บทที่ 2

อุปกรณ์ และ วิธีการ

1. อุปกรณ์ และ เครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองเป็นอุปกรณ์จากห้องปฏิบัติการหน่วยจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. อาหาร (Media) อาหารทุกชนิดจะต้องผ่านการฆ่าเชื้อ (Sterilization) ด้วยอุ้อบความกันไอน้ำ ซึ่งวิธีเตรียมได้แสดงไว้ในภาคผนวก ข

2.1 อาหารเพาะแยกเชื้อ Vibrio spp.

Thiosulfate-citrate-bile salt sucrose agar(TCBS)

2.2 อาหารทดสอบ Vibrio spp.

อาหารที่ใช้ทดสอบเชื้อ Vibrio spp. ทุกชนิดจะเติม Sodium chloride ให้มีความเข้มข้นเป็น 3 % (3 % NaCl) ยกเว้นอาหารบางชนิดที่ต้องเติมตามความเข้มข้นที่แตกต่างไปตามความต้องการ ซึ่งจะได้กล่าวเป็นรายๆไป

Thiosulfate-citrate-bile salt sucrose agar(TCBS)

Blood agar (BA)

Nutrient agar (NA)

Marine agar (MA)

Nutrient broth (NB)

Gluconate broth

Indole test medium

Triple sugar iron agar (TSI)

Glucose phospahate medium (MR-VP broth)

Urea medium

Lecithovitellin agar (egg yolk agar)

O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside broth(ONPG)

Mueller Hinton medium (MHA)

Potassium cyanide broth (KCN broth)

012882

Simon's citrate agar

Casein agar

DNase test medium

Gelatin agar

Hippurate agar

Starch agar

Tyrosine agar

Tween 80 medium

Nitrate broth

Hugh-Leifson medium (H&L medium)

Broth sugar เติม 1% ของ glucose, mannose, fructose, galactose, maltose, saccharose, mannitol, starch, glycerol, arabinose, xylose, lactose, melibiose, raffinose, melezitose, adonitol, dulcitol, inocitol, sorbitol, sorbose และ cellobiose.

Medium for carbon utilization test เติม 0.2% ของ organic acids คือ acetate, benzoate, citrate, formate, pyruvate, succinate, malonate, tartrate, oxalate, butylate, n-valerate, lactate, D-malate, D-glutamate, L-serine, L-proline, L-histidine และ fumarate.

Decarboxylase medium เติม 0.5% ของ L-arginine, L-lysine และ L-ornithine

3. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ Vibrio spp. เตรียมตามสูตรที่ปรากฏในภาคผนวก ข

3.1 น้ำยาที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อ Vibrio spp.

Solution A (0.8% sulfanilic acid in 5N acetic acid)

Solution B (0.5% α-naphthlamine in 5N acetic acid)

Hydrogen peroxide solution 3%

Cytochrome oxidase reagent

Benedict solution

Indole reagent (Kovac's reagent)

Methyl red solution

Voges-Proskauer test reagent

O/129 (Disk paper)

1 N HCl

Acid mercuric chloride

Lugol's iodine solution

3.2 น้ำยาที่ใช้ย้อมเซลล์

3.2.1 Gram staining

Crystal violet solution

Iodine solution

Safranin O solution

Alcohol 95%

3.3.2 Flagella staining

Flagella stain

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>วิธีการ</u>

1. เชื้อที่ทำการศึกษา

1.1 เชื้อ Vibrios ที่แยกได้จากบริเวณอ่าวไทยตอนใน จำนวน 97 สายพันธุ์ (strains) โดยแยกได้จาก หอยแมลงภู่ 32 strains, หอยนางรม 6 strains, น้ำ 13 strains, ดิน 34 strains, และ ปลาทรายขาว 12 strains (ดังรายละเอียดที่แสดงไว้ในตารางที่ 3 และ 4)

1.2 เชื้อ Vibrios ที่ทำการพิสูจน์ชนิดแล้ว และ Reference strains ซึ่งได้รับจาก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จำนวน 15 strains (ดังรายละเอียดที่แสดงไว้ในตารางที่ 5)

2. วิธีแยกเชื้อที่ทำการศึกษา

2.1 ตัวอย่าง และ สถานที่เก็บตัวอย่าง

2.1.1 ตัวอย่างหอย

2.1.1.1 หอยแมลงภู่

เก็บในบริเวณปากแม่น้ำสมุทรสงคราม 1สถานี คือ สถานี L_4 และ บริเวณอ่าวบ้านแหลม จ.เพชรบุรี3 สถานี คือ สถานี L_1, L_2 และL_3 (ดังปรากฏในแผนที่รูปที่ 2) บริเวณอ่างศิลา 1สถานี คือ สถานี M_1 และ อ.เมือง จ.ชลบุรี 1 สถานี คือ สถานี M_2 (ดังปรากฏในแผนที่รูปที่ 3)

2.1.1.2 หอยนางรม

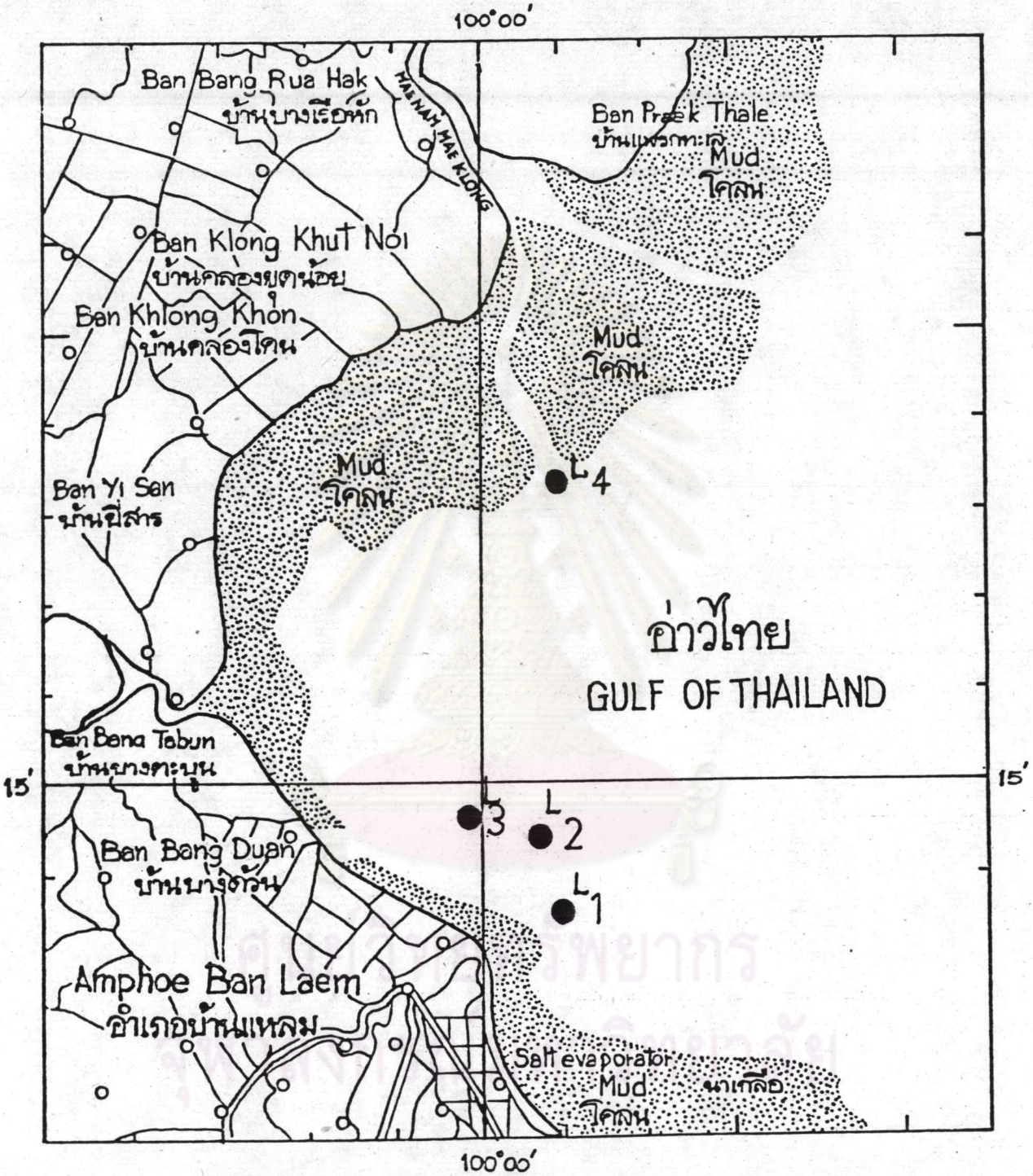
เก็บในบริเวณอ่างศิลา 1 สถานี คือ สถานี O_1 และ บ้านบางโปรง จ. ชลบุรี1 สถานี คือ สถานี O_2 (ดังปรากฏในแผนที่รูปที่ 3)

2.1.2 ตัวอย่างน้ำ

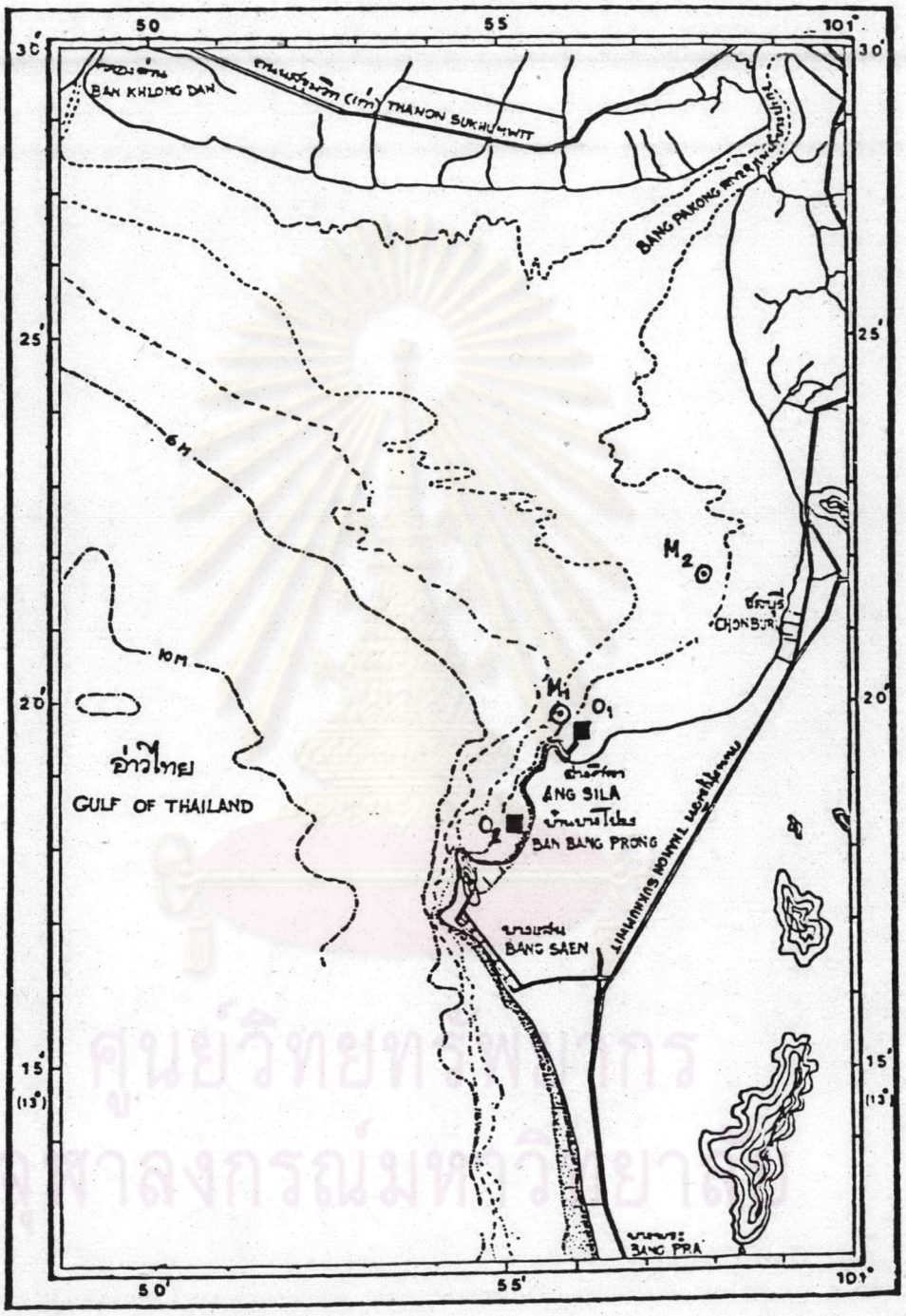
เก็บในบริเวณปากแม่น้ำสมุทรสงคราม 1 สถานี คือ สถานี L_4 และ บริเวณอ่าวบ้านแหลม จ.เพชรบุรี 3 สถานี คือ สถานี L_1, L_2 และ L_3 (ดังปรากฏในแผนที่รูปที่ 2) บริเวณปากแม่น้ำปราณบุรี อ.ปราณบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์ 4 สถานี คือ สถานี B_1, B_2, B_3 และ B_4 (ดังปรากฏในแผนที่รูปที่ 4)

2.1.3 ตัวอย่างดิน

เก็บในบริเวณเดียวกันกับตัวอย่างน้ำ



รูปที่ 2 แผนที่แสดงสถานีเก็บตัวอย่าง หอยแมลงภู่, น้ำ และ ดิน ในบริเวณอ่าวบ้านแหลม จ.เพชรบุรี

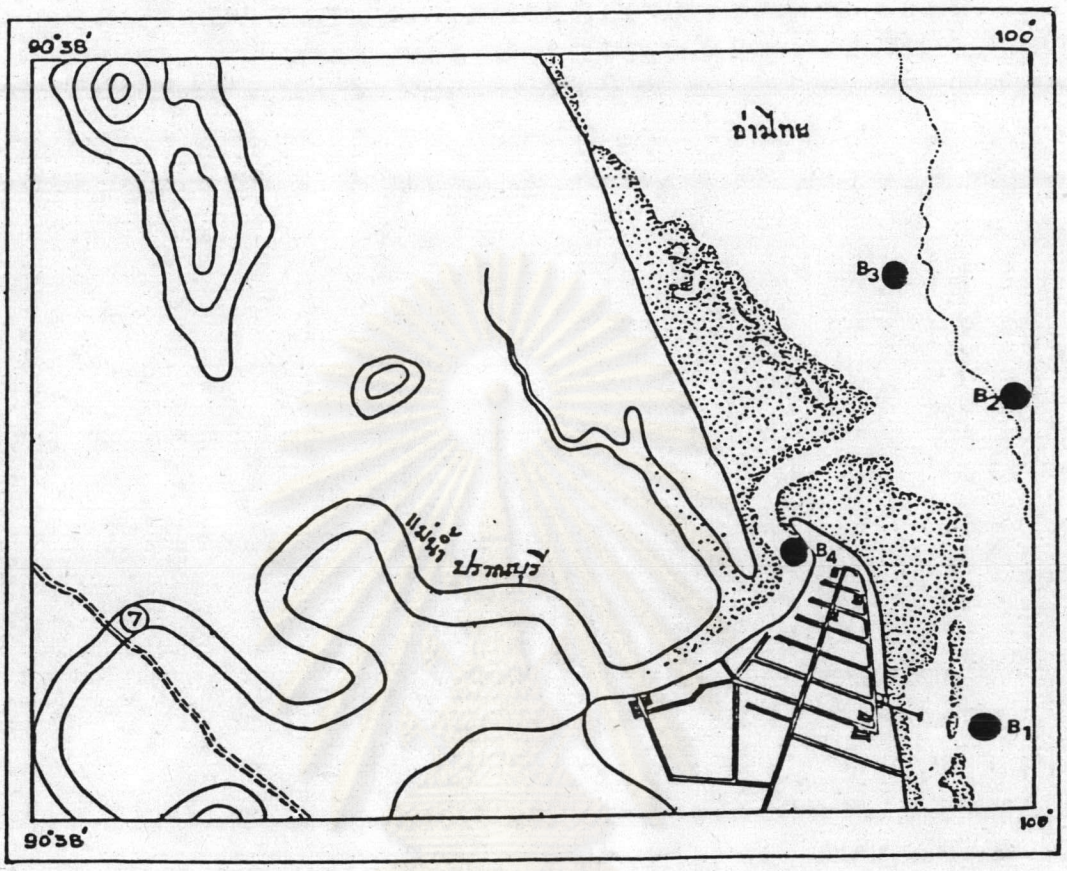


รูปที่ 3 แผนที่แสดงสถานีเก็บตัวอย่างบริเวณ ต.อ่างศิลา, ต.บ้านบางโปรง และ อ.เมือง จ.ชลบุรี

■ ตัวอย่างหอยนางรม : สถานี O_1 และ O_2

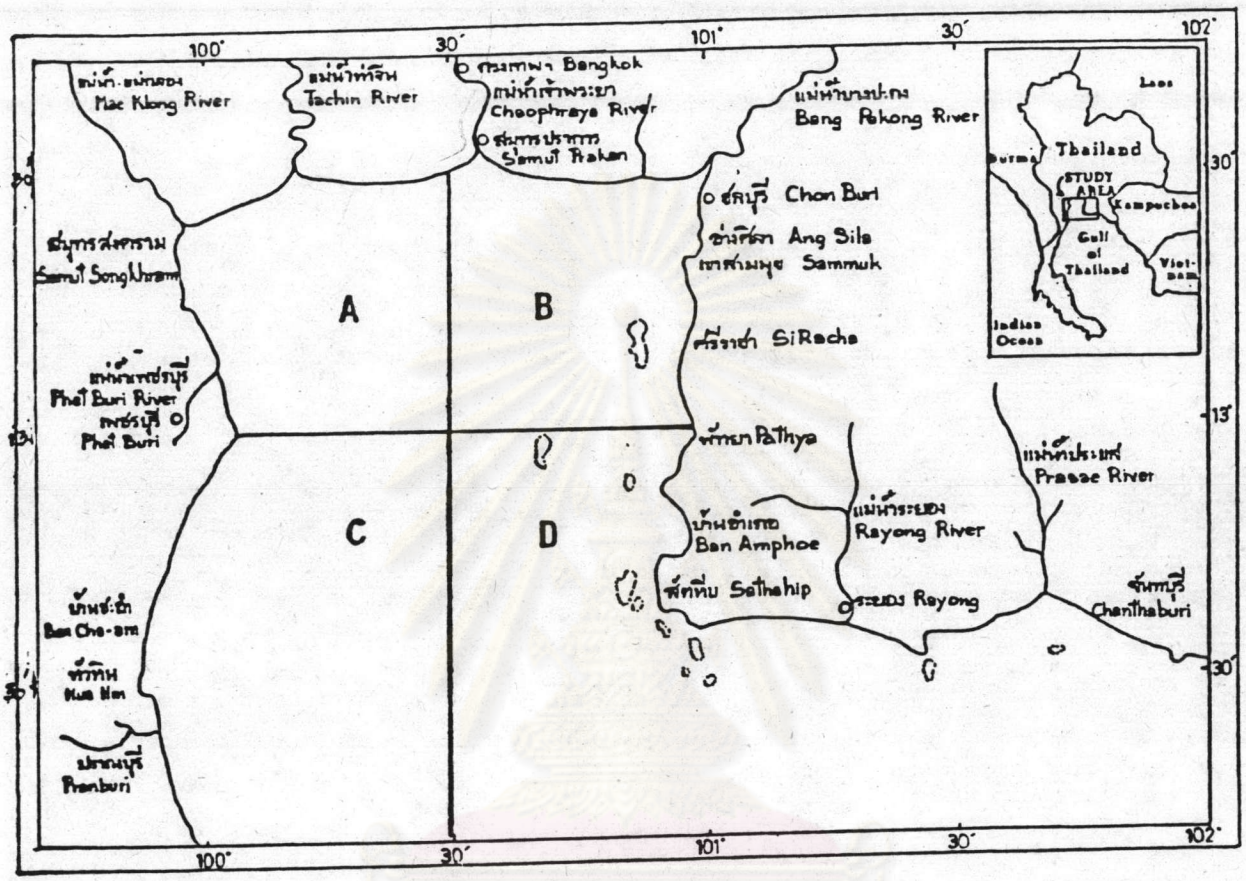
⊙ ตัวอย่างหอยแมลงภู่ : สถานี M_1 และ M_2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 แผนที่แสดงสถานีเก็บตัวอย่าง ดิน และ น้ำ ในบริเวณปากแม่น้ำปราณบุรี อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์ 4 สถานี คือ สถานี B_1, B_2, B_3 และ B_4 ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 แผนที่แสดงสถานีเก็บตัวอย่างปลาทรายขาว โดยอวนลากหน้าดิน บริเวณ zone A , อ่าวไทยตอนใน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.4 ตัวอย่างปลา

เก็บจากการลากอวน โดยเรือสำรวจแหล่งประมง 2 บริเวณอ่าวไทยตอนใน ในเดือนพฤษภาคม 2528 ในบริเวณ A (ดังปรากฏในแผนที่รูปที่ 5)

2.2 วันที่เก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างระหว่างเดือน เมษายน 2528 ถึง เดือนตุลาคม 2528 รายละเอียดได้แสดงไว้ในตารางที่ 4

2.3 วิธีการเก็บตัวอย่าง

2.3.1 ตัวอย่างหอย

เก็บตัวอย่างหอยแต่ละชนิด บรรจุลงในถุงพลาสติกทันทีที่ขึ้นจากเรือประมง แล้วนำมายังห้องปฏิบัติการทันที

2.3.2 ตัวอย่างน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำบริเวณใต้ผิวหน้าน้ำประมาณ 10-30 ซม. ใส่ขวดบรรจุที่มีปริมาตร 5 ลิตร นำมายังห้องปฏิบัติการทันที

2.3.3 ตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดิน โดยใช้ Grabs ใส่ในขวดพลาสติกปากกว้างที่มีปริมาตร 500 มล. นำมายังห้องปฏิบัติการทันที

2.3.4 ตัวอย่างปลา

เก็บตัวอย่างปลา หลังจากลากอวน ใส่ถุงพลาสติก นำไปแช่แข็งทันที หลังจากเรือปฏิบัติการเสร็จ นำตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการทันที

2.4 การเตรียมตัวอย่างเพื่อแยก และ นับเชื้อ

2.4.1 ตัวอย่างหอย

นำตัวอย่างหอยที่เก็บมานั้น ล้างทำความสะอาดเปลือกหอยด้วย 95% Alcohol แล้วผ่าด้วยมีดที่ฆ่าเชื้อแล้วด้วย 95% Alcolhol แยกเฉพาะเนื้อหอย ใส่ petridish ที่ฆ่าเชื้อแล้ว

2.4.2 ตัวอย่างปลา

คัดเอาเฉพาะอวัยวะภายใน ด้วยปากคีบ, มีด และกรรไกร ที่ฆ่าเชื้อแล้วด้วย 95% Alcohol

2.5 การเตรียมส่วนผสมเนื้อเดียวกัน (Homogeneous)

2.5.1 ตัวอย่างหอย

นำตัวอย่างหอย 10 กรัม ใส่ลงใน sterile Voltex Beaker แล้วเติม Peptone Salt Dilution (PSD) ประมาณ 40 มล. ทำการปั่นด้วยเครื่องปั่นละเอียด (MSE Homogenizer) จากความเร็วต่ำ แล้วค่อยๆ เพิ่มความเร็วขึ้นนาน 5 นาที จึงเติม PSD อีก 50 มล. ที่เหลือลงในขวด ทำให้ได้ส่วนผสมเนื้อเดียวกันที่มีความเข้มข้นเป็น 10^{-1}

2.5.2 ตัวอย่างปลา ทำเช่นเดียวกัน ข้อ 2.5.1

2.5.3 ตัวอย่างดิน ทำเช่นเดียวกัน ข้อ 2.5.1

2.6 การเตรียมความเจือจางของส่วนผสมเนื้อเดียวกัน

2.6.1 ตัวอย่างหอย

ทำ serial dilution โดยนำส่วนผสมเนื้อเดียวกัน ของตัวอย่างหอยในขวด Voltex Beaker ที่มีความเจือจาง 10^{-1} ดูดมา 1 มล. โดยใช้ sterile pipette 10 มล. ลงใน PSD 9 มล. ในหลอดทดลองจะได้ความเจือจาง 10^{-2} จากหลอดที่มีความเข้มข้น 10^{-2} ใช้ sterile pipette ดูดมา 1 มล. ลงใน PSD 9 มล. จะได้สารผสมเนื้อเดียวกันของตัวอย่างหอยที่มีความเจือจาง 10^{-3}

2.6.2 ตัวอย่างน้ำทะเล

ดูดตัวอย่างน้ำทะเล ด้วย sterile pipette 10 มล. มา 1 มล. ใส่ใน PSD 9 มล. ในหลอดทดลองจะได้ส่วนผสมเนื้อเดียวกันของน้ำที่มีความเจือจาง 10^{-1}

2.6.3 ตัวอย่างดิน

ทำ serial dilution เช่นเดียวกับตัวอย่างหอย

2.7 การแยกเชื้อ Vibrios จากตัวอย่าง

ทำการแยกเชื้อ Vibrios จากตัวอย่างต่างๆ โดยใช้ selective media คือ Thiosulfate-citrate- bile salt-sucrose agar

2.7.1 ตัวอย่างหอย

นำตัวอย่างหอยแมลงภู่ และ หอยนางรม ที่มีความเจือจาง 10^{-1},10^{-2},10^{-3} มาทำการเพาะแยกเชื้อ โดยใช้ sterile pipette 1 มล. ดูดตัวอย่างมา 0.1 มล. หยดลงบน TCBS แล้วใช้ pasteur pipette ที่โค้งงอเป็นรูปสามเหลี่ยม เกลี่ยให้ทั่ว plate นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง นับจำนวน colony บน TCBS ที่มีลักษณะเป็น Vibrios และ บันทึกลักษณะรูปร่าง colony ที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม

2.7.2 ตัวอย่างน้ำ

นำตัวอย่างน้ำ ที่มีความเจือจาง 10^{0} และ 10^{-1} มาทำการเพาะแยกเชื้อ Vibrios เช่นเดียวกับข้อ 2.6.1

2.7.3 ตัวอย่างดิน และ ตัวอย่างปลา

นำตัวอย่างดิน และ ตัวอย่างปลา ที่มีความเจือจาง 10^{-1},10^{-2}และ 10^{-3} มาทำการเพาะแยกเชื้อ Vibrios เช่นเดียวกับข้อ 2.6.1

2.8 การทำเชื้อ Vibrios ให้บริสุทธิ์

นำเอา colony ที่มีลักษณะเป็น Vibrios คือ จะมีลักษณะ colony สีเขียวไส ขนาด 2 - 3 มม., colony สีเหลือง ขนาด 3 -5 มม. ผิวด้านบนยกนูนขึ้นชัดเจน, colony สีเหลือง ขนาดใหญ่ ประมาณ 4 -6 มม. ลักษณะ mucoid หรือ colony สีเหลืองขนาดเล็กมาก ประมาณ 1 - 2 มม. เป็นต้น มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำการ streak บน Nutrient agar ที่มี NaCl 3 % w/v (3% NA) นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 ° C นาน 24 ชั่วโมง นำ single colonyที่ได้มา streak บน 3% NA นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง อีกครั้งหนึ่ง

สำหรับ ลักษณะ colony ของเชื้อ Vibrios ที่พบจากตัวอย่างต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น ที่พบบน TCBS ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2,3

ตารางที่ 2 ลักษณะ colony ของเชื้อ Vibrios 5 กลุ่ม ที่จำแนกได้บน TCBS

กลุ่มที่	สี	ขนาด	ลักษณะอื่นๆ	สัญญลักษณ์
1	เขียวใส	2-4 mm.	รอบๆcolony ใส entire	Vp
2	เหลืองปนขาวคล้ายนม	3-6 mm.	mucoidบาง strain มีสีเหลืองตรงกลาง.ล้อมรอบด้วยสีขาวคล้ายนม.	MV-1
3	เหลือง	3-5 mm.	ผิวตรงกลางยกนูนขึ้น (umbonate)	MV-2
4	เหลืองใส	1-2 mm.	ผิว colonyโค้ง (convex)	MV-3
5	เขียวใส.	1.5-2 mm.	ลักษณะคล้ายกลุ่มที่ 1 แต่มีขนาดเล็กกว่า	MV-4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 จำนวนเชื้อ Vibrios แต่ละกลุ่มตามลักษณะครั้งแรกที่พบ(Primary culture)จากตัวอย่างชนิดต่างๆ

ลักษณะ colonyบน TCBS	จำนวน strainsของเชื้อ Vibrios					รวม
	น้ำ	กิน	หอยแมลงภู่	หอยนางรม	ปลาทรายขาว	
Vp	2	12	7	1	–	22
MV-1	–	11	8	–	8	27
MV-2	6	8	11	5	2	32
MV-3	3	–	–	–	–	3
MV-4	2	3	6	–	2	13
รวม	13	34	32	6	12	97

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แหล่งที่มาของเชื้อที่ทำการศึกษา

Strain no	แหล่งที่มา	สถานี	วันที่แยกเชื้อ
LMP-1102 : Vp	หอยแมลงภู่	L_1	29 เม.ย. 28
LMP-11101: MV-1	หอยแมลงภู่	L_1	29 เม.ย. 28
LMV-21103: MV-2	หอยแมลงภู่	L_1	29 เม.ย. 28
LMV-12101: MV-1	หอยแมลงภู่	L_2	29 เม.ย. 28
LMV-23102: MV-2	หอยแมลงภู่	L_3	29 เม.ย. 28
LMV-41102: MV-4	หอยแมลงภู่	L_1	29 เม.ย. 28
LMV-41112: MV-4	หอยแมลงภู่	L_1	29 เม.ย. 28
LMV-41103: MV-4	หอยแมลงภู่	L_1	29 เม.ย. 28
LMV-24102: MV-4	หอยแมลงภู่	L_4	29 เม.ย. 28
FV-11001 : MV-1	ปลาทรายขาว	Zone A	22 พ.ค. 28
FV-13001 : MV-1	ปลาทรายขาว	Zone A	22 พ.ค. 28
FV-16001 : MV-1	ปลาทรายขาว	Zone A	22 พ.ค. 28
FV-16002 : MV-1	ปลาทรายขาว	Zone A	22 พ.ค. 28
FV-16004 : MV-1	ปลาทรายขาว	Zone A	22 พ.ค. 28
FV-17002 : MV-1	ปลาทรายขาว	Zone A	22 พ.ค. 28
FV-18001 : MV-1	ปลาทรายขาว	Zone A	22 พ.ค. 28
FV-18002 : MV-1	ปลาทรายขาว	Zone A	22 พ.ค. 28
FV-25003 : MV-2	ปลาทรายขาว	Zone A	22 พ.ค. 28
FV-25004 : MV-2	ปลาทรายขาว	Zone A	22 พ.ค. 28
FV-41011 : MV-2	ปลาทรายขาว	Zone A	22 พ.ค. 28
FV-48001 : MV-4	ปลาทรายขาว	Zone A	22 พ.ค. 28
LWV-21101: MV-2	น้ำ	L_1	28 พ.ค. 28
LWV-31101: MV-3	น้ำ	L_1	28 พ.ค. 28

ตารางที่ 4 ต่อ

Strain no	แหล่งที่มา	สถานี	วันที่แยกเชื้อ
LMV-41101:MV-4	น้ำ	L_1	28 พ.ค. 28
LSV-13102:MV-1	ดิน	L_3	28 พ.ค. 28
BSP-4104 :Vp	ดิน	B_4	28 พ.ค. 28
BSV-13102:MV-1	ดิน	B_3	28 พ.ค. 28
BSV-23101:MV-2	ดิน	B_3	28 พ.ค. 28
BSV-23102:MV-2	ดิน	B_3	28 พ.ค. 28
BSV-23103:MV-2	ดิน	B_3	28 พ.ค. 28
BWV-23101:MV-4	น้ำ	B_4	28 พ.ค. 28
OP -1102 :Vp	หอยนางรม	O_1	15 มิ.ย. 28
OV -21002:MV-2	หอยนางรม	O_1	15 มิ.ย. 28
OV -21003:MV-2	หอยนางรม	O_1	15 มิ.ย. 28
OV -21005:MV-2	หอยนางรม	O_1	15 มิ.ย. 28
OV -21006:MV-2	หอยนางรม	O_1	15 มิ.ย. 28
OV -22002:MV-2	หอยนางรม	O_2	15 มิ.ย. 28
LSV-23201:MV-2	ดิน	L_3	23 ส.ค. 28
LSV-43202:MV-4	ดิน	L_3	23 ส.ค. 28
BSP-4202 :Vp	ดิน	B_4	23 ส.ค. 28
BSV-14201:MV-1	ดิน	B_4	23 ส.ค. 28
BSV-14203:MV-1	ดิน	B_4	23 ส.ค. 28
BSV-44201:MV-4	ดิน	B_4	23 ส.ค. 28
LMV-13201:MV-1	หอยแมลงภู่	L_3	23 ส.ค. 28
LMV-23202:MV-2	หอยแมลงภู่	L_3	23 ส.ค. 28
LMV-23204:MV-2	หอยแมลงภู่	L_3	23 ส.ค. 28

ตารางที่ 4 ต่อ

Strain no	แหล่งที่มา	สถานี	วันแยกเชื้อ
LMV-42201:MV-4	หอยแมลงภู่	L_2	23 ส.ค. 28
LMP-2202 :Vp	หอยแมลงภู่	L_2	23 ส.ค. 28
LMV-12201:MV-1	หอยแมลงภู่	L_2	23 ส.ค. 28
LMV-22201:MV-2	หอยแมลงภู่	L_2	23 ส.ค. 28
BSP-2103 :Vp	ดิน	B_2	23 ส.ค. 28
BSV-12101:MV-1	ดิน	B_2	23 ส.ค. 28
BSV-22101:MV-2	ดิน	B_2	23 ส.ค. 28
BWP-2102 :Vp	น้ำ	B_2	23 ส.ค. 28
BWV-22101:MV-2	น้ำ	B_2	23 ส.ค. 28
BWV-22102:MV-2	น้ำ	B_2	23 ส.ค. 28
BWV-22103:MV-2	น้ำ	B_2	23 ส.ค. 28
BWV-22104:MV-2	น้ำ	B_2	23 ส.ค. 28
BWV-32101:MV-3	น้ำ	B_2	23 ส.ค. 28
LWV-31201:MV-3	น้ำ	L_1	23 ส.ค. 28
LWV-21201:MV-2	น้ำ	L_1	23 ส.ค. 28
LMP-3301 :Vp	หอยแมลงภู่	L_3	30 ก.ย. 28
LMP-3302 :Vp	หอยแมลงภู่	L_3	30 ก.ย. 28
LMV-23301:MV-2	หอยแมลงภู่	L_3	30 ก.ย. 28
LMV-23302:MV-2	หอยแมลงภู่	L_3	30 ก.ย. 28
LMV-23303:MV-2	หอยแมลงภู่	L_3	30 ก.ย. 28
LMV-41201:MV-4	หอยแมลงภู่	L_1	30 ก.ย. 28
LMV-21201:MV-2	หอยแมลงภู่	L_1	30 ก.ย. 28
LMV-21202:MV-2	หอยแมลงภู่	L_1	30 ก.ย. 28

ตารางที่ 4 ต่อ

Strain no	แหล่งที่มา	สถานี	วันที่แยกเชื้อ
LMP-2301 :Vp	หอยแมลงภู่	L_2	30 ก.ย. 28
LMP-2304 :Vp	หอยแมลงภู่	L_2	30 ก.ย. 28
LMP-2306 :Vp	หอยแมลงภู่	L_2	30 ก.ย. 28
LMV-12301:MV-1	หอยแมลงภู่	L_2	30 ก.ย. 28
LMV-12306:MV-1	หอยแมลงภู่	L_2	30 ก.ย. 28
LWP-2102 :Vp	น้ำ	L_2	30 ก.ย. 28
LSP-1101 :Vp	ดิน	L_1	30 ก.ย. 28
LSP-1102 :Vp	ดิน	L_1	30 ก.ย. 28
BSP-1101 :Vp	ดิน	B_1	30 ก.ย. 28
BSV-21101:MV-2	ดิน	B_1	30 ก.ย. 28
BSV-21111:MV-2	ดิน	B_1	30 ก.ย. 28
BSP-1103 :Vp	ดิน	B_1	30 ก.ย. 28
BSV-21103:MV-4	ดิน	B_1	30 ก.ย. 28
BSV-41101:MV-4	ดิน	B_1	30 ก.ย. 28
BSP-3301 :Vp	ดิน	B_3	30 ก.ย. 28
BSP-3302 :Vp	ดิน	B_3	30 ก.ย. 28
BSP-3303 :Vp	ดิน	B_3	30 ก.ย. 28
BSP-3304 :Vp	ดิน	B_3	30 ก.ย. 28
BSP-3305 :Vp	ดิน	B_3	30 ก.ย. 28
BSV-13301:MV-1	ดิน	B_3	30 ก.ย. 28
BSV-13302:MV-1	ดิน	B_3	30 ก.ย. 28
BSV-13303:MV-1	ดิน	B_3	30 ก.ย. 28
BSV-13304:MV-1	ดิน	B_3	30 ก.ย. 28

ตารางที่ 4 ต่อ

Strain no	แหล่งที่มา	สถานี	วันที่แยกเชื้อ
BSV-13305:MV-1	ดิน	B_3	30 ก.ย. 28
1MV-10001:MV-1	หอยแมลงภู่	M_1	21 ต.ค. 28
LMV-13301:MV-1	ดิน	L_3	30 ก.ย. 28
2MV-40001:MV-4	หอยแมลงภู่	M_2	21 ต.ค. 28
LMV-12111:MV-1	หอยแมลงภู่	L_2	29 เม.ย. 28

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 รายละเอียดของเชื้อ Vibrios ที่พิสูจน์แล้ว และreference strain

Strain no.	Species	Coded
ATCC-19264	V. anguillarum	ATCC 19264
CFS -10001	V. alginolyticus	V 438/29
CFS -20001	V. mimicus	P 1587
CFS -30002	V. vulnificus	P 2033/28
CFS -40001	V. cholerae	VCI 29/29
CFS -50001	NAG	VNG 105/29
CFS -50002	NAG	VNG 106/29
GFS -70001	V. fluvialis	V 1277/28
CFS -70011	V. fluvialis	V 1277/28
CFS -70002	V. fluvialis	V 936/28
CFS -80001	V. parahaemolyticus	V 2067/28
CFS -80002	V. parahaemolyticus	V 2071/28
CFS -80003	V. parahaemolyticus	V 2064/28
CFS -80004	V. parahaemolyticus	V 2060/28
CFS -80005	V. parahaemolyticus	V 2074/28

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยพบทั้งหมด 5 กลุ่ม

2.9 การเก็บเชื้อ Vibrios เป็น stock culture

หลังจากได้ Vibrios ที่บริสุทธิ์ ทำการเก็บเชื้อ 2 วิธี คือ

2.9.1 เก็บลงใน 3 % NA

เขี่ยsingle colony โดยใช้เข็มเขี่ย แล้วแทงลงใน 3% NA ที่บรรจุในหลอดเกลียวขนาดเล็ก นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง แล้วจึงเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.9.2 Stock cultureใน Nutrient brothที่มี 3% NaCl w/v (3% NB)

เขี่ย single colony โดยใช้ loop แล้ว subculture ใน 3% NB นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง จึงถ่ายเชื้อใส่หลอดเกลียวขนาดเล็ก (ทนได้ที่อุณหภูมิ - 80°C) นำไปแช่แข็งทันที ที่อุณหภูมิ -80 °C

3. ลักษณะที่ทำการศึกษาเชื้อ Vibrios

ทำการศึกษา ลักษณะต่างๆ ทั้งด้าน Cultural, Physical และ Biochemical characteristicรวมทั้งสิ้น 160 ลักษณะ จำนวนเชื้อ 112 strains ดังมีรายละเอียดการทดสอบแต่ละลักษณะดังนี้ คือ

1. ลักษณะ colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate-citrate-bile salt-sucrose agar(TCBS)(McNicol, 1983)

ป้ายเชื้อจาก 3% NA ลงบน TCBS เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะต่างๆ ได้แก่

1.1 สี (colour)

colony มีสีเหลืองปนขาวคล้ายนม (mucoid), สีเหลือง หรือ สีเขียว

1.2 ขนาด (size)

colony มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง น้อยกว่า 1 มม., 1 มม., 2-3 มม., หรือ 4-6 มม.

1.3 รูปร่าง (shape)

colony มีรูปร่างพื้นผิวเป็นแบบ แบนราบ (flat) โค้งนูน (convex) ยกนูนแค่เรียบ (raise) หรือ โค้งนูน และ มีตุ่มตรงกลาง (umbonate)

1.4 ขอบ (edge)

ขอบของ colony เป็นแบบเรียบ (entire) หรือ หยัก (undulate)

1.5 ความหนาแน่น (density)

colony มีความหนาแน่น เป็นแบบโปร่งใส (transparence) ,โปร่งแสง (translucence) ,ทึบ (opaque) หรือ เป็นเมือกชื้น (mucoid)

1.6 ความสามารถในการละลาย (emulsified)

วิธีศึกษาโดยใช้ loop แตะ colony แล้วค่อยๆ เขี่ยลงบนแผ่น slide ที่มีน้ำกลั่นหยดอยู่ 1 หยด สังเกตดูว่า สามารถละลายได้ยาก (difficult) หรือ ง่าย (easy)

11.7 เนื้อของ colony (texture)

วิธีศึกษาโดยใช้ loop ค่อยๆแตะ colony แล้ว สังเกตดูว่า เนื้อของ colony เป็นแบบ เม็ดเล็กๆ (granular) ,เหนียวหนืด (viscid) หรือ เป็นแผ่น (membranous)

1.8 การติดบนพื้นผิว media (adhesive to media)

ขณะที่ใช้ loop แตะ colony สังเกตว่า colony ติด หรือ ไม่ติดบนพื้นผิว media

(ลำดับลักษณะที่ศึกษา 1 - 23)

I10299543

2. ลักษณะ colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar (BA) (McNicol , 1983)

ป้ายเชื้อจาก 3 % NA streak ลงบน BA นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะต่างๆของ colony ดังนี้

2.1 การย่อยสลายของเม็ดเลือดแดงแกะ(Hemolysis of blood sheep)

สังเกตว่า เม็ดเลือด รอบๆ colony มีการแตกตัวหรือไม่ ไม่ ถ้าปรากฏว่า สีแดงของเลือดจางลง แสดงว่า การย่อยสลายเม็ดเลือดเป็นแบบ partial hemolysis หากสีแดงของเลือดแบ่งแยกเป็น 2 ขอบเขต จะเป็นแบบ double zone hemolysis หรือ ถ้าไม่มีสีแดงของเลือดจะเป็นแบบ complete hemolysis

2.2 ขนาด (size)

colony มีขนาดน้อยกว่า 1 มม.,1 มม., หรือ 4 -6 มม.

2.3 ขอบ (edge)

ขอบของ colony เป็นแบบเรียบ (entire) หรือ หยัก (undulate)

2.4 รูปร่าง (shape)

colony มีรูปร่างพื้นผิวเป็นแบบราบ (flat) หรือ โค้งนูน (convex)

2.5 ความหนาแน่น (density)

colony มีความหนาแน่นเป็นแบบ โปร่งใส (transparence) โปร่งแสง (translucence) ,ทึบ (opaque) หรือ เมือกชื้น (mucoid)

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 24 - 38)

3. ลักษณะ colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3% NA

ศึกษาลักษณะ colony บน 3% NA ซึ่งนำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง ลักษณะที่ทำการศึกษา ได้แก่

3.1 ขนาด (size)

colony มีขนาด น้อยกว่า 1 มม., 1 มม., 2 -3 มม., 4 - 6 มม., หรือ กระจายทั่วไป (swarm)

3.2 รูปร่าง (shape)

colony มีรูปร่างพื้นผิว เป็นแบบ แบนราบ (flat) หรือ โค้งนูน (convex)

3.3 ขอบ (edge)

ขอบของ colony เป็นแบบเรียบ (entire) หรือ หยัก (undulate)

3.4 ความหนาแน่น (density)

colony มีความหนาแน่น เป็นแบบ โปร่งใส (transparence) ทึบ (opaque) , เมือกขึ้น (mucoid) หรือ โปร่งแสง (translucence)

(สำคับลักษณะที่ศึกษาที่ 39 -51)

4. ลักษณะ colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine agar (MA)

ป้ายเชื้อจาก 3% NA ลงบน MA เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะต่างๆ ได้แก่

4.1 ขนาด (size)

colony มีขนาดเป็นแบบ วัดขอบเขตไม่ได้แน่นอน คือ แผ่กระจายไปทั่ว (swarm), น้อยกว่า 1 มม., 1 มม., 2 - 3 มม., หรือ 4-6 มม.

4.2 รูปร่าง (shape)

colony มีรูปร่างพื้นผิวเป็นแบบ แบนราบ (flat) หรือ โค้งนูน (convex)

4.3 ขอบ (edge)

ขอบของ colony เป็นแบบเรียบ (entire) หรือ หยัก (undulate)

4.4 ความหนาแน่น (density)

colony มีความหนาแน่น เป็นแบบ โปร่งใส (transparence) ,โปร่งแสง (translucence) , ทึบ (opaque) หรือ เมือกชื้น (mucoid)

(ลำดับลักษณะศึกษาที่ 52-64)

5. การย้อมติดสีแกรม (Gram staining)

ทำการย้อมสีแกรม ดังวิธีที่ปรากฏในภาคผนวก ก

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 67)

6. การย้อมสีแฟลกเจลลา (Flagella staining)

ทำการย้อมสีแฟลกเจลลา ดังวิธีที่ปรากฏในภาคผนวก ก

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 68)

7-14. pH tolerance (McNicol, 1983)

นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงจาก 3% NA มา subculture ลงใน 3% NB 3% NB ให้เชื้อมีความขุ่น แล้วทำการทดสอบโดยหยดเชื้อลงใน 3% NB ที่มี pH ต่างกัน คือ pH 3, 4,4.5,5, 7, 10, 11 และ 12 ตามลำดับ เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°c นาน 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตความขุ่น (turbidity) ของเชื้อ

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 68-75)

15-22 Salt tolerance (McNicol, 1983)

หยดเชื้อที่ได้ทำการ subculture จาก 3%NA ลงใน 3% NB ที่มีความขุ่นแล้ว ลงใน 3% NA ที่มีความเข้มข้นของเกลือ sodium chloride ระดับต่างๆกัน คือ 0 %, 0.5 %, 1 %, 3 %, 6 %, 8 %, และ 10 %, ตามลำดับ เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°c นาน 24 ชั่วโมง สังเกตดูว่า อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใดขุ่นบ้าง ก็แสดงว่า เชื้อสามารถต้านทานความเค็มของหลอดนั้นได้

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 76 - 83)

23. การทดสอบ Catalase (Cowan , 1974)

โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อจาก 3% NA ที่เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง ลงบน slide แล้วหยดทับด้วย Hydrogen peroxide 3 % สังเกตว่า มีฟองอากาศเกิดขึ้น หรือไม่ ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้นจะให้ผลบวก

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 84)

24. การทดสอบ Oxidase (Cowan, 1974)

หยดน้ำยา cytochrome oxidase ลงบนกระดาษกรอง 1 หยด ป้ายเชื้อจาก 3% NA ลงบน กระดาษกรอง สังเกตว่า มีสีม่วงเกิดขึ้นภายใน 10 วินาที หรือไม่ ถ้ามีสีม่วงเกิดขึ้นจะให้ผลบวก

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 85)

25. การทดสอบออกซิไดซ์กลูโคเนต (Guconate oxidation test) (Cowan, 1974)

หยดเชื้อลงใน gluconate broth เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง เติมน้ำยา Benedict's solution ลงไป 1 มล. ต้มนาน 10 นาน ถ้า gluconate ถูก oxidized เป็น 2-keto-gluconate จะเกิดตะกอนสีน้ำตาล หรือ ส้ม อ่านผลเป็นบวก แต่ถ้า gluconate ไม่ถูก oxidized สีของ Benedict's solution จะไม่เปลี่ยนแปลง โดยจะคงเป็นสีฟ้าเหมือนเดิม

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 86)

26. การทดสอบอินดอล (Indole test) (Cowan, 1974)

นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงจาก 3 % NA มา subculture ลงใน 3% NB ให้เชื้อมีความขุ่น แล้วจึงหยดเชื้อลงใน 3% peptone water เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C อ่านผลโดยเติม Kovac's reagent ลงไปประมาณ 3-5 หยด เขย่าหลอด ถ้ามี อินดอล จะสังเกตเห็นว่า Kovac's reagent จะเปลี่ยนเป็นสีชมพู หรือ สีแดง

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 87)

27. การทดสอบการเกิด Hydrogen sulphide(H_2S) (Cowan,1974)

ป้ายเชื้อจาก 3% NA ลงบน 3% TSI โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลม แทงเข้าไปในส่วนก้น (butt) แล้วป้ายตามแนวราบ (slant) เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง สังเกตดูว่า มีสีดำของ H_2S เกิดขึ้นในส่วนก้นหลอด หรือไม่ ถ้าเกิดสีดำของ H_2S จะอ่านผลเป็นบวก

(สำคับลักษณะที่ศึกษาที่ 88)

28. การทดสอบ Methyl red (MR-reaction)(Cowan, 1974)

นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงจาก 3% NA มา subculture ลงใน 3% NB ให้เชื้อมีความขุ่น แล้วนำมาทำการทดสอบโดยหยดเชื้อลงใน 3% Glucose phosphate medium เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง อ่านผล โดยแบ่งครึ่งเป็น 2 หลอด เพื่อใช้ในการทดสอบMethyl red และ Voges-proskauer test

วิธีการทดสอบ Methyl red ทำโดย หยด Methyl red 2 หยด แล้วเขย่าเบาๆ สังเกตดูว่า น้ำยาเปลี่ยนเป็นสีอะไร ถ้าเปลี่ยนเป็นสีแดง จะอ่านผลบวก ถ้าเป็นสีเหลือง จะอ่านผลลบ

(สำคับลักษณะที่ศึกษาที่ 89)

29. การทดสอบ Voges-Proskauer(V-P test)(Cowan, 1974)

นำหลอดที่ 2 จากข้อ 28 มาทดสอบโดยเติมน้ำยา 5% α - naphthol ลงไป 0.4 มล. เขย่าเล็กน้อย แล้วเติม 40% KOH 0.2 มล. เขย่าหลอด แล้วเอียงนาน 15 นาที ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้น แสดงว่า เชื้อผลิต acethyl-methyl carbinol อ่านผลเป็นบวก

(สำคับลักษณะที่ศึกษาที่ 90)

30. การทดสอบการผลิต Urease (Urease test) (Cowan, 1974)

ป้ายเชื้อจาก 3% NA ลงบนอาหาร 3% Christensen urea medium เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง ถ้าเชื้อผลิต urease อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีแดง

(สำคับลักษณะที่ศึกษาที่ 91)

31. การทดสอบ Lecithinase activity (Cowan, 1974)

ป้ายเชื้อจาก 3 % NA ลงบน 3% egg yolk agar โดยป้ายเป็นจุด เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ° C นาน 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตตะกอนไขมัน (free fat) ภายใน และ รอบๆ colony ซึ่งจะมีสีขาวขุ่นกว่าส่วนอื่น จะอ่านผลเป็นบวก

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 92)

32. การทดสอบ ONPG (ONPG test) (Cowan, 1974)

นำเชื้อที่เพาะเลี้ยง จาก 3% NA มา subculture ลงใน 3% NB ให้เชื้อมีความขุ่น แล้วทำการทดสอบโดยหยดเชื้อลงใน 3% ONPG broth เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ° C นาน 24 ชั่วโมง ถ้าอาหารทดสอบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่า เชื้อมี β -galactosidase activity อ่านผลเป็นบวก

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 93)

33. O/129 sensitivity (Cowan, 1974)

วาง O/129 disks บนผิวหน้าของ MHA ที่ป้ายเชื้อแล้ว เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง สังเกตดูรอบๆ disks จะไม่มีเชื้อขึ้น (clear zone) อ่านผลเป็นบวก

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 94)

34. การทดสอบการเจริญเติบโตใน Potassium cyanide (KCN test) (Cowan, 1974)

นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงจาก 3% NA มา subculture ลงใน 3% NB ให้เชื้อมีความขุ่น แล้วทำการทดสอบโดยหยดเชื้อลงบนอาหาร 3% KCN broth 1 หลอด และ 3% KCN broth base (ไม่มี KCN ซึ่งเป็น control) 1 หลอด เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง สังเกตดูความขุ่น (turbidity) เปรียบเทียบกันระหว่าง หลอดที่มี KCN และ หลอดควบคุม ถ้าหลอดทั้งสองขุ่น จะอ่านผลเป็นบวก แต่ถ้าหลอดควบคุมขุ่น และ หลอดที่มี KCN อยู่ใส จะอ่าน

ผลเป็นลบ

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 95)

35. การทดสอบการใช้ Citrate (Citrate test) (Cowan, 1974)

ใช้ลวดป้ายเชื้อ บนผิวหน้าของ Simmon's citrate medium 3% เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง ถ้าอาหารเปลี่ยนสีจากสีเขียว เป็นสีน้ำเงิน อ่านผลเป็นบวก

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 96)

36. การย่อยสลาย Casein (Cowan, 1974)

ป้ายเชื้อจาก 3% NA ลงบน 3% casein agar เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ถ้าเชื้อย่อยสลาย casein ได้ รอบๆ colony จะใส (clear zone) อ่านผลเป็นบวก

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 97)

37. การย่อยสลาย Deoxyribonucleic acid (DNase activity) (Cowan, 1974)

ป้ายเชื้อจาก 3% NA ลงบน 3% DNase test medium เป็นจุด 3 จุด เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 36 ชั่วโมง ทดสอบโดยลอกผิวหน้าด้วย 1 N HCl ถ้ารอบๆบริเวณจุดทั้งสามใส (clear zone) จะอ่านผลเป็นบวก

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 98)

38. การย่อยสลาย gelatin (Gelatin hydrolysis) (Cowan, 1974)

ป้ายเชื้อจาก 3% NA ลงบน 3% gelatin agar เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง นำมาทดสอบโดยหยดน้ำยา acid merculic chloride ลงบนผิวหน้า ถ้า gelatin ถูกย่อยสลาย รอบๆบริเวณที่ป้ายเชื้อจะใส ส่วน gelatin ที่ไม่ถูกย่อยสลาย จะขุ่นทันที

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 99)

39. การย่อยสลาย Hippurate (Hydrolysis of Hippurate)

(Cowan, 1974)

ป้ายเชื้อจาก 3% NA ลงบนผิวหน้าของ 3% Hippurate agar เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง อ่านผลโดย สังเกตว่า ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีชมพู หรือ สีแดง จะอ่านผลเป็นบวก

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 100)

40. การย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis)(Cowan, 1974)

ป้ายเชื้อจาก 3% NA ลงบนอาหาร 3% starch agar เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ทดสอบโดย หยดสารละลาย lugol's iodine ลงบนผิวหน้า ถ้าเชื้อย่อยสลายแป้ง รอบๆบริเวณที่ป้ายเชื้อจะไม่มีสีดำเกิดขึ้น

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 101)

41. การย่อยสลาย Tyrosine (Hydrolysis of Tyrosine)

(Cowan, 1974)

ป้ายเชื้อจาก 3% NA ลงบนอาหาร 3% Tyrosine agar เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง สังเกตว่า มีการจางหายไปของผลึก tyrosine รอบๆบริเวณที่ป้ายเชื้อจะอ่านผลเป็นบวก

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 102)

42. การทดสอบการย่อย Lipase (Hydrolysis of Tween 80)

(Cowan, 1974)

ป้ายเชื้อจาก 3% NA ลงบนอาหาร 3% Tween 80 agar เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C สังเกตผลทุกวันนาน 3 วัน อ่านผล โดยดูบริเวณรอบๆที่เชื้อเจริญจะขุ่น (opaque) อ่านผลเป็นบวก

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 103)

43. Reduction of Nitrate to Nitrite and Gas(Cowan, 1974)

นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงจาก 3% NA มา subculture ลงใน 3% NB ให้เชื้อมีความขุ่น แล้วทำการทดสอบโดย หยดเชื้อลงใน 3% Nitrate broth ที่มี durham tube ที่ไล่อากาศออกแล้ว หลังจากเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง นำมาอ่านผลโดย สังเกตดูว่า ใน durham tube มี gas หรือไม่ ถ้าไม่มี gas อยู่จึงทดสอบ โดยหยด Nitrate reagent A และ B ลงไปอย่างละ 3 หยด สังเกตดูว่า เกิดสีแดงขึ้น หรือไม่ ถ้าเกิดสีแดงขึ้น แสดงว่า nitrate ถูก reduce เป็น nitrite แต่ถ้าไม่เกิดสีแดงเกิดขึ้น ก็ใส่ผงสังกะสี(zinc dust) ลงไปเล็กน้อย เขย่าหลอด ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้น ก็แสดงว่า nitrate ไม่ถูก reduced แต่ถ้าไม่มีสีแดงเกิดขึ้น ก็แสดงว่า nitrate ถูก reduced ไปจนเป็น gas ซึ่งสังเกตเห็นได้ใน durham tube

(สำคับลักษณะที่ศึกษาที่ 104-105)

44-46. การทดสอบ oxidative และ fermentative (O-F test) (Hugh and Leifson, 1953)

การทดสอบนี้ เพื่อต้องการทราบว่าเชื้อจุลินทรีย์ จะผลิตกรดจาก glucose โดยวิธี oxidation หรือ fermentation โดยทำการเพาะเชื้อในอาหาร 3% Hugh and Leifson medium ซึ่งมี glucose 1%การทดสอบนี้ ต้องใช้อาหาร 2 หลอด หลังจากเพาะเชื้อโดยใช้ลวดปลายแหลม(needle) ป้ายเชื้อแทงเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นเส้นตรง แล้วปิดด้วย paraffinอ่อน (soft paraffin) หนึ่งหลอด นำหลอดทั้งสองไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง นำมาอ่านผลโดย

44. Oxidation

หลอดที่ไม่ได้ปิด paraffin เปลี่ยนเป็นสีเหลือง หลอดเดียว แสดงว่า เชื้อผลิตกรดจาก glucose โดยวิธี oxidation

45. Fermentation

หลอดทั้งสองเปลี่ยนจากสีน้ำเงิน เป็นสีเหลือง แสดงว่า เชื้อผลิตกรดจาก glucose โดยวิธี fermentation

46. No reaction

หลอดทั้งสอง ไม่เปลี่ยนจากสีน้ำเงิน แสดงว่า เชื้อไม่สามารถผลิตกรดจาก glucose

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 106 - 108)

47. Motility

ศึกษาโดยใช้วิธี Hanging drop ทำโดยหยดเชื้อลงบน clover slide แล้วคว่ำลงปิดบน slide หลุม นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าเชื้อสามารถเคลื่อนไหวไปมาได้ จะอ่านผลการทดสอบนี้เป็นบวก

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 109)

48-78 การผลิตกรดจาก carbohydrates (Acid production from carbohydrates ; Cowan, 1974)

นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงจาก 3% NA มา subculture ลงใน 3% NB ให้เชื้อมีความขุ่น แล้วหยดลงในอาหาร 3% broth sugars ซึ่งมี carbohydrates 21 ชนิด ได้แก่ glucose, mannose, fructose, galactose, maltose, saccharose, mannitol, starch, glycerol, arabinose, xylose, lactose, melibiose,, raffinose, melezitose, adonitol, dulcitol, inocitol, sorbitol, sorbose และ cellobiose นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง ถ้าสีของอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใดเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่า เชื้อผลิตกรดจาก carbohydrates ในหลอดนั้น

สำหรับ carbohydrates 9 ชนิด ได้แก่ glucose mannose, fructose, galactose, maltose, saccharose, mannitol, starch, glycerol จะทดสอบว่า เชื้อให้ gas ด้วยหรือไม่ โดยสังเกตจาก gas bubble ที่เกิดขึ้นใน durham tube

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 110-139)

79-97 การใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน (Carbon sources utilization tests ; Cowan, 1974)

นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงจาก 3%NA มา subculture ลงใน 3% NB ให้เชื้อมีความขุ่น แล้วทำการทดสอบโดยหยดเชื้อลงบนอาหาร Medium for carbon utilization tests ซึ่งเติมสารอินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ 18 ชนิด ได้แก่ sodium acetate, m-hydroxybenzoic acid, sodium citrate, sodium formate, sodium pyruvate, sodium succinate, sodium malonate, sodium (D+) tartrate, sodium oxalate, sodium butylate, n-valeric acid, sodium lactate, sodium DL-maltate, L-glutamic acid sodium salt, L-serine, L-proline, L-histidine

นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 5 วัน ถ้าอาหารในหลอดใด เปลี่ยนจาก สีเหลืองอ่อน เป็นสีชมพู หรือ สีแดง แสดงว่า เชื้อที่ทดสอบสามารถใช้ สารอินทรีย์นั้น เป็นแหล่งคาร์บอนได้

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 140 -157)

98-100. การทดสอบดีคาร์บอกซิเลส (Decarboxylase test)

(Falkow, 1958)

นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงจาก3% NA มา subculture ลงใน 3% NB ให้เชื้อมีความขุ่น แล้วทำการทดสอบโดยหยดเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3%Decarboxylase test medium(Falkow's) 4 หลอด โดยหลอดหนึ่งจะเป็นหลอดควบคุม ส่วนอีก 3หลอด จะมี amino acid 3 ชนิด คือ L-arginine L-lysine, L-ornithine ตามลำดับ หลังจากหยดเชื้อแล้ว ปิดด้วย paraffin เหลว (liquid paraffin) เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยหลอดควบคุมต้องเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง และ เปรียบเทียบกับหลอดที่มี amino acid ถ้าไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง จะอ่านผลบวก แต่ถ้าเปลี่ยนเป็นสีเหลือง จะอ่านผลลบ

(ลำดับลักษณะที่ศึกษาที่ 158 -160)

การศึกษาลักษณะดังกล่าวข้างต้น ได้สรุปจำนวนลักษณะที่ทดสอบไว้ในตาราง ที่ 6

ตารางที่ 6 ลำดับการทดสอบทางชีวเคมี และ จำนวนลักษณะ ที่ทำการศึกษา

ลำดับทดสอบ	การทดสอบ.	จำนวนลักษณะที่ทดสอบ	ลำดับลักษณะที่ศึกษา
1	ลักษณะ Colony บน อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate-citrate-bile salt sucrose agar(TCBS)	23	1-23
2	ลักษณะ Colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar (BA)	15	24-38
3	ลักษณะ Colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3% Nutrient agar (3% NA)	13	39-51
4	ลักษณะ Colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine agar (MA)	13	52-64
5	การย้อมติดสีแกรม	2	65-66
6	การย้อมสีแฟลกเจลลา	1	67
7-14	ความสามารถด้านทาน pH ระดับต่างๆ	8	68-75
15-22	ความสามารถด้านทานความเค็ม	8	76-83
23	การทดสอบ catalase	1	84
24	การทดสอบ oxidase	1	85
25	การทดสอบการ oxidized gluconate	1	86
26	การทดสอบ อินดอล	1	87
27	การทดสอบการเกิด H_2S	1	88
28	การทดสอบ Methyl red	1	89
29	การทดสอบ Voges-Proskauer	1	90
30	การทดสอบการผลิต Urease	1	91
31	การทดสอบ Lecithinase activity	1	92

ตารางที่ 6 ต่อ

ลำดับทดสอบ	การทดสอบ	จำนวนลักษณะที่ทดสอบ	ลำดับลักษณะที่ศึกษา
32	การทดสอบ ONPG	1	93
33	การทดสอบ O/129 sensitivity	1	94
34	การทดสอบการเจริญเติบโตใน Potassium cyanide	1	95
35	การทดสอบใช้ Citrate	1	95
36	การย่อยสลาย Casein	1	97
37	การย่อยสลาย DNA	1	98
38	การย่อยสลาย Gelatin	1	99
39	การย่อยสลาย Hippurate	1	100
40	การย่อยสลาย แป้ง	1	101
41	การย่อยสลาย Tyrosine	1	102
42	การทดสอบการยลิก lipase	1	103
43	Reduction of Nitrate to Nitrite and gas	2	104-105
44-46	การทดสอบ Oxidativeและ Fermentative	3	106-108
47	Motility	1	109
48-78	การยลิกกรดจากcarbohydrates	30	110-139
79-97	การใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่ง carbon	18	140-157
98-100	การทดสอบกีคาร์บอกซิเลส	3	158-160

การวิเคราะห์ทาง Numerical Taxonomy

ทำการเปรียบเทียบเชื้อ Vibrios แต่ละสายพันธุ์ (strains) โดยมีวิธีการดังนี้ คือ

1. คำนวนหาค่า similarity value (s value)percentage ระหว่าง strains โดยใช้ Jaccard similarity โดยใช้สูตรของ Sokal and Michenner(1958) หาค่า coefficient of Jaccard ดังนี้ คือ

$$\% S_j = \frac{\sum +}{all-[(\sum -)+(\sum nc)]} \times 100$$

เมื่อ $\sum +$ คือ ผลรวมลักษณะที่เป็นบวกทั้งคู่

$\sum -$ คือ ผลรวมลักษณะที่เป็นลบทั้งคู่

nc คือ จำนวนลักษณะที่ไม่ได้ทำการทดสอบ จึงไม่นำมาเปรียบเทียบ

all คือ จำนวนลักษณะที่ทำการศึกษาทั้งหมด

2. นำค่า s value ไปสร้างตาราง similarity value matrix

3. จัดกลุ่มโดยใช้วิธีการแบบ unweight average linkage clustering

4.. สร้าง Dendrogram

5. วิเคราะห์กลุ่ม (cluster) ของเชื้อ Vibrios ที่ทำการศึกษาว่าเป็น species ใหม่ ที่ยังไม่ได้ทำการ identified หรือ เป็น species เก่า ที่ได้เคยมีการ identified แล้ว

วิธีการวิเคราะห์ทาง Numerical Taxonomy ตั้งแต่ขั้นตอนที่ 1 ถึง 4 ทำโดยใช้เครื่อง Computer Tri Gem A ส่วน program ที่ใช้ในการศึกษา คือ The Numerical Taxonomy program (PC-Taxan) ซึ่งได้รับ program จาก Colwell แห่ง The University of Maryland

วิธีการ code ลักษณะที่ทดสอบ เพื่อการคำนวนหาค่า similatity เป็นแบบ two stage coding(Sneath, 1972) คือ ลักษณะที่เป็นลบ จะ code เป็น 1 และ ลักษณะที่เป็นบวก จะ code เป็น 2