครบ 2 วัน โดยแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อมาจำนวน 1-2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบขนาดเล็ก หยดสารละลายแอลฟาเนพทอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 0.6 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นหยดสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ตามลงไป เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วอ่านผล

- ถ้าเกิดสีแดงชมพู บันทึกผลเป็นบวก
- ถ้าเกิดสีเหลืองหรือสีอื่นๆ ให้ตั้งทิ้งไว้ 4 ช.ม. และถ้าเกิดสีแดงชมพู บันทึกผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่เกิดสีแดงชมพู บันทึกผลเป็นลบ

3.5.5.1.7 การทดสอบการสร้างอินโดล (Indole) (ลำพึง.2545)

1. ปลูกเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา ลงในอาหาร tryptone broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 3)ในหลอดทดสอบ จำนวน 2 หลอด

2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องหรือ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. เมื่อครบเวลานำมาทดสอบอินโดล โดยหยดสารละลาย Kovac 's reagent ประมาณ 0.5-1.0 มิลลิลิตร (2-3 หยด) ลงในหลอดอาหารที่เลี้ยงเชื้อไว้ เขย่าเบาๆให้สารละลายผสมกัน สังเกตผล

- ถ้าเกิดสีแดงหรือสีชมพู บันทึกผลเป็นบวก แสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ Tryptophanase ย่อยสลายทริปโตเฟนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อินโดล
- ถ้าไม่เกิดสีแดง บันทึกผลเป็นลบ

3.5.5.1.8 การทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide Production test) (ลำพึง.2545)

1. ปลูกเชื้อลงในอาหาร triple sugar iron agar slant (TSI) (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) โดย streak ที่ผิวหน้าของอาหาร และแทงตรงๆลงไปที่ส่วนก้นหลอด

2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องหรือ 30 องศาเซลเซียส และตรวจผลภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงควรเก็บหลอดไว้ตรวจผลจนครบ 5 วัน

3. สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารและการเกิดก๊าซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 แสดงตัวอย่างการแปรผลและบันทึกผลการทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น	การแปลผล
ตะกอนสีดำ	เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S)
อาหารที่ผิวหน้าไม่เปลี่ยนสีและอาหารที่ก้นหลอดสีเหลือง	เกิดการหมักน้ำตาลกลูโคส
อาหารที่ผิวหน้าและก้นหลอดมีสีเหลือง	เกิดการหมักน้ำตาลแล็กโทสและ/หรือน้ำตาลซูโครส
อาหารเกิดมีรอยแตกหรือฟองอากาศ	เกิดแก๊ส
อาหารไม่เปลี่ยนสี	ไม่เกิดการหมักน้ำตาล

3.5.5.1.9 การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate Fermentation test) (ลำพึง.2545)

ปลูกเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง ลงในอาหารที่ใช้ทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิด (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) (คาร์โบไฮเดรตที่ใช้ เช่น กลูโคส ฟรุกโตส แลคโตส กาแลคโตส ซูโครส เป็นต้น) ในการทดลองนี้ได้ทดสอบเฉพาะน้ำตาลกลูโคสเท่านั้น จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องหรือ 30 องศาเซลเซียส ตรวจผลการสร้างกรดและก๊าซทุกวันจนครบ 7 วัน ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักคาร์โบไฮเดรต และสร้างกรดขึ้นจะทำให้อาหารมีพีเอชต่ำลงและสีของอินดิเคเตอร์จะเปลี่ยนไป ถ้าใช้ บรอมครีซอลเพอร์เพิลเป็นอินดิเคเตอร์ จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองและสามารถสร้างก๊าซได้

ตารางที่ 3.3 แสดงตัวอย่างการแปรผลและบันทึกผลการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต

ลักษณะการเปลี่ยนแปลง		การแปรผล	บันทึกผล
สีอาหารในหลอดทดลอง	สีอาหารและก๊าซในหลอดดักก๊าซ		
เหลือง	เหลือง/ไม่เกิดก๊าซ	เชื้อสร้างกรดแต่ไม่สร้างก๊าซ	A
เหลือง	เหลือง/เกิดก๊าซ	เชื้อสร้างกรดและสร้างก๊าซ	AG
เขียวอมเหลือง	ไม่เกิดก๊าซ	เชื้อสร้างสารประเภทด่าง	K

A = Acid

AG = Acid,Gas

K = Alkaline

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.5.1.10 การทดสอบความสามารถในการสร้างไฮดรอกซีอะซิโตนจากกลีเซอรอล (ดวงใจ.2535)

1. เลี้ยงเชื้อบนอาหารทดสอบการสร้างไฮดรอกซีอะซิโตนจากกลีเซอรอล (ภาคผนวก ก หมายเลข 8) โดย streak ที่ผิวหน้าของอาหาร เชื้อละ 2 หลอด

2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องหรือ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3. เมื่อครบเวลา ทำการทดสอบโดยการหยดสารละลายเฟลลิ่ง (Fehling) ลงบนเชื้อ ผลบวกแสดงโดยเกิดวงสีแดงอิฐรอบๆโคโลนีของเชื้อ

3.5.5.2 การจัดจำแนกทางชีวโมเลกุลโดยใช้เทคนิค 16s rDNA

3.5.5.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียจะเจริญในอาหาร GYC เป็นเวลา 2-5 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ Moonmangmee(2000) เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการเซนตริฟิวก์ที่ 12000 xg เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น เซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้นำมาใส่ในอีดีทีเอบัฟเฟอร์(EDTA buffer) (โซเดียมคลอไรด์(NaCl) 0.15 โมลาร์ และอีดีทีเอ(EDTA) 1 โมลาร์ ที่พีเอช 8.0) ทำให้เซลล์แตกโดยการเติมสารละลายไลโซไซม์(lysozyme) 10 มก./มล. หลังจากนั้นเติม RNAse 10 มก./มล. นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมเอนไซม์โปรติเนส เค (Protinase K) 20 มก./มล. แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นเติมโซเดียมโดเดซิล (sodium dodecyl sulphate(sps))25% 40 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใส่สารละลายโซเดียมอะซิเดียม(sodium acitate)5 โมลาห์ 180 ไมโครลิตร และขจัดโพลีแซคคาร์ไรด์ของเซลล์ออกโดยเติมสารละลายซิทิวไตรเมทิวแอมโมเนียมโบรไมด์ (cetyltrimethylammonium bromide) 2% 100 ไมโครลิตรและเซนตริฟิวก์ ที่ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที โครโมโซมดีเอ็นเอ ที่เป็นสายคู่จะทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มต่อไอโซไมลิคแอลกอฮอล์ 25 : 1 (Chloroform/isomylic alcohol 25:1 v/v) 2 ครั้ง เร่งให้เกิดตะกอน เทใส่หลอดใหม่และเพิ่มปริมาณด้วยเอทานอล 2 ครั้ง นำโครโมโซมดีเอ็นเอที่ได้มาใส่ในน้ำที่มีความบริสุทธิ์ ขนาดของดีเอ็นเอ สามารถตรวจสอบได้โดยใช้อิเล็คโทรโฟรีซิสอากาโรสเจล(agarose gel electrophoresis) 1% ในทีบีอีบัฟเฟอร์(TBE buffer) 1X (ทริสบอเรต(Tris–borate) 89 มิลลิโมล, กรดบอริก(boric acid) 89 มิลลิโมล, อีดีทีเอ(EDTA) 2 มิลลิโมล ; พีเอช 8.0) ด้วยขนาดสัญลักษณ์ a 1-Kb DNA ladder. นำแผ่นเจลที่ย้อมสีเอทิเดียมโบรไมด์(ethidium bromide) มาส่องใต้แสงอัลตราไวโอเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.5.2.1 PCR ในการวิเคราะห์ 16s-23s-5s rDNA

พีซีอาร์(PCR) เตรียมให้มีปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร โดยใส่ทาการาเอ็กแทรค (TaKara Ex Taq) 0.50 ไมโครลิตร, 10 เท่าของเอ็กแท็คบัฟเฟอร์(10X Ex Taq Buffer) 10 ไมโครลิตร, สารผสมดีเอ็นทีพี(dNTP mixture) 8.0 ไมโครลิตร, 16S forward primer 0.50 ไมโครลิตร(100 pmol μl^{-1}), 5S reverse primer 0.50 ไมโครลิตร (100 pmol μl^{-1}), ดีเอ็นเอ (DNA) 2.0 ไมโครลิตรและเติมน้ำกลั่น เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR 35 รอบ denaturation (1 รอบ 94 องศาเซลเซียส/4 วินาที); annealing (35 รอบ: 94 องศาเซลเซียส/30 วินาที, 50 องศาเซลเซียส/30วินาที, 72 องศาเซลเซียส/3 นาที); final extension: (72องศาเซลเซียส/10 นาที) ดูขนาด DNA โดยนำแผ่นเจลที่ย้อมสีเอทิเดียมโบรไมด์(ethidium bromide) มาส่องใต้แสงอัลตราไวโอเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียเซลลูโลสจากผลไม้เน่าเสีย

