

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์. 2547. เทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2541. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ยุวดี มหาศักดิ์ศิริ. 2546. การแยกแอกติโนมัยซีดที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากดินร้งปลวกในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิจิตรา อนันต์ศิริวัฒนา. 2545. การพิสูจน์เอกลักษณ์และฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอกติโนมัยซีดส์จากดินบริเวณเกาะเสม็ด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วีระวัฒน์ ปิยะเกรียงไกร. 2544. สัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของแอกติโนมัยซีดส์ที่ไม่ติดเชื้อแอกติโนมัยซีด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สายพิน สุวรรณจณี. 2549. ผลของสารยับยั้งแกมมาซีครีเทสต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

### ภาษาอังกฤษ

- Adam, D. Richardson and Chris, M. Ireland. 2004. A profile of the in vitro antitumor activity of lissoclinolide. Toxicol. Appl. Pharmacol. 195: 55-61.
- Aghighi, S., Shahidi Bonjar, G. H., Rawashdeh, R., Bataynch S. and Saadoun, I. 2004. First Report of Antifungal Spectra of Activity of Actinomycetes Strains Against *Alternaria solani*, *Alternaria alternate*, *Fusarium solani*, *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahliae* and *Saccharomyces cerevisiae*. Asian J. Plant Sci. 3. 4: 463-471.

- Alejandro M.S. Mayer and Kirk R. Gustafson. 2006. Marine pharmacology in 2003–2004: Anti-tumour and cytotoxic compounds. Euro. J. of cancer. 42: 2241-2270.
- Anisuzzaman, A. S. M., Sugimoto Naoki, Bhuiyan, M. S. A., Sadik Golam and Gafur, M. A., 2001. Toxicological studies of two novel compounds isolated from *Streptomyces* species. The Sci. 6: 368-371.
- Benveniste, R. and Davies, J., 1973. Aminoglycoside antibiotic- inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic resistant bacteria. NAS. 70: 2276- 2280.
- Bibb, J. M. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. Curr. Opin. Microbiol. 8: 208- 215.
- Brock, T. D., Smith, D. W., and Madigan, M. T. 1984. Biology of Microorganisms. 4<sup>th</sup> ed. New Jersey: Prentice-Hall.
- Burkhard Haefner. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. DDI. 8: 536-544.
- Caccavo, F. 1999. Protein-mediated adhesion of the dissimilatory Fe(III) reducing bacterium *Shewanella alga* BrY to hydrous ferric oxide. Appl. Env. Microbiol. 65:5017-5022.
- Castillo, M.A., Felis, N., Aragón, P., Cuesta, G. and Sabater, C., 2006. Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil. Inter. Biodeter. Biodegra. 58: 196- 202.
- Cohn, J. E. 1943. The pigment production of *Actinomyces coelicolor* and *A. violaceusruber*. J. Gen. Microbiol. 115: 133-150.
- Commins, C. S. 1958. Studies on the cell wall composition and taxonomy of Actinomycetales and related groups. J. Gen. Microbiol. 18: 173-189.
- Connell, N. D., 2001. Expression systems for use in actinomycetes and related organisms. Curr. Opin. Biotechnol. 12: 446- 449.
- Coombs, J. T., Franco, C. M. M. and Loria, R., 2003. Complete sequencing and analysis of pEN2701, a novel 13-kb plasmid from an endophytic *Streptomyces* sp. Plasmid. 49: 86- 92.
- Cross, T., and Goodfellow, M. 1973. Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance. London: Academic Press

