บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดเลือกหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการคัดแยกหาแบคทีเรียชอบเค็มจากตัวอย่างน้ำปลาที่มีอายุการหมักแตกต่างกัน

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาทดสอบ มี 8 ชนิด (ภาคผนวก ก หมายเลข 1-8) ได้แก่

-Brain heart infusion agar
-Complex medium of Dundas
-Sehgal & Gibbons medium
-Tryptic soy yeast extract agar
-Tryptone yeast extract agar
-Nutrient agar
-Plate count agar (Standard method agar)
-Viande-Levure glucose agar

โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้แต่ละชนิดผสมโซเดียมคลอไรด์ จนกระทั่งความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์ และเติม cysteine hydrochloride ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.04 เปอร์เซ็นต์

1.2 การเก็บตัวอย่างน้ำปลา เก็บตัวอย่างน้ำปลาซึ่งทำจากปลาไส้ตันที่มีอายุการหมัก 10 วันจากถังหมักขนาดเล็กที่ส่งมาจากโรงงานน้ำปลาเพชรทักษิณ จังหวัดชุมพร การเก็บตัวอย่างเป็นแบบสุ่ม 3 ระดับ คือ ระดับผิวบน ระดับกลางและระดับล่างของถังหมัก ระดับละ 3 จุด จุดละประมาณ 10 มิลลิลิตร โดยใช้ลูกยางและปิเปตที่ปราศจากเชื้อดูดตัวอย่างน้ำปลาใส่ขวดรูปกรวย (Erlenmeyer flask) ที่ปราศจากเชื้อ นำมาเขย่าให้ผสมกันก่อนนำไปใช้

1.3 การคัดแยกจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด ทำโดยวิธี dilution plating method (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำโดยใช้ BBL Gas Pak System เป็นเวลา 14 วัน

การนับจำนวนแบคทีเรีย นับเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีแบคทีเรียระหว่าง 30-300 โคโลนี คำนวณค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดและสังเกตความแตกต่างของโคโลนีแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่มองเห็นด้วยตาเปล่า

1.4 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.2 และ 1.3 แต่ใช้ตัวอย่างจากถังหมักขนาดเล็กถังเดิมที่มีอายุการหมักประมาณ 3 เดือน

1.5 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียที่คำนวณได้จากข้อ 1.3 และข้อ 1.4 รวมทั้งความแตกต่างของโคโลนีแบคทีเรียที่สังเกตได้ คัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนและชนิด ของแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดเจริญมากที่สุดเพื่อใช้ในการวิจัยต่อไป

2. การศึกษาคุณสมบัติบางประการและคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่เจริญได้ดีภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำจากตัวอย่างน้ำปลาหมักตามธรรมชาติที่มีอายุการหมักแตกต่างกัน

2.1 การศึกษาข้อมูลเบื้องต้น คุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีบางประการของตัวอย่างน้ำปลาที่มีอายุการหมักแตกต่างกัน

2.1.1 ตัวอย่างน้ำปลาที่นำมาทดสอบได้จากถังหมักตามธรรมชาติที่มีอายุการหมัก 1,2,3,4,6 และ 13 เดือนตามลำดับ ของโรงงานน้ำปลาเพชรทักษิณ จังหวัดชุมพร โดยสุ่มตัวอย่างบริเวณต่าง ๆ ทั่วถังหมักใส่ลงในขวดกลมปากแคบที่มีผ้าปิดสนิท ให้ได้ปริมาตรรวมประมาณ 750 มิลลิลิตร บันทึกข้อมูลเบื้องต้นได้แก่ อายุการหมัก ชนิดของปลา อัตราส่วนปลาและเกลือ สภาพการหมักและลักษณะของตัวอย่าง

2.1.2 นำตัวอย่างน้ำปลาทั้ง 6 ตัวอย่าง (จากข้อ 2.1.1) มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 เพื่อแยกเศษเนื้อปลาและตะกอน นำของเหลวที่ผ่านการกระดาษกรองไปวัดและวิเคราะห์สิ่งต่อไปนี้

ก. วัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) โดยใช้ Digital pH meter,Suntex Model sp-5A

ข. วัดความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็นเปอร์เซ็นต์โดยใช้ Digital Salt meter,SOAR Model 1600

ค. การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen) ตามหลักการของ Kjeldahl (34) ตามภาคผนวก ค หมายเลข 2

ง. การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน (amino acid nitrogen) (34) ซึ่งปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนนี้คือ ผลต่างคิดเป็นกรัมระหว่างฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน (formaldehyde nitrogen) ซึ่งหาตามวิธีในภาคผนวก ค

หมายเลข 3 กับแอมโมเนียคัลไนโตรเจน (ammoniacal nitrogen) ซึ่งหาตามวิธีในภาคผนวก ค หมายเลข 4 ในน้ำปลา 1 ลิตร

2.2 การศึกษาจำนวนและคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่เจริญได้ดีภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำจากตัวอย่างน้ำปลาที่มีอายุการหมักแตกต่างกัน

2.2.1 การศึกษาจำนวนและคัดแยกแบคทีเรีย ใช้วิธี dilution plating method และวิธีการบ่มเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 1.3 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 1.5 ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำในแต่ละ dilution และแต่ละเปอร์เซ็นต์เกลือของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อครบ 14 วัน นำจานแก้วเพาะเชื้อที่มีโคโลนีแบคทีเรียระหว่าง 30–300 โคโลนี มานับจำนวนและคำนวณหาแบคทีเรียเริ่มต้นใน 1 มิลลิลิตรของแต่ละตัวอย่างน้ำปลา นำจานแก้วเพาะเชื้อที่นับจำนวนโคโลนีได้ระหว่าง 30–300 โคโลนีของชุดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำปลาทั้ง 6 ตัวอย่าง มาคัดแยกแบคทีเรียโดยใช้เข็มเขี่ยและลูปที่ปราศจากเชื้อแตะโคโลนีแล้วนำมาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม เพื่อให้เกิดโคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์ ให้หมายเลขกำกับแต่ละโคโลนีที่แตะมา นำจานเพาะเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่สภาวะเดิมนาน 7 วัน (การคัดแยกแบคทีเรียจะคัดแยกมาจาก 1 จาน ของแต่ละตัวอย่างน้ำปลาเท่านั้น โดยคัดเลือกจานที่มีการกระจายของโคโลนีสม่ำเสมอ และมีความแตกต่างของโคโลนีมากกว่าจานอื่น ๆ)

2.2.2 การเก็บรักษาเชื้อที่คัดแยกได้ ใช้เข็มเขี่ยแตะโคโลนีเดี่ยวและบริสุทธิ์จากจานแก้วเพาะเชื้อที่ได้จากข้อ 2.2.1 แทง (stab) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy yeast extract agar ซึ่งบรรจุอยู่เกือบเต็มหลอดฝาเกลียวขนาด 16x100 มิลลิลิตร และใช้เข็มเขี่ยแตะโคโลนีเดิมจุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy yeast extract broth ซึ่งบรรจุอยู่เกือบเต็มหลอดฝาเกลียว ขนาด 16x100 มิลลิลิตร เช่นกัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดจะมีโซเดียมคลอไรด์และ cysteine hydrochloride ผสมอยู่ 25 และ 0.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะปกติ สังเกตจนมีแบคทีเรียเจริญตามแนวปักและขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว นำหลอดดังกล่าวไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุก 3 สัปดาห์

2.3 การจัดกลุ่มและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ นำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ (ในข้อ 2.2.2) มาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy yeast extract agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 25 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ละ 2 จานนำไปบ่มภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำและสภาวะที่มีออกซิเจนปกติ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกระทั่งโคโลนีของแบคทีเรียปรากฏ สภาวะละ 1 จาน เมื่อครบ

