ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก
อาหารที่ใช้สำหรับแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อ

1. Buffer Charcoal Yeast Extract (BCYE) medium

1.1 BCYE agar

Agar	15.0	g
Yeast extract	10.0	g
ACES buffer (2-[(2-Amino-2-oxoethyl)-amino]-ethane sulfonic acid)	10.0	g
Charcoal, activated	2.0	g
α-Ketoglutarate	1.0	g
L-cysteine•HCl•H_2O	0.4	g
$Fe_4(P_2O_7)_3$•$9H_2O$	0.25	g
น้ำกลั่น	1	l

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น L-cysteine•HCl•H_2O และ $Fe_4(P_2O_7)_3$•$9H_2O$ เข้าด้วยกัน ปรับ pH ให้ได้ 6.9 ด้วย 1N KOH ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีเมื่ออุณหภูมิของอาหารลดลงที่ระดับ 50-55°C จึงเติม L-cysteine•HCl•H_2O และ $Fe_4(P_2O_7)_3$•$9H_2O$ ผสมให้เข้ากันดีก่อนเทลงบนจานเพาะเชื้อที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว

หมายเหตุ L-cysteine•HCl•H_2O และ $Fe_4(P_2O_7)_3$•$9H_2O$ มีจำหน่ายสำเร็จรูป (Fluka 92394) โดยมีส่วนประกอบใน 1 vial ดังนี้

1. L-Cystein hydrochloride	200	mg
2. Ferric pyrophosphate	125	mg

เติมน้ำกลั่นที่ไร้เชื้อ 5 ml/vial เพื่อละลายสารก่อนนำไปผสมลงไปในอาหารในอัตราส่วน 1 ml ของสารผสม ต่ออาหาร 100 ml

1.2 BCYE broth

มีวิธีการเตรียมเหมือน BCYE agar ทุกประการ ยกเว้นไม่มีการเติม agar ลงในอาหารเท่านั้น เทอาหารที่เตรียมลงในขวดเพาะเชื้อตามปริมาตรที่ต้องการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. Nutrient medium

2.1 Nutrient agar

Beef extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1.0	l

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนเทลงบนจานเพาะเชื้อที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว

2.2 Nutrient broth

มีวิธีการเตรียมเหมือน NA ทุกประการ ยกเว้นไม่มีการเติม agar ลงในอาหารเท่านั้น เทอาหารที่เตรียมลงในขวดเพาะเชื้อตามปริมาตรที่ต้องการ

3. Thiosulfate Citrate Bile salts Sucrose medium

3.1 Thiosulfate Citrate Bile salts Sucrose Agar (TCBS Agar)

Agar	15.0	g
Oxgall	8.0	g
Proteose Peptone	10.0	g
Saccharose	20.0	g
Sodium Citrate	10.0	g
Sodium Chloride	10.0	g
Sodium Thiosulfate	10.0	g
Yeast Extract	5.0	g
Bromthymol Blue	0.04	g
Ferric Ammonium Citrate	1.0	g
Thymol Blue	0.04	g

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนเทลงบนจานเพาะเชื้อที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว

3.2 Thiosulfate Citrate Bile salts Sucrose broth

มีวิธีการเตรียมเหมือน TCBS Agar ทุกประการ ยกเว้นไม่มีการเติม agar ลงในอาหารเท่านั้น เทอาหารที่เตรียมลงในขวดเพาะเชื้อตามปริมาตรที่ต้องการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. Nitrate broth

ประกอบด้วย

Bacto-beef extract	3.0	g
Bacto-peptone	5.0	g
Potassium nitrate	1.0	g
Distilled water	1	l

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนเทลงบนจานเพาะเชื้อที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว

5. Gelatin agar

ประกอบด้วย

อาหารเหลว nutrient broth

เจลลาตินความเข้มข้นร้อยละ 12 (ผสมเจลลาติน 12 g ใน nutrient broth 100 ml)

6. Urea broth

ประกอบด้วย

Urea	20.0	g
Na_2HPO_4	9.5	g
KH_2PO_4	9.1	g
Yeast extract	0.1	g
Phenol Red	0.01	g
Urea solution	100.0	ml

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น Urea solution เข้าด้วยกัน ปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วย 1 N NaOH ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีเมื่ออุณหภูมิของอาหารลดลงที่ระดับ 50-55°C จึงเติม Urea solution ที่ผ่านการกรอง ผสมให้เข้ากันดีก่อนนำไปทดสอบกับเชื้อต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

สารเคมี

ชุดย้อมสีแกรม

1. Crystal violet stain

Crystal violet	5.0	ml
น้ำกลั่น	100	ml

ละลาย crystal violet ในน้ำกลั่น จากนั้นเก็บใส่ขวดสีชา

2. Gram iodine solution

Iodine	1.0	g
Potassium iodine	2.0	g
น้ำกลั่น	300	ml

ละลาย iodine และ potassium iodine ในน้ำกลั่น จากนั้นเก็บใส่ขวดสีชา

3. Decolorizer

Ethanol, 95%	250	ml
Acetone	250	ml

ละลาย acetone ใน 95% ethanol เก็บใส่ขวดสีชา

4. Safranin O solution

Safranin O	2.5	g
Ethanol, 95%	100	ml

ละลาย safranin O ใน 95% ethanol เก็บใส่ขวดสีชา เมื่อจะใช้ต้องนำมาเจือจางลงอีก 5-10 เท่า โดยใช้น้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Nitrate test

การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรต (Nitrate reduction test) อาหารที่ใช้ทดสอบ คือ nitrate broth และสารเคมีที่ใช้ คือ สารละลาย α-naphthylamine (สารละลาย A) และ sulphanilic acid (สารละลาย B) วิธีทดสอบมีดังต่อไปนี้