- DeBoer, C. and Bannister, B. 1975. Process for producing the antibiotic U-44,590. United States Patent. 541,346.
- El-Tarabily, A. K. and Sivasithamparam, K., 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Soil Biol. Biochem. 38: 1505 -1520.
- Federica Sponga, Linda Cavaletti, Ameriga Lazzarini, Angelo Borghi, Ismaela Ciciliato, D. Losi and Flavia Marinelli, 1999. Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms. J. Biotechnol. 70: 65-69.
- Fernando Peláez. 2006. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products- Can history repeat? Biochem. Pharmacol. 71: 981-990.
- Fourati-Ben Fguira, L., Fotso, S. and Mellouli, L. 2004. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. Res. in Micro. 156:341-347.
- Gesheva, V., Ivanova, V. and Gesheva, R. 2004. Effects of nutrients on production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *streptomyces hygrosopicus*. Microbiol. Res. 160:243 248.
- Glodman, D. A., Weinstein, R. A., Wenzel, R. P., Tablan, O. C., Duma, R. J., Gaynes, R. P., Schlosser, J. and Martone, W. J., 1996. Strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial resistant microorganisms in hospitals: a challenge to hospital leadership. JAMA. 275: 234-240.
- Hadjira Boudjella, Karima Bouti, Abdelghani Zitouni, Florence Mathieu, Ahmed Lebrihi and Nasserline Sabaou. 2006. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. Microbiol. Res. 161: 288-298.
- Hirsch, P., Mevs, U., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P. and Stackebrandt, E. 2004. Cryptoendolithic Actinomycetes from Antarctic Sandstone Rock Samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two Isolates Related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932. Syst. Appl. Microbiol. 27:166-174.
- Holt, J. G., Krieg, N.R., Shealth, P.H.A., Staley, J.T. and William, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. U.S.A.: The Williams and Wilkins.

- Ignacio González, Angel Ayuso-Sacido, Annaliesa Anderson and Olga Genilloud. 2005. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. FEMS Microbiol. Eco. 54 : 401-415.
- Igarashi, Y., 2003. Secondary metabolites of endophytic actinomycetes. The international society for the biology of Actinomycetes 13<sup>th</sup> symposium and world federation of culture collections. Technical report 8:34.
- Kalakoutskii, L. V. and Agre, N. S. 1976. Comparative aspects of development and differentiation on actinomycetes. Bacteriol. Rev. 40:469-524.
- Kawamoto, I. 1989. Genus *Micromonospora*, In: William, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds) Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Vol 4. pp. 2442-2450. Baltimore: The William and Wilkins.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. and Hopwood, D. A. 2000. Practical Streptomyces Genetics. Norwich: John Innes Foundation.
- Kutzner, H. J., 1981. The family Streptomycetaceae. In: Starr MP, Stolp H, Truper HG, Balows A and Schlegel H (Eds) The Prokaryotes: a hand book on habitants. Isolation and Identification of Bacteria. pp 2028-2092. Berlin: Springer-Verlag.
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Cnockaert, C. M., Dawyndt, P., Liu, Z., Huang, Y. and Swings, J., 2005. Grouping of streptomycetes using 16S- ITS RFLP fingerprinting. Res. in Microbiol. 156: 755- 762.
- Lederberg, J., Krsek, M., Morris, N., Egan, S. M. H. and Wellington, E. 2000. Encyclopedia of Microbiology. 2<sup>nd</sup> vol 1. New York: The Rockefeller University.
- Lee, J. Y. and Hwang. B. K., 2002. Diversity of antifungal Actinomycetes in various vegetative soils of Korea. Can. J. Microbiol. 48: 407-417.
- Lilia Fourati-Ben Fguira, Serge Fotso. Raoudha Ben Ameer-Mehdi, Lotfi Mellouli and Hartmut Laatsch. 2005. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. Res. in Microbiol. 156: 341-347.
- Lixiang Cao, Zhiqi Qui, Jianlan You, Hongming Tan and Shining Zhou, 2005. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of fusarium

- wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. FEMS Microbiol. Letters. 247 : 147-152.
- McCarthy, A. J., 1989. Genus *Thermomonospora*, In: William, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds) Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Vol 4. pp. 2562-2568. Baltimore: The William and Wilkins.
- Maddison, D. R. and Maddison, W. P., 2001. MacClade 4. Analysis of phylogeny and character evolution version 4.03. Sunderland, M.A., U.S.A.: Sinauer Associates.
- Manallack, D. T., Crosby, I. T., Khakham, Y. and Capuano, B., 2008. Platensimycin: a promising antimicrobial targeting Fatty Acid synthesis. Curr. Med. Chem. 15 7:705-10.
- Mellouli, L., Ameur-Mehdi, R. B., Sioud, S., Shlem, M. and Bejar, S., 2003. Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. Res. in Micro.154:345-352.
- Miyadoh, S., 1993. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganisms approach. Actinomycetologia. 9:100-106.
- Okazaki, T., 2003. Actinomycetes isolated from plant leaves and their antibiotic substances. The international society for the biology of Actinomycetes 13<sup>th</sup> symposium and world federation of culture collections. Technical report 8:34.
- Oliveira, R.S., Castro, P.M.L., Dodd, J.C. and Vosátka, M., 2005. Synergistic effect of *Glomus intraradices* and *Frankia* spp. on the growth and stress recovery of *Alnus glutinosa* in an alkaline anthropogenic sediment. Chemosphere. 60: 1462- 1470.
- Palaga, T., Kataoka, T., Woo, JT. and Nagai, K. 1996. Suppression of apoptotic cell death of IL-3-dependent cell line by ER/ SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitors upon IL-3 deprivation. Exp.Cell. Res. 228: 92-97.
- Pridham, T. G., and Gottlieb, D. 1948. The utilization of carbon compounds by some actinomycetales as an aid for species determination. J. Bacteriol. 107-114.

- Raoudha Ben Ameer Mehdi, Samiha Sioud, Lilia Fourati Ben Fguira, Samir Bejar and Lotfi Mellouli. 2006. Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. TN97 strain. Process Biochem. 41: 1506-1513.
- Rintala, H., Nevalainen, A., Rönkä, E. and Suutari, M., 2001. PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of streptomycetes. Molecular and Cellular Probes. 15: 337- 347.
- Saito, A., Miyashita, K., Biukovi, G. and Schrempf, H. 2001. Characteristics of a *Streptomyces coelicolor* A3(2) extracellular protein targeting chitin and chitosan. Appl. Env. Micro. 67:1268-1273.
- Salas, J. A. and Méndez, C., 1998. Genetic manipulation of antitumor- agent biosynthesis to produce novel drugs. Tibtech November. 16: 475- 482.
- Shih, H. D., Lui, Y. C., Hsu, F. L., Mulabagal, V., Dodda, R. and Hauang, J. W., 2003. Fungichomin: a substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizotonia solani*. J. Agri. Food. Chem. 51: 95-99.
- Shirling, E. B. and Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol 16: 313-340.
- Strohl, W. R., 1997. Industrial antibiotics : today and the future, In : Strohl Wr (ed). Biotechnology of antibiotics, 2<sup>nd</sup> end. pp. 1-47. New York: Marcel Dekker.
- Sujatha, P. et al., 2004. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Res.160:119-126.
- Swofford, D. L., 1999. PAUP\* Phylogenetic analysis using parsimony(and other methods), Version 4.08b8. Sunderland, M.A., USA: Sinauer Associates.
- Sykes, G., and Skinner, F. A., 1973. Actinomycetales: Characteristics and Practical importance. New York: Academic Press.
- The Society for Actinomycetes Japan 1997. Atlas of actinomycetes, Japan: Asakura Publishing.
- Ueda, K., Seki, T., Kudo, T., Yoshida, T., and Kataoka, M. 1999. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. J. Bacteriol. 181:78-82.

- Waksman, S. A. 1950. Actinomycetes: Their Nature, Occurrence, Activities and Importance. Massachusetts: Chronica Botanica Company.
- Waksman, S. A. and Henrici. Streptomycetaceae. In : Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E., 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8<sup>th</sup> ed. Baltimore: The Williams and Wilkins Company.
- Waksman, S. A. and Lomanitz, S. 1925. Contribution to the chemistry of decomposition of proteins and amino acids by various groups of microorganisms. J. Agric. Res. 30: 263-281.
- Waksman, S. A. and Woodruff, H. B. 1940. Bacteriostatic and Bactericidal substances produced by a soil actinoyces. J. Bacteriol. 40: 609.
- Wang, J., Stephen, M., Soisson, K., Young, W. and Shoop, S. 2006. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. Nature. 441:358-361.
- Weber, T., Welzel, K., Pelzer, S., Vente, A. and Wohlleben, W., 2003. Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. J. Biotechnol. 106: 221- 232.
- Williams, S. T., Goodfellow, M. and Alderson, G., 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4. U.S.A.: The Williams and Wilkins.
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Huang, Y. and Yuen, K., 2006. Genomic evidence for antibiotic resistance gene of actinomycetes as origins of antibiotic resistance gene in pathogenic bacteria simply because actinomycetes are more ancestral than pathogenic bacteria. Medical Hypotheses. 67: 1297- 1304.
- Zhonghui Zheng, Wei Zeng, Yaojian Huang, Zhiyuan Yang, Jun Li, Huirong Cai and Wenjin Su. 2000. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. FEMS Microbiol. Letters. 188: 87- 91.

ภาคผนวก



## ภาคผนวก ก

## สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. โซเดียม เคซีเนต อการ์ (Sodium Caseinate Agar)

โซเดียมเคซีเนต (Sodium caseinate)	2.0	กรัม
ไดโพเทสเทียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.2	กรัม
เฟอร์รึคลอไรด์ ( $FeCl_3$ )	0.01	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

เติม cycloheximide 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ nystatin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารปฏิชีวนะทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 50 °C

## 2. โซเดียม เคซีเนต บรอต (Sodium Caseinate Broth)

โซเดียมเคซีเนต (Sodium caseinate)	2.0	กรัม
ไดโพเทสเทียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.2	กรัม
เฟอร์รึคลอไรด์ ( $FeCl_3$ )	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

### 3. นิวเทรียนท์ อการ์ (Nutrient Agar)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	5.0	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

### 4. นิวเทรียนท์ บรอก (Nutrient Broth)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

### 5. แมนนิทอล มังปิ้ง อการ์ (Mannitol Mungbean Agar)

ถั่วเขียวบด	20.0	กรัม
น้ำตาลแมนนิทอล (D-mannitol)	20.0	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำประปา	500.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

ต้มถั่วเขียวบดกับน้ำประปาจนเดือด กรองเอาถั่วเขียวออก นำน้ำต้มถั่วเขียวที่ได้มาเติมน้ำตาลแมนนิทอล และน้ำกลั่น ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 เติมวุ้นผง แล้วนำไปต้มจนเดือดอีกครั้ง นึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

### 6. โซลูเบิล สตาร์ช บรอก (Soluble Starch Broth)

แป้ง (Soluble Starch)	10.0	กรัม
กลีเซอรอล (Glycerol)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	2.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	3.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO <sub>4</sub> )	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

7. โซเดียม เคซีเนต ยีสต์ เอ็กซ์แทรก บรอต (Sodium Caseinate Yeast Extract Broth)

โซเดียมเคซีเนต (Sodium caseinate)	2.0	กรัม
ไดโพเทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.2	กรัม
เฟอร์ริคลอไรด์ ( $FeCl_3$ )	0.01	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

8. ทริปติก ซอย อการ์ (Tryptic Soy Agar)

กัญไคส	2.5	กรัม
แบคโต ทริปโตน (Bacto tryptone)	17.0	กรัม
แบคโต ซอยโทน (Bacto soy tone)	3.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพเทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	2.5	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

9. ทริปติก ซอย บรอต (Tryptic Soy Broth)

แบคโต ทริปโตน (Bacto tryptone)	17.0	กรัม
แบคโต ซอยโทน (Bacto soy tone)	3.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพเทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

## 10. แซบบรอต อการ์ (Sabouraud Agar)

แบคโตเปปโทน (Bacto peptone)	10.0	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	40.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 5.6

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

## 11. โปเตโต เดกซ์โตรส อการ์ (Potato Dextrose Agar)

มันฝรั่ง	200.0	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	20.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ต้มมันฝรั่งในน้ำจนเดือดประมาณ 20 นาที กรองเอาส่วนน้ำใสมาใช้

ปรับพีเอชเท่ากับ 5.6

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

## 12. มุลเลอร์ ฮินตัน อการ์ (Mueller-Hinton Agar)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	2.0	กรัม
เคซีน (Acid Hydrolysate of Casein)	17.5	กรัม
แป้ง (starch)	1.5	กรัม
วุ้นผง	17.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

13. กลูโคส ยีสต์ มอลท์ เอกซ์แทรกท อการ์ (Glucose Yeast Malt Extract agar)

กลูโคส	4.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	4.0	กรัม
สารสกัดจากมอลท์	10.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO <sub>3</sub> )	2.0	กรัม
วุ้นผง	17.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 7.2

นี้่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

14. โซเดียม เคซิเนต ยีสต์ เอกซ์แทรกท อการ์ (Sodium Caseinate Yeast Extract Agar)

โซเดียมเคซิเนต (Sodium caseinate)	2.0	กรัม
ไดโพเทสเทียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.2	กรัม
เฟอร์ริคลอไรด์ (FeCl <sub>3</sub> )	0.01	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2

นี้่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

15. ISP1 ทริปโตน ยีสต์ เอกซ์แทรกท อการ์ (Trypton-Yeast Extract Agar)

ทริปโตน (Trypton)	5.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นี้่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

## 16. ISP2 ยีสต์ มอลท์ เอกซ์แทรก อการ์ (Yeast-Malt Extract Agar)

สารสกัดจากมอลท์ (Malt extract)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	4.0	กรัม
กลูโคส	4.0	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

## 17. ISP3 โธัด มีล อการ์ (Oat Meal Agar)

ข้าวโอ๊ต (Oat meal)	20.0	กรัม
*สารละลายเทรซ โซลท์ (Trace salt solution)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ต้มข้าวโอ๊ตในน้ำกลั่นโดยต้มให้เดือดประมาณ 10-15 นาที นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เติมน้ำกลั่นลงไปให้อาหารจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เติม Trace salt solution ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (\*ภาคผนวก ก หมายเลข 26)

## 18. ISP4 อินออแกนิก ซอลล์ สตาร์ช อการ์ (Inorganic Salts Starch Agar)

แป้ง (Soluble starch)	10.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(NH_4)_2SO_4$ )	2.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ( $CaCO_3$ )	2.0	กรัม
*สารละลาย เทรซ โซลท์ (Trace salt solution)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

\*ภาคผนวก ก. หมายเลข 26

## 19. ISP5 กลีเซอรอล แอสปาราจีน อการ์ (Glycerol Asparagines Agar)

กลีเซอรอล (Glycerol)	10.0	กรัม
แอสปาราจีน ( <i>L</i> -asparagine)	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	1.0	กรัม
*สารละลาย เทรซ ซอลต์ (Trace salt solution)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

\*ภาคผนวก ก. หมายเลข 26

## 20. ISP6 เปปโตเน ยีสต์ แอซแทรก ไอร์ออน อการ์ (Peptone Yeast Extract Iron Agar)

แบคโต เปปโตเน (Bacto peptone)	15.0	กรัม
โปรติโอส เปปโตเน (Proteose peptone)	5.0	กรัม
เฟอริก แอมโมเนียม ซิเตรต (Ferric ammonium citrate)	0.5	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	1.0	กรัม
โซเดียมซัลเฟต ( $Na_2SO_4$ )	0.08	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	1.0	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

## 21. ไทโรซีน อการ์ (Tyrosine Agar)

กลีเซอรอล (Glycerol)	15.0	กรัม
แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine)	0.5	กรัม
แอล-เอสปาราจีน (L-asparagine)	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	1.0	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.1	กรัม
*สารละลาย เทรซ ซอลต์ (Trace salt solution)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2-7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °C และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

\*ภาคผนวก ก. หมายเลข 26

## 22. ไนเตรท อการ์ (Nitrate Agar)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตเน (Bacto peptone)	5.0	กรัม
โปแทสเซียมไนเตรท ( $KNO_3$ )	2.0	กรัม
วุ้นผง	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

## 23. โมดิฟายด์ เบนเนท อการ์ (Modified Bennett's Agar)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	1.0	กรัม
กลีเซอรอล (Glycerol)	10.0	กรัม
แบคโต เปปโทเน (Bacto peptone)	2.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	1.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

พีเอช 7.3 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °C ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 10 นาที



## 24. เบซอล มีเดียม (Basal Medium Agar)

กลูโคส	10	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.5	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.01	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	1.0	กรัม
วุ้นผง	12.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °C และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

## 25. คาร์บอน ยูทิลิเซชัน อการ์ (Carbon Utilization Agar)

แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(NH_4)_2SO_4$ )	2.64	กรัม
โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ )	2.38	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.5	กรัม
*สารละลายเทรซซอลต์ของ Pridham และ Gottlieb	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	12.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °C และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