กำหนดนำจานเพาะเชื้อทั้ง 2 สภาวะของแต่ละสายพันธุ์มาดูการเจริญเปรียบเทียบกัน ถ้าเจริญได้ทั้ง 2 สภาวะจัดเป็นพวก facultative anaerobic bacteria ถ้าเจริญได้เฉพาะภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำอย่างเดียวจัดเป็นพวก obligate microaerobic bacteria นำแบคทีเรียจากจานเพาะเชื้อที่บ่มภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำมาศึกษาลักษณะโคโลนี รูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์และการติดสีแกรม โดยใช้วิธีของ Dussault, H. P. (74) โดยการกระจายแบคทีเรียกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) บนสไลด์สะอาดทิ้งไว้ให้แห้งเองที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นล้างเอาเกลือออกด้วยสารละลายกรดอะซิติคเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) นาน 5 นาที เทกรดทิ้งแล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ย้อมด้วยสารละลาย crystal violet (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) นาน 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ หยดสารละลายแกรมไอโอดีน (ภาคผนวก ข หมายเลข 9) ให้ท่วมนาน 1 นาทีแล้วล้างด้วยน้ำ ผ่านสารละลายอะซีโตนแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 10) ไม่เกิน 15 วินาที ล้างน้ำทันที แล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ ย้อมด้วย basic fuchsin (ภาคผนวก ข หมายเลข 11) นาน 20–30 วินาที ล้างด้วยน้ำแล้วซับให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า จัดกลุ่มแบคทีเรียตามสภาวะการเจริญ การติดสีแกรม รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์

3. การทดสอบเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มกลุ่มที่เจริญได้เฉพาะภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ดี

3.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย โดยดูการย่อยไขมันของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy yeast extract agar ที่มีกลีเซอรอลไตรบิวไทเรตเป็นแหล่งไขมัน (75) และผสมโซเดียมคลอไรด์ลงไปจนกระทั่งความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ใช้เข็มเขี่ยแตะเชื้อบริสุทธิ์กลุ่มแบคทีเรียที่เจริญได้เฉพาะภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำที่คัดแยกได้จากข้อ 2.3 มาจุด (spot) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 จาน นำไปบ่มภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้นนำจานเพาะเชื้อมาตรวจหาบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี และคัดเลือกแบคทีเรียที่ให้อัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีมากที่สุดในแต่ละความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ โดยคัดเลือกจากน้ำปลาตัวอย่างละ 1 โคโลนี

3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เพื่อเป็นแนวทางในการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยยึดแนวจัดจำ-

แนกแบคทีเรียตามหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (64)

3.2.1 ลักษณะเจริญของแบคทีเรีย นำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy yeast extract agar ที่ผสมโซเดียมคลอไรด์จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ มาศึกษารูปร่าง ขนาด สีและความโปร่งแสงหรือความทึบแสงของโคโลนี

3.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

<u>การติดสีแกรม</u> ใช้แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy yeast extract agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 25 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 7 วัน ไปย้อมแกรมตามวิธีของ Dussault, H. P. (74) ดังกล่าวแล้วในข้อ 2.3

<u>การย้อมสีเอ็นโดสปอร์</u> นำแบคทีเรียที่มีอายุ 10–14 วัน มากระจายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์บนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งให้แห้งเองที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นล้างเกลือออกด้วยสารละลายกรดอะซีติคเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 5 นาที เทกรดทิ้งปล่อยให้แห้ง หยดสารละลายสี malachite green เข้มข้น 5 เปอร์-เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 12) ให้ความร้อนโดยใช้ไอน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ระวังอย่าให้สีแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็น ล้างด้วยน้ำ ย้อมด้วย safranin (ภาคผนวก ข หมาย-เลข 13) เป็นเวลา 30 วินาที ล้างน้ำแล้วซับให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า สปอร์จะติดสีเขียว ส่วนของเซลล์จะติดสีแดง

<u>การเคลื่อนที่</u> นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ปลูกเชื้อแบบปักตรง (stab inoculation) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ motility test medium (ภาคผนวก ก หมายเลข 11) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 25 เปอร์เซ็นต์ ถ้าแบคทีเรียเจริญออกนอกรอยที่ปลูกแสดงว่าเคลื่อนที่ได้

3.2.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

นำแบคทีเรียอายุ 7 วัน ปลูกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 25 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 7 วันและทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีดังต่อไปนี้