1. เขี่ยแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวจากจานอาหารที่ต้องการทดสอบ ลงในอาหาร nitrate broth
2. เพาะเลี้ยงแบคทีเรียใน nitrate broth ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง
3. เติมสารละลาย A และ B สารละลายละ 5 หยด ลงไปในหลอดทดลอง
4. ตรวจผลโดยสังเกตการเกิดสีแดงปนตะกอนเป็นผลบวก ไม่เกิดสีแดงปนตะกอนเป็นผลลบ

Catalase test

1. เขี่ยแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวจากจานอาหารที่ต้องการทดสอบลงบนกระจกสไลด์
2. หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนโคโลนีที่ต้องการทดสอบ
3. ตรวจผลโดยสังเกตการเกิดฟองเป็นผลบวก ไม่เกิดฟองเป็นผลลบ

Gelatin test

1. เขี่ยแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวจากจานอาหารที่ต้องการทดสอบ ลงในอาหาร gelatin agar
2. เพาะเลี้ยงแบคทีเรียใน gelatin agar ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 สัปดาห์
3. ตรวจผลโดยสังเกตความเหลวของอาหารที่เกิดขึ้นเป็นผลบวก เมื่อทำการเอียงหลอดทดลองไปยังด้านใดด้านหนึ่ง หากอาหารยังแข็งเป็นผลลบ

Urease test

1. เขี่ยแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวจากจานอาหารที่ต้องการทดสอบ ลงในอาหาร urea broth
2. เพาะเลี้ยงแบคทีเรียใน urea broth ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง
3. ตรวจผลโดยสังเกตสีที่เปลี่ยนแปลงหากเป็นผลบวกจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู ผลลบไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

STE buffer

1. NaCl, 1M

   ละลาย NaCl 292 g ในน้ำกลั่น 800 ml จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 l

2. Tris-HCl (pH 7.5), 1M

   ละลาย Tris-HCl 121.1 g ในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย HCl จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 l

3. Sodium EDTA (pH 8), 1M

ละลาย EDTA.H_2O 186.1 g ในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH เป็น 8.0 โดย HCl จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 l

ผสมสารละลายทั้ง 3 เข้าด้วยกันในปริมาตร ดังนี้

- NaCl, 1M 100 ml
- Tris-HCl, 1M 50 ml
- Sodium EDTA, 1M 10 ml
- น้ำกลั่น 1 l

นำสารผสมที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิห้อง

SDS (sodium dodecyl sulfate)

ละลาย SDS 25 mg ในน้ำกลั่น 1 ml ใน microcentrifuge tube ขนาด 2.0 ml ไม่ต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิห้อง

Lysozyme

ละลาย lysozyme 10 mg ในน้ำกลั่น 1 ml ใน microcentrifuge tube ขนาด 2.0 ml ไม่ต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิห้อง

Proteinase K

ละลาย proteinase K 25.9 mg ในน้ำกลั่น 1 ml ใน microcentrifuge tube ขนาด 2.0 ml ไม่ต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

RNase

ละลาย RNase 10 mg ในน้ำกลั่น 1 ml ใน microcentrifuge tube ขนาด 2.0 ml ไม่ต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

Phenol

นำ phenol มาหลอมละลายที่อุณหภูมิ 68°C โดยเติม hydroxyquinolines จนได้ ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% เพื่อยับยั้ง RNase และ chelator ion และเพิ่มสีเหลืองให้กับชั้น organic phase

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นเติม 0.5M Tris-HCl pH 8.0 คนด้วย magnetic stirrer 15 นาที ทิ้งไว้จนแยกชั้น ดูดสารชั้นบนออกให้ได้มากที่สุด จากนั้นทำซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ 0.1M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่เหลืออยู่ คนให้เข้ากันจนกระทั่งวัด pH ได้สูงกว่า 7.8 ทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดูดสารชั้นบนออกให้มากที่สุด จากนั้นเติม 0.1M Tris-HCl pH 8.0 (10%) ของปริมาตรทั้งหมด เพื่อปิดผิวหน้าของสารละลาย phenol ที่ equilibrated เสร็จแล้วเก็บที่ 4℃ ในขวดสีชา ได้นาน 1 เดือน หรือจนสารละลายดังกล่าวเปลี่ยนเป็นสีส้ม

10X TNE buffer

Tris-HCl, 100 mM	12.11 g
NaCl, 2.0 M	116.89 g
EDTA, 10mM	3.72 g
น้ำกลั่น	1000 ml

ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121℃ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิห้อง

TNE buffer + 2% Triton X-100

TNE buffer	98 ml
Triton X-100	2 ml

ผสมให้เข้ากัน ไม่ต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิห้อง

50X TAE buffer

1. Tris-base

   ละลาย Tris-base 242.0 g ในน้ำกลั่น 1 l คนให้ละลาย

2. Glacial acetic acid

   ละลาย glacial acetic acid 57.1 ml ในน้ำกลั่น 1 l คนให้ละลาย

3. EDTA (pH 8), 0.5M

   ละลาย EDTA.H_2O 186.1 g ในน้ำกลั่น 800 ml คนให้ละลาย ปรับ pH เป็น 8.0 โดย HCl จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 l

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผสมสารละลายทั้ง 3 เข้าด้วยกันในปริมาตร ดังนี้

- Tris buffer 242.0 g
- Glacial acetic acid 57.1 ml
- EDTA, 0.5M 100.0 ml
- น้ำกลั่น 1 l

ละลาย Tris-base และ 0.5M EDTA ในน้ำกลั่น จากนั้นเติม glacial acetic acid ลง (ทำในตู้ดูดควัน) คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1 l นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6X loading dye

Bromophenol blue	0.25	mg
Glycerol	3	ml
TAE buffer, 5X	1	ml
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	10	ml

ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งเก็บไว้ใน microcentrifuge tube ที่ -20°C

Ethydium bromide

EtBr, 5mM	60	µl
TAE buffer	250	ml

ละลาย EtBr ลงใน 1X TAE buffer ผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืด ที่ 4°C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

ลำดับรหัสพันธุกรรมเพื่อคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะในการแยกความแตกต่างระดับ serogroup

บริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila* strain Corby (NC_009494) ขนาด 901 bp จากฐานข้อมูลใน GenBank

primer mip F

3′-GGCAGAATTAGTGGGCGATTTGTTTTTGCTTTATTTTGCTCAATTTATTGTGCAGTA
TGAGAACTTAAGTGTAAGACTAAAAGGGGATTGTTTATGAAGATGAAATTGGTGACT
GCAGCTGTTATGGGGCTTGCAATGTCAACAGCAATGGCTGCAACCGATGCCACATCA
TTAGCTACAGACAAGGATAAGTTGTCTTATAGCATTGGTGCCGATTTGGGGAAGAAT
TTTAAAAATCAAGGCATAGATGTTAATCCGGAAGCAATGGCTAAAGGCATGCAAGAC
GCTATGAGTGGCGCTCAATTGGCTTTAACCGAACAGCAAATGAAAGACGTTCTTAAC
AAGTTTCAGAAAGATTTGATGGCTAAGCGTACTGCTGAATTCAATAAGAAAGCGGAT
GAAAATAAAGTAAAAGGGGAAGCCTTTTTAACTGAAAACAAAAACAAGCCAGGCGT
TGTTGTATTGCCAAGTGGTTTGCAATACAAAGTAATCAATTCTGGAAATGGTGTTAA
ACCCGGAAAATCGGATACAGTCACTGTCGAATATACTGGTCGTCTGATTGATGGTAC
CGTTTTTGACAGTACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGCAACGTTCCAGGTTTCACAAGT
TATCCCTGGATGGACAGAAGCTTTGCAATTGATGCCAGCTGGATCAACTTGGGAAAT
TTATGTTCCCTCAGGTCTTGCATATGGCCCACGTAGCGTTGGCGGACCTATTGGCCCA
AATGAAACTTTAATATTTAAAATTCACTTAATTTCAGTGAAAAAATCATCTTAAGTTT
TTTTGAATTAAAGTCATACAAAACGCATCCTTCTCATTTAGAGAGGGATGCTCTCTTT
GTAAAGGCTAATGATCTTCATAAAAGGTGTCAGCCTAACACCAC-5′

primer mip R

ความยาวของลำดับรหัสพันธุกรรมที่ส่งวิเคราะห์ มีความยาว 817 bp ซึ่งเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank บริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila* strain Corby (NC_009494) ซึ่งมีขนาด 901 bp โดยการทำ alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W พบว่า ลำดับรหัสพันธุกรรมในด้าน 3′ ของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

L. pneumophila serogroup 1, 2, 3, 6, 8, 10 และ 11 หายไป 63 bp คือ GGCAGAATT AGTGGGCGATTTGTTT TTGCTTTATTTTGCTCAATTTATTGTGCAGTATGAGAA และด้าน 5′ ลำดับรหัสพันธุกรรมของ *L. pneumophila* serogroup 1, 2, 3, 6, 8, 10 และ 11 หายไป 21 bp คือ AAGGTGTCAGCCTAACACC AC ดังนั้นเมื่อทำการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RII และ *Pvu*II ต้องทำการบวกความยาวของรหัสพันธุกรรมเพิ่มทางด้าน 3′ และ 5′ ด้วย

แสดงตำแหน่งของลำดับรหัสพันธุกรรมที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RII

L. pneumophila serogroup 1 ความยาว 817 bp

3′-CTTAAGTGTAAGACTAAAAGGGGATTGTTTATGAAGATGAAATTGGTGACTGCAG
CTGTTATGGGGCTTGCAATGTCAACAGCAATGGCTGCAACCGATGCCACATCATTAG
CTACAGACAAGGATAAGTTGTCTTATAGCATTGGTGCCGATTTGGGGAAGAATTTTA
AAAATCAAGGCATAGATGTTAATCCGGAAGCAATGGCTAAAGGCATGCAAGACGCT
ATGAGTGGCGCTCAATTGGCTTTAACCGAACAGCAAATGAAAGACGTTCTTAACAAG
TTTCAGAAAGATTTGATGGCTAAGCGTACTGCTGAATTCAATAAGAAAGCGGATGAA
AATAAAGTAAAAGGGGAAGCCTTTTTAACTGAAAACAAAAACAAGCCAGGCGTTGT
TGTATTGCCAAGTGGTTTGCAATACAAAGTAATCAATTCTGGAAATGGTGTTAAACC
CGGAAAATCGGATACAGTCACTGTCGAATATACTGGTCGTCTGATTGATGGTACCGT
TTTTGACAGTACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGCAACGTTCCAGGTTTCACAAGTTAT
CCCTGGATGGACAGAAGCTTTGCAATTGATGCCAGCTGGATCAACTTGGGAAATTTA
TGTTCCCTCAGGTCTTGCATATGGCCCACGTAGCGTTGGCGGACCTATTGGCCCAAAT
GAAACTTTAATATTTAAAATTCACTTAATTTCAGTGAAAAAATCATCTTAAGTTTTTT
TGAATTAAAGTCATACAAAACGCATCCTTCTCATTTAGAGAGGGATGCTCTCTTTGTA
AAGGCTAATGATCTTCATAA-5′

ได้ความยาวชิ้น DNA ที่ถูกตัด 4 ชิ้น ได้แก่ 19, 164, 271, 447 bp

L. pneumophila serogroup 2 ความยาว 817 bp

3′-CTTAAGTGTAAGACTAAAAGGGGATTGTTTATGAAGATGAAATTGGTGACTGCAG
CTGTTATGGGGCTTGCAATGTCAACAGCAATGGCTGCAACCGATGCCACATCATTAG
CTACAGACAAGGATAAGTTGTCTTATAGCATTGGTGCCGATTTGGGGAAGAATTTTA
AAAATCAAGGCATAGATGTTAATCCGGAAGCAATGGCTAAAGGCATGCAAGACGCT

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ATGAGTGGCGCTCAATTGGCTTTAACCGAACAGCAAATGAAAGACGTTCTTAACAAG
TTTCAGAAAGATTTGATGGCAAAGCGTACTGCTGAATTCAATAAGAAAGCGGATGAA
AATAAAGTAAAAGGGGAAGCCTTTTTAACTGAAAACAAAAACAAGCCAGGCGTTGT
TGTATTGCCAAGTGGTTTGCAGTACAAAGTAATCAATGCTGGAAATGGTGTTAAACC
CGGTAAATCCGATACAGTGACTGTGGAATACACTGGTCGTCTGATTGATGGTACCGT
TTTTGACAGTACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGCAACTTTTCAGGTTTCACAAGTTAT
CCCAGGATGGACAGAAGCTTTGCAATTGATGCCAGCTGGATCAACTTGGGAAATTTA
TGTTCCCTCAGGTCTTGCATATGGCCCACGTAGCGTTGGCGGACCTATTGGCCCAAAT
GAAACTTTAATATTTAAAATTCACTTAATTTCAGTGAAAAAATCATCTTAAGTTTTTT
TGAATTAAAGTCATACAAAACGCATCCTTCTCATATAGAGAGGGATGCACTCTTTGT
AAAGGCTAATGATCTTCATAA-5′

ได้ความยาวชิ้น DNA ที่ถูกตัด 3 ชิ้น ได้แก่ 183, 271, 447 bp

L. pneumophila serogroup 3 ความยาว 817 bp

3′-CTTAAGTGTAAGACTAAAAGGGGATTGTTTATGAAGATGAAATTGGTGACTGCAG
CTGTTATGGGGCTTGCAATGTCAACAGCAATGGCTGCAACCGATGCCACATCATTAG
CTACAGACAAGGATAAGTTGTCTTATAGCATTGGTGCCGATTTGGGGAAGAATTTTA
AAAATCAAGGCATAGATGTTAATCCGGAAGCAATGGCTAAAGGCATGCAAGACGCT
ATGAGTGGCGCTCAATTGGCTTTAACCGAGCAACAAATGAAAGACGTTCTTAACAAG
TTTCAGAAAGATTTGATGGCAAAGCGTACTGCTGAATTCAATAAGAAAGCGGATGAA
AATAAAGTGAAAGGGGAAGCCTTTTTAACTGAAAACAAAAACAAGCCAGGCGTTGT
TGTATTGCCAAGTGGTTTGCAATACAAAGTAATCAATGCTGGAAATGGTGTTAAACC
CGGTAAATCGGATACAGTCACTGTCGAGTACACTGGTCGTCTGATTGATGGTACCGT
TTTTGACAGTACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGCAACTTTTCAGGTTTCACAAGTTAT
CCCAGGATGGACTGAAGCTTTGCAATTGATGCCAGCTGGATCAACTTGGGAAATTTA
TGTTCCCTCAGGTCTTGCATATGGCCCACGTAGCGTTGGCGGACCTATTGGCCCAAAT
GAAACTTTAATATTTAAAATTCACTTAATTTCAGTGAAAAAATCATCTTAAGTTTTTT
TGAATTAAAGCCATACAAAACGCATCCTTCTCATTTACAGAGGGATGCTCTCTTTGTA
AAGGCTAATGATCTTCATAA-5′

ได้ความยาวชิ้น DNA ที่ถูกตัด 3 ชิ้น ได้แก่ 183, 271, 447 bp

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

L. pneumophila serogroup 6 ความยาว 817 bp

3′-CTTAAGTGTAAGACTAAAAGGGGATTGTTTATGAAGATGAAATTGGTGACTGCGG
CTGTTATGGGGCTTGCAATGTCAACAGCAATGGCTGCAACCGATGCCACATCATTAG
CTACAGACAAGGATAAGTTGTCTTATAGCATTGGTGCCGATTTGGGGAAGAATTTTA
AAAATCAAGGCATAGATGTTAATCCGGAAGCAATGGCTAAAGGCATGCAAGACGCT
ATGAGTGGCGCTCAATTGGCTTTAACCGAACAGCAAATGAAAGACGTTCTTAACAAG
TTTCAGAAAGATTTGATGGCAAAGCGTACTGCTGAATTCAATAAGAAAGCGGATGAA
AATAAAGTAAAAGGGGAAGCCTTTTTAACTGAAAACAAAAACAAGCCAGGCGTTGT
TGTATTGCCAAGTGGTTTGCAATACAAAGTAATCAATGCTGGAAATGGTGTTAAA
CCTGGTAAATCGGATACAGTCACTGTCGAATACACTGGTCGTCTGATTGATGGTACC
GTTTTTGACAGTACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGCAACTTTTCAGGTTTCACAAGTT
ATCCCAGGATGGACAGAAGCTTTGCAATTGATGCCAGCTGGATCAACTTGGGAAATT
TATGTTCCCTCAGGTCTTGCATATGGCCCACGTAGCGTTGGCGGACCTATTGGCCCAA
ATGAAACTTTAATATTTAAAATTCACTTAATTTCAGTGAAAAAATCATCTTAAGTTTT
TTTGAATTAAAGTCATACAAAACGCATCCCTCTCATTTAGAGAGGGATGCTCTCTTTG
TAAAGGCTAATGATCTTCATAA-5′

