ภาคผนวก ค

วิธีการทดสอบ และวิธีวิเคราะห์

1. การเก็บตัวอย่างจากทะเลเพื่อแยกเชื้อยีสต์ (ดัดแปลงจากวิธีของ Fell, 2001)

ยีสต์จัดเป็นกลุ่ม polyphyletic อยู่ในพวก basidiomycetous และ ascomycetous fungi ที่

มีลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ยีสต์ที่พบมีอยู่ประมาณ 100 genera และ 800 species ซึ่งเป็นเพียง 1% ของ species ที่มีอยู่ทั้งหมดในธรรมชาติ บทบาทของยีสต์ในธรรมชาติก็เหมือนกับ fungi ชนิดอื่นๆคือเป็น saprophytes ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนสารอินทรีย์จากพืชหรือสัตว์ไปเป็นเซลล์ยีสต์หรือผลิตภัณฑ์ที่อาจจะมีความสำคัญในทางอุตสาหกรรม ยีสต์บางชนิดก่อโรคในคนหรือสัตว์ มักพบทั่วไปใน aerobic marine habitats โดยมีการกระจายของชนิดและจำนวนแตกต่างกันขึ้นกับความเข้มข้นและชนิดของสารอินทรีย์ บริเวณใกล้ชายฝั่งมักพบในช่วง 10-1000 เซลล์ต่อน้ำ 1 ลิตร ในขณะที่บริเวณพื้นผิวที่มีสารอินทรีย์ต่ำจนถึงทะเลลึกจะพบเพียงไม่กี่เซลล์จนถึง 10 เซลล์ต่อลิตร แม้ว่าบางครั้งตรงจุดที่มีสารอาหารมากเป็นครั้งคราวอาจจะมียีสต์สูงถึง 3000-4000 เซลล์ต่อลิตร

<u>วิธีการเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อยีสต์</u>

เทคนิคที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างควรดัดแปลงให้เหมาะสมกับสิ่งแวดล้อม โดยส่วนใหญ่แล้วยีสต์เป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญและเพิ่มจำนวน จึงมักไม่พบยีสต์ในน้ำหรือตะกอนดินที่อยู่ในสภาพที่มีออกซิเจนน้อย การเก็บตัวอย่างบริเวณตื้นๆสามารถทำได้โดยใช้ขวดแก้ว vials หรือถุงพลาสติกที่ปลอดเชื้อ

วิธีการแยกเชื้อ

ตัดชิ้นส่วนตัวอย่างพอประมาณด้วยกรรไกร, มีด และคีมจับ

⇓

ถ่ายใส่ลงในอาหาร YM broth 0.01% chloramphenical และ 0.002% Streptomycin

⇓

บ่มที่ 12 องศาเซลเซียส 5-7 วัน

⇓

นำเชื้อใน YM broth ประมาณ 0.1 มล. เกลี่ยในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM Agar ที่มียาปฏิชีวนะ และ ที่ปรับ pH < 4.5

⇓

บ่มที่ อุณหภูมิ 30°ซ

<u>การแยกโคโลนีเดี่ยวเพื่อทำให้เชื้อมีความบริสุทธิ์</u>

หลังจากทำการ spread plate จนเชื้อมีการเจริญและเกิดเป็นโคโลนีเดี่ยวแล้ว จะมีการแยกโคโลนีเดี่ยวดังกล่าวเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยการ streak plate ลงในอาหาร YM Agar ที่ไม่มีการเติมยาปฏิชีวนะและปรับค่าความเป็นกรดด่าง โดยอาศัยหลักการพิจารณาโคโลนีที่เกิดขึ้นตามเกณฑ์ดังนี้

1. Morphological characters

- Gram reaction
- shape, size and arrangement of organism

- motility

- presence of endospore, capsule and flagella (detected by appropriate strains)

- reaction of Ziehl – neelsen and any other special strains

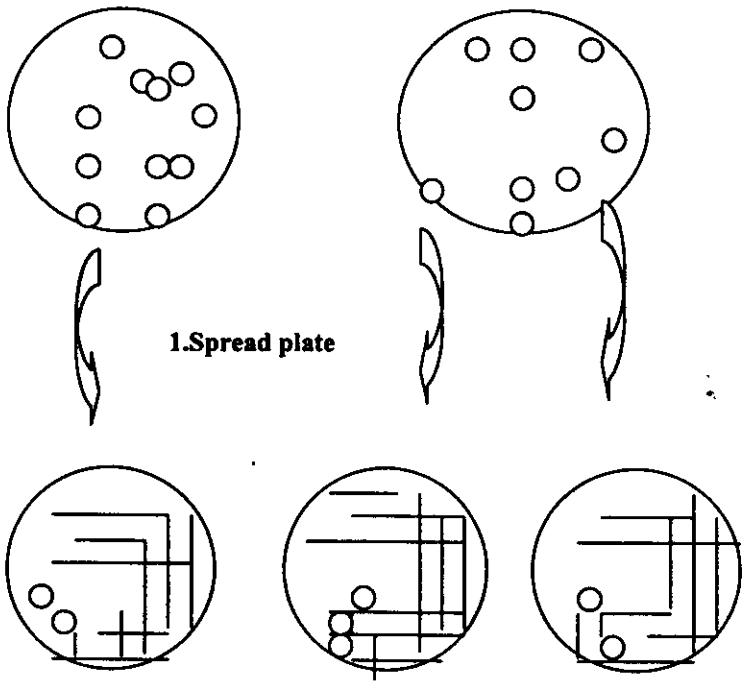
2. Culture charaters

- shape : circular, irregular, rhizoid
- size : วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (มม.)
- chromogenesis : สีของเม็ดสี
- opacity : ความใส ขุ่น ฝ้า
- elevation : flat, raised, convex, umbonate
- surface : smooth, rough, dull, glistening
- edge : entire, unduate, lobate, dentate, rhizoid

หลังจากที่ทำการเลือกโคโลนีตามลักษณะต่างๆ แล้ว เราจะทำเชื้อหรือโคโลนีที่เลือกให้บริสุทธิ์ต่อไป

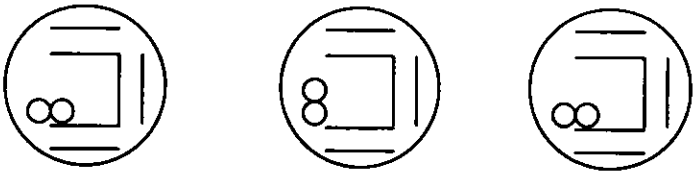
<u>การทำเชื้อที่แยกได้ให้บริสุทธิ์</u>

YM Agar + antibiotic **YM Agar + pH < 4.5**

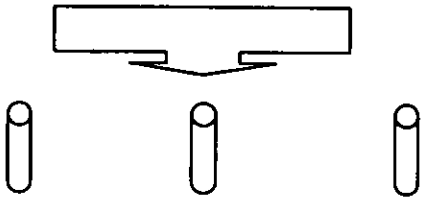


2. YM Agar Streak plate (Purification 1)

3. YM Agar Streak plate (Purification 2)



4. YM Agar Streak plate (Purification 3)



<u>วิธีการแยกให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์</u>

1. Spread plate จะใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างที่เลี้ยงอยู่ใน อาหารเหลวมา 0.1 มิลลิลิตรจากนั้นถ่ายใส่จานเพาะเชื้อที่มีที่มียาปฏิชีวนะ และมีค่าพีเอช < 4.5 จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-4 วัน
2. Streak plate เป็นการแยกโคโลนีเดี่ยวที่ได้จากการ spread plate ที่มีการเจริญดีแล้ว เพื่อมาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยการถ่ายลงในอาหารแข็ง YM agar โดยจะมีการแยกโคโลนีเดี่ยวจากการ streak plate ต่ออีก 2 ครั้ง
3. การเตรียมเก็บเชื้อ (slant) เป็นการเก็บเชื้อที่มีความบริสุทธิ์แล้วลงเก็บไว้เพื่อรอการถ่ายเชื้อโดยมีวิธีการ คือ

เตรียมอาหาร YM agar ใส่หลอดประมาณ 3 มล.

⇓

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที

⇓

นำมาวางเอียงเพื่อให้อาหารแข็ง

⇓

ใช้ Loop เขี่ยเชื้อที่บริสุทธิ์จากจานเพาะเชื้อลงในหลอดอาหาร

⇓

นำมาบ่มเพื่อให้เชื้อมีการเจริญ

⇓

ใช้ parafilm พันและเก็บในตู้เย็นเพื่อรอการถ่ายเชื้อ

<u>การเก็บเชื้อใน Glyceral มีวิธีการดังนี้</u>

เตรียมอาหาร YM broth หลอดละ 3 มล

⇓

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที

⇓

ใช้ Loop เขี่ยเชื้อที่บริสุทธิ์จากจานเพาะเชื้อลงในหลอดอาหาร

บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 วัน

⇓

เตรียมกลีเซอรอลที่ฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 0.5 มล

⇓

ดูดเชื้อจากอาหารเหลว 0.5 มล. ถ่ายลงกลีเซอรอลผสมให้เข้ากัน

⇓

นำเก็บที่ –80 องศาเซลเซียส

2. การวัดกิจกรรมการยับยั้ง *Vibrio harveyi* ของยีสต์ที่แยกได้โดยวิธี Agar spot assay

2.1. ศึกษาการเจริญของเชื้อ *V.harveyi* โดยการนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี plate count

2.1.1. เขี่ยเชื้อ *V.harveyi* จากอาหารวุ้นเอียงลงในอาหารแข็ง TSA, TCBS และในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง เพื่อทดสอบการเรืองแสง, การให้โคโลนีสีเขียว ในอาหาร TSA, TCBS และ 16 ชั่วโมงเพื่อเตรียมถ่ายเชื้อ

2.1.2. ถ่ายเชื้อ *V.harveyi* 100 ไมโครลิตร จากอาหาร TSB ในข้อ 2.1.1 (อัตราส่วนร้อยละ 3.3) ลงในอาหาร TSB 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.1.3. เจือจางเชื้อด้วยสารละลายเกลือแกง 0.85 % ให้อยู่ในช่วง 10^{-6} - 10^{-9} แล้วนำเชื้อที่เจือจางได้ 100 ไมโครลิตร เกลี่ยลงในอาหาร TSA เจือจางละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ

30°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.1.4. นับจำนวนโคโลนีและทำการคำนวนให้เป็นหน่วย CFU/ml

2.2. ศึกษาความสามารถในการยับยั้ง *Vibrio harveyi* ของเชื้อยีสต์ที่แยกได้

2.2.1. ถ่ายเชื้อยีสต์จากอาหารวุ้นเอียงลงบนอาหาร YMA บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเชื้อยีสต์ให้พร้อมทดลองในขั้นต่อไป(Active)

2.2.2. นำเชื้อ *V. harveyi* ลงเลี้ยงในอาหาร TSB 3 มิลลิลิตร และนำเชื้อยีสต์ที่ต้องการศึกษาแตะลงบนอาหาร YMA บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.3. ถ่ายเชื้อ *V.harveyi* 100 ไมโครลิตร(อัตราส่วนร้อยละ 3.3) ลงในอาหาร TSB 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.2.4. นำเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 และบ่มครบเวลาแล้วเจือจางให้ได้ 10^6 CFU/ml ด้วยสารละลายเกลือแกง 0.85 % จากการคำนวณในข้อ 2.2.1 แล้วนำเชื้อ 1 มิลลิลิตร มาเติมในอาหาร TSA 9 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45°ซ ผสมให้เข้ากัน (*V.harveyi* 10^5 CFU/ml) เททับบนอาหาร YMA ซึ่งมียีสต์เจริญอยู่แล้ว

2.2.5. บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและบันทึกผลการทดลองที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

3. การวัดกิจกรรมการยับยั้ง *Vibrio harveyi* ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ที่แยกได้โดยวิธี Agar diffusion assay

3.1. ถ่ายเชื้อยีสต์จากอาหารวุ้นเอียงลงบนอาหาร YMA บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2. ถ่ายเชื้อยีสต์จากข้อ 3.1 ลงเลี้ยงในอาหาร YMB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3. นำยีสต์จากข้อ 3.2 มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

3.4. นำส่วนใสมาปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วย 1 M NaOH แล้วทำให้ปลอดเชื้อด้วยวิธีการกรองผ่าน Syringe Filter ขนาด 0.2 µm

3.5. นำเชื้อ *V.harveyi* ซึ่งถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 (ตามข้อ 2.2.4) มาเจือจางให้ได้ 10^7 CFU/ml ด้วยสารละลายเกลือแกง 0.85 % มา 200 ไมโครลิตร ผสมในอาหาร TSA 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 55°ซ ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบนจานเลี้ยงเชื้อ จะได้จำนวน *V.harveyi* สุดท้ายในจานเลี้ยงเชื้อเป็น 10^5 CFU/ml

3.6. เจาะหลุมขนาด 4 มิลลิเมตร บนอาหาร TSA ในข้อ 3.5 แล้วนำส่วนใสของยีสต์จากข้อ 3.4 มาเจือจาง 0, 2, 4, 8 และ 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปิเปตมา 20 ไมโครลิตร หยอดลงบนหลุม พร้อมทั้งทำตัวควบคุมควบคู่ไปด้วย (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)

3.7. บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลอง

4. การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งของยีสต์

4.1. ถ่ายเชื้อยีสต์ซึ่งซึ่งเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 ลงในอาหาร Mueller Hinton Agar ซึ่งมี soluble starch % โดยการ spot ยีสต์ลงบนอาหารดังกล่าว จานละ 4 ไอโซเลต ทำไอโซเลตละ 2 ซ้ำ

4.2. บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ให้ยีสต์เจริญเป็นโคโลนีที่เห็นได้ด้วยตาเปล่า

4.3. เปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียีสต์เจริญในข้อ 4.2 แล้ววางเกล็ดไอโอดีนลงกลางจาน 1-2 เกล็ด

4.4. คว่ำส่วนตัวจานที่มียีสต์เจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15-30 นาที

4.5. ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและบันทึกผลการทดลองที่เวลา 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง

5. การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีนเคซีนของยีสต์

5.1. ถ่ายเชื้อยีสต์ซึ่งซึ่งเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 ลงในอาหาร Casien Agar โดยการ spot ยีสต์ลงบนอาหารดังกล่าว จานละ 4 ไอโซเลต ทำไอโซเลตละ 2 ซ้ำ

5.2. บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและบันทึกผลการทดลองที่เวลา 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง

6. การทดสอบความสามารถในการย่อย Tributyrin ของยีสต์

6.1. ถ่ายเชื้อยีสต์ซึ่งซึ่งเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 ลงในอาหาร Tributyrin Medium โดยการ spot ยีสต์ลงบนอาหารดังกล่าว จานละ 4 ไอโซเลต ทำไอโซเลตละ 2 ซ้ำ

6.2. บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและบันทึกผลการทดลองที่เวลา 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง

7. การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรทของยีสต์

ความสามารถในการรีดิวซ์เกลือไนเตรท/ไนไตรท์ โดยการเลี้ยงยีสต์ในอาหาร nitrate broth แล้วคัดเลือกยีสต์ที่สามารถใช้ไนเตรท ไนไตรท์ได้ดีที่สุด มีวิธีการทดสอบดังนี้

7.1. ถ่ายเชื้อยีสต์ซึ่งซึ่งเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 3.2 ในอัตราส่วนร้อยละ 3.3 ลงในอาหาร Nitrate Reduction Medium ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7.2. ทำการทดสอบไนไตรท์ที่เกิดขึ้นโดยเติม Sulfanilic acid และ α –naphthylamine

reagent solution อย่างละ 2-3 หยด เขย่า, สังเกตสี

สีแดง : ผลบวก(มีการรีดิวซ์ในเตรท)

ไม่มีสี : ผลลบ(ไม่มีการรีดิวซ์ในเตรท)

7.2.1. เติมผงสังกะสีลงไปเล็กน้อย เขย่า, สังเกตสี

สีแดง : ผลลบ(ไม่มีการรีดิวซ์ในเตรท)

ไม่มี : ผลบวก(มีการรีดิวซ์ในเตรท)