รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกียรติชัย เจษฎาพันธ์, นงนุช โลรัตน์ และบุญเติม ถิรวัฒนประเสริฐ 2532. ปัจจัยที่มีผลกระทบต่ออุปสงค์การสั่งเข้ากุ้งสดแช่แข็งของคู่ค้าที่สำคัญของไทย, ในรายงานผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 27 วันที่ 30 มีค.-1 กพ. 2532 สาขาเศรษฐศาสตร์และบริหารธุรกิจ สังคมศาสตร์ ทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม คหกรรมศาสตร์ ศึกษาศาสตร์และมนุษยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ หน้า 125-134.

ธงชัย ลือไทยลงค์. 2531. ญี่ปุ่นตลาดกุ้งแช่แข็งไทย สรุปข่าวธุรกิจ 19(18) : 39-48.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปล์. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. pp.166.

นภา โล่ห์ทอง. 2535. จุลชีววิทยาของอาหารทะเลแช่แข็ง จากเอกสารประกอบคำบรรยายเรื่องจุลชีววิทยาของอาหารทะเลแช่แข็ง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

บังอร สายสิทธิ์. 2534. คุณสมบัติกุ้งเพื่อการส่งออก. วารสารฟาร์มกุ้ง. 2(15) : 4-5.

ฝ่ายวิชาการธนาคารกสิกรไทย. 2532. กุ้งแช่แข็งส่งออกยังสดใสแต่ภายในมีปัญหา. สรุปข่าวธุรกิจ. 20(4) : 1-4.

เพ็ญศรี รอดมา, อุรารัตน์ วุฒิกรภัณฑ์ และอัชฌา ญานานุวัฒน์. 2534. คุณภาพของกุ้งเพาะเลี้ยงและกุ้งทะเลแช่แข็ง. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กองวิเคราะห์อาหารส่งออก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 33(4):183-188.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรืองไร โตกฤษณะ. 2532. โอกาสการส่งออกกุ้งแช่แข็งจากประเทศไทย. ในรายงานผลงานวิจัยในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 27 วันที่ 30 มค.-1 กพ. สาขาเศรษฐศาสตร์และบริหารธุรกิจ สังคมศาสตร์ ทรัยพยากรและสิ่งแวดล้อม คหกรรมศาสตร์ ศึกษาศาสตร์ และมนุษย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. หน้า 135-148.

สมาคมส่งออกอาหารแช่เยือกแข็ง,พฤหัสบดีที่ 24-26 พฤศจิกายน 2537. อิตาลิระงับนำเข้าอาหารทะเลชั่วคราว. การค้าระหว่างประเทศและเกษตร. ประชาชาติธุรกิจ. :12

ภาษาอังกฤษ

Agner, K. 1943. Erythrocyte Catalase activity for chemistry, Mineralogy Geology, Band 17(13) : 9.

Ang, C.Y.W, Liu, F, Townsend, W.E, and Fung, D.Y.C. 1994. Sensitive catalase test for end-point temperature of heated chicken meat. J. of Food Sci. 59(3) : 494-497.

AOAC. 1984. Official Methods of Analysis 14th ed., The Assoiation of Official Analytical Chemists Arlington, Virginia. pp.1441.

Asru, K. 1972. Colorimetric assay of catalase. Anal. Biochem. 47 : 389-394.

Bonnichsen, R.K, Chance, B. and Theorell, H. 1947. Catalase activity. Acta Chemica Scand, 1: 685-709.

Bunchanan, R.E, and Gibbon N.E (ed.). 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8 th ed. The Williams and Wilkins co, Baltimore.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Chance, B. 1950. The reaction of catalase in the presence of the notation. System Biochem J. 46,387-402.

_____. 1952a. The effect of pH upon the equilibria of catalase compounds. J. Biol Chem. 194:483-494.

_____. 1952b. The spectra of the enzyme-substrat complexes of catalase and peroxidase. Archive of Biochem and Biophys. 41: 404-414.

_____. and Fergusson, R.R. 1954. The mechanism of enzyme action. In A Symposium on Amino Acid Metabolism. (W.D. Mciery and B. Glass, eds.) The Johns Hopkins Press, Baltimore,MD. pp.389.

Charboneau, R. Therrien, J., and Gagnon, M. 1975. Detection and measurement of bacterial catalase by the disc floatation method using the catalasemeter. Can. J. Microbiology . 21: 580-582.

Clayton, R.K. 1960. An intermediate stage in the H_2O_2-induced synthesis of catalase in Rhodopseudomonas pheroides. J. Cell Composiol. 55:1-8.

Cobb I.B.F., Banderzant, C., Hanna, M.O., and Chia Ping, S. 1976. Effect of ice storage on microbiological and chemical changes in shrimp and melting ice in a model system. J. of Food Sci. 41: 29-34.

Dodds, K.L., Holley, R.A., Kemoton, A.G. 1983. Evaluation of the catalase and limulus amoebocytelysate test for rapid determination of the microbial quality of vacuum - packed cooked turkey J. Can Food Sci. 16: 167-172.

Finn, G.J. and Condon, S. 1975. Regulation of catalase synthesis in Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 123:570-579.

Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. 1988. Food Microbiology. 4th edition. Singapore.

Frederick, S.A. and Fridovich, I. 1981. Manganese and defenses against oxygen toxicity in Lactobacillus plantarum. J. Bacteriol. 145:442-451.

Fung D.Y.C. 1986. Rapid method and automation for food microbiology, in Biodeterioration (Barry, S.B. and Houghton, D.R., C.A.B. International Slough, U.K.). 3-31.

_____. and Petrishko, D.T. 1973. Capillary tube catalase test Applied Microbiology. 16: 631-632.

_____. 1991. Rapid methods and automation for food microbiology, In Instrumental Methods for Quality Assurance in Food (D.Y.C Fung and R.E. Matthews, eds Marcel Dekker, (New York).

Gagnon, M., Hunting, W.M., and Esselen, W.B. 1959. New method for catalase determination Anal Chem. 31: 144-146.

George, I.J. Wang and Daniel Y.C. Fung. 1986a. Feasibility of using catalase activity as and index of microbial load on chicken Surface. J. of Food Sci. 15(16): 1442-1444.

_____. 1986b. Significance of bacterial catalase in food microbiology . A review. J. of Food Safety. 8 : 47-67.

George, P. 1948. A comparision of the decomposition of hydrogenperoxide by catalase, ferrous and ferric ions haemin and ferrous phathalocyanin. J. Biochem. 43:287-295.

Goldschmidt, M.C. and Fung, D.Y.C. 1978. New methods for microbial analysis of food. J. of Food Prot. 41:201-219.

Griffiths, M.W., Phillip J.D. 1984. Methods for rapid detection of post pasteurization contamination in cream. J. of the Society of Dairy Technology. 37: 22-26.

Jennifer, Y, Lee, M.S. and Fung, D.Y.C. 1986. Methods for sampling meat surfaces. J. of Env. Health. 48(4) : 200-205.

Jones, P. and Suggett, A. 1968. The catalase-hydrogen peroxide system. J. Biochem. 110:621-629.

Keilin, D. and Hartree, .F. 1951. Purification of horse-radish peroxidase and comparision of catalase and metheamoglobin. J. Biochem. 49:88-104.

Lonne, D.C. 1969. A rapid test for determining the quality of raw refrigerated milk. The Australian Journal of Dairy Technology. 24: 66-68.

Marie, A. and Parax, F. 1980. Factors affecting the growth and the catalase synthesis in Micrococcus luteus cells. Hoppe-Seyler's Zeitschehrift Fure Physiol Chemie. 361: 603-606.

Molland, J. 1947. Bacterial catalase. Acta. Path et Microbial Scand. Suppl. pp.66.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Nicholls, P. 1959. Chemical nature and reaction mechanisms of enzyme catalase and peroxidase. Ph.D. Thesis. University of Cambridge. U.K.

Ogura, Y., 1955. Catalase activity at high concentration of hydrogenperoxide. Archive of Biochem and Biophys. 57(2) :288-300.

Phillip, G.H., 1981. Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology .Washington DC. pp.187.

Phillip, J.D., and Griffiths, M.W. 1986. A note on the use of the catalasemeter in assesing the quality of milk. Applied Bacteriol. 62: 233-236.

Robinson, D.S. 1991 Peroxidase and catalase in foods. In Oxiodative Enzyme in Food .Procter department of food science, The United of Leeds. U.K. 25-29.

SAS Institute. Inc. 1982. SAS User's Guide Statistic SAS Institute Cary, NC.

Shamshad, S.T., Kger-un-Nisa, Riza, M., Zuberi, R., and Qadri R.B. 1990. Shelf life of shrimp (Penaeus merguiensis) stored at different temperatures. J. of Food Sci. 55: 1201-1205.

Shewan, J.M., Hobbs, G., and Hodgkiss, W. 1960. A determinative scheme for the identification of certain genera of gram negative bacteria with special reference of Pseudomonadaceae. J. Appl. Bacteriol. 23: 379.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Strother, G.K and Ackerman, E. 1961. Physical factors influencing catalase rate constants. Acta Biochem et Biophys. 47:317-326.

Sumner, J.B., Dounce, A.L and Frampton, V.L. 1940 Catalase III J. Biol Chem. 136:343-356.

Sydney, M.F., Allen, J.B. and Scott, S. 1986. Diagnostic Microbiology. pp.358.

Tria, E. 1939. Anticatalase. J. Biol Chem. 129:377-392.

Vanderzant, C. and Nickelson, R. 1969. A Microbial examination of muscle tissue of beef, pork, and lamb carcasses. J. Milk Food Technol. 31: 357-361.

Voneuler, H. and Josepson, K. 1926. The catalase. J. Justus Liebigs Annal de Chemie. 450:158-181.

Wesley, A and Margarat, J.B. 1990. Basic Microbiology Philadelphia. United State Department of Agriculture Lippincolt Company. pp.661.

Whittenbury, R. 1964. Hydrogenperoxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. J Gen Microbiol. 35:13-26.

Williits, R.E. 1965. An evaluation of the catalase test for the detection of mastitis milk. Diss. Abstr. 26(2): 586.

_____. and Babel, F.J. 1965. Disc Floatation test for measurement of catalase activity in milk. J. Dairy Sci. 48: 1287-1289.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

ก 1. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

1) โซเดียมอะซิเตต-กรดอะซิติกบัฟเฟอร์ pH 5.0-5.5

โดยเตรียมสารละลายดังนี้

สารละลาย A : สารละลาย $CH_3COONa.3H_2O$ ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร

สารละลาย B : สารละลาย CH_3COOH ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ตามตาราง

pH	ปริมาตรสารละลาย A (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
5.0	70.0	30.0
5.5	88.5	11.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0-8.0

โดยเตรียมสารละลายดังนี้

สารละลาย A : สารละลาย $Na_2HPO_4.12H_2O$ ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร

สารละลาย B : สารละลาย $NaH_2PO_4.H_2O$ ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ตามตาราง

pH	ปริมาตรสารละลาย A (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
6.0	6.2	43.8
6.5	16.0	34.0
7.0	30.5	19.5
7.5	42.0	8.0
8.0	47.3	2.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3) บอเรตบัฟเฟอร์ pH 8.0 - 9.0

โดยเตรียมสารละลายดังนี้

สารละลาย A : สารละลาย $Na_2B_4O_7.10H_2O$ ความเข้มข้น 0.025 โมลต่อลิตร

สารละลาย B : สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ตามตาราง

pH	ปริมาตรสารละลาย A (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
8.5	50	15.2
9.0	50	4.6

นำสารละลายบัฟเฟอร์ไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดันที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ การปรับ pH ต้องใช้สารละลาย A หรือ B ของบัฟเฟอร์แต่ละชนิดในการปรับเท่านั้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ก 2. การเตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดัดแปลงจากวิธีของ Dodd, Holley และ Kemoton (1983) มีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1. เตรียม Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) จำนวน 14.6 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย EDTA เข้มข้น 10^{-4}

โมลาร์ นำมาฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดันอุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที

2. เตรียมสารละลาย H_2O_2 เข้มข้นร้อยละ 30 โดยนำ H_2O_2 เข้มข้นร้อยละ 37 จำนวน 810 มิลลิลิตร บรรจุลงใน volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

3. ผสมสารละลายในข้อ 2 จำนวน 200 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เติมสารละลายในข้อ 1 จำนวน 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ดังนั้นจะได้สารละลาย H_2O_2 เข้มข้นร้อยละ 6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมตัวอย่าง

ข 1. การเตรียมคะตะเลสจากแบคเรียที่แยกได้จากตัวกุ้ง

1) นำกุ้งกุลาดำสดทั้งเปลือกจำนวน 10 กรัม ใส่ลงในโถปั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปลอดเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร ปั่นให้ละเอียด เจือจางด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อให้อยู่ในช่วง 1 ต่อ 10^5

2) นำตัวอย่างในข้อ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเพาะเชื้อบน Nutrient agar โดยการ spraed plate บ่มที่อุณหภูมิ 21 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3 นำโคโลนีที่เจริญผสมกันแล้วทำ suspension ของเซลล์ในน้ำเกลือที่ปลอดเชื้อ ซึ่ง suspension ของเซลล์นี้จะใช้สำหรับตรวจสอบแอคติวิตีของคะตะเลสจากแบคทีเรีย

ข 2. การเตรียมคะตะเลสจากเนื้อเยื่อกุ้ง

1) ล้างกุ้งกุลาดำที่ยังมีชีวิตอยู่ล้างให้สะอาด ปอกเปลือกชักไส้เพื่อป้องกันปัญหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียในเนื้อเยื่อกุ้งจำนวน 20 กรัม และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 20 มิลลิลิตร ในโถปั่นที่ปลอดเชื้อด้วยอัตราเร็วต่ำ เพื่อป้องกันไม่ให้คะตะเลสในเนื้อเยื่อถูกทำลายด้วยความร้อนแล้วรีบนำเนื้อเยื่อนั้นมาทดสอบแอคติวิตีของคะตะเลส

ข 3. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย Pseudomonas fluorescens

1) เลี้ยงเชื้อ Pseudomonas fluorescens ที่อยู่ในรูปของ lyophilize (TISTR 358) ใน Nutrient broth เป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

