บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ที่สำคัญ

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น Centrikon T-42K ของบริษัท Kontron Instrument Inc., Germany

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman, USA

เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA

เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries, Inc., USA

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น RO-8 ของบริษัท Memmert, Western Germany

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Psychrotherm controlled environment incubator shaker) รุ่น 6-21 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย (Tryptic soy broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

อาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

อาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบเม็ดขนาดต่างๆ ของบริษัท Grobest, Thailand

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. *Bacillus* S11

เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก แยกและคัดเลือกสายพันธุ์จากลำไส้กุ้งกุลาดำที่มีสุขภาพดี โดยวรรนิภา เพี้ยนภักตร์ (2539) ใช้สำหรับเตรียมเซลล์เพื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

2. *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526

ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ค้นคว้าการเลี้ยงกุ้งเครือเจริญโภคภัณฑ์ ใช้สำหรับทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียม *Bacillus* S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก

เลี้ยง *Bacillus* S11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (ภาคผนวก ก. ข้อ2) บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30^0 ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.หลังจากนั้นแยกเซลล์โดยการตกตะกอนด้วยแคลเซียมคลอไรด์ในปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง จากนั้นนำเซลล์สดที่กรองได้ไปใช้ผสมอาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูป (ภาคผนวก ก. ข้อ 13)

2. การเตรียมอาหารกุ้งกุลาดำผสม *Bacillus* S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก

นำเซลล์สด *Bacillus* S11 จากข้อ 1 ผสมกับอาหารกุ้งกุลาดำในอัตราส่วน 1:3 น้ำหนักต่อน้ำหนักโดยใช้เซลล์สด *Bacillus* S11 หนึ่งส่วนต่ออาหารกุ้งกุลาดำสามส่วน (วรรนิภา เพี้ยนภักตร์, 2539) คลุกให้เข้ากันดีกระจายไม่ให้อาหารติดเป็นก้อนเก็บใส่ภาชนะที่สะอาดในตู้เย็น

ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในอาหารกุ้งกุลาดำ จำนวน *Bacillus* S11 ที่ผสมในอาหารกุ้งกุลาดำทันทีและในระหว่างการจัดเก็บ โดยวิธี total plate count

3. เตรียมบ่อเลี้ยงกุ้ง

เตรียมบ่อดินเพื่อใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ขนาดประมาณ 1,000 ตร.ม.ต่อบ่อ จำนวน 2 บ่อ ความลึกของบ่อประมาณ 1.5 เมตร ณ ตำบลบึงบอน อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี ซึ่ง

เป็นพื้นที่ที่มีสภาพแบบดินเปรี้ยวผสมดินเค็ม ทำการตากบ่อไว้ประมาณ 2 สัปดาห์ จากนั้นปล่อยน้ำเข้าให้มีความลึกประมาณ 1.0-1.3 เมตร และปรับแต่งน้ำให้มีความเค็มประมาณ 4 ส่วนในพันส่วน (ppt) ติดตั้งเครื่องตีน้ำเพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำ

4. เพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 100 วัน

4.1 การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1

กุ้งกุลาดำระยะ postlarvae 24 (PL24) จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา นำมาเลี้ยงในบ่อดินขนาด 1,000 ตร.ม. ที่เตรียมไว้ (ภาคผนวก ฉ) บรรจุน้ำเค็ม 4 ส่วนในพันส่วน ปล่อยกุ้ง 40,000 ตัวต่อบ่อ (40 ตัวต่อตร.ม.) ให้อากาศด้วยเครื่องตีน้ำแบบใบพัด ทำการเลี้ยงกุ้งโดยใช้ระบบการเลี้ยงแบบปิด (Closed System) (Fast และ Menasveta, 1998)และให้อาหาร 3 เวลาต่อวัน การทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1. กลุ่มควบคุม (Control) คือกลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปโดยไม่ผสมเซลล์ *Bacillus* S11
2. กลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปผสมเซลล์สด *Bacillus* S11 หนึ่งมื้อทุกวัน

4.2 การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 2

กุ้งกุลาดำระยะ postlarvae 24 (PL24) จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา นำมาเลี้ยงในบ่อดินที่เตรียมไว้ บรรจุน้ำเค็ม 4 ส่วนในพันส่วน ปล่อยกุ้ง 30,000 ตัวต่อบ่อ (30 ตัวต่อตร.ม.) ให้อากาศด้วยเครื่องตีน้ำแบบใบพัด ทำการเลี้ยงกุ้งโดยใช้ระบบปิดและให้อาหาร 3 เวลาต่อวัน การทดลองใช้บ่อดิน 2 บ่อโดยทั้ง 2 บ่อให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปผสมเซลล์สด *Bacillus* S11 หนึ่งมื้อทุกวัน

4.3 การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 3

กุ้งกุลาดำระยะ postlarvae 25 (PL25) จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา นำมาเลี้ยงในบ่อดินที่เตรียมไว้ บรรจุน้ำเค็ม 4 ส่วนในพันส่วน ปล่อยกุ้ง 40,000 ตัวต่อบ่อ (40 ตัวต่อตร.ม.) ให้อากาศด้วยเครื่องตีน้ำแบบใบพัด ทำการเลี้ยงกุ้งโดยใช้ระบบปิดและให้อาหาร 3 เวลาต่อวัน การทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1. กลุ่มควบคุม (Control) คือกลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปโดยไม่ผสมเซลล์ *Bacillus* S11
2. กลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปผสมเซลล์สด *Bacillus* S11 1 มื้อทุกวัน

4.4 การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 4

กุ้งกุลาดำระยะ postlarvae 25 (PL25) จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดชลบุรี จำนวน 1,920 ตัว นำมาเลี้ยงในกระชังขนาด 2 ตร.ม. ในบ่อดินเดียวกันขนาดประมาณ 600 ตร.ม. (ภาคผนวก ฉ) บรรจุน้ำเค็ม 4 ส่วนในพันส่วน ปล่อยกุ้ง 80 ตัวต่อกระชัง (40 ตัวต่อตร.ม.) ให้อากาศด้วยหัวทรายตลอดเวลา ทำการเลี้ยงกุ้งโดยใช้ระบบปิดและให้อาหาร 3 เวลาต่อวัน การทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1. กลุ่มควบคุม (Control) คือกลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปโดยไม่ผสมเซลล์ *Bacillus* S11 มี 12 กระชัง (12 ซ้ำ)

2. กลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปผสมเซลล์สด *Bacillus* S11 หนึ่งมื้อทุกวัน มี 12 กระชัง (12 ซ้ำ)

4.5 การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 5

กุ้งกุลาดำระยะ postlarvae 15 (PL15) จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดชลบุรี จำนวน 960 ตัว นำมาเลี้ยงกระชังขนาด 2 ตร.ม. ในบ่อดินเดียวกันขนาด 600 ตร.ม. บรรจุน้ำเค็ม 4 ส่วนในพันส่วน ปล่อยกุ้ง 80 ตัวต่อกระชัง (40 ตัวต่อตร.ม.) ให้อากาศด้วยหัวทรายตลอดเวลา ทำการเลี้ยงกุ้งโดยใช้ระบบปิดและให้อาหาร 3 เวลาต่อวัน การทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1. กลุ่มควบคุม (Control) คือกลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปโดยไม่ผสมเซลล์ *Bacillus* S11 มี 6 กระชัง (6 ซ้ำ)

2. กลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปผสมเซลล์สด *Bacillus* S11 หนึ่งมื้อทุกวัน มี 6 กระชัง (6 ซ้ำ)

การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1 ทำการศึกษาทุก 15 วัน การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 2 3, 4 และ 5 จะทำการศึกษาเหมือนกันทุก 20 วัน โดยแต่ละครั้งจะทำการศึกษา ดังนี้

1. น้ำหนักตัว (กรัม) และ ความยาว (ซม.) ของกุ้งกุลาดำ

2. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยวิธี Total plate count

3. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยวิธี Total plate count

4. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำ โดยวิธี Total plate count

จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และ *Bacillus* S11 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ส่วน *Vibrio* spp. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลล์ซูโครส (ภาคผนวก ก ข้อ 4)

5. ตรวจสอบคุณภาพน้ำบางประการระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ดังนี้

- แอมโมเนียม (NH_4^+) ใช้ Ammonium test kit บริษัท Merck, Germany
- ไนไตรท์ (NO_2^-) ใช้ Nitrite test kit บริษัท Merck, Germany
- ฟอตเฟต (PO_4^{3-}) ใช้ Phosphate test kit บริษัท Merck, Germany
- อัลคาลินิตี (Alkalinity) ใช้ Phosphate test kit บริษัท Merck, Germany
- อุณหภูมิ ใช้ Thermometer
- ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ใช้ DO meter
- พีเอช ใช้ pH meter
- ความเค็ม ใช้ Refractometer

เมื่อเลี้ยงกุ้งครบตามกำหนดจะทำการจับกุ้งขึ้นจากบ่อเพื่อเช็คการรอดชีวิต (%) ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแต่ละครั้ง

5. การทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (challenge test)

นำกุ้งกลุ่มการทดลองละ 45-50 ตัว ที่เหลือจากการเพาะเลี้ยงกุ้งในแต่ละครั้งจากข้อ 4.2 4.4 และ 4.5 มาเลี้ยงในบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 80x87x87 ซ.ม. บรรจุความเค็ม 4 ส่วนในพันส่วน ประมาณ 400 ลิตร ให้อากาศตลอดเวลา ปรับสภาพกุ้งให้คุ้นเคยกับสภาพบ่อทดลองเป็นเวลา 3 วัน และค่อยๆ ปรับความเค็มให้เป็น 20 ส่วนในพันส่วน ก่อนทำการทดลอง

เพาะเลี้ยง *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอยที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) บนเครื่องเขย่าที่ 30^0 ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เวลา 18-24 ชม. หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่ 4^0 ซ เวลา 15 นาที เก็บเซลล์สด และหาจำนวน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในเซลล์สด 1 กรัม ด้วยวิธี Total plate count โดยใช้อาหารแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครสเพื่อใช้คำนวนจำนวน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 ที่ต้องการเติมในน้ำเลี้ยงกุ้ง

ปรับ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 ให้มีความเข้มข้น 10^7 CFU/ml (สมบัติ รักประทานพร, 2541) ในน้ำเพาะเลี้ยงกุ้ง ทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค 8 วัน ติดตามผลการทดลองดังนี้

1. การตายสะสม (cumulative mortality) ติดตามผลทุกวัน

2. จำนวน *Bacillus* S11 และ *Vibrio harveyi* ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ด้วยวิธี Total plate count ติดตามผลทุก 2 วัน

3. จำนวน *Bacillus* S11 และ *Vibrio harveyi* ในลำไส้กุ้งกุลาดำ ด้วยวิธี Total plate count ติดตามผลทุก 2 วัน

จำนวน *Bacillus* S11 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย ส่วน *Vibrio harveyi* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครส

6. การทดสอบหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

สุ่มตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่ตาย (การทดลองละ 10 ตัว) มาทดสอบยืนยันผลว่ากุ้งตายเนื่องจาก *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 นำเฮปพาโตแพเครียส (hepatopancreas) ของกุ้งกุลาดำที่ตาย ลำไส้ และน้ำเลี้ยงกุ้งระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ไปเพาะหาเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครส บ่มที่ 37^0 ซ เป็นเวลา 18-24 ชม.แยกโคโลนีให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ นำไปทดสอบลักษณะทางชีวเคมีพร้อมกับ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เพื่อจำแนกว่าเป็น *Vibrio harveyi* ตามการจำแนกใน Bergey' s Mannual of Systematic Bacteriology (Baumann และ Schubert, 1986) โดยตรวจสอบลักษณะรูปร่างและชีวเคมี และการติดสีแกรม

ลักษณะรูปร่างและชีวเคมี

การติดสีแกรม

นำแบคทีเรียที่เจริญในอาหารแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครส มาย้อมดูการติดสีแกรม (ภาคผนวก ข ข้อ 1-4) ดูรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

การทดสอบการเคลื่อนที่

ปลูกเชื้อลงบนอาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test medium) (ภาคผนวก ก ข้อ 5) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1% โดยแทงเข็มเขี่ยเชื้อลงไปจนสุดหลอดทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37^0 ซ ถ้าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้จะมีรอยการเจริญออกจากรอยที่แทงไว้

การสร้างคะตะเลส

ใช้เชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) อายุ 24 ชม. มากระจายลงบนแผ่นใสที่สะอาด หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3% ลงบนเชื้อ ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสให้ได้ผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่เกิดฟองก๊าซแสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสให้ได้ผลเป็นลบ

การสร้างออกซิเดส

หยดสารละลายเตตระเมทธิลพาราฟีนิลไดเอมีนไดไฮโดรคลอไรด์ (Tetramethyl paraphenydiamine dihydrochloride) เข้มข้น 1% (ภาคผนวก ข ข้อ 5) ลงบนกระดาษกรองจนชุ่มแล้วใช้ลวดพลาทินัมเขี่ยเชื้อจากอาหารแข็งทริปติกซอย ป้ายบนกระดาษกรอง ถ้าเกิดสีม่วงขึ้นภายใน 10 วินาที แสดงว่าผลเป็นบวก สีที่เกิดขึ้นเนื่องจากแบคทีเรียมีการสร้างไซโตโครมออกซิเดส (Cytochrome oxidase) โดย N,N,N,N-Tetramethyl-p-phenylene-diamine) dihydrochloride ถูกออกซิไดซ์โดย oxidized cytochrome c จะเกิดสีม่วงของ Wurster's blue ถ้าไม่เกิดสีม่วง แสดงว่าแบคทีเรียไม่สร้าง cytochrome oxidase

การทดสอบการสร้างอินโดล

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลวทริปโตเฟน (Tryptophane broth) (ภาคผนวก ก ข้อ 6) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1 % บ่มที่อุณหภูมิ 37^0 ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบการสร้างอินโดโดยหยดสารละลายโคแวคส์ (Kovac's reagent) (ภาคผนวก ข ข้อ 6) 1-2 หยด ถ้าเกิดสีชมพูแสดงว่าเชื้อสร้างทริปโตฟราเนส (Tryptophanase) ย่อยสลายทริปโตเฟนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อินโดล ถ้าไม่เกิดสีแสดงว่าผลเป็นลบ

การทดสอบการออกซิไดซ์และการหมัก

ปลูกเชื้อลงในอาหาร Huge and Leifson' s O-F medium (ภาคผนวก ก ข้อ 11) อีกหลอดหนึ่งทำให้อยู่ในสภาพขาดอากาศโดยเทพาราฟินเหลวปิดหน้าประมาณ 2 ซม. นำทั้ง 2 หลอดบ่มที่ 37^0 ซ เป็นเวลา 48 ชม. ดูการเปลี่ยนสีของอาหารและการเกิดก๊าซ โดยอาหารจะ

เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง เฉพาะหลอดที่ไม่ได้เทพาราฟิน แสดงว่าเป็น Oxidation แต่ถ้าเกิดเปลี่ยนสีทั้ง 2 หลอดแสดงว่าเป็น Fermentation

การใช้ไนเตรท

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลวไนเตรท (Nitrate broth) (ภาคผนวก ก ข้อ 7) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1% บ่มที่อุณหภูมิ 37^{0} ซ เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจสอบไนไตรท์ที่เกิดขึ้นโดยการเติมกรดซัลฟานิลิก (Sulfanilic acid) 2-3 หยด และแอลฟาแนพทิลลามีน (α-napthylamine) (ภาคผนวก ข ข้อ 8) ลงไปตามลำดับ ถ้าเกิดสีแดงภายใน 30 วินาที ให้ผลเป็นบวก สีแดงที่เกิดขึ้นเนื่องจากไนไตรท์ที่เกิดขึ้น ทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟานิลิก ได้สารประกอบประเภทเกลือไดอะโซเนียม (Diazonium) และเกลือที่ได้นี้จะรวมตัวกับแอลฟาแนพทิลลามีน ทำให้เกิดสีแดงของอะโซดาย (Azodye) ที่ละลายน้ำได้ แต่ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงให้ผลเป็นลบ บางครั้งไนไตรท์ที่เกิดขึ้นทั้งหมดจะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย อาหารจึงไม่เปลี่ยนสี ดังนั้นจึงต้องใส่ผงสังกะสีลงไปทดสอบ ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง เนื่องจากสังกะสีไปดึงออกซิเจนจากไนเตรทให้กลายเป็นไนไตรท์ แสดงว่าเชื้อไม่สามารถใช้ไนเตรทได้ให้ผลเป็นลบ ถ้าไม่เกิดสีแดงแสดงว่าไนไตรท์เปลี่ยนเป็นแอมโมเนียหมดจึงให้ผลเป็นบวก

การทดสอบเมทิลเรด

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์-วีพี (ภาคผนวก ก ข้อ 8) บ่มที่อุณหภูมิ 37^{0} ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยหยดสารละลายเมทิลเรด (ภาคผนวก ข ข้อ 9)

การทดสอบเมทิลคาร์บินอล (Voges proskauer test)

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์-วีพี (ภาคผนวก ก ข้อ 8) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1% บ่มที่อุณหภูมิ 37^{0} ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบโดยการเติมแอลฟาแนพทอล(α-napthol) 5% ปริมาตร 0.3 มล. (ภาคผนวก ข ข้อ 7) แล้วจึงใส่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40% ปริมาตร 0.2 มล. เขย่าให้ผสมกัน ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นภายใน 10 นาที หรือ 24 ชม. แสดงว่าแบคทีเรียมีการผลิตอะซิโตอิน (Acetoin) จากวัฏจักรบิวทีรีนไกลคอล (Butylene glycol pathway) ซึ่ง 40% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ จะเปลี่ยนกลับให้อะซิโตอินกลายเป็นไดอะซิทิล (Diacetyl) และเกิดสารประกอบสีแดง โดยการเร่งปฏิกิริยาของแอลฟาแนพทอล ให้บันทึกผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีแดงให้ผลเป็นลบ

การใช้ซิเตรท

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารซิมมอนส์ซิเตรท (Simmon' s citrate agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 10) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1% บ่มที่อุณหภูมิ 37^0 ซ เป็นเวลา 2-7 วัน เชื้อที่สามารถใช้ซิเตรทได้จะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ในอาหารจากสีเขียวกลายเป็นสีน้ำเงิน เนื่องจากเชื้อสามารถใช้โซเดียมซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้แอมโมเนียที่มีสมบัติเป็นเบส ทำให้บรอมไธมอลบลู เปลี่ยนจากสีเขียวกลายเป็นสีน้ำเงิน ถ้าเชื้อไม่สามารถใช้โซเดียมซิเตรทได้อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีเขียวเหมือนเดิม

การทดสอบความสามารถในการทนเกลือ

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนิวเตรียนท์ ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0-10% บ่มที่อุณหภูมิ 37^0 ซ เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยดูความขุ่นของเชื้อที่ขึ้นในอาหาร ถ้าเชื้อเจริญเกิดความขุ่นให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เจริญให้ผลเป็นลบ

การทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1% บ่มที่อุณหภูมิ 37^0 ซ เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูการเจริญของเชื้อตามรอยที่เขี่ยเชื้อ ถ้าเชื้อเจริญเกิดความขุ่นให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เจริญให้ผลเป็นลบ

การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเหลวทดสอบการใช้น้ำตาล (ภาคผนวก ก ข้อ 9) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1% บ่มที่อุณหภูมิ 37^0 ซ เป็นเวลา 18-24 ชม. สังเกตการสร้างกรด ถ้าเชื้อสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้จะสร้างกรด ทำให้อินดิเคเตอร์บรอมไธมอลบลูในอาหารเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลืองให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีให้ผลเป็นลบ

7.วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลแต่ละการทดลอง

โดยใช้ Duncan' s multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%