สารมัธยันตร์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่แยกได้จากใบมะขาม *Tamarindus india* Linn.

นางสาวปิยะวรรณ เพชราภา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-2523-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INTERMEDIATES FROM PYRENE DEGRADATION BY A BACTERIAL CONSORTIUM STK ISOLATED FROM *Tamarindus india* Linn. LEAVES.

Miss. Piyawan Bejrapha

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

ISBN 974-14-2523-6

Copyright of Chulalongkorn University

490029

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สารมัธยันตร์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่แยกได้จากใบมะขาม *Tamarindus india* Linn.
โดย	นางสาวปิยะวรรณ เพชราภา
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

ปิยะวรรณ เพชราภา : สารมัธยันตร์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่แยกได้จากใบมะขาม (INTERMEDIATES FROM PYRENE DEGRADATION BY A BACTERIAL CONSORTIUM STK ISOLATED FROM *Tamarindus india* Linn. LEAVES.) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. กาญจณา จันทองจีน, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ จำนวน 114 หน้า. ISBN 974-14-2523-6

กลุ่มแบคทีเรีย STK ซึ่งประกอบด้วยสกุล *Zoogloea* sp., *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิกสูงสามารถย่อยสลายและใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ การพิสูจน์เอกลักษณ์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนเมื่อใช้ความเข้มข้นของไพรีน 100 ส่วนในล้านส่วน โดยได้ทดลองศึกษาทั้งในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 100 มล. ระดับขวดเขย่า ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 1 ลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร และในดิน slurry ที่มีดิน 2 กรัมในน้ำ 16 มล. พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถเจริญและย่อยสลายไพรีนได้มีประสิทธิภาพดีทั้ง 3 สภาวะ โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CFMM ระดับขวดเขย่า แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถย่อยสลายไพรีนมีผลให้ความเข้มข้นลดลงจนถึงระดับที่ตรวจไม่พบด้วย HPLC ภายหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 8 วัน การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 1 ลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ให้ผลคล้ายคลึงกับในขวดทดลองแต่พบว่าการย่อยสลายไพรีนเร็วกว่าคือไม่สามารถตรวจพบไพรีนด้วย HPLC ได้หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ส่วนการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดิน slurry อัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:8 (กรัมต่อมล.) พบว่าการย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วโดยปริมาณไพรีนลดลงเหลือ 13.79 มก.ต่อลิตร ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเพียง 2 วัน สารมัธยันตร์ที่สะสมในระหว่างที่มีการย่อยสลายไพรีนทั้ง 3 สภาวะ เป็นสารรูปแบบเดียวกันโดยการวิเคราะห์ด้วย HPLC และพบว่าจะมีการสะสมสารมัธยันตร์มากที่สุดในวันที่ 8, 7 และ 10 สำหรับการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลอง, ถังหมัก และในดิน slurry ตามลำดับ เมื่อทำการแยกสารมัธยันตร์ให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย preparative TLC และ HPLC ที่ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของเมธานอลในน้ำที่ความเข้มข้น 40 ถึง 80% ที่มีค่า pH 2-3 พบว่าหนึ่งในสารมัธยันตร์ที่ได้เป็นกรดซาลิไซลิก ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีพิษ นอกจากนี้โดยการทดสอบ Ames ยืนยันว่าสารมัธยันตร์ที่ผลิตโดยกลุ่มแบคทีเรียนี้ไม่เป็นสารก่อกลายพันธุ์

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต ปิยะวรรณ เพชราภา

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4672336423 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORD: consortiums/ biodegradation/ pyrene/ salicylic acid/ slurry/ Ames' test

PIYAWAN BEJRAPHA : INTERMEDIATES FROM PYRENE DEGRADATION BY A BACTERIAL CONSORTIUM STK ISOLATED FROM *Tamarindus india* Linn LEAVES. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. KANCHANA JUNTONGJIN, Ph.D., THESIS COADVISOR: ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D., 114 pp. ISBN 974-14-2523-6.

A bacterial consortium STK consisting of *Zoogloea* sp., *Stenotrophomonas* sp. and *Mesorhizobium* sp., possesses high hydrophobic property and capability of degrading and utilizing pyrene as a carbon and energy source. Identifications of metabolic products during pyrene degradation were elucidated using three different cultivation conditions in the presence of 100 ppm pyrene. These conditions were in a shaken flask with 100 ml CFMM, in 2 L-fermenter with the same medium and in soil slurry consisting of 2 g soil and 16 ml sterile water. The STK could grow and efficiently degrade pyrene in all conditions. For the cultivation in shaken flask, pyrene was degraded to an undetectable level by HPLC after 8 days of incubation. Likewise the cultivation in fermenter, the pyrene was completely degraded in 7 days. Moreover in soil slurry, high pyrene degradative ability was observed as only 13.79 mg pyrene L^{-1} was remained in the medium only after 2 days of incubation. All three cultivation conditions showed similar profiles of accumulated intermediates as analyzed by HPLC. Most of the intermediates were accumulated at high level on day 8, 7 and 10 of cultivation in shaken flask, 2 L fermenter and soil slurry, respectively. These intermediates were partially purified by preparative TLC and linear gradient HPLC, one of them was identified as salicylic acid. Furthermore, mutagenicity study of the metabolic products using Ames' test suggested that they had no mutagenicity.

Department Microbiology Student's Signature Piyawan Bejrapha

Field of Study Industrial Microbiology Advisor's Signature Kanchana Juntongjin

Academic Year 2006 Co-advisor's Signature Pairoh Pinphanichakarn

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ กาญจณา จันทองจีน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพาณิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้ให้วิชาการความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และช่วยกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม เป็นอย่างสูง ที่ให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วรินทร ชวศิริ ขอบคุณ เป็นอย่างสูง ที่ให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย และขอขอบคุณ คุณวันชัย ปลื้มภาณุภัทร์ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านวิเคราะห์สารด้วย NMR

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช ขอบคุณเป็นอย่างสูงที่ให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยที่ให้ความช่วยเหลือในด้านวิเคราะห์สารด้วย GC-MS

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาฯ กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยในการดำเนินการวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณ คุณเกศ พูลเจริญ ที่ให้ความอนุเคราะห์เอนไซม์ในเรื่องการทดสอบเอมส์

ขอขอบคุณ คุณปิ่นปัญญา เรียงรุ่งโรจน์ คุณโสรจยา แววศักดิ์ คุณวิมลิม ศิริพัฒนานนท์ คุณไปรมา แก้วสามศรี คุณกิติภัทร ลิ้มประเสริฐ คุณศิริภัทร พงษ์ไพบูลย์ ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือตลอดจนกำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ซ

สารบัญรูป.....ฌ

สัญลักษณ์และคำย่อ.....ฐ

บทที่

1. บทนำ.....1
2. วารสารปริทัศน์.....4
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....28
4. ผลการทดลอง.....45
5. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....71

รายการอ้างอิง.....80

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.....91

ภาคผนวก ข.....97

ภาคผนวก ค.....99

ภาคผนวก ง.....100

ภาคผนวก จ.....106

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....114

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน..... 10

2.2 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนแบบโคเมแทบอลิซึม..... 19

4.1 ค่า R_f จากการวิเคราะห์ TLC และลักษณะการเรืองแสงของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานชนิดต่างๆ..... 58

4.2 ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของดิน..... 63

4.3 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของ *Salmonella typhimurium* TA 98 และ TA 100 ที่เกิดจากสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ..... 70

ตารางที่ ง.1 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่เกิดเองตามธรรมชาติของแต่ละสายพันธุ์..... 105

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างโมเลกุลของไพรีน (Schirmer และคณะ ,1998).....	4
2.2 วิถีการย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรีย (Pinyakong,1999).....	14
2.3 วิถีการย่อยสลายไพรีนโดย *Aspergillus niger* SK 9317 และ *Penicillium glabrum* TW 9424 (1), และ *Mycobacterium* sp. AP1, PYR-1 และ *Pleurotus ostreatus* (2) (Keith, 2006)	17
2.4 วิถีการย่อยสลายไพรีนโดย *Cyclothyrium* sp.(Da Silva และคณะ ,2004).....	21
3.1 ไดอะแกรมแสดงวิธีการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ.....	44
4.1 ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวCFMM เมื่อมีการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK (PYR test) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (PYR Ctrl).....	45
4.2 ลักษณะการเจริญและการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร.....	46
4.3 โครมาโทแกรม TLC ของสารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เวลาต่างๆ ในอาหารเหลว CFMM.....	48
4.4 โครมาโทแกรม HPLC จากการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK หลังจากเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ (R_t 14.12 นาทีคือไพรีน).....	49
4.4 (ต่อ) โครมาโทแกรม HPLC จากการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK หลังจากเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ (R_t 14.12 นาทีคือไพรีน.....	50
4.5 ลักษณะการเจริญและการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย STKในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMMที่ มีไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร.....	51
4.6 TLCโครมาโทแกรมของสารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เวลาต่างๆ ในอาหารเหลว CFMM ที่เกิดขึ้นในถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	52
4.7 HPLC โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในถังหมักขนาด 2 ลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ (R_t 14.12 นาทีคือไพรีน).....	53

รูปที่ หน้า

4.7 (ต่อ) HPLC โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในถังหมักขนาด 2 ลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ (R_t 14.12 นาทีคือไพรีน)..... 54

4.8 TLC โครมาโทแกรมแสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK..... 56

4.9 TLC โครมาโทแกรมของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK (6) เปรียบเทียบกับ ไพรีน (1), กรดซาลิไซลิก (2), กรดพธาลิก (3), กรดโปรโตคาทิคูอิก (4) กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (5)..... 57

4.10 TLC โครมาโทแกรมของกรดซาลิไซลิก (1) เปรียบเทียบกับสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK (ข)..... 59

4.11 HPLC โครมาโทแกรมของกรดซาลิไซลิก (1), เปรียบเทียบกับสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK (2) (แยกให้บริสุทธิ์แบบ linear gradient HPLC โดยใช้สารละลายเมธานอล 40-80% ในน้ำที่มี pH 2.0-3.0..... 60

4.12 HPLC โครมาโทแกรมผสมระหว่างกรดซาลิไซลิกกับสารมัธยันตร์ ก จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK, R_t 7.532 คือซาลิไซลิกผสมกับสารมัธยันตร์ b (แยกให้บริสุทธิ์แบบ linear gradient HPLC โดยใช้สารละลายเมธานอล 40-80% ในน้ำที่มี pH 2.0-3.0)..... 61

4.13 แมสสเปกตรัมของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ..... 62

4.14 ลักษณะการเจริญและการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดินระบบ slurry อัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:8 (กรัมต่อมล.) ที่มีไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร..... 65

4.15 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดินระบบ slurry อัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:8 (กรัมต่อมล.) ที่มีไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร..... 67

4.16 HPLC โครมาโทแกรม จากการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดิน slurry อัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:8 (กรัมต่อมล.) หลังจากเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ (R_t 14.12 นาทีคือไพรีน, Rt 3.1 คือสารมัธยันตร์)..... 68

5.1 (1) วิถีการย่อยสลายไพรีนโดย *Mycobacterium* spp. AP1, KR2 6PY1, PYR-1 และ RJGII-135 (Keith, 2006) (2) วิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดย *Pseudomonas* sp. s47p1 และ s7k5 (Ouyang, 2006) และ (3) วิถีการย่อยสลายแนพทาลีน โดย *Pseudomonas* sp. (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982)..... 74

รูปที่ หน้า

5.2 วิถีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิกโดยจุลินทรีย์ต่างๆ 1) *Pseudomonas* sp. (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982) 2) *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001)..... 76

ค.1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไพรีนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC..... 99

ง.1 การตรวจสอบคุณสมบัติการเป็น *his*$^-$ ของ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA 100 ที่เจริญบน MGA,ลักษณะโคโลนีกลายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGA ที่มีส่วนผสมของฮีสทีดีนและไบโอติน (ก และ ง),ลักษณะโคโลนีกลายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGA ที่มีแต่ไบโอติน (ข และ จ), ลักษณะโคโลนีกลายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGA ธรรมดา (ค และ ฉ)..... 101

ง.2 การตรวจสอบคุณสมบัติการมีพลาสมิด pKM101, *rfa*$^+$, *uvrB*$^-$ ของเชื้อ *Salmonella typhumurium* TA 98 และ TA 100, ลักษณะโคโลนีกลายพันธุ์ที่ต้องการตรวจสอบการมีพลาสมิด pKM101 และการเป็น *rfa*$^+$ บนอาหารแข็ง MGA ที่มี ampicillin disc รวมทั้งฮีสทีดีนและไบโอติน โดยอาศัยเทคนิคการ pour plate (ก และ ค), ลักษณะโคโลนีกลายพันธุ์ที่ต้องการตรวจสอบการมี *uvrB*$^-$ บนอาหารแข็งฮีสทีดีนและไบโอตินโดยการขีดเชื้อเป็นเส้นตรงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGA (ข และ ง)..... 102

จ. 1 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่ไม่เติมสารมัธยันตร์..... 106

จ. 2 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัธยันตร์ความเข้มข้น 2.5 mg/plate..... 106

จ. 3 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัธยันตร์ความเข้มข้น 5.0 mg/plate..... 106

จ. 4 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัธยันตร์ความเข้มข้น 10.0 mg/plate..... 107

จ. 5 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัธยันตร์ความเข้มข้น 20.0 mg/plate..... 107

จ. 6 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติม2-(2-furyl-3-(5-nitro-2-furyl) acylamide ความเข้มข้น 0.1 mg/plate..... 107

จ. 7 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่ไม่เติมสารมัธยันตร์..... 108

จ. 8 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัธยันตร์ความเข้มข้น 2.5 mg/plate..... 108

จ. 9 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัธยันตร์ความเข้มข้น 5.0 mg/plate..... 108

จ. 10 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัธยันตร์ความเข้มข้น 10.0 mg/plate..... 109

จ. 11 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัธยันตร์ความเข้มข้น 20.0 mg/plate..... 109

จ. 12 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมเบนโซ(เอ)ไพรีน ความเข้มข้น 0.1 mg/plate..... 109

จ. 13 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่ไม่เติมสารมัธยันตร์..... 110

จ. 14 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัธยันตร์ความเข้มข้น 2.5 mg/plate..... 110

รูปที่ หน้า

จ. 15 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัธยันตร์ความเข้มข้น 5.0 mg/plate..... 110
จ. 16 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัธยันตร์ความเข้มข้น 10.0 mg/plate..... 111
จ. 17 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัธยันตร์ความเข้มข้น 20.0 mg/plate..... 111
จ. 18 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติม 2-(2-furyl-3-(5-nitro-2-furyl) acylamide ความเข้มข้น 0.1 mg/plate..... 111
จ. 19 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่ไม่เติมสารมัธยันตร์..... 112
จ. 20 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัธยันตร์ความเข้มข้น 2.5 mg/plate..... 112
จ. 21 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัธยันตร์ความเข้มข้น 5.0 mg/plate..... 112
จ. 22 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัธยันตร์ความเข้มข้น 10.0 mg/plate..... 113
จ. 23 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัธยันตร์ความเข้มข้น 20.0 mg/plate..... 113
จ. 24 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมเบนโซ(เอ)ไพรีน ความเข้มข้น 0.1 mg/plate..... 113

สัญลักษณ์ และคำย่อ

°ซ = องศาเซลเซียส

% = เปอร์เซ็นต์

มก. = มิลลิกรัม

มล. = มิลลิลิตร

มม. = มิลลิเมตร

ซม. = เซนติเมตร

ซม. = ชั่วโมง