<u>การสร้างเอนไซม์คาตาเลส</u> หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy yeast extract agar ถ้ามีฟองกาซเกิดขึ้น แสดงว่าให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่มีฟองกาซเกิดขึ้นให้ผลเป็นลบ

<u>การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส</u> นำกระดาษกรอง Whatman No. 1 ที่ชุบสาร-ละลาย tetramethyl paraphenylenediamine dihydrochloride เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 15) พอหมาด นำมาวางบนจานเพาะเชื้อที่สะอาด

ใช้เข็มเขี่ยที่ทำด้วยลวดแพลตตินัม แตะโคโลนีแบคทีเรียมาขีดลงบนกระดาษกรองดังกล่าว สังเกตดูการเปลี่ยนแปลงภายใน 1 นาที ถ้ามีสีม่วงเกิดขึ้นตามรอยขีด แสดงว่าแบคทีเรียนั้นมีเอนไซม์ไซโตรโครมออกซิเดส

การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลวยูเรีย (ภาคผนวก ก หมายเลข 12) สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของฟีนอลเรดในอาหารจากสีเหลืองส้มเป็นสีชมพู แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสย่อยยูเรียแล้วได้แอมโมเนีย ทำให้อาหารมีสภาพเป็นด่าง บันทึกผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีบันทึกผลเป็นลบ

การรีดิวส์ไนเตรท ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic nitrate medium (ภาคผนวก ก หมายเลข 13) ตรวจผลโดยใช้สารละลายทดสอบไนไตรท์ ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย ก และสารละลาย ข (ภาคผนวก ข หมายเลข 16) โดยหยดสารละลายดังกล่าวลงไปชนิดละ 5 หยดตามลำดับ เขย่าให้ผสมกัน ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีแดง แสดงว่าไนเตรทถูกรีดิวส์เป็นไนไตรท์ บันทึกผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีแดงให้เติมผงสังกะสีลงไปเล็กน้อย ถ้าเกิดสีแดง แสดงว่าไนเตรทถูกรีดิวส์ด้วยผงสังกะสีให้ผลเป็นลบที่แท้จริง ถ้าไม่มีสีแดงเกิดขึ้น บันทึกผลเป็นบวก เพราะไนเตรทถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ โดยแบคทีเรีย และไนไตรท์ถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นก๊าซไนโตรเจนในที่สุด

การสร้างอินโดล ปลูกแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic nitrate medium เช่นเดียวกับการทดสอบรีดิวส์ไนเตรท ตรวจหาสารอินโดลที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายโคแวค (Kovac reagent) (ภาคผนวก ข หมายเลข 17) โดยหยดสารละลายโคแวค 2-3 หยด ลงในหลอดทดสอบที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ถ้าเกิดสีแดงลอยอยู่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าแบคทีเรียนั้นมีความสามารถสร้างอินโดลได้ บันทึกผลเป็นบวก

การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ปลูกแบคทีเรียแบบปักตรง (stab) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Triple sugar iron agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 14) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีดำ บันทึกผลเป็นบวก

การทดสอบเมธิลเรด ปลูกแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MR-VP (ภาคผนวก ก หมายเลข 15) ตรวจผลทุก 3 วัน โดยแบ่งอาหารมาประมาณ 2-3 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายเมธิลเรด (ภาคผนวก ข หมายเลข 18) ลงไป 2-3 หยด ถ้าเกิดสีแดงในอาหารบันทึกผลเป็นบวก ถ้าเกิดสีเหลืองบันทึกผลเป็นลบ

การทดสอบเมธิลคาร์บินอล (Voges-Proskauer test) ปลูกแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MR-VP (ภาคผนวก ก หมายเลข 15) ตรวจผลทุก 3 วัน โดยแบ่งอาหารมาประมาณ 2-3 มิลลิลิตร เติมน้ำยาทดสอบ สารละลาย ก และสารละลาย ข (ภาคผนวก ข หมายเลข 19) ลงไปอย่างละ 2-3 หยด ถ้าอาหารมีสีชมพูเกิด

ขึ้นภายใน 10 นาที บันทึกผลเป็นบวก ส่วนหลอดที่ไม่เกิดสีชมพูให้ตั้งทิ้งไว้เพื่อดูผลภายใน 24 ชั่วโมง ถ้าไม่เกิดสีชมพูขึ้น บันทึกผลเป็นลบ

<u>การทดสอบย่อยแป้ง</u> ปลูกแบคทีเรียแบบจุด ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบการย่อยแป้ง (ภาคผนวก ก หมายเลข 16) ในจานเพาะเชื้อ ตรวจดูการย่อยแป้งโดยราดสารละลายแกรมไอโอดีน (ภาคผนวก ข หมายเลข 9) ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้ บันทึกผลเป็นบวก

<u>การทดสอบการสร้างเอนไซม์เจลลาติเนส</u> ปลูกแบคทีเรียแบบจุด ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบการย่อยเจลลาติน (ภาคผนวก ก หมายเลข 17) ในจานเพาะเชื้อ ตรวจดูการย่อยเจลลาตินโดยราดสารละลายอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต (ภาคผนวก ข หมายเลข 20) ให้ทั่วจานเพาะเชื้อตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ถ้าเกิดบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี แสดงว่า แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์เจลลาติเนส ย่อยเจลลาตินได้ บันทึกผลเป็นบวก

<u>การทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส</u> ปลูกแบคทีเรียแบบจุดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบการย่อยโปรตีนของ skim milk (ภาคผนวก ก หมายเลข 18) ในจานเพาะเชื้อ ตรวจดูการย่อยโปรตีนโดยสังเกตบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนี ถ้าเกิดบริเวณใสแสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสย่อยโปรตีนใน skim milk ได้ บันทึกผลเป็นบวก

<u>การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต</u> ปลูกแบคทีเรียลงในอาหาร phenol red broth base (ภาคผนวก ก หมายเลข 19) คาร์โบไฮเดรตที่ใช้ทดสอบได้แก่ กลูโคส แลคโตส ไซโลส มอลโตส อราบิโนส แมนนิดอล ฟรุคโตส กาแลคโตส ซอร์บิตอล ซูโครส ไรโบส ราฟิโนส และดูโอซิตอล โดยเติมลงไป 1 เปอร์เซ็นต์ สังเกตการสร้างกรดและกาซ ถ้าแบคทีเรียใช้คาร์โบไฮเดรตได้จะสร้างกรดขึ้นมา ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟีนอลเรด เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง ถ้าแบคทีเรียสร้างกาซได้ กาซจะเข้าไปแทนที่อาหารในหลอดดักกาซ

<u>การทดสอบความสามารถของการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ</u> ปลูกแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy yeast extract broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 9) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่จนความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5, 5,10,15,20 และ 29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สังเกตการเจริญจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. การคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีส่วนประกอบของอาหารน้อยสุด (minimum medium) ซึ่งแบคทีเรียที่คัดเลือกได้สามารถเจริญได้ดี เพื่อใช้ในการทดสอบการสร้างกรด-

ไขมันที่ระเหยได้

4.1 การเตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้ เลี้ยงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic soy yeast extract broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์ และ cysteine hydrochloride ผสมอยู่ 25 และ 0.04 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน

4.2 การคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้

-อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ (synthetic medium) ชนิดต่าง ๆ (ภาคผนวก ก หมายเลข 20-22)

-Medium 73 (ภาคผนวก ก หมายเลข 23)

-Complex medium of Dundas (ภาคผนวก ก หมายเลข 24)

-Basal salt medium ที่มีการเปลี่ยนแปลงแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ (ภาคผนวก ก หมายเลข 25)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ใส่ลงในหลอดผาเกลียวขนาด 16x100 มิลลิลิตร ปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น ใช้ปิเปตดูดสารละลายแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่เตรียมไว้เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดละ 2 หลอด หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดูการเจริญของแบคทีเรีย โดยการสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีส่วนประกอบของอาหารน้อยที่สุดที่คัดเลือกได้ไปใช้ในการศึกษาการสร้างกรดไขมันที่ระเหยได้จากไขมันของปลาไส้ตันต่อไป

5. การศึกษาชนิดของกรดไขมันที่ระเหยได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไขมันจากปลาไส้ตันเป็นสารตั้งต้น

5.1 การแยกไขมันจากปลา ปลาที่ใช้ในการทดลองคือ ปลาไส้ตันจากสะพานกรุงเทพ นำปลาไส้ตันมาล้างและคัดแยกสิ่งสกปรกออก แบ่งใส่ถุงพลาสติกถุงละ 200 กรัม เก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส วิธีการแยกไขมันจากปลาไส้ตันนี้ใช้วิธีของ Bligh และ Dyer (76) โดยเอาปลาที่แช่แข็งมาทิ้งไว้ให้อ่อนตัว นำปลา 200 กรัมมาปั่นกับสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม 200 มิลลิลิตร และเมธิลแอลกอฮอล์ 400 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง homogenizer ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เติมคลอโรฟอร์มลงไปอีก 200 มิลลิลิตร ปั่นต่อไปอีก 30 วินาที เติมน้ำกลั่นลงไปอีก 200 มิลลิลิตร และทำการปั่นต่อไปอีก 30 วินาที นำของผสมที่ได้ไปกรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อ

I10308854

แยกเอาเศษปลาออก ในขั้นตอนนี้สารละลายจะแยกออกเป็น 2 ชั้น เทสารละลายชั้นบนซึ่งเป็นชั้นของน้ำและเมธิลแอลกอฮอล์ทิ้งไป นำเฉพาะชั้นของคลอโรฟอร์มซึ่งอยู่ชั้นล่างมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารละลายที่กรองได้ซึ่งเป็นคลอโรฟอร์มที่มีไขมันปลาไส้ตันละลายอยู่ไประเหยเอาคลอโรฟอร์มออกด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส เก็บไขมันของปลาไส้ตันที่ได้ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป (แผนผังขั้นตอนของการแยกไขมันจากปลาไส้ตันดังแสดงในภาคผนวก ค หมายเลข 5)

5.2 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของอาหารน้อยที่สุดซึ่งเติมไขมันที่แยกได้จากปลาไส้ตันลงไป

5.2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบต่ำสุดที่คัดเลือกได้ในข้อ 4 โดยมีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 25 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยางนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น เติมไขมันจากปลาไส้ตันที่แยกได้ ลงไปขวดละ 0.1 มิลลิลิตร (ประมาณ 0.2 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด)

5.2.2 เติมสารละลายแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบต่ำสุดและมีค่าความขุ่น (OD_{550}) ประมาณ 0.2 ลงไปสายพันธุ์ละ 1 ขวด ๆ ละ 5 มิลลิลิตร ไล่กาซออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อและบริเวณเหนือผิวอาหารในขวดเลี้ยงเชื้อด้วยกาซไนโตรเจน ซึ่งในการใช้กาซไนโตรเจนแทนที่กาซออกซิเจนจะช่วยให้ไขมันกระจายตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดียิ่งขึ้น วิธีการแทนที่กาซทำโดยใช้หลอดแก้วยาวประมาณ 15 เซนติเมตร ซึ่งภายในบรรจุสำลีต่อเข้ากับสายยางจากถังกาซไนโตรเจน ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งต่อกับพลาสเจอร์ปิเปตซึ่งมีสำลีจุกที่อยู่ปลายด้านบน นำอุปกรณ์ดังกล่าวไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้เป่ากาซไนโตรเจนลงในขวดแต่ละขวดนาน 4-5 นาที จากนั้นรีบปิดปากขวดด้วยจุกยาง ทำขวดควบคุม (control) ที่ไม่ได้เติมเชื้อควบคู่กันไปด้วย เลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบต่ำสุด แต่ไม่เติมไขมันของปลาไส้ตันในสภาวะเดียวกันอีก 1 ชุดการทดลอง นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปใส่ในเครื่องเขย่า (shaker) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน

5.3 การสกัดกรดไขมันที่ระเหยได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละขวดมาวัดหาค่าความเป็นกรดด่าง ด้วย pH meter (Suntex Model sp-5A) หลังจากนั้นนำเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อชุดที่เติมไขมัน

ของปลาไส้ตันไปสกัดกรดไขมันที่ระเหยได้ที่เกิดขึ้น ตามวิธีของ McIver และคณะ (54) โดยเติมกรดวาเลอริค (valeric acid) ซึ่งใช้เป็น internal standard ลงไปในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อโดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 กรัมต่อลิตร นำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 2.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริค ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เทอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวลงในกรวยแยกสาร (separating funnel) ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมไดเอธิลอีเทอร์ (diethyl ether) ($(C_2H_5)_2O$) ลงไป 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือเป็นเวลา 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ปล่อยส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไป เติมน้ำกลั่นที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 11.0 ลงในกรวยแยกสาร 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือเป็นเวลา 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น นำชั้นของน้ำ (ชั้นล่าง) ไปปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 2.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริคเหมือนขั้นตอนต้น นำสารละลายที่ได้มาเทใส่ในกรวยแยกสารที่สะอาด เติมไดเอธิลอีเทอร์ ลงไป 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือเป็นเวลา 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น นำชั้นของไดเอธิลอีเทอร์มาเติมด้วยแมกนีเซียมซัลเฟต หรือโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ประมาณ 1-2 กรัม ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที เขย่าเป็นครั้งคราว นำเฉพาะส่วนของไดเอธิลอีเทอร์ไประเหยด้วย rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิห้อง จนได้ปริมาตรเหลืออยู่ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร (แผนผังขั้นตอนของการสกัดกรดไขมันที่ระเหยได้ดังแสดงในภาคผนวก ค หมายเลข 6)

5.4 การสกัดกรดไขมันที่ระเหยได้ในน้ำปลาที่ผลิตเป็นการค้า

นำน้ำปลาที่มีขายตามท้องตลาด และเป็นที่นิยมบริโภคของคนทั่วไปมา 5 ชนิด โดยใช้น้ำปลาตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร เติมกรดวาเลอริคซึ่งใช้เป็น internal standard โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 2.0 แล้วดำเนินการสกัดกรดไขมันที่ระเหยได้ตามวิธีการเช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.5 การศึกษาชนิดของกรดไขมันที่ระเหยได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำปลาที่ผลิตเป็นการค้าโดยใช้กาซโครมาโตกราฟี

ฉีดกรดไขมันที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อและตัวอย่างน้ำปลาผ่านเครื่องกาซโครมาโตกราฟี ยี่ห้อ Chrompack Packard รุ่น 438A ซึ่งใช้ detector แบบ flame ionization detector (FID) ใช้ CP-SIL-5CB column (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.22 มิลลิเมตร ยาว 25 เมตร) ซึ่งปรับอุณหภูมิไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 นาทีและให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้น 20 องศาเซลเซียสต่อนาที อุณหภูมิของ injection port และ detector ถูกปรับไว้ที่ 230 และ 200 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ใช้กาซ

ฮีเลียม (He) เป็นตัวพาด้วยอัตราเร็ว 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ split ratio 1:100

5.6 การแปรผล ใช้วิธีการเปรียบเทียบค่า retention time ของกราฟ (peak) แต่ละกราฟในโครมาโตแกรมที่ได้ กับกราฟในโครมาโตแกรมของสารละลายกรดไขมันที่ระเหยได้มาตรฐาน (standard volatile fatty acid) ของกรดอะซีติค (acetic acid) กรดโปรปิโอนิค (propionic acid) กรดไอโซบิวไทริค (isobutyric acid) กรดบิวไทริค (butyric acid) กรดไอโซวาเลอริค (isovaleric acid) และกรดวาเลอริค (valeric acid) ความเข้มข้นชนิดละ 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งผ่านกระบวนการสกัดตามวิธีของ McIver และคณะเช่นเดียวกัน

ศึกษาชนิดของกรดไขมันที่ระเหยได้จากที่แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สร้างขึ้นจากไขมันของปลาไส้ตัน และเปรียบเทียบกับชนิดของกรดไขมันที่ระเหยได้ของน้ำปลาที่ผลิตเป็นการค้า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย