หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกแบคทีเรียชอบเค็มสูงจากถังหมักน้ำปลา

ทำการแยกแบคทีเรียชอบเค็มสูงโดยนำของเหลวจากถังหมักปลา ที่ใช้ในการทดลองของสาโรจน์ (สาโรจน์ ประเสริฐศิริวัฒน์, 2531) ซึ่งใช้ปลาหมักกับเกลือในอัตราส่วน 3:1 ใช้เวลาในการหมักนานประมาณ 3 เดือน (จำนวนปลาประมาณ 30 กิโลกรัม ใช้ปลาไส้ตันและเกลือเม็ดจากจังหวัดชุมพร) การเก็บตัวอย่างน้ำปลาเป็นแบบสุ่ม 3 ระดับ คือ ระดับผิวบน ระดับกลาง และระดับล่างของถังหมัก ระดับละ 6 จุด จุดละประมาณ 5 มิลลิลิตร โดยใช้ลูกยางและปิเปตที่ปราศจากเชื้อดูดน้ำปลาใส่ในฟลาสก์ที่ปราศจากเชื้อ นำมาเจือจางให้เข้ากันแล้วทำให้เจือจางด้วยน้ำเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ กระจายเชื้อ (spread plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 (Medium 73) (Norberg & Hofsten, 1969, ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ซึ่งเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้แบคทีเรียชอบเค็มสูงเท่านั้นที่เจริญได้ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 7-10 วัน เก็บโคโลนีเดี่ยวในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง (slant) เพื่อทำการทดลองต่อไป

2. การคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่ผลิตเอนไซม์เจลลาทินเนส (gelatinase) บนอาหารวุ้น

ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่ผลิตเอนไซม์เจลลาทินเนส โดยการจุด (spot) แบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 1 ลงบนอาหารวุ้นมีเดียม 73 ซึ่งเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 15,20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 7-10 วัน นำมาตรวจผลโดยการราดทับด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว (saturated ammonium sulfate) ซึ่งจะตกตะกอนเจลลาทินในอาหารเลี้ยงเชื้อเห็นเป็นสีขาวขุ่น ถ้าแบคทีเรียชอบเค็มสูงเชื้อใดผลิตเอนไซม์เจลลาทินเนส จะย่อยสลายเจลลาทินในอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดเป็นบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนี ถ้าไม่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนีแสดงว่าโคโลนีนั้นไม่มีการขับเจลลาทินเนสออกมานอกเซลล์

3. การคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่ผลิตเอนไซม์เคซิเนส (caseinase) บนอาหารวุ้น

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่ผลิตเอนไซม์เคซิเนส โดยการจุด (spot) เชื้อแบคทีเรียที่เก็บไว้จากข้อ 1 ลงบนอาหารวุ้นมีเดียม 73 ดัดแปลง (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ซึ่งใส่ skim milk 1.0 เปอร์เซ็นต์ แทนเจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ

37 องศาเซลเซียส นาน 7-10 วัน ตรวจผลโดยการสังเกตบริเวณใสรอบโคโลนี ถ้าแบคทีเรียชอบเค็มสูงเชื้อใดมีเอนไซม์เคซิเนส จะย่อยสลาย skim milk เกิดเป็นบริเวณใสรอบโคโลนี ถ้าไม่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนีแสดงว่าโคโลนีนั้นไม่มีการขับเคซิเนสออกมานอกเซลล์

4. การหาความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายเจลลาตินและเคซิอีนของแบคทีเรียชอบเค็มที่คัดเลือกไว้

นำแบคทีเรียชอบเค็มสูง 5 ไอโซเลทคือไอโซเลทหมายเลข 1,8,13,14 และ 19 ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง (slants เป็นเวลา 7-10 วัน ทำให้เจือจางลงครั้งละ 10 เท่าด้วยน้ำเกลือ 25 เปอร์เซนต์ จะได้แบคทีเรียชอบเค็มสูงที่ทำให้เจือจางแล้วดังนี้ คือ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} นำแต่ละ dilution มา 0.1 มล. กระจายให้ทั่วบนจานเลี้ยงเชื้อซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) กับจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ดัดแปลง (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน เลือกจานเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีเดี่ยว วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีและบริเวณใสรอบโคโลนี คำนวณหาอัตราส่วนระหว่าง เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนีต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี เปรียบเทียบอัตราส่วนที่ได้จากการทดลอง

5. การคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่ผลิตเอนไซม์เคซิเนสในอาหารเหลว

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่ผลิตเอนไซม์เคซิเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่มีการขับโปรติเอสออกนอกเซลล์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมีเดียม 73 เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25 เปอร์เซ็นต์ เขย่า 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บเชื้อทุกวัน นาน 8 วัน นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (nm) เพื่อดูการเจริญ ส่วนหนึ่งนำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นแรงสูง (centrifuge Beckman J2-21)10,000 รอบต่อนาที (rotor JA-14) ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์แล้วนำส่วนน้ำใสไปหาแอคติวิตี (activity) ของเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีของ Norberg และ Hofsten (1969) อีกส่วนหนึ่งนำไปหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (1951)

วิธีหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีของ Norberg และ Hofsten (1969) นำส่วนน้ำใส 1.0 มิลลิลิตร ผสมกับ 1.0 มิลลิลิตรของ 1.0 เปอร์เซ็นต์เคซิอีนใน 0.1 โมลาร์ทริชบัฟเฟอร์ pH 8.0 ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาและตกตะกอนโปรตีนด้วยการเติม 2.0 มิลลิลิตร ของ 10 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid, ภาคผนวก ข หมายเลข 2) แช่น้ำแข็ง 20 นาที

กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 5 นำส่วนน้ำใสไปวัดการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer (Hitachi 220A)

วิธีทำกราฟมาตรฐานของไทโรซีน (Tyrosine)

ผสม 1.0 มิลลิลิตรของสารละลายไทโรซีนที่มีความเข้มข้น 0-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับ 1.0 มิลลิลิตรของ 0.1 โมลาร์ทริชบัฟเฟอร์ pH 8 ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 60 นาที เติม 2.0 มิลลิลิตร ของ 10 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรคลอโรอะซิติก นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

วิธีหาปริมาณโปรตีนของ Lowry

นำสารละลายตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร ผสมกับรีเอเจนต์ C 5.0 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมรีเอเจนต์ D ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หาค่าโปรตีนโดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้ bovine serum albumin (Sigma Co.) เป็นโปรตีนมาตรฐาน รายงานแอคติวิตีของเอนไซม์โดยให้หนึ่งหน่วย (unit)ของเอนไซม์แอคติวิตีหมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย 1.0 เปอร์เซ็นต์ เคซีอีนได้ 1.0 ไมโครกรัมไทโรซีนในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

6. การคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสม

ทำการคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเอนไซม์เคซิเนส โดยเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงซึ่งคัดเลือกจากข้อ 5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 5 ชนิด ได้แก่

- Tryptone-yeast extract-salt medium (ภาคผนวก ก หมายเลข 3)
- Complex medium of Sehgal and Gibbons (ภาคผนวก ก หมายเลข 4)
- Complex medium of Dundas (ภาคผนวก ก หมายเลข 5)
- Halobacterium medium broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 6)
- Medium 73 (ภาคผนวก ก หมายเลข 1)

เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 100 รอบต่อนาที เก็บเชื้อทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 8 วัน เพื่อนำมาวัดความเจริญและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส และนำมาหาค่าปริมาณโปรตีนดังได้อธิบายแล้วในข้อ 5

7. การปรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

ทำการปรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยการเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกได้จากข้อ 5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีเดียม 73 ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 100 รอบต่อนาที เก็บเชื้อทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 8 วัน เพื่อนำมาวัดความเจริญและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส และนำมาหาค่าปริมาณโปรตีนดังได้อธิบายแล้วในข้อ 5

8. การทดลองหาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสม

8.1 การใช้เจลลาทินเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแร่ต่าง ๆ (mineral salts) เช่นเดียวกับในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีเดียม 73 ไม่มีผงสกัดจากยีสต์ แต่มีเจลลาทินที่มีความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน (ภาคผนวก ก หมายเลข 7) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 100 รอบต่อนาที เก็บเชื้อทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 8 วันแล้วนำไปวัดการเจริญของเชื้อ และวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส ตามวิธีของ Norberg และ Hofsten (1969) และหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry ดังอธิบายแล้วในข้อ 5

8.2 การทดลองเมื่อใส่เจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

8.2.1 การแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแร่ต่าง ๆ เช่นเดียวกับในมีเดียม 73 ใส่เจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน ซึ่งได้แก่ กรดแคสอะมิโน 0.1 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และผงสกัดจากยีสต์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 8) วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

8.2.2 การแปรความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแร่ต่าง ๆ เช่นเดียวกับในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 โดยมีเจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์เป็น 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 9) ทำการวัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตาม

016544

I 10306596

รายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

8.2.3 การแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแร่ต่าง ๆ เช่นเดียวกับในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 โดยมีเจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ ผงสกัดจากยีสต์ 0.5 เปอร์เซตน์ แล้วแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เป็น 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 10) วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

8.2.4 การแปรความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโน

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแร่ต่าง ๆ เช่นเดียวกับในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 โดยมีเจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโน เป็น 0.1,0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 11) วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

8.2.5 การแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ เมื่อใส่ผงสกัดจากยีสต์ 0.05 เปอร์เซ็นต์

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแร่ต่าง ๆ เช่นเดียวกับในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ใส่เจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ ผงสกัดจากยีสต์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็น 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 12) วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

8.2.6 การแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ เมื่อใส่กรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแร่ต่าง ๆ เช่นเดียวกับในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ใส่เจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ กรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็น 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 13) วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8.3 การทดลองเมื่อใส่เจลลาทิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

8.3.1 การแปรความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแร่ต่าง ๆ เช่นเดียวกับในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ใส่เจลลาทิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์เป็น 0.1, 0.2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 14) วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

8.3.2 การแปรความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโน

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแร่ต่าง ๆ เช่นเดียวกับในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ใส่เจลลาทิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโน 0.5 0.1 0.2 และ 0.5 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 15) วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

8.3.3 การแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ เมื่อใส่ผงสกัดจากยีสต์ 0.05 เปอร์เซ็นต์

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแร่ต่าง ๆ เช่นเดียวกับในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ใส่เจลลาทิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ผงสกัดจากยีสต์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เป็น 0.05 และ 0.1 ปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 16) วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

8.3.4 การแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ เมื่อใส่กรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแร่ต่าง ๆ เช่นเดียวกับในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ใส่เจลลาทิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ กรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เป็น 0.05 และ 0.1 ปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 17) วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

8.4 การทดลองเมื่อใส่เจลลาทิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

8.4.1 การแปรความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแร่ต่าง ๆ เช่นเดียวกับในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ใส่เจลลาทิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์เป็น 0.1, 0.2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 18) วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

8.4.2 การแปรความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโนเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแร่ต่าง ๆ เช่นเดียวกับในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ใส่เจลลาทิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโนเป็น 0.1, 0.2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 19) วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

8.5 การใช้กลูโคส (glucose) เป็นแหล่งคาร์บอนแทนเจลลาทิน แล้วแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแร่ต่าง ๆ เช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ มีเดียม 73 ยกเว้นใช้กลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน แทน 1.0 เปอร์เซ็นต์ เจลลาทิน แปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ 1.0 เปอร์เซ็นต์ของ กรดแคสอะมิโน แอมโมเนียมคลอไรด์ และผงสกัดจากยีสต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 20) วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

9. <u>การแปรความเข้มข้นของเกลือแร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

9.1 การแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตและโปแตสเซียมคลอไรด์ โดยคงความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ 0.02 เปอร์เซ็นต์

9.1.1 การแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต เมื่อไม่เติมโปแตสเซียมคลอไรด์

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ กรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ไม่เติมโปแตส

เซียมคลอไรด์ แล้วแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตดังนี้ 0.0, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 21) วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

9.1.2 การแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต เมื่อเติมโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.25 เปอร์เซ็นต์

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเจลลาติน 1.0 เปอร์เซ็นต์ กรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ และโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.25 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตดังนี้ 0.0, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 22) วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

9.1.3 การแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต เมื่อเติมโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเจลลาติน 1.0 เปอร์เซ็นต์ กรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ และโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตดังนี้ 0.0, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 23) วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

9.1.4 การแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต เมื่อเติมโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.75 เปอร์เซ็นต์

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเจลลาติน 1.0 เปอร์เซ็นต์ กรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ และโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.75 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตดังนี้ 0.0, 0.5,1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 24) วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

9.2 การแปรความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ กรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต แล้วแปรความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ดังนี้ 0.0, 0.01, 0.02 และ 0.04 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 25) วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

10. <u>การแปรความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับสูตรอาหาร</u>

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงสูตรอาหารจากการทดลองข้อ 8 และ 9 โดยมีเจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ กรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์ โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีแมกนีเซียมซัลเฟต แล้วปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 (ภาคผนวก ก หมายเลข 26) วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

11. <u>การแปรอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่คัดเลือกได้จากข้อ 10</u>

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่คัดเลือกไว้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 9 ซึ่งมีเจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ กรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีแมกนีเซียมซัลเฟต ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 45 และ 50 องศาเซลเซียส วัดการเจริญของเชื้อและหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนส รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรายละเอียดที่อธิบายแล้วในข้อ 5

12. <u>การแปรความเป็นกรดด่างในสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์หาโปรติเอสในรูปของเคซิเนสแอคติวิตี</u> (assay medium)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกไว้ 5 วัน นำมาปั่นตกตะกอนเซลล์ดังรายละเอียดในข้อ 5 นำน้ำใสมาวิเคราะห์โดยวิธีของ Norberg และ Hofsten (1969) เพื่อหาโปรติเอสในรูปของเคซิเนสแอคติวิตี assay medium ที่ใช้มีการแปรความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 (ภาคผนวก ข

หมายเลข 4)

13. <u>การศึกษาโครงสร้างภายในและภายนอกของแบคทีเรียชอบเค็มสูงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน</u> (Electron microscope)

13.1 การศึกษาโครงสร้างภายในด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบทรานสมิชชัน (Transmission Electron Microscope)

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงสายพันธุ์หมายเลข 8 บนอาหารวุ้นมีเดียม 73 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน นำมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดไม่เกิน 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร นำมาตรึงส่วนประกอบภายใน (fixation) ใน 2.5 เปอร์เซ็นต์กลูตาอัลดีไฮด์ ซึ่งอยู่ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 โซเดียมคลอไรด์ 25 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ที่ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 25 เปอร์เซ็นต์ผสมกับแคลเซียมคลอไรด์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ post-fix ด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ออสเมียมเตรดตรอคไซด์ (Osmium tetroxide)ในโซเดียมคลอไรด์ 25 เปอร์เซ็นต์กับแคลเซียมคลอไรด์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ pH 7.0 นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นแช่ใน 2 เปอร์เซ็นต์ยูเรนิลอะซิเตท (Uranyl acetate) 30 นาทีขจัดน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) ด้วยเอทธานอล 35, 70, 95 เปอร์เซ็นต์อย่างละ 15 นาทีและแอบโซลูท เอทธานอล (absolute ethanol) ครั้งละ 15 นาที 2 ครั้ง แล้วแช่ในสารละลายที่เป็นส่วนผสมของเอทธานอลกับบพลาสติค (Araldite) ในสัดส่วน 1:1 เป็นเวลา 1 คืน แล้วจึงฝังในพลาสติค อบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 1 คืน, 45 และ 60 องศาเซลเซียสอย่างละ 1 วัน แล้วตัดตัวอย่างให้มีความหนาประมาณ 80 นาโนเมตร ด้วยเครื่องตัด ultramicrotome LKB Model V ย้อมด้วยยูเรนิลอะซิเตท และเลดซิเตรท (lead citrate) จากนั้นศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบทรานสมิชชัน JEOL Model JEM-200 CX ด้วยความต่างศักดาไฟฟ้า 80 กิโลโวลต์ ถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบทรานสมิชชัน โดยใช้ฟิล์มสำหรับอิเล็คตรอนไมโครสโคป FG orthochromatic (FUJI)

13.2 การศึกษารูปร่างภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบสแกนนิง (Scanning Electron Microscope)

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงสายพันธุ์หมายเลข 8 บนอาหารวุ้นมีเดียม 73 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 0.5 ลูกบาศก์มิลลิเมตรทำ fixation, post-fixation และ dehydration ด้วยเอทธานอลความเข้มข้นต่าง ๆ เช่นเดียวกับข้อ 13.1 แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องทำให้ตัวอย่างแห้งที่จุดวิกฤต (critical point dryer) Model BALZER ติดตัวอย่างลงบน

แท่งทองเหลืองสำหรับวางตัวอย่าง (stub) นำไปฉาบทองด้วยเครื่อง Ion sputter (BALZER) แล้วจึงนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบสแกนนิง (JEOL Model JSM-T20) ด้วยความต่างศักดาไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์ ถ่ายภาพด้วยฟิล์ม Verichrome pan VP 120 (KODAK)

14. การศึกษาลักษณะบางประการของแบคทีเรียชอบเค็มสูง เพื่อเป็นแนวทางในการจัดจำแนกเชื้อโดยยึดแนวทางการจัดจำแนกเชื้อตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Noel, 1984)

14.1 การติดสีแกรม ใช้วิธีย้อมของ H.P. Dussault (Dussault, 1955) นำแบคทีเรียชอบเค็มผสมกับน้ำเกลือเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ นำไปเขี่ยให้กระจายบนกระจกสไลด์ ทิ้งให้แห้ง ผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง แช่ในกรดอะซิติคเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที เพื่อล้างเกลือออก ย้อมด้วยคริสตอลไวโอเลตนาน 1-2 นาที ล้างน้ำ หยดสารละลายแกรมไอโอดีน ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างน้ำ ล้างด้วยเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ รีบล้างน้ำทันที ย้อมด้วย Ziehl-Neelson's carbofuchsin นาน 30 วินาที ล้างน้ำซับแห้ง

14.2 การเคลื่อนที่ ใส่เชื้อแบคทีเรียชอบเค็มแบบปักตรง (stab inoculation) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Motility test medium (ภาคผนวก ก หมายเลข 27) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 25 เปอร์เซ็นต์ ถ้าแบคทีเรียเจริญนอกรอยปักแสดงว่าเคลื่อนที่ได้

14.3 การสร้างเอนไซม์คาตาเลส หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) ลงบนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ถ้ามีฟองกาซเกิดขึ้น แสดงว่ามีเอนไซม์คาตาเลส

14.4 การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ใช้ Platinum loop หรือแท่งแก้วแตะแบคทีเรียชอบเค็ม นำมาขีดบนกระดาษกรอง Whatman no. 1 ซึ่งชุบสารละลาย Tetramethy-p-phenylenediamine dihydrochloride เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 9) สังเกตการเปลี่ยนแปลงภายใน 1 นาที ถ้ามีสีม่วงเกิดขึ้นตามแนวที่ขีด แสดงว่าแบคทีเรียมีเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส

14.5 การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส ใส่เชื้อแบคทีเรียชอบเค็มในอาหารเหลวยูเรีย (ภาคผนวก ก หมายเลข 28) สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของฟีนอลเรดในอาหารจากสีเหลืองส้มเป็นสีชมพู แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสย่อยยูเรียได้

แอมโมเนีย ทำให้อาหารมีสภาพเป็นด่าง

14.6 การรีดิวส์ไนเตรท ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลวมีเดียม 73 เติมโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตรวจผลโดยใช้น้ำยาทดสอบไนไตรท์ ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย ก และสารละลาย ข (ภาคผนวก ข หมายเลข 10) โดยหยดน้ำยาดังกล่าวอย่างละ 5 หยด ถ้ามีสีแดงแสดงว่าไนเตรทถูกรีดิวส์เป็นไนไตรท์ ถ้าไม่เกิดสีแดงนำไปทดสอบต่อโดยใส่ผงสังกะสีลงไปเล็กน้อย ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่าไนเตรทถูกรีดิวส์ด้วยผงสังกะสี ถ้าไม่เกิดสีแดง เนื่องจากไนเตรทถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์โดยแบคทีเรียแล้ว

14.7 การสร้างอินโดล ปลูกแบคทีเรียชอบเค็มลงในอาหารเหลวมีเดียม 73 (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ซึ่งเพิ่มจำนวนทริพโตนเป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสารอินโดลที่เกิดขึ้นโดยใช้น้ำยาโคแวค (ภาคผนวก ข หมายเลข 11) โดยหยดโคแวค 2-3 หยดลงในหลอดทดสอบที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ถ้าเกิดสีแดงลอยอยู่บนผิวหน้าอาหาร แสดงว่าแบคทีเรียนั้นมีความสามารถสร้างอินโดลได้

14.8 ความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรท ปลูกเชื้อลงในอาหาร Phenol red broth base (ภาคผนวก ก หมายเลข 29) คาร์โบไฮเดรทที่ใช้ทดสอบได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส แมนโนส ฟรุคโตส ไรโบส มอลโตส แลคโตส และซูโครส โดยเติมลงไป 1.0 เปอร์เซ็นต์ สังเกตการสร้างกรดและกาซ ถ้าแบคทีเรียใช้คาร์โบไฮเดรทได้จะสร้างกรดขึ้นมา ทำให้อาหารที่มีฟีนอลเรดเป็นดัชนีเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง ถ้าแบคทีเรียทำให้เกิดกาซได้ กาซจะเข้าไปแทนที่อาหารในหลอดดักกาซ

14.9 การย่อยไขมัน ปลูกเชื้อแบคทีเรียแบบจุด (point inoculation) ลงบนอาหารทดสอบไขมัน (ภาคผนวก ก หมายเลข 30) ในจานเลี้ยงเชื้อ ถ้าเกิดตะกอนขุ่นขาวรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรีย แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสย่อยทวีน 80 ได้

14.10 การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ปลูกเชื้อแบบปักตรง (stab inoculation) ลงในอาหาร Triple Sugar Iron agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 31) ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีดำ แสดงว่าแบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์

14.11 การใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน ปลูกเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Simon citrate agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 32) ถ้าบรอมไธมอลบลูเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าแบคทีเรียสามารถใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนได้

14.12 การเจริญใน anaerobic agar ปลูกเชื้อแบบปักตรงตลอดความลึกของอาหาร Thioglycolate agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 33) สังเกตการเจริญของแบคทีเรีย ถ้าเจริญบนผิวหน้าของอาหารแสดงว่าเป็นแบคทีเรียพวก aerobe ถ้าสามารถเจริญในส่วนลึกของอาหารได้ แสดงว่าเป็นแบคทีเรียพวก facultative anaerobe