ได้ความยาวชิ้น DNA ที่ถูกตัด 4 ชิ้น ได้แก่ 66, 117, 271, 447 bp

L. pneumophila serogroup 8 ความยาว 817 bp

3′-CTTAAGTGTAAGACTAATAGGGGATTGTTTATGAAGATGAAATTGGTGACTGCAG
CTGTTATGGGGCTTGCAATGTCAACAGCAATGGCTGCAACCGATGCAACATCATTAG
CTACAGACAAGGATAAGTTGTCTTATAGCATTGGTGCCGATTTGGGGAAGAATTTTA
AAAATCAAGGCATAGATGTTAATCCGGAAGCAATGGCTAAAGGCATGCAAGACGCT
ATGAGTGGCGCTCAATTGGCTTTAACCGAACAGCAAATGAAAGACGTTCTTAACAAG
TTTCAGAAAGATTTGATGGCAAAGCGTACTGCTGAATTCAATAAGAAAGCGGATGAA
AATAAAGTAAAAGGGGAAGCCTTTTTAACTGAAAACAAAAACAAGCCAGGCGTTGT
TGTATTGCCAAGTGGTTTGCAATACAAAGTAATCAATTCTGGAAATGGTGTTAAACC
CGGAAAATCGGATACAGTCACTGTCGAATATACTGGTCGTCTGATTGATGGTACCGT
TTTTGACAGTACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGCAACGTTCCAGGTTTCACAAGTTAT
CCCTGGATGGACAGAAGCTTTGCAATTGATGCCCGCTGGATCAACTTGGGAAATTTA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

TGTTCCCTCAGGTCTTGCATATGGCCCACGTAGCGTTGGCGGACCTATTGGCCCAAAT
GAAACTTTAATATTTAAAATTCACTTAATTTCAGTGAAAAAATCATCTTAAGTTTTTT
TGAATTAAAGTCATACAAAACGCATCCTTCTCATTTAGAGAGGGATGCTCTCTTTGTA
AAGGCTAATGATCTTCATAA-5′
ได้ความยาวชิ้น DNA ที่ถูกตัด 4 ชิ้น ได้แก่ 19, 164, 271, 447 bp

L. pneumophila serogroup 10 ความยาว 817 bp

3′-TTTATCAGTAAGACTAATAGGGGATTGTTTAGGAAGATGAAATTGGTGACTGCAG
CTGTTATGGGGCTTGCAATGTCAACAGCAATGGCTGCAACCGATGCAACATCATTAG
CTACAGACAAGGATAAGTTGTCTTATAGCATTGGTGCCGATTTGGGGAAGAATTTTA
AAAATCAAGGCATAGATGTTAACCCGGAAGCAATGGCTAAAGGCATGCAAGACGCT
ATGAGTGGCGCTCAATTGGCTTTAACCGAACAGCAAATGAAAGACGTTCTTAACAAG
TTTCAGAAAGATTTGATGGCAAAGCGTACTGCTGAATTCAATAAGAAAGCGGATGAA
AATAAAGTAAAAGGGGAAGCCTTTTTAACTGAAAACAAAAACAAGCCAGGCGTTGT
TGTATTGCCAAGTGGTTTGCAATACAAAGTAATCAACGCTGGAAATGGTGTTAAACC
CGGTAAATCGGATACAGTCACTGTCGAATACACTGGTCGTCTGATTGATGGTACCGTT
TTTGACAGTACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGCAACTTTTCAGGTTTCACAAGTTATC
CCAGGATGGACAGAAGCTTTGCAATTGATGCCAGCTGGATCAACTTGGGAAATTTAT
GTTCCCTCCGGTCTTGCATATGGCCCACGTAGCGTTGGCGGACCTATTGGCCCAAATG
AAACTTTAATATTTAAAATTCACTTAATTTCAGTGAAAAAATCATCTTAAGATTTTGT
GAATTAAAGTCATACAAAATGCATCCTTCTCATTGAGAGAAGGATGCTCTTTATATA
ATGAATATTAAGCTTCATAA-5′
ได้ความยาวชิ้น DNA ที่ถูกตัด 3 ชิ้น ได้แก่ 183, 271, 447 bp

L. pneumophila serogroup 11 ความยาว 817 bp

3′-CTTAAGTGTAAGACTAAAAGGGGATTGTTTATGAAGATGAAATTGGTGACTGCAG
CTGTTATGGGGCTTGCAATGTCAACAGCAATGGCTGCAACCGATGCCACATCATTAG
CTACAGACAAGGATAAGTTGTCTTATAGCATTGGTGCCGATTTGGGGAAGAATTTTA
AAAATCAAGGCATAGATGTTAATCCGGAAGCAATGGCTAAAGGCATGCAAGACGCT
ATGAGTGGCGCTCAATTGGCTTTAACCGAACAGCAAATGAAAGACGTTCTTAACAAG

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

TTTCAGAAAGATTTGATGGCAAAGCGTACTGCTGAATTCAATAAGAAAGCGGATGAA
AATAAAGTAAAAGGCGAAGCCTTTTTAACTGAAAACAAAAACAAGCCAGGCGTTGTT
GTATTGCCAAGTGGTTTGCAATACAAAGTAATCAATGCTGGAAATGGTGTTAAACCC
GGTAAATCGGATACAGTCACTGTCGAGTACACTGGTCGTCTGATTGATGGTACCGTTT
TTGACAGTACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGCAACTTTTCAGGTTTCACAAGTTATC
CCAGGATGGACTGAAGCTTTGCAATTGATGCCAGCTGGATCAACCTGGGAAATTTAT
GTTCCCTCAGGTCTTGCATATGGCCCACGTAGCGTTGGCGGACCTATTGGCCCAAATG
AAACTTTAATATTTAAAATTCACTTAATTTCAGTGAAAAAATCATCTTAAGTTTTTTT
GAATTAAAGCCATACAAAACGCATCCTTCTCATTTAGAGAGGGATGCTCTCTTTGTAA
AGGCTAATGATCTTCATAA-5′

ได้ความยาวชิ้น DNA ที่ถูกตัด 4 ชิ้น ได้แก่ 43, 183, 228, 447 bp

แสดงตำแหน่งของลำดับรหัสพันธุกรรมที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pvu*II

L. pneumophila serogroup 1 ความยาว 817 bp

3′-CTTAAGTGTAAGACTAAAAGGGGATTGTTTATGAAGATGAAATTGGTGACTGCAG
CTGTTATGGGGCTTGCAATGTCAACAGCAATGGCTGCAACCGATGCCACATCATTAG
CTACAGACAAGGATAAGTTGTCTTATAGCATTGGTGCCGATTTGGGGAAGAATTTTA
AAAATCAAGGCATAGATGTTAATCCGGAAGCAATGGCTAAAGGCATGCAAGACGCT
ATGAGTGGCGCTCAATTGGCTTTAACCGAACAGCAAATGAAAGACGTTCTTAACAAG
TTTCAGAAAGATTTGATGGCTAAGCGTACTGCTGAATTCAATAAGAAAGCGGATGAA
AATAAAGTAAAAGGGGAAGCCTTTTTAACTGAAAACAAAAACAAGCCAGGCGTTGT
TGTATTGCCAAGTGGTTTGCAATACAAAGTAATCAATTCTGGAAATGGTGTTAAACC
CGGAAAATCGGATACAGTCACTGTCGAATATACTGGTCGTCTGATTGATGGTACCGT
TTTTGACAGTACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGCAACGTTCCAGGTTTCACAAGTTAT
CCCTGGATGGACAGAAGCTTTGCAATTGATGCCAGCTGGATCAACTTGGGAAATTTA
TGTTCCCTCAGGTCTTGCATATGGCCCACGTAGCGTTGGCGGACCTATTGGCCCAAAT
GAAACTTTAATATTTAAAATTCACTTAATTTCAGTGAAAAAATCATCTTAAGTTTTTT
TGAATTAAAGTCATACAAAACGCATCCTTCTCATTTAGAGAGGGATGCTCTCTTTGTA
AAGGCTAATGATCTTCATAA-5′

ได้ความยาวชิ้น DNA ที่ถูกตัด 3 ชิ้น ได้แก่ 118, 237, 546 bp

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

L. pneumophila serogroup 8 ความยาว 817 bp

3′-CTTAAGTGTAAGACTAATAGGGGATTGTTTATGAAGATGAAATTGGTGACTGCAG
CTGTTATGGGGCTTGCAATGTCAACAGCAATGGCTGCAACCGATGCAACATCATTAG
CTACAGACAAGGATAAGTTGTCTTATAGCATTGGTGCCGATTTGGGGAAGAATTTTA
AAAATCAAGGCATAGATGTTAATCCGGAAGCAATGGCTAAAGGCATGCAAGACGCT
ATGAGTGGCGCTCAATTGGCTTTAACCGAACAGCAAATGAAAGACGTTCTTAACAAG
TTTCAGAAAGATTTGATGGCAAAGCGTACTGCTGAATTCAATAAGAAAGCGGATGAA
AATAAAGTAAAAGGGGAAGCCTTTTTAACTGAAAACAAAAACAAGCCAGGCGTTGT
TGTATTGCCAAGTGGTTTGCAATACAAAGTAATCAATTCTGGAAATGGTGTTAAACC
CGGAAAATCGGATACAGTCACTGTCGAATATACTGGTCGTCTGATTGATGGTACCGT
TTTTGACAGTACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGCAACGTTCCAGGTTTCACAAGTTAT
CCCTGGATGGACAGAAGCTTTGCAATTGATGCCCGCTGGATCAACTTGGGAAATTTA
TGTTCCCTCAGGTCTTGCATATGGCCCACGTAGCGTTGGCGGACCTATTGGCCCAAAT
GAAACTTTAATATTTAAAATTCACTTAATTTCAGTGAAAAAATCATCTTAAGTTTTTT
TGAATTAAAGTCATACAAAACGCATCCTTCTCATTTAGAGAGGGATGCTCTCTTTGTA
AAGGCTAATGATCTTCATAA-5′

ได้ความยาวชิ้น DNA ที่ถูกตัด 2 ชิ้น ได้แก่ 118, 783 bp

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง

Selective media ของเชื้อ *Legionella* sp.

1. อาหารสูตร 1

ประกอบด้วย

ACES buffer (2-[(2-Amino-2-oxoethyl)-amino]-ethane sulfonic acid)	10.0	g
Agar	15.0	g
Bile salt	1.5	g
Charcoal, activated	2.0	g
$Fe_4(P_2O_7)_3 \cdot 9H_2O$	0.25	g
α-Ketoglutarate	1.0	g
L-cysteine•HCl•H_2O	0.4	g
Yeast extract	10.0	g
น้ำกลั่น	1	l

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น L-cysteine•HCl•H_2O และ $Fe_4(P_2O_7)_3 \cdot 9H_2O$ เข้าด้วยกัน ปรับ pH ให้ได้ 6.9 ด้วย 1N KOH ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออุณหภูมิของอาหารลดลงที่ระดับ 50-55°C จึงเติม L-cysteine•HCl•H_2O, $Fe_4(P_2O_7)_3 \cdot 9H_2O$, vancomycin และ glycine ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นกรองให้ปราศจากเชื้อ ก่อนเทลงบนจานเพาะเชื้อที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว

หมายเหตุ

1. L-cysteine•HCl•H_2O และ $Fe_4(P_2O_7)_3 \cdot 9H_2O$ มีจำหน่ายสำเร็จรูป (Fluka 92394) โดยมีส่วนประกอบใน 1 vial ดังนี้

1.1	L-Cystein hydrochloride	200	mg
1.2	Ferric pyrophosphate	125	mg

เติมน้ำกลั่นที่ไร้เชื้อ 5 ml/vial เพื่อละลายสารก่อนนำไปผสมลงไปในอาหารในอัตราส่วน 1 ml ของสารผสม ต่ออาหาร 100 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ผสมส่วนประกอบทั้ง 4 ชนิด ด้วยอัตราส่วนดังนี้

2.1	L-Cystein	10%
2.2	Ferric pyrophosphate	0.25 g/l
2.3	Vancomycin	1 µg/ml
2.4	Glycine	0.3%

2. อาหารสูตร 2

ประกอบด้วย

ACES buffer (2-[(2-Amino-2-oxoethyl)-amino]-ethane sulfonic acid)	10.0 g
Agar	15.0 g
Charcoal, activated	2.0 g
$Fe_4(P_2O_7)_3 \cdot 9H_2O$	0.25 g
α-Ketoglutarate	1.0 g
L-cysteine•HCl•H_2O	0.4 g
Yeast extract	10.0 g
น้ำกลั่น	1 l

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น L-cysteine•HCl•H_2O และ $Fe_4(P_2O_7)_3 \cdot 9H_2O$ เข้าด้วยกัน ปรับ pH ให้ได้ 6.9 ด้วย 1N KOH ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออุณหภูมิของอาหารลดลงที่ระดับ 50-55°C จึงเติม L-cysteine•HCl•H_2O, $Fe_4(P_2O_7)_3 \cdot 9H_2O$, vancomycin, polymycin B และ glycine ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นกรองให้ปราศจากเชื้อ ก่อนเทลงบนจานเพาะเชื้อที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว

หมายเหตุ

1. ผสมส่วนประกอบทั้ง 5 ชนิด ด้วยอัตราส่วนดังนี้

2.1	L-Cystein	10%
2.2	Ferric pyrophosphate	0.25 g/l
2.3	Vancomycin	5 mg/l
2.4	Polymycin B	50 U
2.5	Glycine	0.3%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. อาหารสูตร 3

ประกอบด้วย

Agar	17	g
Acid Hydrolysate of Casein1	7.5	g
Beef Extract	2	g
$Fe_4(P_2O_7)_3 \cdot 9H_2O$	0.25	g
Starch	1.5	g
L-cysteine•HCl•H_2O	0.4	g

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น L-cysteine•HCl•H_2O และ $Fe_4(P_2O_7)_3 \cdot 9H_2O$ เข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรเป็น 1 1 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออุณหภูมิของอาหารลดลงที่ระดับ 50-55°C จึงเติม L-cysteine•HCl•H_2O และ $Fe_4(P_2O_7)_3 \cdot 9H_2O$ ที่ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นกรองให้ปราศจากเชื้อ ก่อนเทลงบนจานเพาะเชื้อที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว

4. อาหารสูตร 4

ประกอบด้วย

Agar	15.0	g
ACES buffer	10.0	g
(2-[(2-Amino-2-oxoethyl)-amino]-ethane sulfonic acid)		
Charcoal, activated	2.0	g
$Fe_4(P_2O_7)_3 \cdot 9H_2O$	0.25	g
α-Ketoglutarate	1.0	g
L-cysteine•HCl•H_2O	0.4	g
Methylene blue	0.065	g
Yeast extract	10.0	g
น้ำกลั่น	1	l

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น L-cysteine•HCl•H_2O และ $Fe_4(P_2O_7)_3 \cdot 9H_2O$ เข้าด้วยกัน ปรับ pH ให้ได้ 6.9 ด้วย 1N KOH ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออุณหภูมิของอาหารลดลงที่ระดับ 50-55°C จึงเติม L-cysteine•HCl•H_2O และ $Fe_4(P_2O_7)_3 \cdot 9H_2O$ ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นกรองให้ปราศจากเชื้อ ก่อนเทลงบนจานเพาะเชื้อที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หมายเหตุ

1. L-cysteine•HCl•H_2O และ $Fe_4(P_2O_7)_3$•$9H_2O$ มีจำหน่ายสำเร็จรูป (Fluka 92394) โดยมีส่วนประกอบใน 1 vial ดังนี้

1.1	L-Cystein hydrochloride	200 mg
1.2	Ferric pyrophosphate	125 mg

เติมน้ำกลั่นที่ไร้เชื้อ 5 ml/vial เพื่อละลายสารก่อนนำไปผสมลงไปในอาหารในอัตราส่วน 1 ml ของสารผสม ต่ออาหาร 100 ml

2. ผสมส่วนประกอบทั้ง 2 ชนิด ด้วยอัตราส่วนดังนี้

2.1	L-Cystein	10%
2.2	Ferric pyrophosphate	0.25 g/l

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก จ

ปริมาณเซลล์ที่น้อยที่สุดจากการนับเซลล์ด้วย Haemacytometer ที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค PCR โดยไม่ผ่านการกรองผงถ่านออกจากปฏิกิริยา

ตาราง 11 ปริมาณเซลล์ในการนับแต่ละความเข้มข้นตั้งแต่ 1×10^{-1}-1×10^{-10} โดยวิธี hemacytometer

ความเข้มข้น	**จำนวนเซลล์จากการนับ 5 ช่อง ($\bar{X}$±SD)**	**ปริมาณเซลล์ (เซลล์/ml)**
1×10^{-1}	นับไม่ถ้วน	นับไม่ถ้วน
1×10^{-2}	31.33 ± 2.89	31.33×10^{4}
1×10^{-3}	8.87 ± 3.41	8.87×10^{4}
1×10^{-4}	0.47 ± 0.47	4.70×10^{3}
1×10^{-5}	0.27 ± 0.12	2.70×10^{3}
1×10^{-6}	0.13 ± 0.23	1.30×10^{3}
1×10^{-7}	0.13 ± 0.12	1.30×10^{3}
1×10^{-8}	0	0
1×10^{-9}	0	0
1×10^{-10}	0	0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณเซลล์ที่น้อยที่สุดจากการนับเซลล์ด้วย Haemacytometer ที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค PCR โดยผ่านการกรองผงถ่านออกจากปฏิกิริยา

ตาราง 12 ปริมาณเซลล์ในการนับแต่ละความเข้มข้นตั้งแต่ 1×10^{-1}-1×10^{-10} โดยวิธี hemacytometer

ความเข้มข้น	**จำนวนเซลล์จากการนับ 5 ช่อง ($\bar{X}$±SD)**	**ปริมาณเซลล์ (เซลล์/ml)**
1×10^{-1}	นับไม่ถ้วน	นับไม่ถ้วน
1×10^{-2}	55.13 ± 4.37	55.13×10^{4}
1×10^{-3}	18.00 ± 3.39	18.00×10^{4}
1×10^{-4}	6.00 ± 1.13	6.00×10^{4}
1×10^{-5}	0.90 ± 0.14	9.00×10^{3}
1×10^{-6}	0.40 ± 0.28	4.00×10^{3}
1×10^{-7}	0.20 ± 0.14	2.00×10^{3}
1×10^{-8}	0	0
1×10^{-9}	0	0
1×10^{-10}	0	0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ฉ

ตาราง 13 การเจริญของแบคทีเรียทดสอบบนอาหารสูตรที่สร้างขึ้น

แบคทีเรีย	ความเจือจาง 1×10^{-5}		ความเจือจาง 1×10^{-7}			
	อาหารสูตร 1 $\bar{X}$ ± SD (โคโลนี)	BCYE มาตรฐาน $\bar{X}$ ± SD (โคโลนี)	อาหารสูตร 2 $\bar{X}$ ± SD (โคโลนี)	อาหารสูตร 3 $\bar{X}$ ± SD (โคโลนี)	อาหารสูตร 4 $\bar{X}$ ± SD (โคโลนี)	BCYE มาตรฐาน $\bar{X}$ ± SD (โคโลนี)
L. pneumophila serogroup 1	0.00 ± 0.00	>300.00 ± 0.00	164.00 ± 11.31	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	208.00 ± 11.31
L. pneumophila serogroup 2	0.00 ± 0.00	>300.00 ± 0.00	118.00 ± 14.14	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	118.00 ± 9.90
L. pneumophila serogroup 3	0.00 ± 0.00	>300.00 ± 0.00	162.00 ± 1.41	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	171.00 ± 12.73
L. pneumophila serogroup 6	0.00 ± 0.00	>300.00 ± 0.00	5.00 ± 5.66	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	11.00 ± 1.41
L. pneumophila serogroup 8	0.00 ± 0.00	>300.00 ± 0.00	211.50 ± 9.19	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	214.00 ± 11.31
L. pneumophila serogroup 10	0.00 ± 0.00	>300.00 ± 0.00	214.50 ± 7.78	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	242.50 ± 16.26

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 13 (ต่อ) การเจริญของแบคทีเรียทดสอบบนอาหารสูตรที่สร้างขึ้น

เชื้อแบคทีเรีย	ความเจือจาง 1×10^{-5}		ความเจือจาง 1×10^{-7}			
	อาหารสูตร 1 $\bar{x}$ ± SD (โคโลนี)	BCYE มาตรฐาน $\bar{x}$ ± SD (โคโลนี)	อาหารสูตร 2 $\bar{x}$ ± SD (โคโลนี)	อาหารสูตร 3 $\bar{x}$ ± SD (โคโลนี)	อาหารสูตร 4 $\bar{x}$ ± SD (โคโลนี)	BCYE มาตรฐาน $\bar{x}$ ± SD (โคโลนี)
L. pneumophila serogroup 11	0.00 ± 0.00	>300.00 ± 0.00	195.50 ± 12.02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	203.50 ± 9.19
Ps. aeruginosa	-	-	0.00 ± 0.00	-	-	125.00 ± 4.24
S. aureus	-	-	0.00 ± 0.00	-	-	30.50 ± 7.78
E. coli	-	-	0.00 ± 0.00	-	-	7.50 ± 4.95
V. cholerae	-	-	0.00 ± 0.00	-	-	103.50 ± 7.78
K. pneumoniae	-	-	0.00 ± 0.00	-	-	31.00 ± 2.83
P. mirabilis	-	-	0.00 ± 0.00	-	-	11.50 ± 0.71
Sal. typhi	-	-	0.00 ± 0.00	-	-	64.00 ± 2.83
Shi. dysenteriae	-	-	0.00 ± 0.00	-	-	8.00 ± 2.83
P. vulgaris	-	-	0.00 ± 0.00	-	-	4.00 ± 0.00
Bacillus sp. (ขรุขระ)	-	-	0.00 ± 0.00	-	-	100.00 ± 11.31
Bacillius sp. (ขาวลาม)	-	-	0.00 ± 0.00	-	-	123.50 ± 6.36

หมายเหตุ - = ไม่ได้ทดสอบการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ, $\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ย, SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวนงลักษณ์ ใจโต

วัน เดือน ปีเกิด 27 กันยายน 2529

ประวัติการศึกษา ประถมศึกษา โรงเรียนอนุบาลเชียงใหม่

มัธยมศึกษาโรงเรียนกาวิละวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่

ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved