

ภาคผนวก

1. สัตว์ทดลอง

โดยการสุ่มซื้อจากตลาดสด 5 ตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร ได้แก่ หอยแครง 50 ตัวอย่าง, หอยลาย 50 ตัวอย่าง และหอยแมลงภู่ 50 ตัวอย่าง

2. ส่วนผสม TCBS agar

TCBS	44.6 g
Distill water	500 ml

ต้มส่วนผสมจนเดือด จากนั้นเทใส่จานเพาะเลี้ยงเชื้อปริมาณ 5ml ปิดฝารอให้แข็งตัว แล้วเก็บเข้าตู้เย็น ก่อนนำมาใช้ควร dye plate ให้แห้ง เป็นเวลา 30 นาที

3. ส่วนผสม alkaline peptone water (APW)

APW	5 g
NaCl	5 g
Distill water	500 ml

ปรับค่า pH ให้ได้ 8.6 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

4. ส่วนผสม 0.5X TBE buffer

Tris	5.4 g
Boric	27.5 g
EDTA	0.373 g
Distill water	1000 ml

5. ส่วนผสม Phosphate buffer solution (PBS) สำหรับทำ PCR

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g

KH_2PO_4	2.4 g
Distill water	1000 ml

ชั่งส่วนผสมทั้งหมด ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.4 นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

6. ส่วนผสม Phosphate buffer solution (PBS) สำหรับการแยกเชื้อ

$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$	0.2622 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{2H}_2\text{O}$	1.424 g
Sodium chloride	8.75 g
Tween 20	0.5 ml
Distill water	1000 ml

ชั่งส่วนผสมทั้งหมด ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.4 นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การทดสอบโดยวิธีมาตรฐาน

1. ส่วนผสม TSI

Bacto peptone	20 g
Sodium chloride	5.0 g
Lactose	10.0 g

Sucrose	10.0 g
Glucose	10.0
Ferrous ammonium sulphate	0.2g
Sodium thiosulphate	0.2 g
Phenol red	0.025 g
Agar	15.0 g

ต้มส่วนผสมเพื่อละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นนำไปใส่หลอดทดลอง หลอดละ 10 ml ปิดด้วยฝาปิด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ นำออกมาเอียงให้อาหารข้นแข็งตัวในลักษณะเป็น agar deep หรือ agar tall ในกรณีที่ต้องการทดสอบการสร้าง H₂S จาก ferrous sulphate อย่างเดียว ถ้าต้องการทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลทั้งสามชนิด ต้องทำเป็นอาหารเอียง ให้ผิวหน้าที่เอียงมีความชันเล็กน้อย

2. การทดสอบ Oxidase

Kovac's oxidase reagent

(1% tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride)

Platinum loop หรือ แท่งแก้ว

กระดาษกรอง

เอียงเชื้อใน Nutrient agar จากนั้นนำเชื้อมาขีดบนกระดาษกรองที่หยด Kovac's oxidase reagent โดยใช้ Platinum loop หรือแท่งแก้ว

3. การทดสอบ Voges-Proskauer(VP)reagent

α-Naphthol solution

Ethanol (95%) 100 ml

α-Naphthol 5g

ละลาย α-Naphthol ด้วย Ethanol

40% KOH

Potassium hydroxide 40 g

Distill water 1000 ml

ละลาย KOH ในน้ำ แล้วเติมน้ำให้ครบ 1000ml

สำหรับผลการทดสอบ Voges-Proskauer (VP), เติม reagent ตัวแรก (alpha-naphthol) ลงไป 0.6ml ต่อสารละลายเชื้อใน VP broth ที่บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาตร 5 ml

เขย่า และใส่ reagent ตัวที่สอง (KOH) 0.2 ml ต่อสารละลายเชื้อใน VP broth ที่บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาตร 5 ml เขย่าเบาๆ วางทิ้งไว้ 15 นาที ผล Voges-Proskauer (VP) บวก จะเกิดเป็นสีแดงที่ผิวของสารละลายเชื้อ ถ้ายังไม่แดงทิ้งไว้ 45 นาทีแล้วจึงอ่านผล ส่วนผลลบจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

4.การทดสอบ Arginine decarboxylase

Arginine broth

Nessler's reagent

เขี่ยเชื้อลงในอาหาร Arginine broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา แล้วหยด Nessler's reagent ลงไป 1-2 หยด ถ้า Arginine broth เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีผลการทดสอบเป็นลบ

5.การทดสอบ Methyl red

Ethanol (95%) 40ml

Methyl red 0.04 ml

Distilled water 100 ml

ละลาย Methyl red ด้วย Ethanol แล้วเติมน้ำให้ครบปริมาตร 1000 ml เก็บในขวดสีน้ำตาล

6. การทดสอบ Indole test

1% peptone broth

Kovac' Reagent

บ่มเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน 1% peptone broth จากนั้นบ่มเชื้อที่ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หยด Kovac' Reagent 5 หยด เขย่าหลอดทดลองเบาๆ 2-3 ครั้ง แล้วสังเกตการณ์เปลี่ยนสีของ Medium

7. การทดสอบ Mannitol salt agar

Mannitol 10.0g

NaCl 75.0 g

Phenol Red 0.025 g

Agar 15 g

Distilled water 1000ml

ภาคผนวก ค

การย้อมแบบแกรม

1. Crystal violet stain

Crystal violet (Gentain violet)	0.5 g
Distill water	100 ml

2. Decolorize

95% Ethanol	250 ml
Acetone	250 ml

3. Gram iodine solution

Iodine	1.0 g
Potassium iodine	2.0 g
Distill water	300 ml

4. Safranin O solution

Safranin	2.5 g
Ethanol	100 ml

เมื่อต้องการนำไปใช้ควรเจือจางลงอีก 5-10 เท่า ด้วยน้ำกลั่น