\*ภาคผนวก ก หมายเลข 27

## 26. สารละลายเทรซ ซอลล์ (Trace Salts Solution)

เฟอร์รัสซัลเฟต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.1	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ ( $MnCl_2$ )	0.1	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45  $\mu m$  และเติมลงในอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 45-50 °C

## 27. สารละลายเทรซ ซอลล์ของ Pridham และ Gottlieb

(Pridham and Gottlieb trace salt solution)

คอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.64	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.11	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ ( $\text{MnCl}_2$ )	0.79	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด  $0.45 \mu\text{m}$  และเติมลงในอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ  $45-50^\circ\text{C}$

## 28. กลูโคส ยีสต์ มอลท์ เอกซ์แทรก บรอต (Glucose Yeast Malt Extract Broth)

กลูโคส	4.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	4.0	กรัม
สารสกัดจากมอลท์	10.0	กรัม
วุ้นผง	17.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

## 29. มอลท์ เอกซ์แทรก บรอต (Malt Extract Broth)

สารสกัดจากมอลท์ (Malt extract)	2.0	กรัม
แบคโต เปปโตน (Bacto peptone)	1.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

## 30. ยีสต์ มอลท์ เอกซ์แทรกท อการ์ (Yeast-Malt Extract Broth)

สารสกัดจากมอลท์ (Malt extract)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	4.0	กรัม
กลูโคส	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

## 31. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 (stock reagent)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ผงสำเร็จรูป	10.4	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต	2	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร กวนให้เป็นเนื้อเดียวกันปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่าประมาณ 6.9-7.4 ด้วย HCL ความเข้มข้น 1N ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านหัวกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากเชื้อขนาด 0.22 ไมครอนเมตร ลงในขวดใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากเชื้อขวดละ 90 มิลลิลิตร ปิดฝาและพันพาราฟิล์ม เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C

## 32. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี Fetal Bovine Serum ความเข้มข้น 10% (complete media)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 (stock reagent)	90	มิลลิลิตร
ซีรัม (inactivated fetal bovine serum)	10	มิลลิลิตร
Gentamycin (100 mg/ml)	100	ไมโครลิตร

## 33. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 สำหรับเก็บเซลล์แช่แข็ง

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 (working reagent)	9	มิลลิลิตร
DMSO	1	มิลลิลิตร

## ภาคผนวก ข

## สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

## 1. 0.5 McFarland Standard

BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.175	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.175 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปิเปตต์สารละลาย BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลาย 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร จะได้สารแขวนลอยที่มีลักษณะขุ่น เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

2. บัฟเฟอร์ Phosphate buffer saline (PBS, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> free) ความเป็นกรด-ด่าง 7.4

NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
NaHPO <sub>4</sub>	1.44	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24	กรัม

นำแต่ละส่วนละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.4 ด้วย HCL เข้มข้น 1N หรือ NaOH เข้มข้น 1N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 1000 มิลลิลิตร ینگมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

## 3. สารละลาย MTT 5 mg/ml ใน PBS

MTT	50	มิลลิกรัม
PBS	10	มิลลิลิตร

ละลาย MTT ใน PBS กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่หลอดไมโครทิวป์ปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร หุ้มแผ่นฟอยด์เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

## 4. สารละลาย 0.04 N HCl ใน isopropanol

เติม HCl 0.331 มิลลิลิตร ลงใน 80 มิลลิลิตร isopropanol ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วย isopropanol เก็บที่อุณหภูมิห้อง

## 5. Tris-HCl pH 8

Tris base	121	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย Tris base ให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย HCl ให้เท่ากับ 8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

## 6. Washing buffer

PVP (Polyvinylpyrrolidone)	2	กรัม
Ascorbic acid	1.76	กรัม
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol	4	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว (Autoclaved water) จนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

## 7. 2X CTAB lysis buffer

CTAB	4	กรัม
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	8	มิลลิลิตร
NaCl	16.36	กรัม
2-mercaptoethanol	1	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 8. Chloroform/isoamyl alcohol (24: 1 v/v)

Choloroform	192	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	8	มิลลิลิตร

## 9. 20 % Polyethylene glycol 6000 (PEG)

Polyethylene glycol 6000	20	กรัม
--------------------------	----	------

NaCl	14.61	กรัม
------	-------	------

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 10. Tris-EDTA buffer (TE buffer)

1 M Tris-HCl; pH 7.4, 7.5 หรือ 8	10	มิลลิลิตร
----------------------------------	----	-----------

0.5 M EDTA; pH 8.0	2	มิลลิลิตร
--------------------	---	-----------

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 11. 0.5 M EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid)

EDTA	86.10	กรัม
------	-------	------

น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

ละลาย EDTA ให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย NaOH ให้เท่ากับ 8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนขึ้น ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

## ภาคผนวก ค

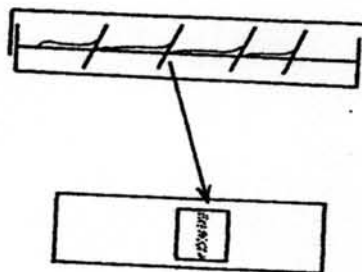
### วิธีการทดลอง

#### 1. การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของตัวอย่างดิน

ชั่งตัวอย่างดินตัวอย่าง 5 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (1:2) นำไปเขย่าด้วย rotary shaker 200 rpm เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน จากนั้นนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วย pH meter

#### 2. เทคนิค Slide Culture

ขีดแอกติโนมัยซีทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำแผ่นปิดสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว มาเสียบเป็นมุมเฉียงลงบนรอยขีด บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นดึงแผ่นปิดสไลด์มาวางบนแผ่นสไลด์ที่หยดสี lacto phenol cotton blue ไว้ นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์



ที่มา Holt, J.G., Krieg, N. R., Sheath, P.H.A., Staley, J.T., and William, S.T. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup> ed., U.S.A.:Williams & Wilkins.

### 3. การหาน้ำหนักแห้งของเส้นใย (Dry cell weight)

3.1 นำกระดาษกรอง Whatman No.1 อบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง (desicator) แล้วนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

3.2 นำกระดาษกรองมากรองเส้นใยออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

3.3 นำกระดาษกรองที่มีเส้นใยติดอยู่เข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

3.4 นำออกมาใส่ในโถอบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

3.5 นำค่าน้ำหนักของกระดาษกรองมาหักออกผลที่ได้จะเป็นน้ำหนักแห้งของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร

### 4. การเตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)

4.1 ตัดชิ้นวุ้นที่มีโคโลนีของแอสโตโมแนดเซียสเจริญอยู่เป็นชิ้นสี่เหลี่ยม มีพื้นที่ประมาณ  $5 \times 5$  mm<sup>2</sup> นำชิ้นวุ้นไปอบด้วยไอของ 1% ออสเมียมเตตระออกไซด์ (Osmium tetroxide, OsO<sub>4</sub>) ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20 ซี เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิ

4.2 ขจัดน้ำออก (dehydration) จุ่มตัวอย่างในเอทานอลความเข้มข้น 30 50 70 90 และ 100% ขึ้นตอนละ 10-20 นาทีตามลำดับ

4.3 การทำตัวอย่างให้แห้ง โดยการทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point drying) โดยการใช้เครื่องทำให้แห้ง (critical dryer model SAMDRI-780)

4.4 นำตัวอย่างไปติดบนแท่นทองเหลืองด้วยการติดตัวอย่างที่นำไฟฟ้าได้ (electroconductive adhesive)

4.5 นำตัวอย่างไปเคลือบผิวด้วยทอง ความหนาประมาณ 20 ไมโครเมตร โดยใช้เครื่อง Ion sputter coater, model JSC-110

4.6 นำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, IEOL รุ่น JSM-5410LV)

ที่มา : ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายวรปรัชญ์ ศรีสุขคำ เกิดเมื่อวันที่ 17 สิงหาคม พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดน่าน สำเร็จ การศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนศรีสวัสดิ์วิทยาคาร จังหวัดน่าน สำเร็จการศึกษาระดับ วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตร จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2547