จากการคัดเลือกแบคทีเรียเซลลูโลสจากผลไม้เน่าเสีย ได้แก่ ตะขบ มะละกอ มะดัน ชมพู่ มะม่วง ลองกอง แอปเปิล และแตงโม โดยนำผลไม้เน่าเสียเหล่านี้มาเลี้ยงในอาหาร HS medium ที่มีการเติมสารยับยั้งการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่น (สารดังกล่าวได้แก่ กรดอะซิติก 0.2 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ และไซโคเฮกซาไมด์ 0.01 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) และสารเหล่านี้ยังใช้สำหรับการสร้างเส้นใยเซลลูโลสของแบคทีเรียเซลลูโลสอีกด้วย (Toyosaki และคณะ 1995) การเจริญที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน เชื้อแบคทีเรียจะสร้างเส้นใยและประสานกันเป็นแผ่นวุ้นลอยอยู่บริเวณผิวหน้าอาหารเหลว ซึ่งผลไม้ที่นำมาทำการแยกเชื้อพบเฉพาะตะขบ และมะละกอ เท่านั้นที่สามารถสร้างเซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ HS medium ได้ สำหรับผลไม้ชนิดอื่นไม่พบการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสบนผิวหน้าอาหารเหลว อาจเนื่องมาจากผลไม้ที่นำมาใช้ในการแยกเชื้อมีการเจริญของเชื้อยีสต์มากกว่า ทำให้เชื้อยีสต์เจริญเติบโตได้ดีและแย่งอาหารจากเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำขวดอาหารที่มีการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสบนผิวหน้าอาหารมาเจือจางที่ 10^{-5} 10^{-6} และ 10^{-7} นำสารละลายเชื้อเหล่านี้มา spread ลงบนอาหารแข็ง GEY Agar ซึ่งมีแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นองค์ประกอบ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นเลือกเก็บโคโลนีที่มีลักษณะกลมนูน สีขาวขุ่น แข็งและเหนียว เมื่อใช้ลวดเขี่ยเชื้อจะติดมาทั้งโคโลนี แต่เมื่อมีอายุมากขึ้นโคโลนีขรุขระ หรือสร้างโคโลนีซ้อนกัน โดยลักษณะดังกล่าวจะสอดคล้องกับรายงานของ Diaguilla (1967) และ Toyosaki และคณะ (1995) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะของเชื้อ *Acetobacter* ที่สามารถสร้างเส้นใยเซลลูโลสได้ เลือกเก็บผลไม้ละ 50 ไอโซเลท นำโคโลนีเหล่านี้ใส่ในหลอดอาหาร HS medium ปริมาตรอาหาร 5 มิลลิลิตร โดยเลือกเก็บ 1 โคโลนีต่อ 1 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเลือกเฉพาะหลอดที่มีการสร้างแผ่นเซลลูโลสที่ผิวหน้าอาหาร จากไอโซเลททั้งหมด 100 ไอโซเลท พบว่ามีเพียง 87 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างเซลลูโลสบนผิวหน้าอาหารเหลว นำไอโซเลทที่สามารถสร้างเซลลูโลสมา cross streak อีกครั้งในอาหาร GEY Agar เก็บโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงในอาหารเหลว HS medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เลือกเก็บเฉพาะหลอดที่มีการสร้างแผ่นเซลลูโลสที่ผิวหน้าอาหาร พบ 75 ไอโซเลทที่สร้างแผ่นเซลลูโลส โดยแบ่งเป็นไอโซเลทที่แยกได้จากมะละกอ 32 ไอโซเลท และจากตะขบ 43 ไอโซเลท จากนั้นคัดเลือกไอโซเลทที่สร้างเซลลูโลสได้สูงๆจากมะละกอและตะขบอย่างละ 20 ไอโซเลท มาศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และย้อมแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่างของไอโซเลทเหล่านี้ ผลการทดลองพบว่าเมื่อนำไอโซเลทเหล่านี้มาเลี้ยงบนอาหาร GEY Agar เป็นเวลา 3 วัน ส่วนใหญ่ลักษณะโคโลนีกลมนูน ขนาดเล็ก สีครีม ผิวเรียบ แสดงดังตารางที่ 4.1 และเมื่อนำไอโซเลทเหล่านี้มาย้อมแกรมเพื่อดูรูปร่างและการติดสีแกรม พบว่าทุกไอโซเลทติดสีแดงของซาฟรานีน มีรูปร่างเป็นท่อนตรงรี แสดงดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากตะขบและมะละกอที่เน่าเสีย

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
ตะขบ -T 01	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 02	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 03	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 04	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
-T 05	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 06	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 07	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 08	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
-T 09	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 10	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 11	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 12	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
-T 13	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 14	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 15	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 16	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
-T 17	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 18	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 19	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 20	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
มะละกอ -P 01	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 02	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 03	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 04	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
-P 05	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 06	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 07	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 08	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
-P 09	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 10	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 11	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 12	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
-P 13	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 14	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 15	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 16	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	

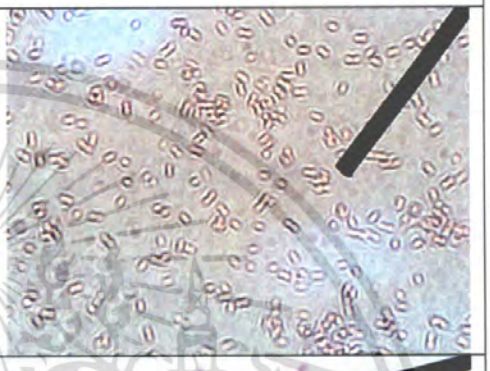
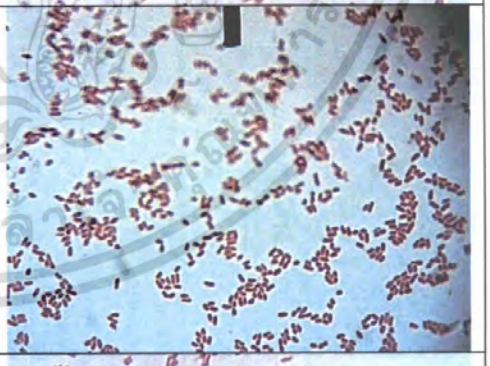
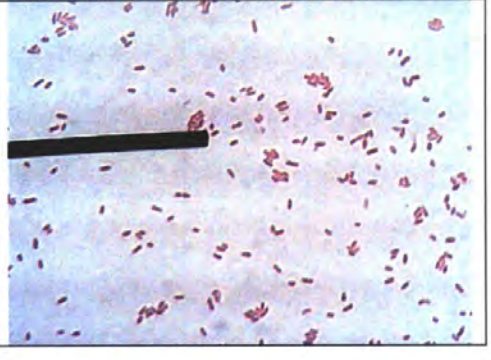
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
-P 17	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 18	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 19	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 20	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	

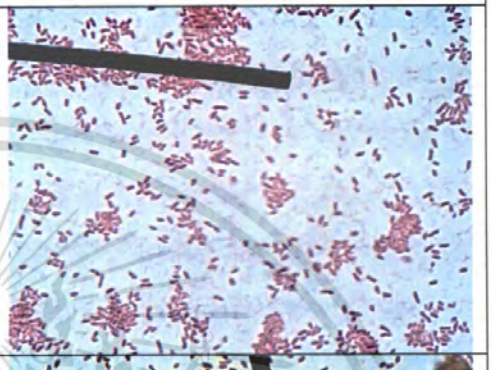
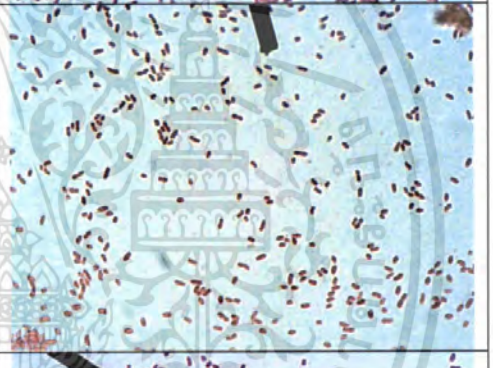
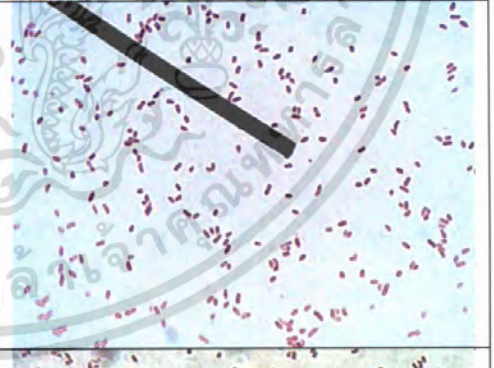
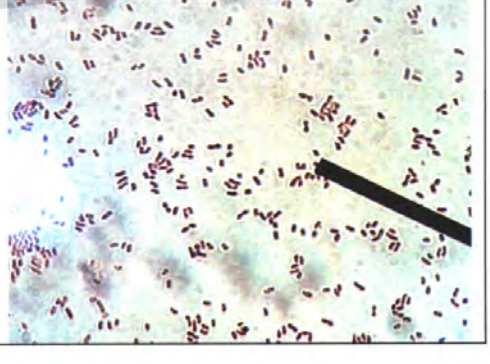
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียเซลลูโลสที่แยกได้จากตะขบและมะละกอ

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
ตะขบ -T 01	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 02	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 03	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 04	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	

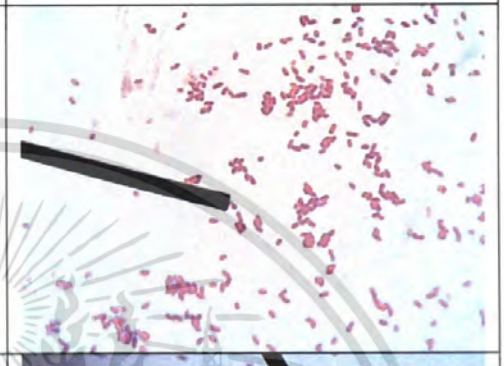
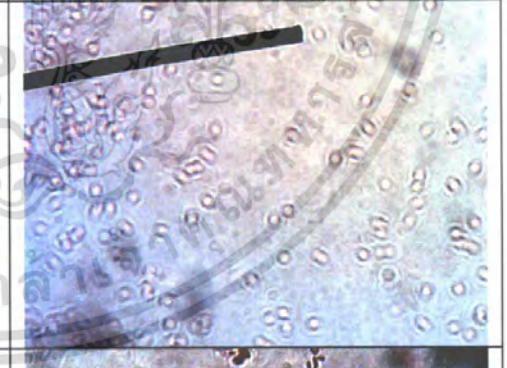
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
-T 05	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 06	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 07	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 08	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	

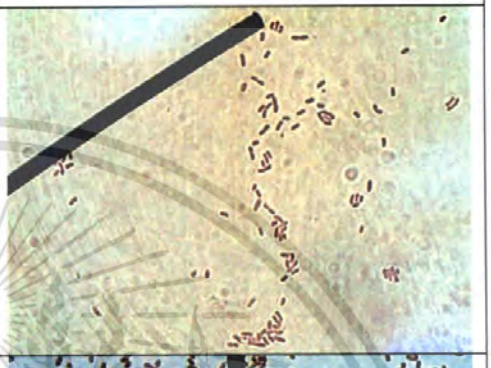
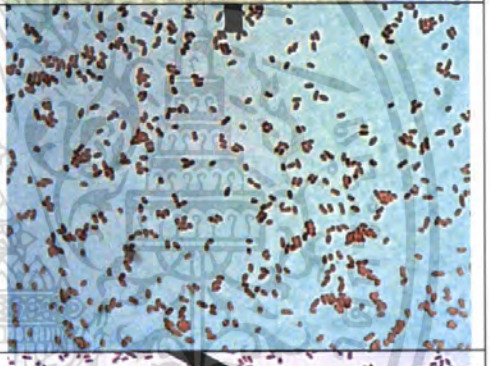
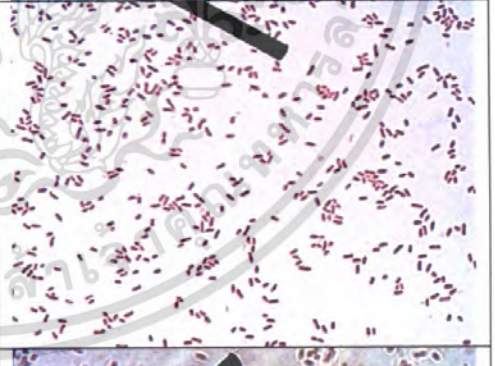
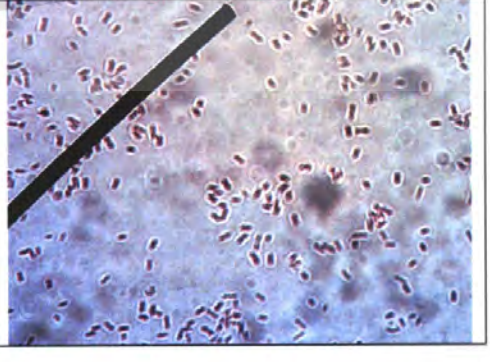
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
-T 09	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 10	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 11	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 12	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	

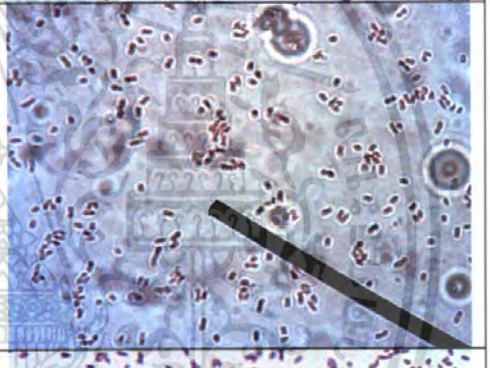
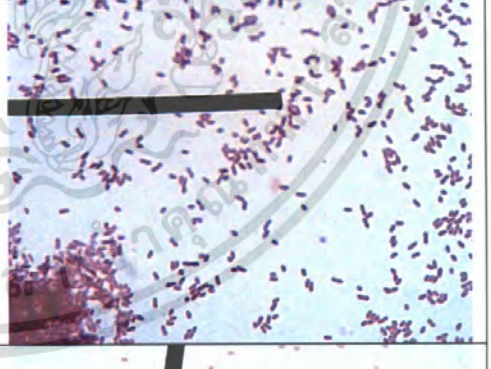
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
-T 13	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 14	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 15	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 16	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	

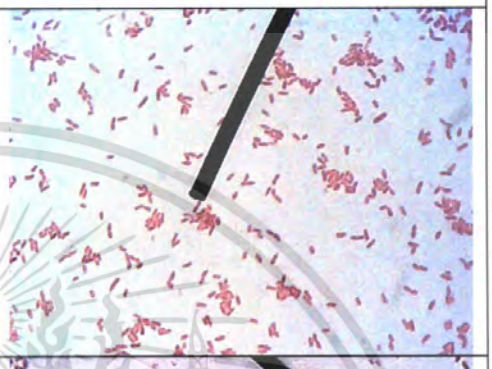
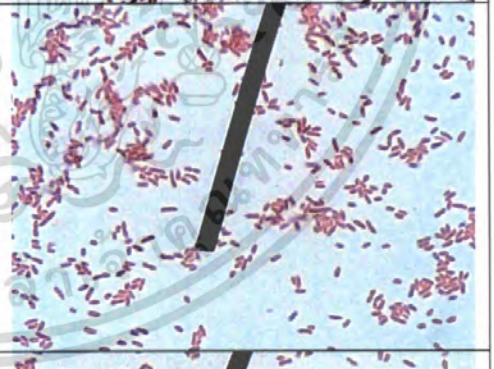
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
-T 17	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 18	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 19	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 20	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	

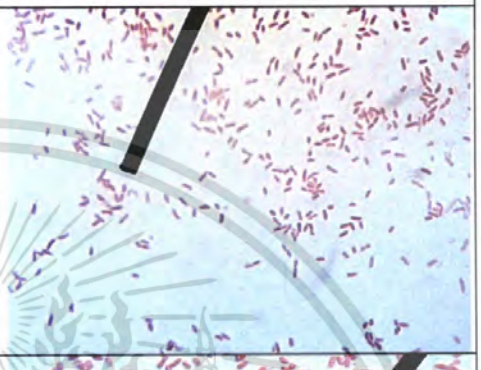
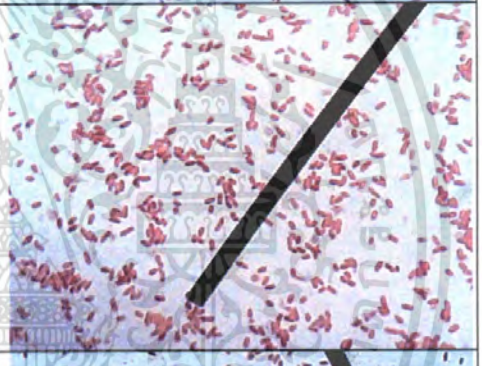
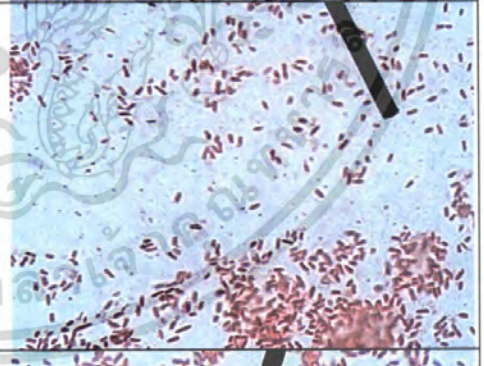
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
มะละกอ -P 01	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-P 02	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-P 03	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-P 04	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	

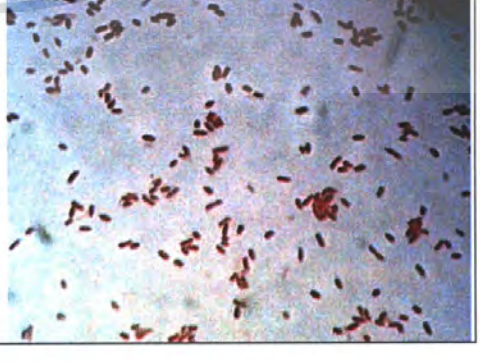
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
-P 05	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-P 06	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-P 07	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-P 08	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	

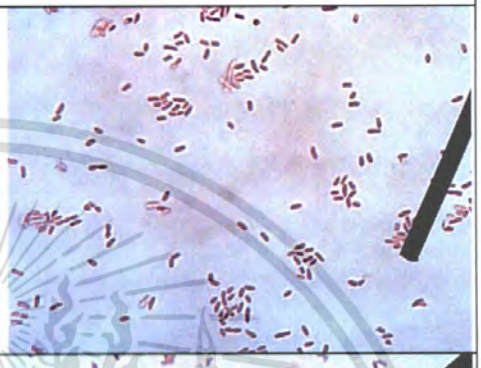
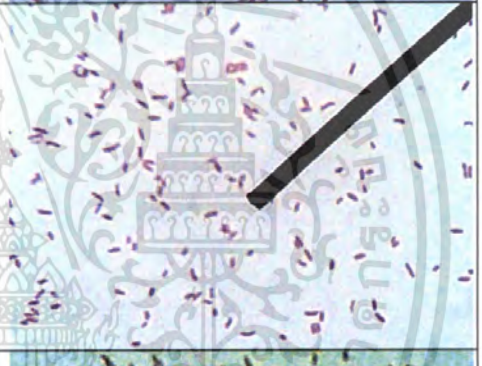
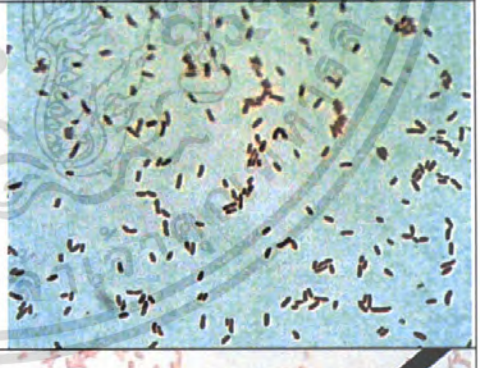
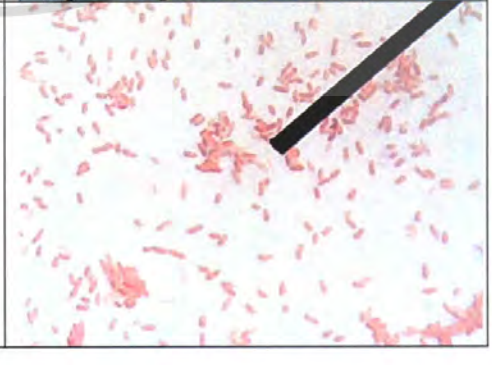
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
-P 09	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-P 10	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-P 11	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-P 12	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	

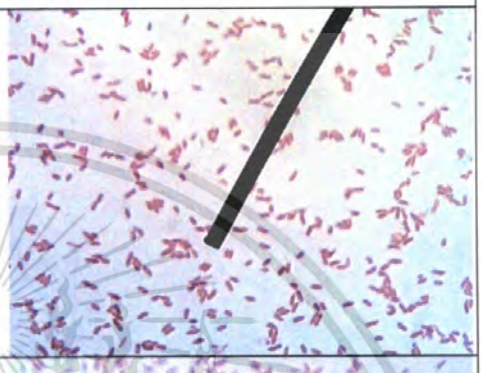
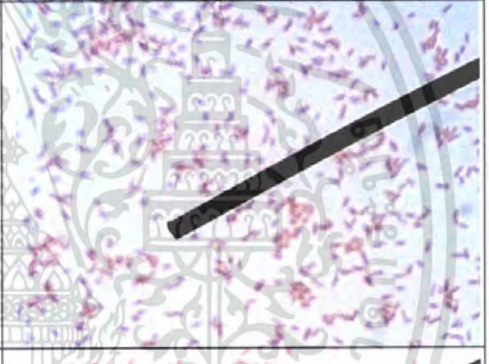
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
-P 13	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-P 14	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-P 15	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-P 16	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรียเซลลูโลส	รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
-P 17	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-P 18	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-P 19	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-P 20	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ศึกษาความสามารถในการสร้างเซลลูโลสของเชื้อที่แยกได้ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

จากการคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถผลิตเซลูโลสได้สูงจากตะขบ 20 ไอโซเลท (T1-T20) และจากมะละกอ 20 ไอโซเลท (P1-P20) นำไอโซเลททั้ง 40 ไอโซเลท มาหมักในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าโดย cross streak ให้ได้โคโลนีเดี่ยว บนอาหาร GEY Agar นำโคโลนีเดี่ยวที่มีอายุ 2 วัน เลี้ยงในอาหาร HS medium ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 90 มิลลิลิตร 1 โคโลนีต่อ 1 ฟลาสก์ นำไปบ่มที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน และสภาวะเขย่านำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันเช่นกัน เมื่อครบกำหนดเก็บเกี่ยวเซลลูโลสที่ได้ คำนวณปริมาณเซลลูโลสที่ได้ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าเปรียบเทียบกัน ผลการทดลองพบว่าจากการแยกเชื้อจากตะขบมี 3 ไอโซเลทที่ให้ปริมาณเซลลูโลสสูงในสภาวะนิ่งคือ ไอโซเลท T01 T07 และ T11 โดยให้ปริมาณเซลลูโลส 0.3620 ± 0.0154 0.3508 ± 0.0176 และ 0.4416 ± 0.0376 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการหมักในสภาวะเขย่าของเชื้อเหล่านี้ให้ปริมาณเซลลูโลสค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในสภาวะนิ่ง โดยจะให้ปริมาณเซลลูโลสอยู่ในช่วง 0.0556 ± 0.0083 – 0.2544 ± 0.0356 กรัมต่อปริมาณน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร แสดงดังตารางที่ 4.3 จากการแยกเชื้อในมะละกอมี 3 ไอโซเลทที่ให้ปริมาณเซลลูโลสสูงในสภาวะนิ่ง คือ ไอโซเลท P06 P09 และ P10 โดยให้ปริมาณเซลลูโลส 0.5485 ± 0.0625 0.4749 ± 0.0139 และ 0.4786 ± 0.0543 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการหมักในสภาวะเขย่าของเชื้อเหล่านี้ให้ปริมาณเซลลูโลสค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในสภาวะนิ่งโดยจะให้ปริมาณเซลลูโลสอยู่ในช่วง 0.0891 ± 0.0099 – 0.5059 ± 0.0482 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร ยกเว้นไอโซเลท P 08 ซึ่งให้ปริมาณเซลลูโลสในสภาวะเขย่าสูงถึง 0.5059 ± 0.0482 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร แสดงดังตารางที่ 4.4

จากการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเซลลูโลสของเชื้อที่แยกได้จากตะขบและมะละกอทั้งในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า พบว่าไอโซเลทที่แยกได้ส่วนใหญ่ให้ปริมาณเซลลูโลสในสภาวะนิ่งสูงกว่าสภาวะเขย่า ยกเว้นไอโซเลท P 08 ซึ่งแยกได้จากมะละกอ ซึ่งในสภาวะนิ่งมีปริมาณเซลลูโลส 0.4523 ± 0.0668 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร ขณะที่สภาวะเขย่ามีปริมาณเซลลูโลส 0.5059 ± 0.0482 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร ไอโซเลทที่ผลิตเซลลูโลสได้สูงในสภาวะนิ่งส่วนใหญ่มักได้จากมะละกอเน่าเสีย แสดงดังรูปที่ 4.1 และ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกได้จากตะขบในอาหาร HS medium ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

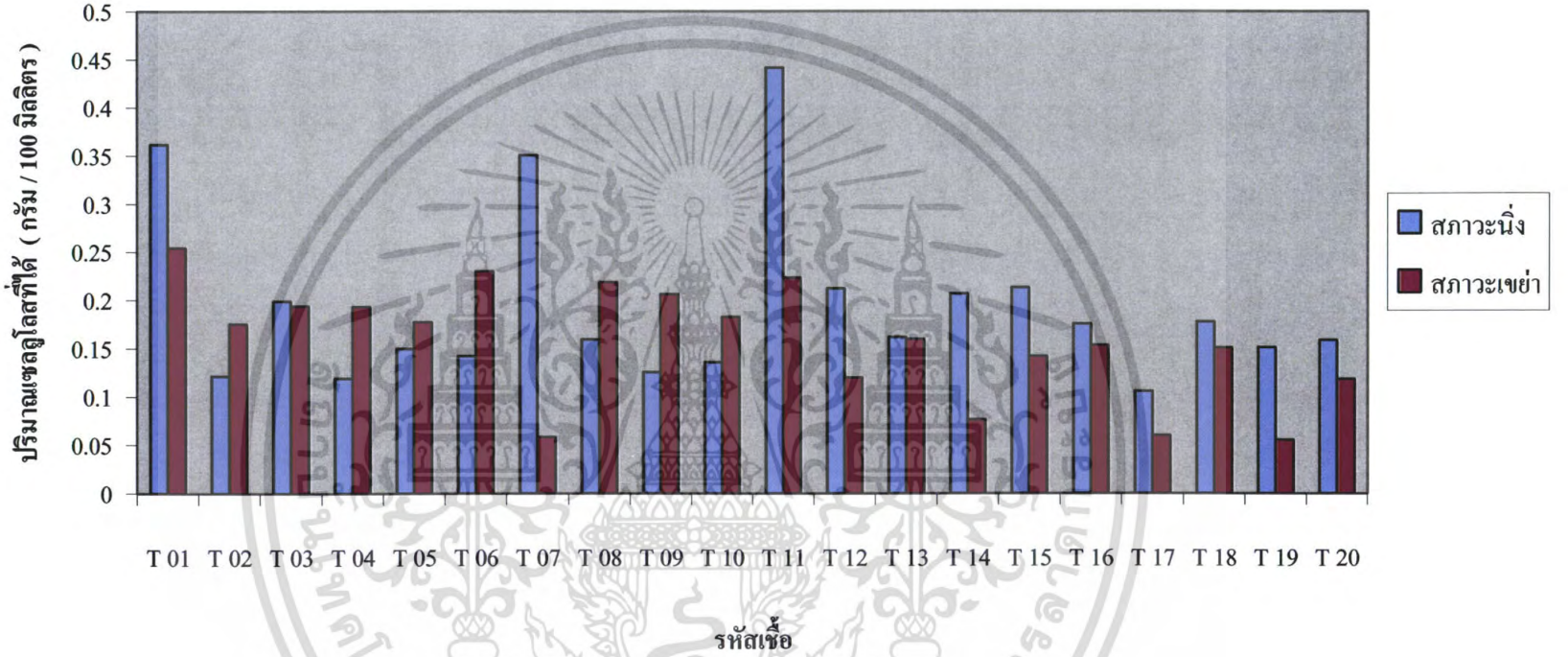
ไอโซเลท	ปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้(กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	
	สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
T 01	0.3620 ± 0.0154	0.2544 ± 0.0356
T 02	0.1756 ± 0.0222	0.1216 ± 0.01730
T 03	0.1992 ± 0.1192	0.1940 ± 0.0256
T 04	0.1934 ± 0.0086	0.1192 ± 0.0052
T 05	0.1773 ± 0.0424	0.1501 ± 0.0372
T 06	0.2302 ± 0.0234	0.1423 ± 0.0190
T 07	0.3508 ± 0.0176	0.0584 ± 0.0196
T 08	0.1595 ± 0.0417	0.2186 ± 0.0364
T 09	0.1256 ± 0.0067	0.2062 ± 0.0053
T 10	0.1360 ± 0.0151	0.1829 ± 0.0388
T 11	0.4416 ± 0.0376	0.2235 ± 0.0306
T 12	0.2123 ± 0.0050	0.1197 ± 0.0193
T 13	0.1617 ± 0.0244	0.1600 ± 0.0196
T 14	0.2070 ± 0.0040	0.0765 ± 0.0167
T 15	0.2132 ± 0.0250	0.1420 ± 0.0539
T 16	0.1755 ± 0.0345	0.1533 ± 0.4110
T 17	0.1059 ± 0.0333	0.0600 ± 0.2007
T 18	0.1777 ± 0.0515	0.1508 ± 0.625
T 19	0.1513 ± 0.0457	0.0556 ± 0.0083
T 20	0.1590 ± 0.0154	0.1184 ± 0.0468

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

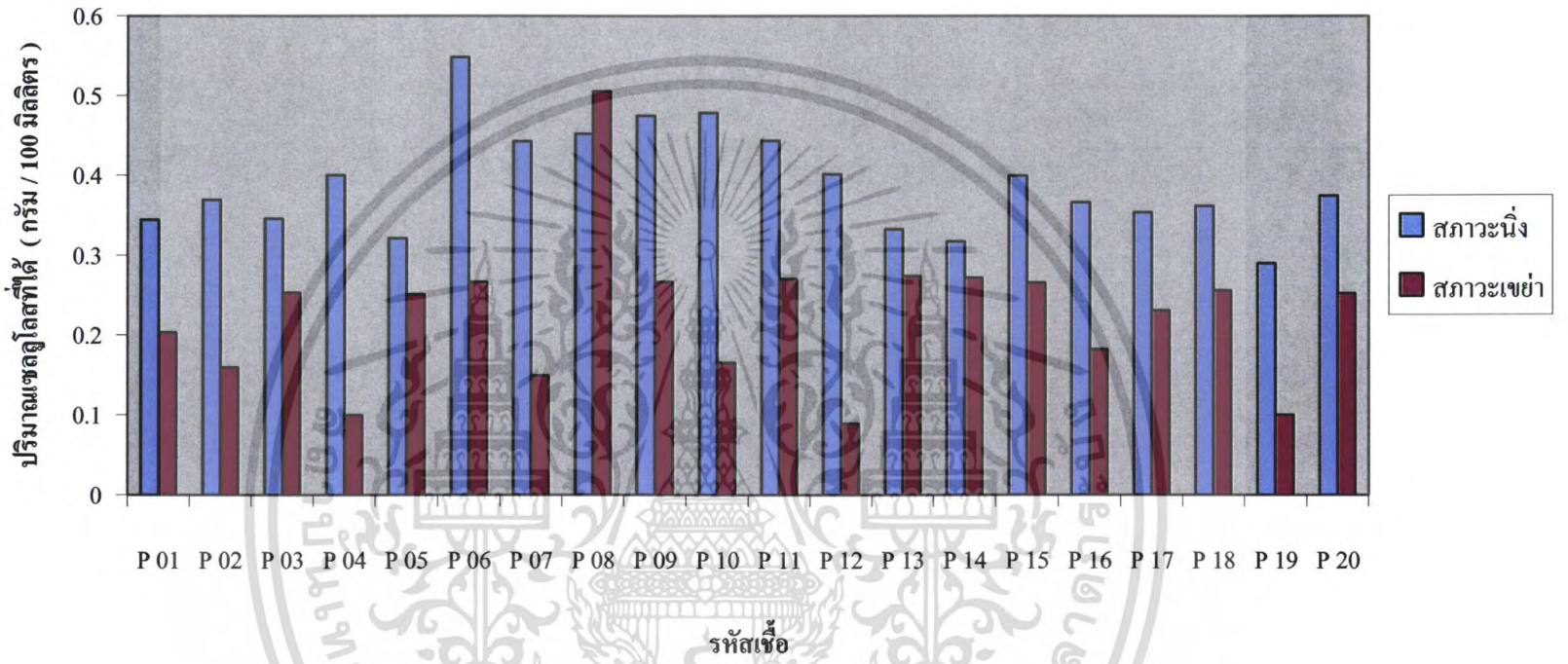
ตารางที่ 4.4 ปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกได้จากมะละกอในอาหาร HS medium ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

ไอโซเลท	ปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้(กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	
	สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
P 01	0.3444 ± 0.0394	0.2034 ± 0.0053
P 02	0.3698 ± 0.0223	0.1593 ± 0.0156
P 03	0.3459 ± 0.0434	0.2533 ± 0.0189
P 04	0.4005 ± 0.0532	0.0999 ± 0.0101
P 05	0.3214 ± 0.2004	0.2510 ± 0.0352
P 06	0.5485 ± 0.0625	0.2665 ± 0.0298
P 07	0.4429 ± 0.0462	0.1495 ± 0.0094
P 08	0.4523 ± 0.0668	0.5059 ± 0.0482
P 09	0.4749 ± 0.0139	0.2666 ± 0.0237
P 10	0.4786 ± 0.0543	0.1657 ± 0.0174
P 11	0.4436 ± 0.0359	0.2704 ± 0.0482
P 12	0.4016 ± 0.0226	0.0891 ± 0.0099
P 13	0.3328 ± 0.0248	0.2739 ± 0.0387
P 14	0.3174 ± 0.0195	0.2719 ± 0.0478
P 15	0.3997 ± 0.0459	0.2659 ± 0.0391
P 16	0.3664 ± 0.0369	0.1823 ± 0.0337
P 17	0.3540 ± 0.0556	0.2308 ± 0.0308
P 18	0.3619 ± 0.0387	0.2558 ± 0.0530
P 19	0.2898 ± 0.0281	0.1002 ± 0.0120
P 20	0.3746 ± 0.0458	0.2525 ± 0.0221

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกได้จากตะขบในอาหาร HS medium ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า



รูปที่ 4.2 ปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกได้จากมะละกอในอาหาร HS medium ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

จากการศึกษาการผลิตเซลลูโลสในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า ความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างเซลลูโลสที่เกิดขึ้นในสภาวะทั้งสองนั้นจะแตกต่างกัน จากการสังเกตลักษณะการสร้างเซลลูโลสที่สภาวะนิ่งจะสร้างเซลลูโลสในลักษณะเป็นเส้นใยและรวมตัวกันเป็นแผ่นวุ้นหนาลอยอยู่เหนือผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อรับออกซิเจน ส่วนในสภาวะเขย่าการสร้างเซลลูโลสจะมีลักษณะเป็นเม็ดๆ หรือเกาะกันเป็นก้อน ซึ่งขนาดขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อ และความเร็วรอบในการเขย่า ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Toyosaki และคณะ (1995) และ Sanchez และคณะ (1999)

จากการทดลองได้คัดเลือกไอโซเลทที่ผลิตเซลลูโลสได้สูงในสภาวะนิ่ง ได้แก่ T01 T07 T11 T12 P06 P08 P09 และ P10 นำไปจัดจำแนกโดยดูลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรม รวมทั้งการทดสอบชีวเคมีต่างๆ เพื่อจัดจำแนกชนิดของไอโซเลทเหล่านี้ต่อไป

4.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียเซลลูโลส

จากการคัดเลือกไอโซเลทที่ผลิตเซลลูโลสได้สูงในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า ได้แก่ T01 T07 T11 T12 P06 P08 P09 และ P10 นำมาทำการจัดจำแนกโดยดูลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมรวมทั้งทดสอบชีวเคมีต่างๆ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบทางชีวเคมีในการจัดจำแนกแบคทีเรียเซลลูโลสที่แยกได้จากตะขบและมะละกอ

การทดสอบ / รหัสเชื้อ	Catalase Test	Oxidation of Ethanol	Oxidative/ Fermentative Test	Methyl red Test	Voques-Proskauer Test	Indole Production Test	Hydrogen sulfide Production test	Carbohydrate Fermentation test (Glucose)	Production of Hydroxyacetone from glycerol
T01	+	-	+/-	+	-	-	-	A	+
T07	+	+	+/-	+	-	-	-	A	+
T11	+	-	+/-	+	-	-	-	A	+
T12	+	+	+/+	+	-	-	-	A	+
P06	+	-	-/-	+	-	-	-	A	+
P08	+	-	-/-	+	-	-	-	A	+
P09	+	-	+/-	+	-	-	-	A	+
P10	+	-	+/-	+	-	-	-	A	+

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลส พบว่า เมื่อนำไอโซเลทของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสได้สูง ได้แก่ T01 T07 T11 T12 P06 P08 P09 และ P10 เลี้ยงในอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง และนำโคโลนีของเชื้อแต่ละไอโซเลทมาทดสอบโดยการหยดสาร สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าทุกไอโซเลทที่นำมาทดสอบเกิดฟองอากาศซึ่งให้ผลเป็นบวก

จากการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอทานอล โดย streak ที่ผิวหน้าของอาหารและบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาตรวจผลพบว่าไอโซเลทที่ T07 และ T12 เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลืองซึ่งให้ผลเป็นบวก และ T01 T11 P06 P08 P09 และ P10 ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารซึ่งให้ผลเป็นลบ

จากการทดสอบ oxidative-fermentative โดยปลูกเชื้อแบบปักตรง (Stab inoculation) ตลอดความลึกของอาหารทดสอบ oxidative-fermentative เชื้อละ 2 หลอด หลอดที่สอง เทพาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อปิดทับผิวหน้าของอาหาร ส่วนหลอดที่หนึ่ง ไม่ต้องเทพาราฟินปิดทับ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการตรวจผลโดยดูการเปลี่ยนสีของอาหารของทั้งสองหลอด ผลบวกให้ผลโดยการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลือง และผลลบแสดงโดยการไม่เปลี่ยนสีของอาหาร พบว่าไอโซเลทที่ T01 T07 T11 P09 และ P10 เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลืองเฉพาะหลอดที่ไม่เทพาราฟินปิดทับ และไอโซเลทที่ T12 เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารทั้งสองหลอด ไอโซเลทที่ P06 และ P08 ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารทั้งในหลอดที่เทและไม่เทพาราฟินปิดทับ

จากการทดสอบเมทธิลเรด โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร MR-VP broth บ่มที่อุณหภูมิห้องหรือ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 - 5 วัน ทำการตรวจผลครั้งแรกเมื่อบ่มเชื้อครบ 2 วัน โดยการหยดสารละลายเมทธิลเรดลงในหลอดอาหารแต่ละไอโซเลท พบว่าทุกไอโซเลทไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหาร จึงทำการบ่มต่ออีกจนครบ 5 วัน จากนั้นทำการตรวจสอบผลอีกครั้ง พบว่าทุกไอโซเลทเกิดการเปลี่ยนสีของอาหาร จากสีเหลืองเป็นสีส้มจึงให้ผลเป็นบวก

จากการทดสอบ VP โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร MR-VP broth บ่มที่อุณหภูมิห้องหรือ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการตรวจผลโดยการหยดสารละลายแอลฟาเนพทอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และหยดสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ พบว่าทุกไอโซเลทไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหาร จึงให้ผลเป็นลบ

จากการทดสอบการสร้างอินโดล โดยการปลูกเชื้อลงในอาหาร tryptone broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจผลโดยหยดสารละลาย Kovac 's reagent ลงในแต่ละไอโซเลท เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ พบว่าทุกไอโซเลทเกิดสีส้มซึ่งให้ผลเป็นลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยนำเชื้อ streak ที่ผิวหน้าของอาหาร triple sugar iron agar slant (TSI) และแทงตรงๆลงไปที่ส่วนก้นหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำการตรวจผลพบว่าทุกไอโซเลท ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารทั้งที่ผิวหน้าอาหารและที่ก้นหลอด รวมทั้งไม่มีตะกอนสีดำ แสดงว่าไม่มีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์

จากการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต(น้ำตาลกลูโคส) โดยปลูกเชื้อลงในอาหารที่ใช้ทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และทำการตรวจผลการสร้างกรดและก๊าซทุกวันจนครบ 7 วัน พบว่าทุกไอโซเลทเกิดการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลือง แต่ในหลอดดักก๊าซไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารและไม่เกิดก๊าซ ซึ่งแลดงผลเป็นบวก

จากการทดสอบความสามารถในการสร้างไฮดรอกซีอะซิโตนจากกลีเซอรอล โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารทดสอบการสร้างไฮดรอกซีอะซิโตนจากกลีเซอรอล บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องหรือ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบผลโดยการหยดสารละลายเฟลลิ่ง (Fehling) ลงบนเชื้อ พบว่าไอโซเลทที่ T01 T07 T11 T12 P06 P08 P09 และ P10 เกิดวงสีแดงอิฐรอบๆโคโลนีของเชื้อซึ่งให้ผลเป็นบวก

จากการดูลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การย้อมแกรมเพื่อดูรูปร่างและการติดสีของไอโซเลทที่แยกได้ รวมทั้งการทดสอบทางชีวเคมีบางประการยังไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นแบคทีเรียเซลลูโลสจีนัสใด ซึ่งจะต้องทดสอบมากกว่านี้ถึงสามารถจะบอกได้ว่าเชื้อที่แยกได้อยู่ในจีนัสหรือ สปีชีส์ใด ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการทดลองเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจัดจำแนกแบคทีเรียเซลลูโลส ขณะเดียวกันได้ส่งไอโซเลทที่ผลิตเซลลูโลสได้สูง คือ T11 และ P09 ไปจัดจำแนกโดยใช้เทคนิค 16s rDNA ที่ ส.ว.ท.ช. พบว่าไอโซเลททั้งสองเป็น *Gluconacetobacter nataicola*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกแบคทีเรียเซลลูโลสจากผลไม้เน่าเสีย ได้แก่ ตะขบ มะละกอ มะดัน ชมพู่ มะม่วง ลองกอง แอปเปิ้ล และแตงโม โดยนำผลไม้เน่าเสียเหล่านี้มาเลี้ยงในอาหาร HS medium ซึ่งผลไม้ที่นำมาทำการแยกเชื้อพบเฉพาะตะขบ และมะละกอ เท่านั้นที่มีการสร้างเซลลูโลส เลือกเก็บผลไม้ละ 50 ไอโซเลท จากไอโซเลททั้งหมด 100 ไอโซเลท จากนั้นคัดเลือกไอโซเลทที่สร้างเซลลูโลสได้สูงๆจากมะละกอและตะขบอย่างละ 20 ไอโซเลทมาศึกษาความสามารถในการหมักเซลลูโลสในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า จากการคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถผลิตเซลูโลสได้สูงจากตะขบ 20 ไอโซเลท (T1-T20) และจากมะละกอ 20 ไอโซเลท (P1-P20) พบว่าจากการแยกเชื้อจากตะขบมี 3 ไอโซเลทที่ให้ปริมาณเซลลูโลสสูงในสภาวะนิ่งคือ ไอโซเลท T01 T07 และ T11 โดยให้ปริมาณเซลลูโลส 0.3620± 0.0154 0.3508± 0.0176 และ 0.4416± 0.0376 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการหมักในสภาวะเขย่าของเชื้อเหล่านี้ให้ปริมาณเซลลูโลสค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในสภาวะนิ่ง จากการแยกเชื้อในมะละกอมี 3 ไอโซเลทที่ให้ปริมาณเซลลูโลสสูงในสภาวะนิ่ง คือ ไอโซเลท P06 P09 และ P10 โดยให้ปริมาณเซลลูโลส 0.5485± 0.0635 0.4749±0.0139 และ 0.4786±0.0543กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นคัดเลือกไอโซเลทที่ผลิตเซลลูโลสได้สูงในสภาวะนิ่ง ได้แก่ T01 T07 T11 T12 P06 P08 P09 และ P10 นำไปจัดจำแนกโดยดูลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรม การทดสอบชีวเคมีต่างๆ โดยลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร GEY Agar ของเชื้อส่วนใหญ่ มีลักษณะกลมนูน สีครีม ผิวเรียบ แล้วเมื่อนำเชื้อมาทำการย้อมแกรมแล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเชื้อทั้งหมดติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน

จากการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของไอโซเลท T01 T07 T11 T12 P06 P08 P09 และ P10 พบว่าไอโซเลทเหล่านี้มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคตาเลส ไม่สามารถออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดอะซิติกได้ยกเว้นไอโซเลท T07 และ T12 ที่สามารถออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดอะซิติกได้ ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นออกซิเดทีฟ (oxisative) มากกว่าเฟอร์เมนเตทีฟ (fermentative) ทดสอบเมทธิลเรดเป็นบวกคือสามารถสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสได้ ทดสอบ VP เป็นลบคือไม่สามารถสร้างสาร acetoin จากการใช้น้ำตาลกลูโคส ไม่สามารถสร้างสารอินโดลจากทริปโตเฟนได้ ไม่สามารถสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ สามารถใช้นำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ และสามารถสร้างไฮดรอกซีอะซิโตนจากกลีเซอรอลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งจากการทดสอบทางชีวเคมีเหล่านี้ ยังไม่สามารถจะบอกได้ว่าไอโซเลทที่นำมาทดสอบเหล่านี้จัดอยู่ในจีนัสและสปีชีส์ใด ซึ่งจะต้องมีการทดสอบเพิ่มเติมมากกว่านี้ และจากการนำไอโซเลท T11 และ P09 ไปจัดจำแนกโดยใช้เทคนิค 16s rDNA พบว่าไอโซเลททั้งสองเป็น *Gluconacetobacter nataicola*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ดวงใจ ช่วยสถิตย์ . 2535. การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้. วิทยานิพนธ์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ลำพึง พุ่มจันทร์. 2545. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียเซลลูโลส *Acetobacter* sp. จากตัวอย่างผลไม้ในเขตร้อนและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลส . วิทยานิพนธ์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นายพัฒนพงษ์ วันจันทึก. 2543 การผลิตเซลลูโลสจากน้ำคั้นจากเปลือกสับปะรดโดยเชื้อ *Acetobacter* sp. วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Chenzhu-Ma and ZhenRong-Gu.2000. Screening,Identification and products testing of high – yield cellulose-producing strains of *Acetobacter xylinum*. Acta-Agriculture-Shanghai,16:3,78-82

De Ley, J., Gillis, M., Swings, J. 1984 Family VI. Acetobacteraceae. In : Krieg,N.R., Holt,J. G (Eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. I. Williams and Wikins,Baltimore, pp.267-278

Gonzalez, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A and Guillamon, J.M. 2005. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria

Gonzalez, A., Guillamon, J. M., Mas, A and Poblet, M. 2006. Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. International Journal of food Microbilogy, 108; 141 – 146

Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarrol, R.R., Yamada, Y., Uchimura, T and Komagata, K. 2003. Diversity of Acetic acid Bacteria Isolated from South – East Asian Sources. The 1st International Symposium and Workshop on "Insight into the World of Indigenous Fermented Foods for Technology Development and Food Safety" August 13-15, 2003 at Kasetsart University, Bangkok, Thailand

Toyosaki, H., Naritomi, T., Seto, A., Matsuoka, M and Tsuchida, T. 1995. Screening of Bacterial Cellulose – Producing *Acetobacter* strains suitable of agitated culture. Biosci. Biotech. Biochem, 59(8), 1498 - 1502

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ธีรวรรธน์ ขันทอง. 2550. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) : http://www.student.chula.ac.th/~49371019/restriction__fragment__length__p.htm

http://www.fostat.org/article/testfood.pdf

http://research.rmu.ac.th/botanical/botany/botany18.htm

http://www.sci.tsu.ac.th

http:/www.gpo.or.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
องค์ประกอบและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเหล่านี้ผสมกับน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้

1. Hestrin and Schramm

กลูโคส	2	เปอร์เซ็นต์
ยีสต์แอ็กแทร์ค	1	เปอร์เซ็นต์
เปปโตน	0.5	เปอร์เซ็นต์
Na_2HPO_4	0.27	เปอร์เซ็นต์
Citric acid	0.12	เปอร์เซ็นต์
พีเอช 5		

2. MR-VP broth

Polypeptone	7.0	กรัม
Dextrose	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	5.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
พีเอช 6.9-7.2		

3. 1เปอร์เซ็นต์ Peptone water สำหรับ Indole test

Peptone	10.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

4. Triple Sugar Iron agar (TSI agar)

Polypeptone	20.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dextrose	1.0	กรัม
Ferrous ammonium sulfate	0.2	กรัม
Sodium thiosufate	0.2	กรัม
Phenol red	0.025	กรัม
Agar	13.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

5. อาหารทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำตาล	10.0	กรัม
Bromthymol blue 1.6 เปอร์เซ็นต์	4.0	กรัม
พีเอช 6.8-7.0		

6. อาหารทดสอบการออกซิไดส์และการหมัก

Basal medium ประกอบด้วย

น้ำตาล	10	กรัม
Peptone	2.0	กรัม
K_2HPO_4	0.3	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	3.0	กรัม
Bromthymol blue	0.2	กรัม

7. อาหารทดสอบการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอทานอล

Bromo-cresol green	1	มิลลิลิตร
ยีสต์สกัด	30	กรัม
Agar	20	กรัม

เติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 15 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการกรอง 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอดทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. อาหารทดสอบการสร้างไดไฮดรอกซีอะซิโตนจากกลีเซอรอล

กลีเซอรอล	30	กรัม
ยีสต์สกัด	30	กรัม
Agar	20	กรัม

เติมกลีเซอรอลที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการกรองลงในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
สารเคมีและน้ำยาทดสอบต่างๆ

1. 3 เปอร์เซ็น Hydrogen peroxide solution

H_2O_2	3.0	กรัม
H_2O	100	มิลลิลิตร

2. Kovac ' s solution

Para-dimethyl-amino benzaldehyde	5.0	กรัม
Amyl or butyl alcohol	75	กรัม
HCl , concentrate	25	กรัม

3. methyl red solution

methyl red	0.8	กรัม
Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์	300	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

ละลายสี methyl red ใน 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol แล้วจึงเติมน้ำกลั่น

4. Voges-Proskauer test solution

Solution A:

Alpha napthol	10	กรัม
Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์	100	มิลลิลิตร

ละลาย Alpha napthol ใน 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol แล้วเก็บในขวดสีชา

Solution B:

KOH	20	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย KOH ในน้ำกลั่นเก็บในขวดสีน้ำตาล

5. Bromthymol blue solution 1.6 เปอร์เซ็นต์

Bromthymol blue	1.6	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ethyl alconol	100	มิลลิลิตร

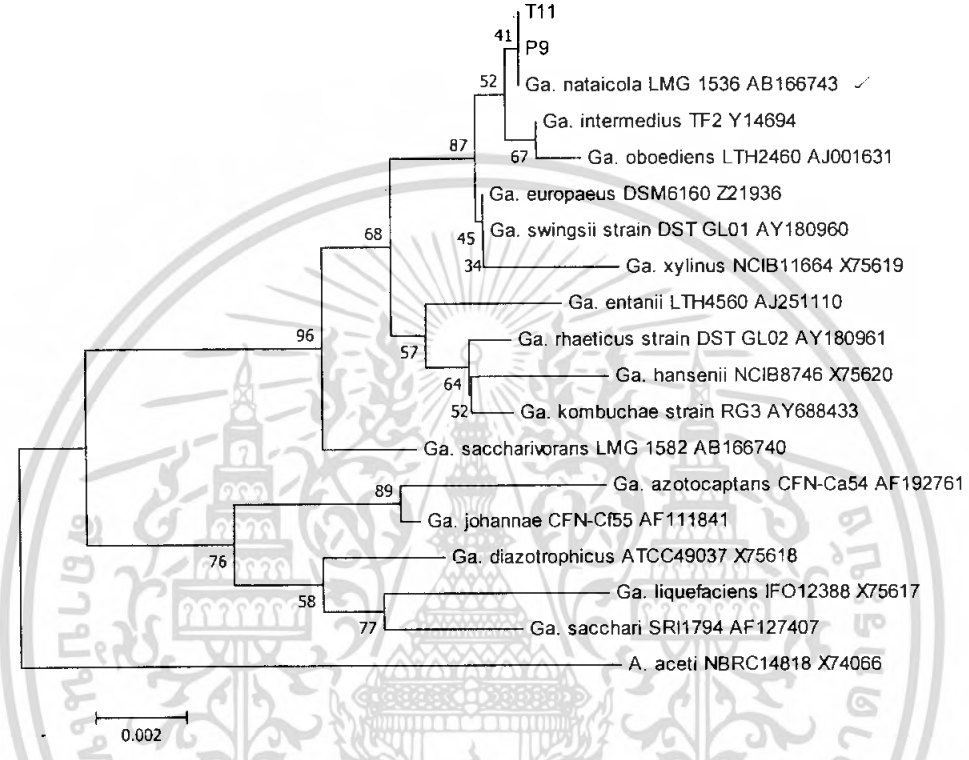
7. Fehling ' s solution

Copper(II) sulfate pentahydrate	69.28	กรัม
Potassium sodium tartrate	346	กรัม
Sodium hydroxide	120	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

Phylogenic tree (NJ tree) based on 16s rDNA partial sequences (~500bp)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16s rDNA (patial) similarity ~500bp ด้านปลาย 5' ของ 16srDNA

	Seq->	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	T11	100.0	100.0	99.8	98.9	99.8	96.5	97.0	98.7	99.8	98.6	99.6	97.0	96.1	99.4	96.5	99.3	97.9	94.6
2	P9	100.0	100.0	99.8	98.9	99.8	96.5	97.0	98.7	99.8	98.6	99.6	97.0	96.1	99.4	96.5	99.3	97.9	94.6
3	Ga. nataicola LMG 1536 AB166743	99.8	99.8	100.0	98.7	99.6	96.3	96.8	98.6	99.6	98.4	99.4	96.8	96.0	99.3	96.3	99.1	97.7	94.4
4	Ga. saccharivorans LMG 1582 AB166740	98.9	98.9	98.7	100.0	99.1	97.0	97.5	98.6	99.1	98.4	98.6	97.5	96.7	98.4	96.8	98.6	97.7	94.9
5	Ga. swingsii strain DST GL01 AY180960	99.8	99.8	99.6	99.1	100.0	96.7	97.2	98.9	100.0	98.7	99.4	97.2	96.3	99.3	96.7	99.4	98.0	94.8
6	Ga._azotocaptans_CFN-Ca54_AF192761	96.5	96.5	96.3	97.0	96.7	100.0	98.4	96.7	96.7	96.0	96.1	98.9	96.7	96.0	96.7	96.1	95.3	94.2
7	Ga._diazotrophicus_ATCC49037_X75618	97.0	97.0	96.8	97.5	97.2	98.4	100.0	96.5	97.2	96.8	96.7	98.4	98.2	96.5	98.2	96.7	95.8	95.4
8	Ga._entanii_LTH4560_AJ251110	98.7	98.7	98.6	98.6	98.9	96.7	96.5	100.0	98.9	98.7	98.7	97.2	95.6	98.6	96.0	98.4	98.0	94.6
9	Ga._europaeus_DSM6160_Z21936	99.8	99.8	99.6	99.1	100.0	96.7	97.2	98.9	100.0	98.7	99.4	97.2	96.3	99.3	96.7	99.4	98.0	94.8
10	Ga. hansenii_NCIB8746_X75620	98.6	98.6	98.4	98.4	98.7	96.0	96.8	98.7	98.7	100.0	98.6	96.5	96.0	98.4	96.5	98.2	98.2	94.6
11	Ga._intermedius_TF2_Y14694	99.6	99.6	99.4	98.6	99.4	96.1	96.7	98.7	99.4	98.6	100.0	96.7	96.1	99.8	96.5	98.9	97.9	94.9
12	Ga._johannae_CFN-Cf55_AF111841	97.0	97.0	96.8	97.5	97.2	98.9	98.4	97.2	97.2	96.5	96.7	100.0	97.0	96.5	97.2	96.7	95.8	94.4
13	Ga._liquefaciens_IFO12388_X75617	96.1	96.1	96.0	96.7	96.3	96.7	98.2	95.6	96.3	96.0	96.1	97.0	100.0	96.0	98.6	95.8	94.9	94.9
14	Ga._oboediens_LTH2460_AJ001631	99.4	99.4	99.3	98.4	99.3	96.0	96.5	98.6	99.3	98.4	99.8	96.5	96.0	100.0	96.3	98.7	97.7	94.8
15	Ga._sacchari_SRI1794_AF127407	96.5	96.5	96.3	96.8	96.7	96.7	98.2	96.0	96.7	96.5	96.5	97.2	98.6	96.3	100.0	96.1	95.4	94.9
16	Ga. xylinus_NCIB11664_X75619	99.3	99.3	99.1	98.6	99.4	96.1	96.7	98.4	99.4	98.2	98.9	96.7	95.8	98.7	96.1	100.0	97.5	94.2
17	Ga. kombuchae strain RG3 AY688433	97.9	97.9	97.7	97.7	98.0	95.3	95.8	98.0	98.0	98.2	97.9	95.8	94.9	97.7	95.4	97.5	100.0	94.2
18	A._aceti_NBRC14818_X74066	94.6	94.6	94.4	94.9	94.8	94.2	95.4	94.6	94.8	94.6	94.9	94.4	94.9	94.8	94.9	94.2	94.2	100.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย