เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมประมง, "ผลผลิตหอย แมงกะพรุน สาหร่าย ไข่เค่า ปลิงทะเล" เอกสารฉบับที่ 3 ฝ่ายสถิติ กรมประมง, หน้า 1-26, 2528

เกรียงศักดิ์ สายธนู, เกรียงศักดิ์ พูนสุข และสงคราม เหลืองทองคำ, "โคไลฟอร์ม และวิบริโอ ตามชายฝั่งทะเลตะวันออกและตะวันตก การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อหลังการเก็บตัวอย่าง", การสัมนาครั้งที่ 2 การวิจัยคุณภาพน้ำและคุณภาพทรัพยากรมีชีวิตในน่านน้ำไทย, สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, หน้า 262-271, 2524 ก.

_____"การแพร่กระจายของเชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัสในน่านน้ำไทย ผลการสำรวจปี 2521-2524" การสัมนาครั้งที่ 2 การวิจัยคุณภาพน้ำและคุณภาพทรัพยากรมีชีวิตในน่านน้ำไทย, สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, หน้า 255-261, 2524 ข.

ครุณี แซ่อุย, อนันต์ ตันสุตพานิช และลิลา เรืองแป้น. "Vibrio harvigi สาเหตุของโรคแบคทีเรียเรืองแสงของลูกกุ้งแชบ๊วย Penaeus merguiensis" การสัมมนาวิทยาศาสตร์ทางทะเลครั้งที่ 3, คณะกรรมการวิทยาศาสตร์ทางทะเลแห่งชาติ, สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2529

ประกอบ บุญไทย, "อหิวาตกโรค" วารสารโรคติดต่อ, 3(1), 12-20, 2520.

พัชรี อังกุระ, "อนุกรมวิธานแบบนิวเมริคัลของจุลินทรีย์ในสกุลวิบริโอจากอ่าวไทยตอนใน", วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2530

วัฒนา ภู่เจริญ, "สภาพการเลี้ยงหอยในปัจจุบันของประเทศไทย" งานสำรวจแหล่งเพาะเลี้ยง, กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง, 27 หน้า, 2521 ก. (เอกสารโรเนียว)

วัฒนา ภู่เจริญ, "การเลี้ยงหอยทะเลของประเทศไทย" เอกสารประกอบคำบรรยายกลักสูตรฝึกอบรมแก่นายทหารประทวน 3 เหล่าทัพ รุ่นที่ 1, กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง, 4 หน้า, 2521 ข.

เรืองไร รัตกฤษณะ, สมคิด ทักษิณาวิสุทธิ์, ศานิต เก้าเอี้ยน และมิติ ตันตังกุล, "ระบบตลาดสินค้าสัตว์น้ำประเภทหอย" งานวิจัยสังคมศาสตร์การประมงแห่งเอเชีย (ประเทศไทย), ภาควิชาเศรษฐศาสตร์เกษตร, คณะเศรษฐศาสตร์และบริหารธุรกิจ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 264 หน้า, 2528.

สงคราม เหลืองทองคำ, เกรียงศักดิ์ สายธนู และเกรียงศักดิ์ พูนสุข, "การทดสอบคานากาวา พิรินมินอน ของเชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส ที่แยกได้จากอ่าวไทยตอนบน" การสัมนาครั้งที่ 2 การวิจัยคุณภาพน้ำและคุณภาพทรัพยากรมีชีวิตในน่านน้ำไทย, สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, หน้า 279-284, 2524.

สุทธิชัย เดมียวณิชย์, "การศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียชนิดโคไลฟอร์มในน้ำทะเลบริเวณอ่าวไทยตอนบนและทะเลอันดามัน", การสัมนาสภาวะน้ำเสียในน่านน้ำไทย, สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, หน้า 191-200, 2521.

สุนันท์ ทวยเจริญ, "ชีวประวัติเบื้องต้นของหอยแครง" เอกสารประกอบการฝึกอบรมประมงจังหวัด, ภาควิชาการประมงรุ่นที่ 2, กองประมงน้ำกร่อย, กรมประมง, 15 หน้า, 2528.

สุนันท์ ทวยเจริญ, สุรางค์ ทิพย์โยธิน และดารณี หันหาบุญ, "การศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่พบในกระเพาะอาหารของหอยแครง", เอกสารรายงานวิชาการฉบับที่ 27 , กองประมงน้ำกร่อย, กรมประมง, 25 หน้า, 2526.

สุมา รักแผน, "แบคทีเรียชนิดโคไลฟอร์มบริเวณปากแม่น้ำเจ้าพระยาและบริเวณใกล้เคียง", เอกสารวิชาการฉบับที่ 20, กองสำรวจแหล่งประมง, กรมประมง, 13 หน้า, 2530.

ศิริ ทุกข์วินาศ, "การเลี้ยงหอยแครงในประเทศไทย" เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 1

สถาบันเพาะเลี้ยงชายฝั่ง จังหวัดสงขลา, 45 หน้า, 2528.

อิทธิพล ตั้งพุทธรักษ์, "ระบบตลาดหอยแครงในประเทศไทย พ.ศ. 2526", วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2528.

ภาษาต่างประเทศ

American Public Health Association, "Recommended Procedures for the Examination of Sea Water and Shellfish," American Public Health Association Inc., New York, 1970.

Alexander, M., Microbial Ecology, John Wiley & Sons, New York, 1971.

Andrews W.H. and M.W. Persnell, "Rapid Recovery of Escherichia coli from Estuarine Water," Applied Microbiology., 23(3), 521-523, 1972.

Andrews, W.M., C.D. Diggs, J.J.Miescier, C.R. Wilson, W.N. Adam, S.A. Furfari, and J.F. Musselman, "Validity of Members of the total Coliform Groups for Identitating the Pressure of Salmonella in the Quahaug, Mercenaria mercenaria," J. Milk Food Technol., 39, 202-213, 1976.

Attena, G., M. Grasso and G. Olivian, "Isolation of Vibrio alginolytian from Ear Suppurative Secretion," I.G. MOD., 80(3), 371-376, 1983.

Barrow, G.I. and D.C. Miller, "Vibrios" Microbiology in Agriculture Fisheries and Food. (Skinner, F.A. and Carr, J.G. ed.), 180-181, Academic Press Inc., 1976.

Baumann, P., L. Baumann, and M. Mandel, "Taxonomy of

Marine Bacteria: The Genus Beneckea," J. Bacteriol., 107, 268-294, 1971.

Baumann, P., L. Baumann, S.S. Bang, and M.J. Woolkalis, "Reevaluation of The Taxonomy of Vibrio, Beneckea and Photobacterium: Abolition of the Genus Beneckea," Curr. Microbiol., 4, 127-132, 1980.

Bott, T.L., "Bacteria and Assessment of Water Quality" Biological Methods for the Assessment of Water Quality, American Society for Testing and Materials, 67-75, 1973.

Bowdre, J.H., M.D. Poole, and J.D. Oliver. "Edena and hemoconcentration in mice experimentally infected with Vibrio valnificus," Infect. Immun., 32, 1193-1199, 1981.

Blake, P.A., M.H. Merson, R.E. Weaver, D.G. Hollis, and P.C. Henblin, "Disease caused by a marine vibrio," N. Engl. J. Med., 300, 1-5, 1979.

Clark, W.A., D.G. Hollis, R.E. Weaver and P. Riley, "Identification of Unusual Pathogenic Gram-Negative Arebic and Facultatively Anaerobic Bacteria," U.S. Department of Health and Disease Controle, Atlanta, Georgia, 1984.

Cowen, S.T., "Manual for the Identification of Medical Bacteria," pp, 127-229, Cambridge University, New York, 1974.

Desmarchelier, P., "Vibrio parahaemolyticus and Other Vibrios," Food Technology in Australia, 30, 339-345, 1978.

Disalvo, S.T., "Manual for the Identification of Medical

bacteria" pp. 127-229, Cambridge University, New York, 1974.

Elliott, R.P., D.C. Clark, and K.H. Lewis, "(1) Their significance and methods of enumeration." Micro-organisms In Foods 2nd ed. International Commission on Microbiologal Specifications for Foods (ICMSF), Toronto, 1978.

Fujino, T., Y. Okuno, D. Nakada, A. Aoyama, D. Fukai, K. Mukai and T. Veho, "On the bacterriological examination of shirasu food poisoning" Med. J. Osaka Univ., 4, 299-304, 1953.

Hastback, W.G., "Short Incubation of Presumtive Media for Detection of Fecal Coliforms in Shellfish" Applied and Environmental Microbiology, 42(6), 1125-1127, 1981.

Harbell, S.C., H.O. Hodgins and M.H. Schiewe, "Studies on the Pathogenesis of Vibriosis in Salmon Oncorhynchus kisutch (Waltaum)" J. Fish Diseases, 2, 391-404, 1979.

Hickman-Brenner, F.W., J.J. Farmer III, D.G. Hollis, G.R. Fanning, A.G. Stergerwalt, R.E. Weaver and D.J. Brenner, "Identification of Vibrio holliae sp. nou. from Patients with Diarrhea," J. Clin. Microbiol., 15(3), 395-401, 1982.

Hollis, D.G., R.E. Weaver, C.N. Baker, and C. Thornsberry. "Halophilic Vibrio Species isolated from blood cultures" J. Clin. Microbiol., 3, 425-431, 1976.

Hood, M.A., G.E. Ness, and N.J. Blake, "Relationship Among

Fecal Coliform, Escherichia coli and Sallmonella spp. in Shellfish", Appl. and Envi. Microbiol., 54(1), 122-126, 1983.

Hood, M.A., G.E. Ness, G.E. Rodrick, and N.J. Blake, "Effect of storage on Microbial Loads of Two Commercially Important Shellfish Species, Crassostrea virginica and Mercenaria campechniensis," Appl. and Env. Microbiol., 45(4), 1221-1228, 1983.

Hunt, D.A., and J. Springer, "Comparison of two rapid test procedures with the standard F.C. test for the recovery of fecal coliform bacteria from shellfish groving area," Proc. 10th National Shellfish Sanitation Workshop (Wilt, D.S. ed.) Food and Drug Administration, Washington D.C., 1977.

Ingram M., D.F. Bray, D.S. Clark, C.E. Dolman, R.P. Eliott, and F.S. Thatcher, "(2) Sampling for microbiological analysis : Principles and specific applications," Microorganisms In Foods, International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), Toronto, 1978

Kaneko, T. and R. Colwell, "Ecology of Vibrio parahaemolyticus in Chesapeake Bay," Journal of Bacteriology, 113(1), 24-32, 1973.

Larsen, J.L., A.F.Farid, and I. Dalsgard. "A Comprehensive study of Environmental and human pathogenic Vibrio alginolyticus strains," Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hug. Abt. 1 Orig. A. 251, 213-222, 1981.

Lee, A., "What constitutes and infective of food poisoning organism?," Food Technology Australia, 30, 335-338, 1978.

Lee, J.V., P. Shread, A.L. Furniss, and T.N. Bryant, "Taxonomy and Description of Vibrio fluvialis sp. nou. (Synonym Group F Vibrio, Group EF-6," J. Appli. Bacteriol., 50, 73-94, 1981.

Liston, J., R.J.Matlher, and J. Baros, "Survival and Growth of Pathogenic Bacteria in Seafoods," Fish Inspection and Quantity Control, (Krenzer, R. ed.) pp. 246-249, Fishing News (books) Limited, London, 1971.

National Shellfish Sanitation Program, "Part 1 Sanitation of Shellfish growing areas," Manual of Operations, 8th ed., Public Health Service Publication No. 33, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington D.C., 32 pp., 1965.

Nishibuchi, M., N.C. Roberts, H.B. Bradford Jr. and R.J. Seidler, "Broth Medium for Enrichment of Vibrio fluvialis from the environment," Appli. and Env. Microbiol., 46(2), 425-429, 1983.

Oliver, J.D., R.A. Warner, and D.R. Cleland, "Distribution of Vibrio valnificus and Other Lactose Fermenting Vibrios in Marine Environment," Appl. and Env. Microbiol., 45(3), 985-998, 1983.

Oliveri, V.P., "Bacterial indicators of pollution," Bacterial Indicators of Pollution. (Pipe, W.O. ed.) pp. 21-24, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida,

1982.

Poole, M.D., and J.D. Oliver. "Experimental pathogenicity and mortality in ligated ideal loop studies of the newly reported halophilic lactase-positive Vibrio sp.," Inct. Immun., 20, 126-129, 1978.

Procio, P., "Vibrio alginolyticus in the Western Australia," Med. J. Aust., 2, 296, 1978.

Public Health Laboratory Service Standing Committee on the Bacteriological Examination of Water Supplies, "Comparison of MacConkey broth, Teepol broth and Glutamic acid media for the enumeration of coliform organism in water," J. of Hyg. Comb., 66, 67-82, 1968.

Reichelt, J.L., P. Baumann, and L. Baumann, "Study of Genetic Relationships Among Marine Species of the Genera Beneckea and Photobacterium by Means of in-vitro DNA/DNA Hybridization," Arch. Microbiol., 110, 101-120, 1970.

Rheinheimer, G., "Aquatic Microbiology" 2nd ed. pp. 34-41, John Wiley & Sons, New York, 1980.

Sakazaki, R., and A. Balows, "Genera Vibrio, Plesiomonas, and Aeromonas," The Prokaryotes A Handbook on Havitats, Isolation, and Identification of Bacteria, (Moriceer, P.S., H. Stope, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Shleger, eds) pp. 1272-1301, Springer-Verlag, New York, 1981.

Schmidt, U., H. Chrnel., and C. Cobbs, "Vibrio alginolyticus Infections in Human," J. Clin. Microbiol., 10(1), 666-668, 1979.

Seidler, R.J., D.A. Allen, R.R. Colwell, S.W. Johnson, and O.P. Daily, "Biochemical Characteristic and Virulence of Environmental group F Bacteria Isolation in the United States," Appl. and Envi. Microbiol. 40, 715-720, 1980.

Smith, T.J. and R.M. Twedt, Journal of the Water Pollution Controle Federation, 43, 2200-2209, 1971.

Thomson, C.A. and C. Vanderzant, "Effect of Processing, Distribution and Storage on Vibrio paraheamolyticus and Bacterial Count of Oyster (Crassostrea virginica)," J. Food Sci., 41, 123-127, 1976 a

_____"Relationship of Vibrio parahaemolyticus in oyster, water and sediment, and bacteriological and environmental indices," J. of Food Science., 41, 117-122, 1976.

Varga, S. and S.W. Anderson, "Significance of Coliforms and Enterococci in Fish Product," Appli. Microbiol., 16(2), 193-196, 1968.

West, P.A., and R.R. Colwell, "Identification and Classification of Vibrionaceae __ An Overview," Vibrio in the Environment., (Colwell, R.R. ed.), pp., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1984.

West, P.A., and J.V. Lee, "Ecology of Vibrio Species, Including Vibrio chloerae, in National Waters of Kent, England," J. Appli. Bacteriol., 435-448, 1982.

WHO, "Guide to Shellfish Hygine," Off set Publication No.31, World Health Organization, Geneva, 1976.

Wood, P.C., "Guide to Shellfish Hygine," World Health Organization, Geneva, 1976.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารทดสอบเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อและทดสอบเชื้อพวกโคไลฟอร์ม

Lactose broth

ส่วนผสม

Beef extract	3	g.
Peptone or polypeptone	5	g.
Lactose	5	g.
Distilled water	1000	ml.

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ปรับสภาพความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วงระหว่าง 6.8 - 7 ใส่ในหลอดแก้วที่มี durham tube อยู่หลอดละ 10 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

Brilliant green lactose 2% bile broth (BGLB)

ส่วนผสม

Peptone	10	g.
Lactose	10	g.
Ox-gall	20	g.
Brilliant green (0.5% aqeaous solution)	2.66	ml.
Distilled water	1000	ml.

วิธีเตรียม

ละลาย peptone และ lactose ในน้ำกลั่น 500 มล. และละลาย ox-gall ในน้ำกลั่น 200 มล. เอาส่วนผสมรวมกันแล้วเติมน้ำกลั่นที่

เหลือลงไป ปรับสภาพความเป็นกรดด่างให้ได้เป็น 7.4 เติม brilliant green แล้วใส่ในหลอดที่มี durham tube หลอดละ 10 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที

E.C. medium

ส่วนผสม

Trytose or trypticase	20	g.
Lactose	5	g.
Bile salt No 3	1.5	g.
Potassium monohydrogen phosphate	4	g.
Potassium dihydrogen phosphate	1.5	g.
Sodium chloride	5	g.
Distilled water	1000	ml.

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่นปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.8 (ถ้าละลายไม่ดีนำไปตั้งไฟให้ร้อน) ใส่ในหลอดแก้วที่มี durham tube อยู่ หลอดละ 10 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที

Lauryl tryptose broth

ใช้อาหารสำเร็จของ Difeo มีส่วนผสมใน 1000 มล. ดังนี้คือ

Tryptose	20	g.
Lactose	5	g.
Potassium phosphate dibasic	2.75	g.
Potassium phosphate monobasic	2.75	g.
Sodium chloride	5	g.
Sodium lauryl sulfate	5	g.

Glutamic acid media (Public Health Laboratory Service, 1968)

ส่วนผสม

Lactose	20	g.
L (+) glutamic acid	5	g.
K2HPO4	1	g.
HCOONa	0.25	g.
NH4Cl	2.5	g.
Bromcresol purple 1% (ethanolic solution)	1	ml.
Distilled water	1000	ml.

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่น ปรับสภาพความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.7 แล้วเติม Bromcresol purple ลงไป ใส่ในหลอดแก้วที่มี durham tube อยู่ หลอดละ 10 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

MacConkey Broth

ใช้อาหารสำเร็จของ Difeo มีส่วนผสมดังนี้คือ

Oxgall	5	g.
Peptone	20	g.
Lactose	10	g.
Brom Cresal Purple	0.01	g.

MacConkey Agar

ใช้อาหารสำเร็จของ Difeo มีส่วนผสมใน 1 ลิตรดังนี้คือ

Peptone	17	g.
Proteose peptone	3	g.

Bile salt No 3	1.5	g.
Sodium chloride	5	g.
Neutral red	0.03	g.
Crystal violet	0.001	g.

Violet-Red Bile Agar (VRB) (Eliott, 1987)

ส่วนผสม

Yeast extract	3	g.
Peptone	7	g.
Sodium chloride	5	g.
Bile salt No. 3	1.5	g.
Neutral red (10% w/v solution)	3	ml.
Crystal violet (0.1% w/v aqueous solotion)	2	ml.
Agar	15	g.
Distilled water	1000	ml.

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่น ต้มให้เดือดจนละลายเป็นส่วนผสมเดียวกัน ทำให้เย็น 50-60 องศาเซลเซียส ปรับสภาพความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.4 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที เวลาจะใช้ต้มให้ละลายแล้วอุ่นให้เย็น 50-60°ซ เทใส่จานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

2. อาหารสำหรับทดสอบเชื้อ Salmonella spp.

Lactose broth (L.B.)

ส่วนผสม

Beef extract	3	g.
Peptone or polypeptone	5	g.

Lactose	5	g.
Distilled water	1000	ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ปรับสภาพความเป็นกรดด่างให้อยู่ในระหว่าง 6.8-7.0 ใส่ในขวดแก้วขวดละ 225 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 ซ นาน 15 นาที

Tetathionate brilliant green broth (TTBB)

ส่วนผสม

Basal medium

Tryptose or proteose peptone	5	g.
Bile salt	1	g.
Calcium carbonate	10	g.
Sodium thiosulphate	30	g.
Distilled water	1000	ml.

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นเก็บไว้ในที่เย็น 5-9 °ซ ก่อนใช้จึงเติม brilliant green 0.5% aqueous solution ลงไป 2 มล. ต้มให้เดือด 10 นาที จึงทำให้เย็นลง เติม 20 มล.ของ iodine solution ลงไปเทใส่หลอด หลอดละ 10-12 มล.

วิธีเตรียม iodine solution

Potassium iodine	5	g.
Iodine crystal	6	g.
Distilled water	20	ml.

ละลายให้เข้ากัน

Brilliant green agar (B.G.A)

ส่วนผสม

Yeast extract	3	g.
Protone peptone or polypeptone	10	g.
Sodium chloride	5	g.
Lactose	10	g.
Sucrose	10	g.
Phenol red (0.2% solution)	40	ml.
Brillant green (0.5% aq. solution)	2.5	ml.
Agar	20	g.
Distilled water	1000	ml.

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมลงใน 960 มล. ของน้ำกลั่นต้มจนเดือดแล้วจึงเติมน้ำกลั่นอีก 40 มล. ทิ้งไว้จนเย็นมีจนเย็นมีอุณหภูมิ 50-60 °ซ ปรับสภาพความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.9 0.1 บรรจุใส่ขวดนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 ซ นาน 15 นาที ก่อนใช้นำไปละลายและอุ่นที่อุณหภูมิ 45-50 °ซ เทลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3. อาหารสำหรับแยกและทดสอบเชื้อมารีนวิบริโอ

Broth sugar

ส่วนผสม

Beef extract	3	g.
Peptone	10	g.
Sodium chloride	5	g.
Distilled water	1000	ml.
Bromthymol blue (0.2% aq. solution)	15	ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่นและปรับสภาพความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.1-7.2 เติม indicator แบ่งใส่ขวดแก้วขวดละ 200 มล.

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที ก่อนใช้เติม carbohydrate ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปโดยทำให้มีความเข้มข้นของ carbohydrate ในอาหารเป็น 1% เขย่าให้เข้ากันแล้วเทใส่หลอดแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปหลอดละประมาณ 2 มล.

carbohydrate ที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้มี 7 ชนิดคือ m-inosital, mannose, lactose, sucrose, arabinose, glyceral และ glucose สำหรับ glucose นั้นต้องดูการผลิต gas เพราะฉะนั้นเวลาเตรียมจะใส่หลอดที่มี durham tube คว่ำอยู่ แล้วค่อยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

Decarboxylase medium (Falkow's, 1958)

ส่วนผสม

Peptone	5	g.
Yeast extract	3	g.
Glucose	1	g.
Distilled water	1000	ml.
Bromcresol purple, 0.2% solution	10	ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับสภาพความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.7 แล้วเติม indicator solution เทใส่ขวดปริมาณ 200 มล. ใส่ amino acid ที่ต้องการทดสอบคือ L-ornithrine hydrochloride ลงไปให้มีความเข้มข้น 0.5% นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที ก่อนใช้เทใส่หลอดแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลอดละประมาณ 2 มล.

Gelatin agar

ส่วนผสม

Gelatin	4	g.

Distilled water	50	ml.
Nutrient agar	1000	ml.

วิธีเตรียม

ละลาย gelatin ในน้ำกลั่นและเติมใน Nutrient agar ที่ละลายแล้วผสมให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที เวลาจะใช้นำไปต้มละลายแล้วนำไปอุ่นที่ 50 °ซ เทใส่จานเพาะเชื้อ ที่ฆ่าเชื้อแล้ว

Glucose phosphate medium (HR-VP broth)

ส่วนผสม

Glucose	5	g.
Peptone	5	g.
Diptassium hydrogenphosphate	5	g.
Distilled water	1000	ml.

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น แล้วปรับสภาพความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.5 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 115 °ซ นาน 20 นาที ก่อนใช้เทใส่หลอดแก้วขนาดเล็กที่ฆ่าเชื้อแล้วหลอดละประมาณ 2 มล.

Medium for carbon utilization test

ส่วนผสม

Sodium chloride	5	g.
Magnesium sulphate heptahydrate	0.2	g.
Diammonium hydrogen phosphate	1	g.
Potassium dihydrogen phosphate	0.5	g.
Organic acid (Sodium salt)	2	g.
Agar	20	g.
Distilled water	1000	ml.

Phenol red, 0.2% solution	4	ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปรับสภาพความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.8 แล้วจึงเติม indicator solution นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 20 นาที เวลาใช้เทใส่หลอดขนาดเล็กที่ฆ่าเชื้อแล้ววาง slant

Carbon source ที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้มี 8 ชนิดคือ cellobiose, ethanol, gluconate, sacharose, D-xylose, L-histidine, citrate และ urea

Nitrate broth

ส่วนผสม

Beef extract	3	g.
Peptone	5	g.
Potassium nitrate	1	g.
Sodium chloride	5	g.
Distilled water	1000	ml.

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น เทใส่หลอดที่บรรจุ durham tube นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที

Nutrient agar

ส่วนผสม

Beef extract	3	g.
Peptone	5	g.
Sodium chloride	5	g.
Agar	15	g.
Distilled water	1000	ml.

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่นต้มให้เดือด ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 เทใส่ขวดปริมาณ 200 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที เวลาใช้นำไปอุ่นที่ 50 C เทใส่ pretidish ที่ฆ่าเชื้อแล้ว

Peptone salt dilution (PSD)

ส่วนผสม

Peptone	1	g.
Sodium chloride	8.5	g.
Distilled water	1000	ml.

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับสภาพความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 เทใส่ขวด ขวดละ 225 มล. และ 45 มล. เทใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มล. นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที

Starch agar

ส่วนผสม

Solution starch	10	g.
Distilled water	50	ml.
Nutrient agar	1000	ml.

วิธีเตรียม

ละลายแป้งในน้ำกลั่นใส่ใน Nutrient agar ที่ละลายแล้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ซ นาน 15 นาที เวลาใช้ละลายแล้วอุ่นที่ 50 C เทใส่ pretidish ที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 15 มล.

Thiosulfate-citrate-bile-salt-sucrose agar (TCBS)

ใช้อาหารสำเร็จของ Eiken โดยใช้ TCBS 86 กรัม ละลาย

ในน้ำกลั่น 1000 มล. แล้วต้มให้เดือด เทใส่ในขวดขวดละ 200 มล. นำไปต้มใน water bath นาน 10 นาที เวลาจะใช้เทใส่ใน pretidish ที่ฆ่าเชื้อแล้วอบทำให้แห้ง

ส่วนผสม (ต่อลิตรของอาหาร) ประกอบด้วย

Yeast extract	5	g.
Peptone	10	g.
Sodium citrate	10	g.
Sodium thiosulphate	7	g.
Oxgall	5	g.
Sodium cholate	3	g.
Sacharose	20	g.
Sodium chloride	10	g.
Ferric citrate	1	g.
Bromthymol blue	0.04	g.
Thymol blue	0.04	g.
Agar	15	g.

Triple Sugar iron (TSI)

ใช้อาหารสำเร็จของ difeo

Tryptose broth (vary % NaCl)

ส่วนผสม

Tryptose	10	g.
Distilled water	1000	ml.

(ใส่ NaCl ให้เป็น 0%, 3%, 8% และ 10%)

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นปรับ pH 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°ซ นาน 15 นาที เวลาใส่เทใส่หลอดแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 2 มล.

Tween 80 medium (Seirra, 1957)

ส่วนผสมที่ 1

Base media

Peptone	10	g.
Sodium chloride	5	g.
Calcium chloride monohydrate	0.1	g.
Agar	20	g.
Distilled water	1000	ml.

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่นต้มให้เดือดปรับสภาพความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.4 แบ่งใส่ขวดละ 2 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที

ส่วนผสมที่ 2

Tween 80	10	ml.

วิธีเตรียม

แบ่ง Tween 80 ใส่หลอดเกลียวขนาดเล็กหลอดละ 2 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 ซ นาน 15 นาที

วิธีเตรียมอาหารก่อนการทดสอบ

นำส่วนผสมที่ 1 ไปต้มละลายแล้วที่ 50°ซ เทส่วนผสมที่ 2 ลงไปเขย่าให้เข้ากัน เทใส่ pretidish ที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 15 มล.

ภาคผนวก ข.

สารเคมีและน้ำยาเคมีที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ

1. Gram's staining Reagent ประกอบด้วย

1. Crystal violet solution
2. Iodine solution
3. Safranin O solution

Crystal Violet Solution

ส่วนผสม

Crystal violet (85-90 % dye content)	2	g.
Ethyl alcohol 95 %	20	ml.
Ammonium oxalate	0.8	g.
Distilled water	80	ml.

วิธีเตรียม

ละลาย Crystal violet ลงใน Alcohol และ Ammonium oxalate ลงในน้ำกลั่น ก่อนใช้จึงผสมสารทั้งสองเข้าด้วยกัน

Iodine solution

ส่วนผสม

Iodine	1	g.
Potassium Iodide	2	g.
Distilled water	100	g.

วิธีเตรียม

ละลาย Safranin O ลงใน ethyl alcohol แล้วค่อยเอาน้ำกลั่นผสมลงไป

2. น้ำยาเคมีที่ใช้ในการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรีย

เตรียมโดยใช้วิธีของ Elliot et al. (1978) และ Poonsak (1978)

Acid menrcuric chloride

ส่วนผสม

Mercuric chloride	12	g.
Distilled water	80	ml.
Conc. HCl	16	ml.

วิธีเตรียม

ละลาย mercuric chloride ด้วยน้ำกลั่นแล้วค่อยๆเติมกรดเข้าให้เข้ากัน

Cytochrome oxidase reagents

1. 1% napthol solution เตรียมโดยการใช้ N,N-dimethyl-p-phenylene-diamine dihydrochloride 1 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร เข้าเก็บในตู้เย็น

Kovac's reagent

ส่วนผสม

p-dimethylaminobenzaldehyde	5	g.
Amyl alcohol	75	ml.
Conc. HCl	25	ml.

วิธีเตรียม

ละลาย aldehyde ใน alcohol แล้วจึงนำไปผสมกับ conc. HCl

Iodine solution

ส่วนผสม

Iodine	5	g.
Potassium iodide	10	g.
Distilled water	100	ml.

วิธีเตรียม

ละลาย potassium iodide และ iodine ในน้ำกลั่น 10 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 100 มล. เวลาจะนำมา

เจือจางด้วยน้ำกลั่น 5 เท่า

Nitrate reducing test reagents

Solution A

ส่วนผสม

Salfanilic acid	1	g.
Acetic acid (5N aq. solution)	125	ml.

วิธีเตรียม

ละลาย sulfanilic acid อย่างช้าๆลง acetic acid จนหมด

Solution B

ส่วนผสม

Naphthylamine	0.5	g.
Acetic acid (5N aq. solution)	100	ml.

วิธีเตรียม

ละลาย - Naphthylamine ลงใน acetic acid อย่างช้าๆ

Voges-Proskauer test reagent

ประกอบด้วย

1. 5% - naphthyl solution เตรียมโดยใช้ 5 กรัม ละลายใน Absolute alcohol 100 ml.

2. 40% Potassium hydroxide solution เตรียมโดยใช้ potassium hydroxide 40 g. ละลายในน้ำกลั่น 100 ml.

O/129 solution

เตรียม stock solution ของ O/129 ให้มีความเข้มข้นเป็น 104 ug/ml โดยการละลาย O/129 250 mg. ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 25 ml. เก็บไว้ในตู้เย็น เวลาจะใช้ใส่ลงใน 3% (NaCl) NA ให้มีความเข้มข้นเป็น 150 ug/ml และ 10 ug/ml โดย

1. ใส่ stock solution ลงใน 3% (NaCl) NA ปริมาตร 200 มล. ที่ละลายแล้วมีอุณหภูมิ 45-50 C ลงไป 3 มล. จะได้ความเข้มข้นของ O/129 ในอาหารเป็น 150 ug/ml

2. เจือจาง stock solution ลงโดยนำ stock solution 1 มล. ใส่ลงในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 9 มล. จะให้ความเข้มข้นลดลงเป็น 10^{3} ug/ml ดูดใส่ใน 3 % (NaCl) NA ปริมาตร 200 มล. ที่ละลายมีอุณหภูมิ 45-50 °ซ ลงไป 2 มล. จะได้ความเข้มข้นของ O/129 ในอาหารเป็น 10 ug/ml

Most Probable Number (MPN) ค่อกวัมของตัวอย่าง โดยใช้จำนวน 3 หลอดในสัดส่วน 0.1, 0.01, และ 0.001 กรัม

Positive Tubes				Positive Tubes				Positive Tubes				Positive Tubes			
0.1	0.01	0.001	MPN	0.1	0.01	0.001	MPN	0.1	0.01	0.001	MPN	0.1	0.01	0.001	MPN
0	0	0	< 3	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7.2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	1	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	1	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7.3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9.2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6.2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9.3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9.4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	1100

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุมา เมืองใย เกิดวันที่ 20 ตุลาคม พ.ศ. 2497 ที่จังหวัดจันทบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง เมื่อปีการศึกษา 2520 เข้ารับราชการในตำแหน่งนักวิชาการประมงทะเล กองสำรวจแหล่งประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เมื่อปี พ.ศ. 2523 จนถึงปัจจุบัน.