2) นำ culture จากข้อ 1 มา streak บน Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อได้โคโลนีเดี่ยวแล้วเก็บไว้ในหลอดอาหารเอียงที่อุณหภูมิประมาณ 10 °C

3) เขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารเอียงในข้อ 3 มาเลี้ยงใน Nutrient broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 21 °C

4) นำ culture จากข้อ 3 มาเจือจางด้วย Nutrient broth ให้อยู่ในช่วง 1 ต่อ 10^3 ถึง 1 ต่อ 10^8 สำหรับใช้ในการตรวจสอบแอคติวิตีของคะตะเลส

ข 4. การแยกแบคทีเรียโดยวิธี Blend Method

ดัดแปลงจากวิธีของ Phillip (1981)

ชั่งตัวอย่างกุ้ง 10 กรัมในโถปั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ปิดฝา ปั่นด้วยความเร็วรอบต่ำเป็นเวลา 2 นาที นำไปตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยใช้ dilution technique

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข 5. การแยกจุลินทรีย์โดยวิธี Rinse Methods

ดัดแปลงจากวิธีของ Jennifer และคณะ(1986)

1) ชั่งตัวอย่างกุ้งกุลาดำวัตถุดิบทั้งเปลือกบันทึกน้ำหนักเป็นกรัมเพื่อคำนวนหาปริมาตรน้ำที่จะใช้ Rinse โดยให้น้ำหนักกุ้ง (กรัม) ต่อ ปริมาตรน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 (มิลลิลิตร) เท่ากับ 1 ต่อ 5 ตามลำดับ ตัวอย่างเช่น กุ้งหนัก 20 กรัม ต้องใช้น้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร

2) ตวงน้ำตามปริมาตรที่คำนวณในข้อ 1 ลงใน ขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่อบฆ่าเชื้อแล้วใช้คีมคีบที่เผาไฟฆ่าเชื้อทิ้งให้เย็น แล้วคีบกุ้งลงในขวดเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 1 นาที ก่อนนำตัวอย่างไปทดสอบคะตะเลสต้องเขย่าอย่างแรงก่อนเสมอ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

ดัดแปลงจากวิธีการของ Phillip และคณะ (1981) มีขั้นตอนดังนี้

1) การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์

นำสารละลายของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาปรับให้ได้ความเข้มข้น 1 ต่อ 10, 1 ต่อ 10^2, 1 ต่อ 10^3, 1 ต่อ 10^4 ตามต้องการโดยใช้น้ำเกลือเข้มข้น ร้อยละ 0.85

2) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชั่งอาหาร Nutrient broth สำเร็จรูป (Difco) 8 กรัม และผง agar 15 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ละลายอาหารด้วยความร้อนจนได้สารละลายใสเทใส่ flask อุดปากขวดด้วยสำลีและปิดปากขวดด้วยแผ่นอะลูมิเนียม นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นที่ประมาณ 50 °C แล้วเทลงในจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 25 มิลลิลิตร เมื่อวุ้นแข็งให้คว่ำจานเลี้ยงเชื้อบรรจุในถุงพลาสติคและเก็บในตู้เย็น

3) วิธีการ

ดูดนำสารละลายของแบคทีเรีย 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อในข้อ 2 นำ spread rod จุ่มแอลกอฮอล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ เผาไฟทิ้งให้เย็นแล้วเกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วจาน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

การจัดกลุ่มของแบคทีเรีย

ง 1. การสุ่มตัวอย่างโคโลนีจากจานเพาะเชื้อ

ตามวิธีของ Frazier และ Westhoff (1988)

นำ suspension ของแบคทีเรียมาทำการเจือจางที่ระดับ 1 ต่อ 10^2, 1 ต่อ 10^3, 1 ต่อ 10^4, 1 ต่อ 10^5 และ 1 ต่อ 10^6 นำทุกความเจือจางมาทำ total plate count โดยการ spread plate บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกจานเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีที่ต้องการ เช่น ต้องการตัวอย่างเชื้อไปทดสอบ 50 โคโลนี ควรเลือกจานเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนประมาณ 50 โคโลนี โดยเขี่ยเชื้อจากทุกโคโลนีไปทำการ streak plate ให้ได้โคโลนีเดี่ยว แล้วเขี่ยเชื้อเก็บไว้ในหลอดอาหารเอียงเพื่อใช้ในการทดสอบขั้นตอนต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ง 2. การย้อมแกรม

มีขั้นตอนดังนี้

1) กระจายเชื้อผสมบนสไลด์ ทำให้แห้งในอากาศ ผ่านเปลวไฟ
2) ย้อมสี กรัมคริสตัลไวโอเล็ต 1 นาที
3) ล้างด้วยน้ำ

4) ย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน 1 นาที

5) ล้างน้ำ

6) ล้างสีออกโดยใช้ เอทธิลแอลกอออล์เข้มข้นร้อยละ 95 โดยเอียงสไลด์ให้ เอทธิลแอลกอออล์ไหลผ่าน สังเกตุดูที่คริสตัลไวโอเล็ตที่ถูกชะออกมา พอเริ่มจางลงหยุดปฏิกิริยาโดยจุ่มลงในน้ำ

7) ซับให้แห้ง

8) ย้อมสีซาฟรานินโอ 20 ถึง 30 วินาที

9) ล้างน้ำ ซับให้แห้ง

10) ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ง 3. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

จาก การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์ (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537)

Oxidase test

การทดสอบ

เตรียมสารละลาย tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ของ Fluka เข้มข้นร้อยละ 1 โดยการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำสารละลายที่เตรียมใหม่ ๆ หยดบนแผ่นกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อใช้เข็มขีดเชื้อมาขีดบนแผ่นกระดาษกรองนั้น สีของแผ่นกระดาษจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินหรือสีม่วงภายใน 10 นาที (ไม่ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ทำด้วยเหล็กหรือนิโครม)

การอ่านผล

ผลบวก เกิดสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้มบนกระดาษกรอง

ผลลบ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทนต่อแบซิทราซิน

การทดสอบ

บ่มเชื้อที่ต้องการทดสอบบน Blood agar plate โดยขีดเชื้อให้ถี่ ๆ ใช้ปากคีบคีบแผ่น disk แล้วจุ่มใน Bacitracin (0.04 µ) วางแผ่น disk บนจานเลี้ยงเชื้อแล้วกดเบา ๆบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง

การอ่านผล

ผลบวก มีบริเวณใสเกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่น disk ที่วางลงไปซึ่งจะกว้างเท่าใดก็ถือว่าเป็นผลบวกทั้งสิ้น

ผลลบ ไม่มีบริเวณที่แบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญเกิดขึ้นเลย

การทนต่อเกลือเข้มข้นร้อยละ 12 ถึง 15

การทดสอบ

เตรียมอาหาร Nutrient broth โดยนำผง Nutrient broth สำเร็จรูป (Difco) 8 กรัมละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร แล้วเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 120 กรัม ละลายอาหารให้เข้ากันด้วยความร้อน ดูดอาหาร 5 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดทดลองปิดปากหลอดด้วยสำลีและหุ้มด้วยแผ่นอะลูมิเนียม ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นแล้ว inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบลงไป บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การอ่านผล

ผลบวก มีการเจริญของเชื้อโดยอาหารขุ่น

ผลลบ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

การวัดระดับการสร้างคะตะเลสของแบคทีเรีย

Capillary tube catalase test

ตามวิธีของ Fung (1971) มีขั้นตอนดังนี้

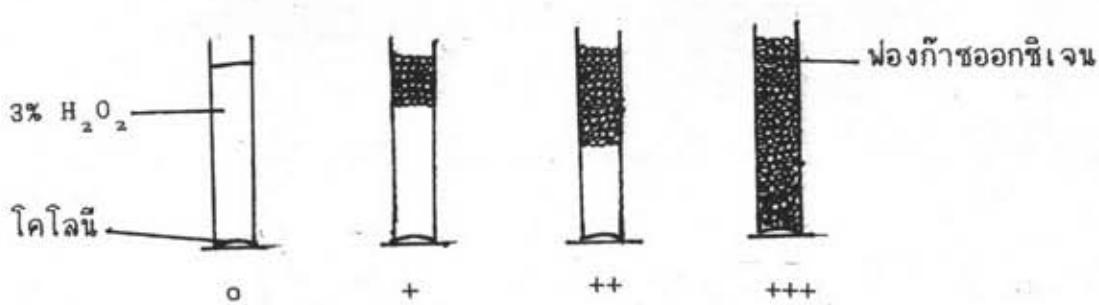
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียมโดยวิธีเดียวกันกับการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในภาคผนวก ค

วิธีการ

1) นำเชื้อที่ต้องการทดสอบมา streak บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) นำหลอด Capillary จุ่มลงในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลาย H_2O_2 เข้มข้นร้อยละ 3 โดยให้มีปริมาณของสารละลายในหลอด Capillary สูงจากปลายด้านล่าง 10 มิลลิเมตร

3) แตะปลายหลอด Capillary ลงบนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจะทำให้เกิดฟองก๊าซออกซิเจนขึ้นภายในหลอด capillary การอ่านผลของระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรีย แสดงดังรูป



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ

วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานของจำนวนเซลแบคทีเรียกับการดูดกลืนแสง

มีขั้นตอนดังนี้

1) การเตรียมตัวอย่าง

เลี้ยงเชื้อจำนวน 1 loop ใน Nutrient broth ปริมาตร 6,8,10,12,15 มิลลิลิตรบ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) การหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

หาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดย dilution technique โดยนำความเจือจางสุดท้าย 1 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อ เทอาหาร Nutrient agar ที่อุณหภูมิประมาณ 50 °C แล้ว เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

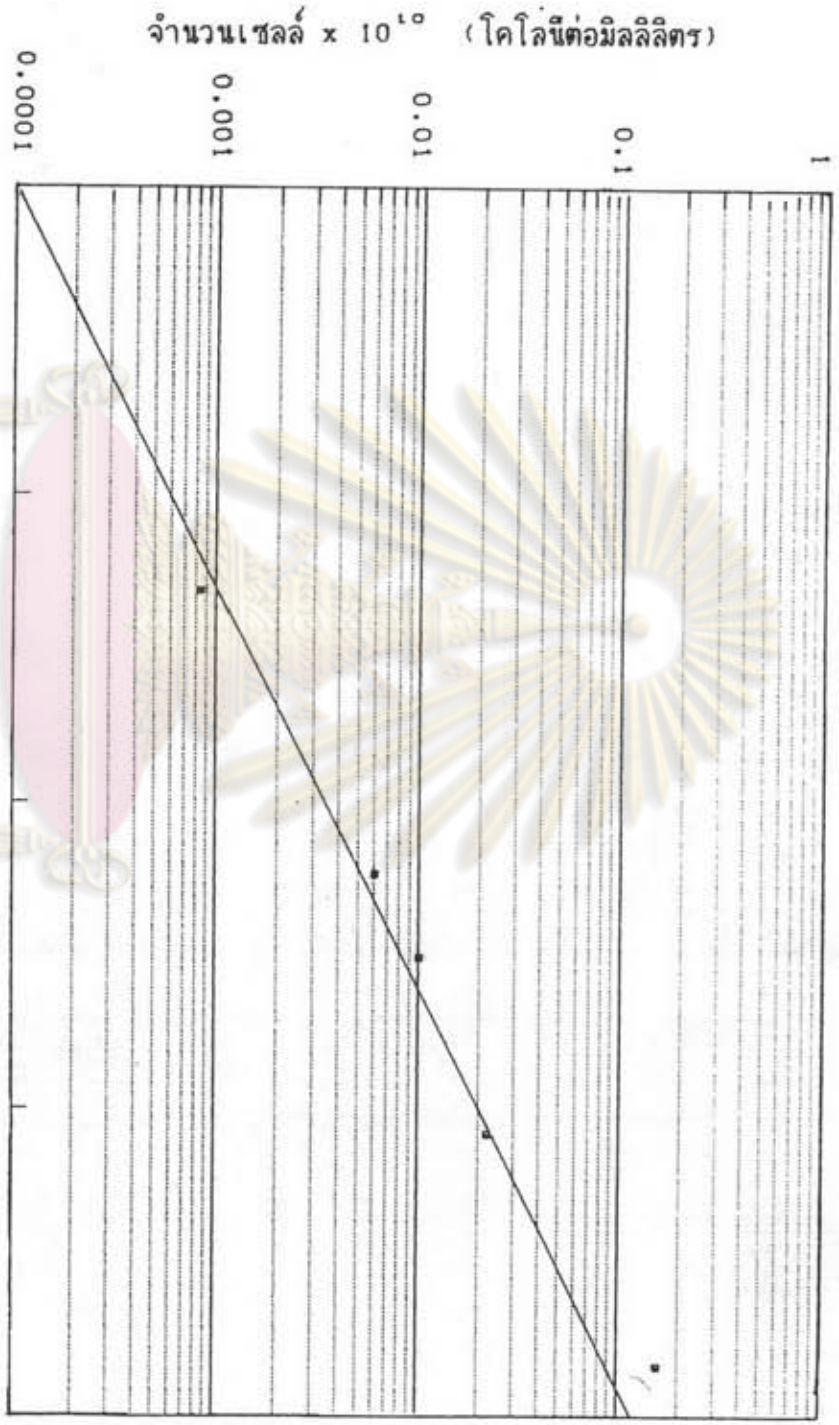
3) การวัดการดูดกลืนแสง

เตรียมเครื่อง Spectrophotometer โดยตั้งความยาวคลื่นที่ 580 นาโนเมตร ใช้ Nutrient broth เป็น Blank ตั้ง 0 นำ culture จากข้อ 1 มาวัดการดูดกลืนแสง

นำค่าการดูดกลืนแสงและผลการจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมาสร้าง Standard curve ซึ่งผลการทดลองแสดงดังรูป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงและจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด



ภาคผนวก ช

การวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม (Analysis of Covarience)

การวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วมในแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design โดยกำหนดตัวแปรดังนี้

Treatment = จังหวัด (ระยอง, นครศรีธรรมราช, สุราษฎร์ธานี)

Dependent variable , y = Floatation time (sec)

Independent variable , x = Colony forming unit/ml

แปลงข้อมูลให้อยู่ในรูป Logarithm วิเคราะห์ความแปรปรวนร่วมตามขั้นตอนดังนี้

1) การตรวจสอบเอกภาพของสัมประสิทธิการถดถอย (Homogeneity of Regression Coefficients) โดยแต่ละ Treatment ไม่มีความแตกต่างระหว่างค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย จากผลการทดสอบพบว่า ไม่มีความแตกต่างระหว่างค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยในแต่ละ Treatment

2) ทดสอบสมมุติฐานว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างปริมาณคะตะเลสจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งทั้ง 3 แหล่ง ของการประมาณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยการตรวจสอบคะตะเลสแสดงผลการทดสอบในตาราง ANOCOVA

สมมุติฐานคือ $H_0 : \gamma_i = 0$

ANOCOVA

SOV	df	Sum of Squares and Product			Adjusted for Regression		
		xx	xy	yy	y	df	Mean Square
จังหวัด	2	2.538	-0.884	0.298	1.706	86	
Error	87	248.495	-86.22	31.664	1.723	88	0.01983
T+E	89	251.845	-87.104	31.942	0.0173	2	

วิเคราะห์ผลสรุป

$$F_o = \frac{(SSE - SSE)/(t-1)}{(SSE/t(r-1)-1)} = \frac{0.0173/2}{1.7057/86} = 0.436$$

$F_{0.10(2,86)} > F_o$ ดังนั้นยอมรับสมมุติฐานคือ ไม่มีความแตกต่างระหว่าง Treatment ซึ่งหมายถึงแหล่งของกุ้งไม่มีผลต่อการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยการใช้ Catalasemeter

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียกับ FT

สมมุติฐาน $H_o : \beta = 0$

$F_o = ((E_{xy})^2/E_{xx})/MSE = ((-86.22)^2/248.495))/1.705/86$

$F_o = 1508.94$

$F_o > F_{o.to(2,86)}$ ดังนั้นจึงปฏิเสธสมมุติฐานแสดงว่าปริมาณจุลินทรีย์มีความสัมพันธ์กับ Flotation time เป็นแบบเส้นตรงโดยมีค่าความชันคือ -0.34 โดยคำนวณจาก

$\beta = E_{xy}/E_{xx} = -86.22/248.495 = -0.34$

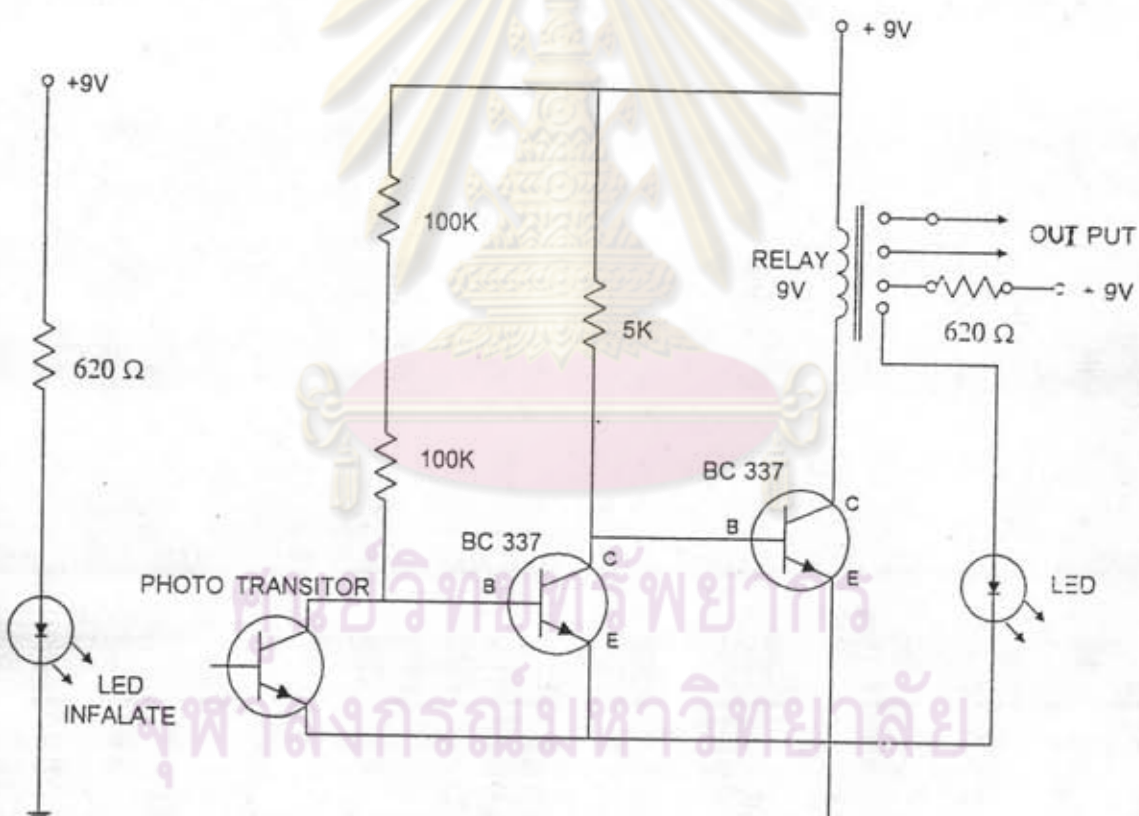
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ช

วงจรไฟฟ้าของ Catalasemeter

ช 1. วงจรไฟฟ้าของ โฟโต-เซลล์

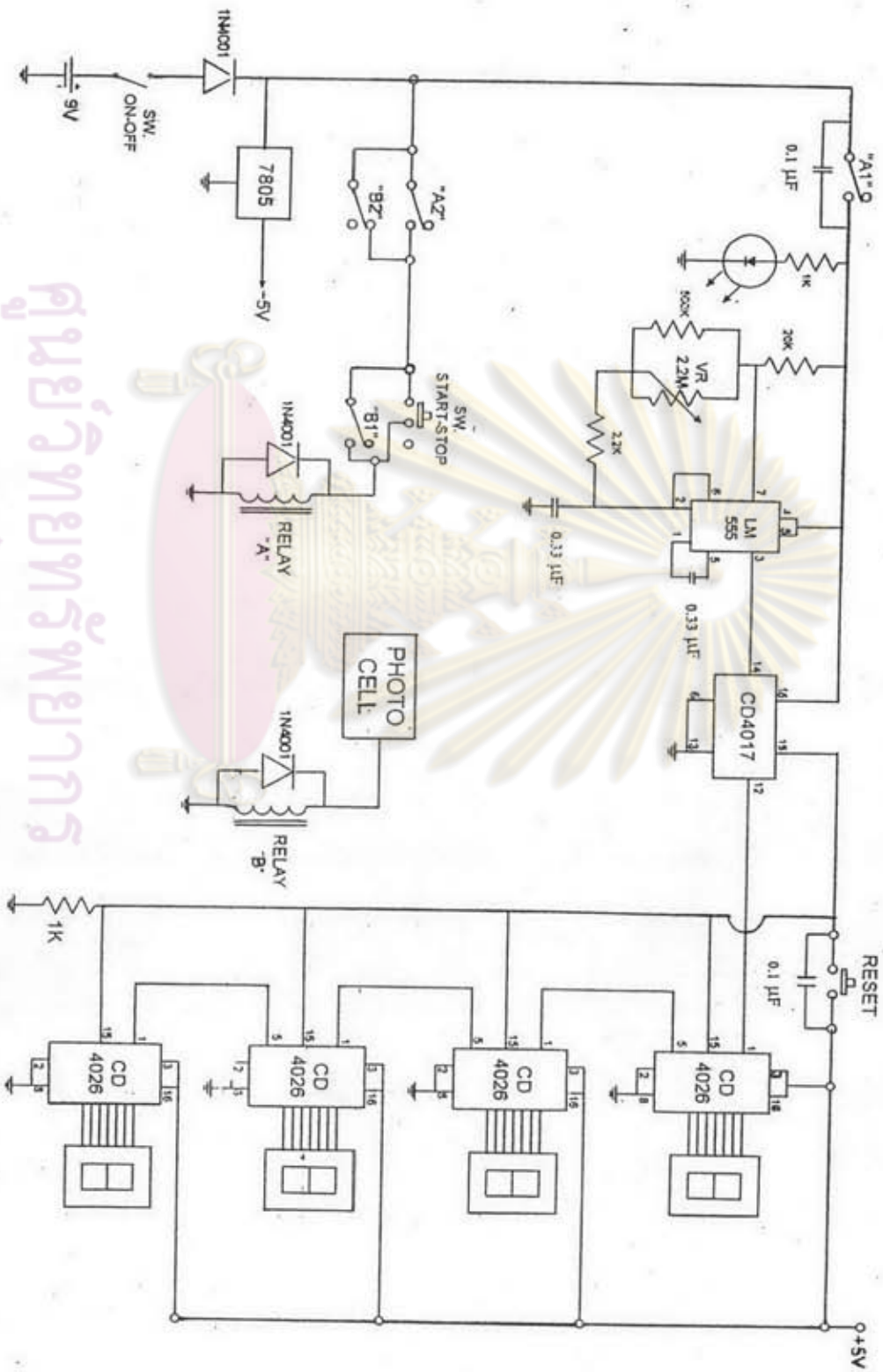
แสดงดังรูป



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข 2. วงจรไฟฟ้าของ Catalasemeter

แสดงวงจรดังรูป



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาว ชื่นจิต จันทน์วัฒนวงษ์ เกิดเมื่อวันที่ 21 พฤศจิกายน พ.ศ. 2512 ที่จังหวัดอุดรธานี สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ ในปีการศึกษา 2534 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2535

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย