บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆที่ใช้ในการศึกษาเป็นอุปกรณ์จากหน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (Media) แสดงวิธีการเตรียมไว้ในภาคผนวก ก.

2.1 อาหารที่ใช้สำหรับหาปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด ใช้ Plate Count Agar (PCA)

2.2 อาหารสำหรับเปรียบเทียบหาปริมาณของแบคทีเรียพวกโคลิฟอร์ม และ ฟีคอลโคลิฟอร์ม ใช้อาหารต่อไปนี้คือ

2.2.1 Lactose Broth (LB)

2.2.2 Brilliant Green Lactose 2% bile Broth (BGLB)

2.2.3 Formate Lactose Glutamate (Glutamate acid Media) (FLG)

2.2.4 Lauryl Sulfate Lactose Broth (Lauryl Lactose Broth) (LSB)

2.2.5 MacConkey Broth (Mac B.)

2.2.6 E C medium

2.2.7 Violet-Red Bile Agar (VRB)

2.2.8 MacConkey Agar (Mac A.)

2.3 อาหารที่ใช้ทดสอบหาแบคทีเรียพวก Salmonella spp.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.1 Lactose Broth (LB)

2.3.2 Tretathionate Brilliant Green Broth (TTBB)

2.3.3 Brilliant Green Agar (BGA.)

2.3.4 Triple Sugar Iron Agar (TSI)

2.4 อาหารที่ใช้แยกแบคทีเรียพวกมารีนวิบริโอ (Marine Vibrios) จากตัวอย่างหอยคือ Thiosulfate-citrate-bile Salt Sucrose Agar (TCBS)

2.5 อาหารที่ใช้ทดสอบเชื้อมารีนวิบริโอ

อาหารที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ มารีนวิบริโอ ทุกชนิดจะเติมโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ให้มีความเข้มข้นเป็น 3% ยกเว้นอาหารบางชนิดที่ต้องการ ซึ่งจะกล่าวเป็นราย ๆ ไป

2.5.1 Thiosulfate-citrate-bile Salt Sucrose Agar (TCBS)

2.5.2 Nutrient Agar (NA)

2.5.3 Triple Sugar Iron Agar (TSI)

2.5.4 Glucose Phosphate Medium (MR-VP Broth)

2.5.5 Gelatin Agar

2.5.6 Starch Agar

2.5.7 Tween 80 medium

2.5.8 Nitrate Broth

2.5.9 Broth Sugar ที่เติม 1% ของ L-arabinose, M-inosital, Mannose, Lactose, Sucrose, Glyceral และ Glucose

2.5.10 Medium for carbon source เติม 1% ของ citrate, histidine D-Xylose, cellobiose, gluconate, ethanol, sucrose และ urea

2.5.11 Decarboxylation medium เติม 0.5% ของ L-arginine, L-lysine และ L-ornithrine

2.5.12 Nutrient Agar ที่เติม O/129 ให้มีความเข้มข้นเป็น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.6 อาหารที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อก่อนทำการทดสอบใช้ Tryptose Phosphate Broth w/o Drextose + 5% Glyceral

3. น้ำยาเคมีที่ใช้ในการทดสอบ Vibrio spp. เตรียมตามสูตรในภาคผนวก ข.

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างหอยที่นำมาทำการตรวจสอบจะได้มาจากแหล่งเพาะเลี้ยงและจากตลาดที่ออกสู่ผู้บริโภค

1.1 ตัวอย่างจากแหล่งเพาะเลี้ยง

1.1.1 หอยนางรมขนาดใหญ่หรือหอยตะโกรม (Crassostrea lugubris) เก็บจากแหล่งเพาะเลี้ยงจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ในเดือนมีนาคมและเดือนกันยายน พ.ศ. 2530

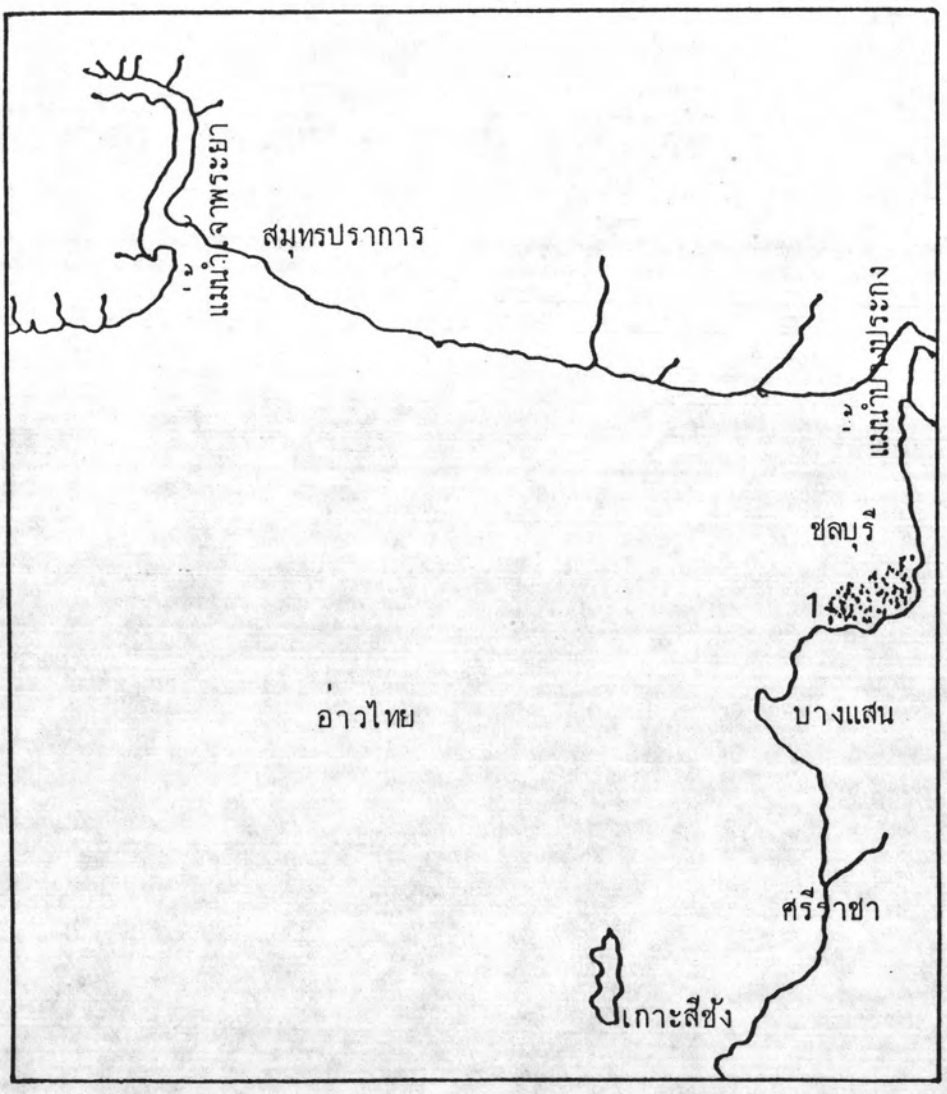
1.1.2 หอยนางรมขนาดเล็กหรือหอยนางรมปากจีบ (C. commercialis) เก็บตัวอย่างจากจังหวัดจันทบุรี ชลบุรี และประจวบคีรีขันธ์ในเดือนสิงหาคมและเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2530

1.1.3 หอยแครง เก็บจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี และสตูล โดยจากจังหวัดสุราษฎร์ธานีเก็บในเดือนมีนาคมและเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2530 จากจังหวัดสตูลเก็บในเดือนสิงหาคม และพฤศจิกายน พ.ศ. 2530

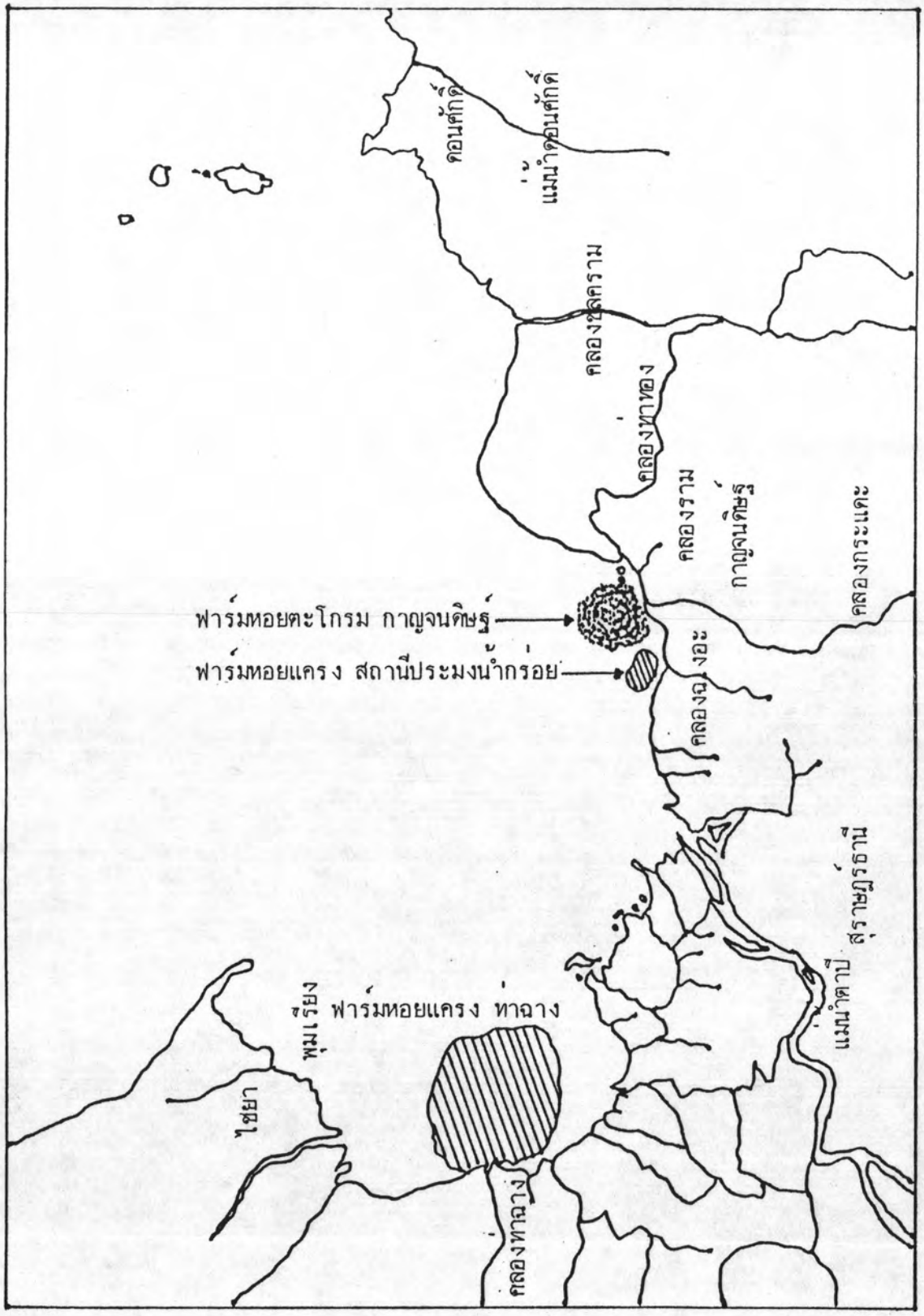
1.2 ตัวอย่างจากตลาด

1.2.1 หอยตะโกรมซื้อจากร้านอาหารในกรุงเทพ ฯ ในช่วงเดือนกรกฎาคม, สิงหาคม, กันยายน, ตุลาคม, พฤศจิกายน และ

รูปที่ 1 แผนที่แสดงแหล่งเพาะเลี้ยงหอยที่นำตัวอย่างมาทำการตรวจสอบ



รูปที่ 2 แหล่งเพาะเลี้ยงหอยนางรมปากจีบ จังหวัดชลบุรี.....(1)



รูปที่ 3 แสดงแหล่งเพาะเลี้ยงหอยตะโกรมและหอยแครงในจังหวัดสุราษฎร์ธานี

ธันวาคม พ.ศ.2530

1.2.2 หอยนางรมปากจีบซื้อจากตลาดสด ร้านอาหาร และบางส่วนจากตลาดอ่างศิลา ในเดือนกรกฎาคม, สิงหาคม, กันยายน, ตุลาคม, พฤศจิกายน และธันวาคม พ.ศ.2530

1.2.3 หอยแครงซื้อจากตลาดสดในกรุงเทพ ฯ ในเดือนกรกฎาคม, สิงหาคม, กันยายน, ตุลาคม, พฤศจิกายนและธันวาคม พ.ศ.2530

2. การเก็บรักษาตัวอย่าง

2.1 ตัวอย่างจากแหล่งเพาะเลี้ยงจะเก็บมาทั้งเปลือกใส่ในถุงพลาสติกขนาดใหญ่ นำกลับมาวิเคราะห์ภายใน 48 ชั่วโมง โดยล้างทำความสะอาดและแกะในห้องปฏิบัติการ

2.2 ตัวอย่างจากตลาด หอยตะโกรมและหอยนางรมปากจีบจะซื้อในรูปแกะแล้ว โดยใส่ในถุงพลาสติกที่สะอาดและแช่มาในน้ำแข็ง นำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ในกรณีที่ทำการวิเคราะห์ทันทีไม่ได้จะเก็บไว้ในตู้แช่แข็งและรีบทำการวิเคราะห์ในวันรุ่งขึ้น

สำหรับหอยแครงซื้อมาทั้งเปลือก และนำมาล้างทำความสะอาด และแกะที่ห้องปฏิบัติการ

3. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

3.1.1 ตัวอย่างหอยจากแหล่งเพาะเลี้ยง หอยทุกชนิดจากแหล่งเพาะเลี้ยงจะเก็บมาทั้งเปลือก เมื่อจะทำการวิเคราะห์จะล้างทั้งเปลือกให้สะอาดด้วยน้ำประปา ขัดด้วยแปรง เสร็จแล้วล้างอีกครั้งด้วย 70% แอลกอฮอล์ แล้วจึงนำมาแกะโดยเครื่องมือที่ใช้แกะซึ่งจะต้องเช็ดทำความสะอาดด้วย 70% แอลกอฮอล์ เมื่อแกะแล้วนำมาใส่ในจานแก้วที่มีฝาปิดและฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นแบ่งตัวอย่างออกเป็นสองส่วน ส่วนละ 25 กรัม โดยส่วนหนึ่งจะใส่ลงในขวดที่บรรจุ LB 225 มิลลิลิตร เพื่อตรวจหาแบคทีเรียพวก Salmonella spp. อีกส่วนหนึ่งนำไปใส่ในถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อสำหรับเข้าเครื่อง Stomacher และเติม PSD 225 มล. นำไปเข้าเครื่อง Stomacher เปิดเครื่อง 15 วินาที

จะได้สารแขวนลอยของตัวอย่างที่ต้องการทำการวิเคราะห์มีความเข้มข้น 1:10 (10^{-1})

3.1.2 ตัวอย่างจากตลาด หอยนางรมทั้งสองชนิดจะซื้อมาแบบแกะเปลือกแล้ว ส่วนหอยแครงจะซื้อมาทั้งเปลือก และมาปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1

3.2 การทำตัวอย่างให้มีความเจือจางตามความต้องการเพื่อความเหมาะสมในการตรวจสอบหาปริมาณของแบคทีเรียแต่ละชนิดจึงจำเป็นจะต้องนำสารแขวนลอยของตัวอย่างที่เราเตรียมไว้มาเจือจางลงจาก 10^{-1} อย่างเป็นลำดับขั้นเป็น 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} โดยดูดตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10^{-1} มา 5 มล. ใส่ลงในขวดที่บรรจุ PSD อยู่ 45 มล. จะได้ตัวอย่างมีความเจือจางเป็น 10^{-2} และทำดังนี้ไปเรื่อยตามลำดับจนกว่าจะได้ความเจือจางตามต้องการ

3.3 การตรวจสอบหาแบคทีเรียชนิดต่างๆ

3.3.1 การหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดบน Plate Count Agar (PCA)

ทำตัวอย่างให้มีความเจือจางเป็น 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} แล้วใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดตัวอย่าง 1 มล. ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ระดับความเจือจางระดับละ 1 จาน แล้วเท PCA ที่ต้มให้ละลายแล้วและอุ่นที่ 45-50°ซ จานละ 15 มล. หมุนจานให้ตัวอย่างกระจายทั่ว ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว คว่ำจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37°ซ นาน 48 ชั่วโมง นำมาตรวจนับปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดที่ขึ้นในจานเพาะเชื้อโดยนับจากจานที่มีเชื้อแบคทีเรียขึ้นไม่ต่ำกว่า 30 โคโลนี และไม่เกิน 300 โคโลนี แล้วนำมาคำนวณเป็นปริมาณของแบคทีเรียต่อ 1 กรัมของตัวอย่างหอย

3.3.2 การตรวจสอบหาแบคทีเรียพวก Salmonella spp.

3.3.2.1 ชั่งตัวอย่างหอย 25 กรัมใส่ลงในขวดที่บรรจุ LB 225 มล. นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง

3.3.2.2 จากนั้นใช้ ปิเปต ที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดจาก 3.3.2.1 มา 1 มล. ใส่ลงในหลอดเพาะเชื้อที่บรรจุ TTBB. อยู่ 10 มล. แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 42°ซ นาน 24 ชั่วโมง

3.3.2.3 เมื่อบ่มเพาะเชื้อ 24 ชั่วโมงแล้วนำลวดเขี่ยเชื้อแตะจาก 3.3.2.2 มา 1 loopแล้วเกลี่ย (streak) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มี BGA ซึ่งอบผิวหน้าแข็งแล้ว นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง นำมาตรวจดูโคโลนีของแบคทีเรียที่เกิดขึ้น BGA โคโลนีที่สงสัยจะเป็นสีชมพูใส

3.3.2.4 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะโคโลนีที่สงสัยแทงลงในหลอดที่บรรจุ slant ของ TSI แล้วป้ายตามแนวราบบนผิว slant นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง นำมาตรวจดูผลโดย Salmonella spp. จะให้สีเหลืองที่ก้น (butt) และสีแดงที่ slant (บางครั้งอาจให้ H_2S คือทำให้ก้นเป็นสีดำได้)

3.3.2.5 นำหลอดที่ให้ผลบวกมาทำ aglutination โดยใช้ Salmolnella poly valent serum ลงบน slide ถ้าเกิดการจับตัวกันเป็นตะกอน แสดงว่าผลการตรวจ Salmonella spp. ของตัวอย่างนั้นเป็นบวก

3.3.3 การตรวจหาแบคทีเรียพวกโคไลฟอร์มและฟีคอลโคไลฟอร์ม ได้ทำการเปรียบเทียบหาปริมาณของ โคไลฟอร์มทั้งหมด และ ฟีคอลโคไลฟอร์ม โดยใช้อาหาร (media) ที่แตกต่างกัน 8 วิธี ดังนี้คือ

วิธีที่ 1 หาปริมาณของโคไลฟอร์มทั้งหมด โดยวิเคราะห์ขั้นต้น ด้วยอาหาร Lactose Broth (LB) และยืนยันด้วยอาหาร Brilliant Green Lactose 2% bile Broth (BGLB) พร้อมทั้งหาปริมาณของฟีคอลโคไลฟอร์ม โดยใช้ E.C. medium (APHA, 1970) วิธีการคือ ทำตัวอย่างทุกชนิดให้มีความเจือจางเป็น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} (ยกเว้นหอยนางรมปากจีบที่เป็นตัวอย่างจากตลาดทำให้มีความเจือจางถึง 10^{-7})

ใช้ปิเปต ที่อบฆ่าเชื้อแล้วดูดตัวอย่างใส่ในหลอดเพาะเชื้อที่บรรจุ LB พร้อมมี durham tube คว่ำอยู่ หลอดละ 1 มล. ความเจือจางละ 3 หลอด แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 48 ชั่วโมง นำมาตรวจผลโดยหลอดที่ให้ผลบวกจะเกิดแก๊สใน durham tube บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกในแต่ละความเจือจางไว้แล้วนำไปทดสอบขั้นยืนยันโดยใช้ loop แตะมาใส่ในหลอดที่บรรจุอาหาร BGLB หลอดละ 1 loop พร้อมทั้งหาปริมาณ ฟีคอลโคไลฟอร์ม โดยใช้ loop แตะหลอดที่ให้ผลบวกมาใส่ในหลอดที่บรรจุ EC medium นำหลอด BGLB ไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 48 ชั่วโมง ส่วนหลอด EC medium นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5°ซ นาน 48 ชั่วโมง นำมาบันทึกผลโดยหลอดที่ให้แก๊สใน durham tube จะให้ผลเป็นบวก บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกในแต่ละความเจือจางแล้วนำไปเปิดตารางหาค่าของ MPN ของโคไลฟอร์มทั้งหมดและฟีคอลโคไลฟอร์ม

วิธีที่ 2 หาปริมาณของโคไลฟอร์มทั้งหมด โดยทดสอบขั้นต้นด้วยอาหาร Lauryl Sulphate Tryptos Broth (LSB) และยืนยันด้วยอาหาร BGLB พร้อมทั้งหาปริมาณ ฟีคอลโคไลฟอร์ม โดยใช้ EC medium (APHA, 1970) และการทดสอบปฏิบัติเช่นเดียวกับ วิธีที่ 1

วิธีที่ 3 หาปริมาณของโคไลฟอร์มทั้งหมด โดยทดสอบขั้นต้นด้วยอาหาร Formate Lactose Glutamate หรือ Glutamic Acid Media (FLG) ยืนยันด้วยอาหาร BGLB และ EC medium (Public Health Laboratory Service Standing Committee on the Bacteriogical Examination of Water Supplies, 1968) และปฏิบัติเช่นเดียวกับวิธีที่ 1

วิธีที่ 4 หาปริมาณโคไลฟอร์มทั้งหมด โดยใช้อาหาร BGBL เพียงอย่างเดียว(ประยุกต์จากวิธีที่ 1, 2 และ 3) วิธีการคือ เตรียมตัวอย่างให้ความเจือจางเช่นเดียวกับ วิธีที่ 1 แล้วใช้ ปิเปต ที่อบฆ่าเชื้อแล้วดูด 1 มล. ใส่ลงในหลอดที่บรรจุ BGLB และมี durham tube อยู่ความเจือจางละ 3 หลอด นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 48 ชั่วโมง บันทึกจำนวนหลอดในแต่ละความเจือจางที่ให้ผลบวกคือแก๊สเกิดใน durham tube นำค่าที่ได้ไปเปิดตารางหาค่า MPN จะได้ค่า MPN ของโคไลฟอร์มทั้งหมด

วิธีที่ 5 หาปริมาณของโคไลฟอร์มทั้งหมด โดยใช้

อาหาร MacConkey Broth (ประยุกต์จาก Elliott, 1978) และปฏิบัติเช่นเดียวกับ วิธีที่ 4

วิธีที่ 6 (ประยุกต์จากวิธีที่ 1, 2 และ 3) หาปริมาณของโคไลฟอร์มทั้งหมด โดยใช้อาหาร EC medium โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับ วิธีที่ 5 แต่นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5°ซ นาน 48 ชั่วโมง

วิธีที่ 7 (ประยุกต์จาก Elliott, 1978) หาปริมาณของโคไลฟอร์ม โดยวิธี plate count โดยใช้อาหาร Violet-Red bile Agar โดยทำตัวอย่างให้มีความเจือจางเป็น 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} ยกเว้นหอยนางรมปากจีบจากตลาดที่นำความเจือจางถึง 10^{-6} ใช้ ปิเปต ที่อบเชื้อแล้วดูดมา 1 มล. ใส่ในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้วความเจือจางละ 1 จาน แล้วเท VRB ที่ต้มละลายแล้วอุ่นให้มีอุณหภูมิ 45-50°ซ ลงไปจานละ 15 มล. หมุนจานให้ตัวอย่างกระจายทั่วแล้วทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัวแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง นำมาตรวจผลโดยนับโคโลนีที่เป็นสีชมพู 300 โคโลนี จะได้ปริมาณของโคไลฟอร์มทั้งหมดต่อน้ำหนัก เป็นกรัมของตัวอย่างหอย

วิธีที่ 8 (ประยุกต์จาก Elliott, 1978) หาปริมาณของโคไลฟอร์มทั้งหมดโดยวิธี plate count โดยใช้อาหาร MacConkey Agar (Mac A.) แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37°ซ นาน 48 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจผลโดยนับโคโลนีที่มีสีชมพูหรือม่วงอยู่ตรงกลางขนาด 1.5-3 มม.

ในการเปรียบเทียบหาปริมาณของแบคทีเรียพวก โคไลฟอร์ม นี้จะใช้ตัวอย่างของหอยแครง หอยนางรมปากจีบ และหอยตะโกรม อย่างละ 15 ตัวอย่าง นำมาคำนวณหาความแตกต่างของปริมาณโคไลฟอร์มทั้งหมด และ ฟีคอลโคไลฟอร์ม โดยใช้วิธี One-Way Analysis of Variance

3.3.4 การวิเคราะห์แบคทีเรียพวก มารีนวิบริโอ

3.3.4.1 การแยกเชื้อ มารีนวิบริโอ จากตัวอย่างหอย ใช้อาหาร TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar) โดยวิธี spreading method โดยนำตัวอย่างของหอยทุกชนิดที่ต้องการตรวจสอบนำมาทำให้มีความเจือจางเป็น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} แล้วใช้

ปิเปต ขนาด 1 มล. ที่อบฆ่าเชื้อแล้วดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วใส่ในจานเพาะเชื้อที่บรรจุ TCBS ที่อบผิวหน้าแล้วลงไป 0.1 มล. ความเจือจางละ 1 จาน แล้วใช้พาสเจอร์ ปิเปต ที่งอปลายเป็นรูปสามเหลี่ยมปาดให้ทั่ว แล้วคว่ำจานเพาะเชื้อลงนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจผลโดยนับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อในจานที่มีปริมาณของโคโลนีพอสมควร แยกขนาดและสีของโคโลนีที่เกิดขึ้นบน TCBS นับและบันทึกผลไว้นำไปคำนวณเป็นปริมาณมารีนวิบริโอ ต่อกรัมของตัวอย่างหอย สำหรับลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันที่สังเกตได้จะมี 5 แบบคือ

1) โคโลนีสีเขียว ขนาด 2-3 มม.

2) โคโลนีสีเหลืองอ่อนและขึ้นขนาด 2-3 มม.

3) โคโลนีสีเหลือง มีจุดกลางนูนขึ้นมาขนาด 2-3 มม.

4) โคโลนีสีเหลืองใสขนาด 1-2 มม.

5) โคโลนีสีเขียวใสขนาดเล็ก 1-1.5 มม.

3.3.4.2 การทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) เขี่ยเอาโคโลนีจาก ข้อ 3.3.4.1 ที่มีลักษณะของสีและขนาดต่างๆกันอย่างละ 1 โคโลนี เขี่ย ลงบนจานเพาะเชื้อที่มี 3% NaCl Nutrient Agar (3% NA) ที่อบผิวหน้าแห้งแล้ว โคโลนีละ 1 จาน นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกเอาโคโลนีเดี่ยวที่เกิดขึ้นโดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อเขี่ย แล้วเขี่ยลงบนจานเพาะเชื้อที่บรรจุ 3% NA ที่อบผิวหน้าแห้งแล้วอีกครั้งหนึ่ง แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ไปทำการทดสอบเพื่อแยกชนิดของ มารีนวิบริโอ ต่อไป

3.3.4.3 การเก็บรักษาเชื้อสำหรับนำไปทำการทดสอบเพื่อแยกชนิดของแบคทีเรีย

เมื่อได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้ว และยังไม่ต้องการทดสอบทันที เราสามารถจะเก็บรักษาไว้ก่อนได้โดยใช้ suspending media คือ Tryptose Phosphate Broth w/o Drextose + 5% Glyceral และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ โดยนำเอาเชื้อพวกมารีนวิบริโอ ที่ต้องการเก็บรักษามาเขี่ยลงบนจานเพาะเชื้อที่มี 3% NA และอบผิวหน้าแห้งแล้ว ให้ทั่วจาน

แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาขูดโคโลนีในจานเพาะเชื้อใส่ลงในอาหาร suspending media บรรจุใส่ในหลอดแก้วขนาดจิ๋วที่อบฆ่าเชื้อแล้วปิดให้แน่นด้วยสำลี และปิดทับอีกครั้งด้วยแผ่นพาราฟินให้แน่นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ

3.3.4.4 การเตรียม suspension ของเชื้อแบคทีเรียเพื่อทำการทดสอบแยกเชื้อทำโดยนำเชื้อที่ต้องการทดสอบมาเกลี่ยลงบนจานเพาะเชื้อที่บรรจุ 3% NA อยู่ให้ทั่วแล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาขูดโคโลนีของเชื้อใส่ลงในหลอดที่บรรจุ normal saline อยู่ประมาณ 7 มล. เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันจะได้ suspension ของเชื้อที่นำไปใช้ในการทดสอบเพื่อแยกเชื้อต่อไป (ในกรณีที่การทดสอบใช้ป้ายจากอาหารแข็งนำเชื้อที่เกลี่ยลงบน 3% NA ที่บ่มเพาะเชื้อที่ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมงแล้วมาใช้ได้เลย)

ลักษณะและวิธีการทดสอบเพื่อแยกชนิดของ มารีนวิบริโอ (West and Colwell, 1984 และ พัชรี อังกุระ, 2530) (อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาเคมีที่ใช้ในการทดสอบจะกล่าวในภาคผนวก)

1. ลักษณะบนอาหาร TCBS (Morphology on TCBS)

สังเกตสีและขนาดของโคโลนีที่เกิดขึ้นบน TCBS พร้อมทั้งลักษณะที่แยกต่างกันด้วย

1.1 สีของโคโลนีจะแบ่งออกเป็น 2 สีคือ สีเขียวและสีเหลือง
สีเขียวจะเป็นโคโลนีของพวก Sucrose negative vibrios
สีเหลืองจะเป็นโคโลนีของพวก Sucrose positive vibrios

1.2 ขนาดของโคโลนีและลักษณะของโคโลนีแบ่งออกเป็น

1.2.1 สีเขียวขนาด 2-3 มม.

1.2.2 สีเหลืองค่อนข้างขุ่นและเยิ้ม ขนาด 2-3 มม.

1.2.3 สีเหลืองมีจุดกลางนูนขึ้นมา ขนาด 2-3 มม.

1.2.4 สีเหลืองใสขนาดเล็ก 1-2 มม.

1.2.5 สีเขียวใสขนาดเล็ก 1-1.5 มม.

7. Cytochrome oxidase (West and Colwell, 1984 และ Cowan, 1974)

หยดน้ำยา cytochrome oxidase ลงบนกระดาษกรอง แล้วใช้ลวดเขี่ยเชื้อจาก 3% NA ป้ายลงบนกระดาษกรอง สังเกตว่ามีสีม่วงเกิดขึ้นภายใน 10 วินาทีหรือไม่ ถ้ามีอ่านผลเป็นบวก

8. Voges-prokaus reaction (Cowan, 1974)

ใช้พาสเจอร์ปิเปต ที่ฆ่าเชื้อแล้วดูด suspension ของเชื้อที่เตรียมไว้สำหรับการทดสอบหยดลงในหลอดที่บรรจุ 3% NaCl Glucose phosphate medium (MV-PV broth) นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง นำมาตรวจผลโดยการเติม 5% -napthol ลงไป 0.4 มล. เขย่าเล็กน้อยแล้วเติม 40% KOH 0.2 มล. เขย่าหลอดแล้วเอียงนาน 15 นาที ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อผลิต acetyl methyl carbinol อ่านผลเป็นบวก

9. O/129 sensitivity (West and Colwell, 1984)

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อจุ่มลงใน suspension ของเชื้อที่เตรียมไว้สำหรับการทดสอบป้ายลงบนจานเพาะเชื้อที่มี 3% NA ที่ผสม vibrio static agent ซึ่งมีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่งโมง นำมาตรวจผลถ้าไม่มีเชื้อนี้ขึ้นแสดงว่า เชื้อมีความไวต่อ vibrio static agent อ่านค่าเป็นบวก

10. Growth at % NaCl (West and Colwell, 1984)

ใช้พาสเจอร์ปิเปต ที่ฆ่าเชื้อแล้วดูด suspension ของเชื้อที่เตรียมไว้สำหรับการทดสอบ แล้วหยดลงใน Tryptose broth ที่มี NaCl 0%, 3%, 8% และ 10% นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37°ซ นาน 24-28 ชั่วโมง นำมาตรวจผลโดยถ้าขุ่นอ่านผลเป็นบวก

11. Growth at 42°ซ

ใช้ พาสเจอร์ ปิเปต ที่ฆ่าเชื้อแล้วดูด สารแขวนลอย ของเชื้อที่เตรียมไว้สำหรับการทดสอบ แล้วหยดลงในหลอดที่บรรจุ tryptose broth ที่มี 3% NaCl แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 42°ซ นาน 24-28 ชั่วโมง ถ้าขุ่นอ่าน

I17A80A10

ผลเป็นบวก

12. Decarboxylation of amino acid

ใช้ พาสเจอร์ ปิเปต ดูด suspension ของเชื้อที่เตรียมไว้สำหรับการทดสอบแล้วหยดลงในหลอดที่บรรจุ 3% NaCl decarboxylation test medium 4 หลอด (หลอดละ 3-4 หยด) โดยหนึ่งหลอดจะบรรจุเฉพาะ base medium เป็นหลอดควบคุม อีก 3 หลอดจะมี กรดอะมีโน (amino acid) 3 ชนิดคือ L-arginine, L-lysine และ L-ornithrine อยู่หลอดละ 0.5% หลังจากหยดเชื้อแล้วเทปิดทับด้วยพาราฟินเหลวที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 48 ชั่วโมง อ่านผลโดยหลอดควบคุมจะต้องเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและเปรียบเทียบกับหลอดที่มีกรดอะมีโน ถ้าไม่เป็นสีเหลืองอ่านผลเป็นบวก

13. Gas form glucose fermentation (Cowan, 1974)

ใช้พาสเจอร์ปิเปต ดูด suspension ของเชื้อที่เตรียมไว้สำหรับการทดสอบ แล้วหยดลงใน 3% NaCl Broth Sugar ที่มี กลูโคส 1% พร้อม durham tube นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 48 ชั่วโมง ถ้าสีของอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และเกิดแก๊สใน durham tube อ่านผลเป็นบวก

14. Fermentation to acid (Cowan, 1974)

ใช้พาสเจอร์ปิเปต ดูด suspension ของเชื้อที่เตรียมไว้สำหรับการทดสอบหยดลงใน 3% NaCl Broth Sugar ที่มี carbohydrate อยู่ 1% นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 48 ชั่วโมง อ่านผลโดยสีของอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่านผลเป็นบวก

15. Enzyme Production (West and Cowell, 1984)

15.1 Gelatinase (Gelatin hydrolysis)

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อจาก 3% NA แล้วป้ายลงในจานเพาะเชื้อที่มี 3% NaCl Gelatin Agar นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง นำมาตรวจผลโดยการหยดน้ำยา acid mercuric chloride ลงบนผิวหน้าถ้า เจลาติน (gelatin) ถูกย่อยสลายไปรอบๆบริเวณที่ป้ายเชื้อจะใสส่วนบริเวณที่ไม่ถูกย่อยจะขุ่น

15.2 Lypase (Hydrolysis of Tween 80)

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อจาก 3% NA ป้ายลงในจานเพาะเชื้อที่มี 3% NaCl Tween 80 medium นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 3 วัน โดยสังเกตผลทุก ๆ วัน อ่านผลโดยถ้า Tween 80 ถูกย่อยสลายบริเวณรอบ ๆ ที่ป้ายเชื้อจะขุ่น (opaque) อ่านผลเป็นบวก

15.3 Amylase (Starch hydrolysis)

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อจาก 3% NA ป้ายแบบ spot innoculation ลงบนจานเพาะเชื้อที่มี 3% NaCl Starch Agar แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง นำมาตรวจผลโดยหยดสารละลายไอโอดีนที่เจือจางลงบนผิวหน้าให้ท่วม ถ้าแป้งถูกย่อยสลายบริเวณรอบๆที่ป้ายเชื้อจะใสอ่านผลเป็นบวก

16. Utilization at sole source of carbon (Cowan, 1974)

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อจาก 3% NA ป้ายลงบน slant ของอาหารที่ต้องการทดสอบซึ่งจะเติม carbon source 8 ชนิดคือ cellobiose, ethanol, gluconate, sucrose, citrate, urea, D-Xylose และ histidine และนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 48 ชั่วโมง นำมาตรวจผลโดยถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพูหรือสีแดงอ่านผลเป็นบวก

2. ลักษณะการ swarm บนอาหาร 3% NaCl Nutrient agar (West and Colwell, 1984)

สังเกตดูการ swarm ของโคโลนีที่ขึ้นบน 3% NA ที่อบผิวหน้าแล้ว ถ้า swarm ให้บันทึกผลเป็นบวก

3. การย้อมสีแกรม (gram staining) (Cowan, 1974)

ย้อมสีของเชื้อวิบริโอบนสไลด์โดยวิธี gram staining แล้วตรวจดูลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทัศน์กำลังขยาย 100X โดยเชื้อวิบริโอจะติดสีแดงแกรมลบ และรูปร่างเป็นท่อนสั้น (rod shape) อาจตรงหรือโค้งงอเล็กน้อย

4. Indole test (ทดสอบการสร้าง indole) (Cowan, 1974)

ใช้พาสเจอร์ปิเปต ที่อบฆ่าเชื้อแล้วดูด suspension ของเชื้อที่เตรียมไว้เพื่อการทดสอบลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร indole test medium 3-4 หยด แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง นำมาตรวจผลโดยเติม Kovac's reagent ลงไป 3-5 หยด เขย่าให้ทั่วถ้ามี indole เกิดขึ้นจะสังเกตเห็นว่า Kovac's reagent จะเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือแดงอ่านผลเป็นบวก

5. H_2S production (Cowan, 1974)

ป้ายเชื้อที่ต้องการทดสอบด้วยเข็มเขี่ยจาก 3% NA แล้วแทงลงในหลอดที่มี slant ของ 3% NaCl TSI agar แล้วป้ายตามแนวราบ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดสีดำที่ก้นหลอดถ้ามีอ่านค่าผลเป็นบวก

6. Nitrate reduction test (Cowan, 1974)

ใช้พาสเจอร์ปิเปต ที่ฆ่าเชื้อแล้วดูด suspension ของเชื้อที่เตรียมไว้เพื่อการทดสอบหยดลงในหลอดที่บรรจุ 3% NaCl NO_3-Broth นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง นำมาตรวจผลโดยการเติม Solution A และ B ลงไปอย่างละ 4-5 หยด ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นอ่านผลเป็นบวก ถ้าไม่มีสีแดงเกิดขึ้นให้เติมผงสังกะสี (zinc dust) ลงไป ถ้าไม่มีสีแดงเกิดขึ้นอีกอ่านผลเป็นบวก