ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ก. สีย้อมแกรมแบคทีเรีย (Gram stain) โดยวิธี Hucker modification of gram method (Rodina, 1972)

สารละลาย

1. Hucker crystal violet

A	crystal violet (90 เปอร์เซ็นต์ dye content)	2 กรัม
	ethyl alcohol (95 %)	20 มิลลิลิตร
B	ammonium oxalate	0.8 กรัม
	distilled water	80 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้งาน สามารถเก็บรักษาสารละลายนี้ได้เป็นเดือน

2. Lugal solution

crystalline iodine	1 กรัม
potassium iodine	2 กรัม
distilled water	300 มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน คนให้ละลาย แล้วเก็บในที่ไม่ถูกแสง

3. Safranin solution

เตรียม stock safranin 2.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:10 ก่อนนำไปใช้งาน

วิธีการย้อมแกรม

เกลี่ยเชื้อบาง ๆ บนสไลด์ นำไปอังไฟพออุ่น (fixed) หยด crystal violet ให้ท่วม วางทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำประปาประมาณ 2 วินาที หยด lugal solution ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสี (decolorized) ด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ ethyl alcohol 0.5 นาที รีบล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วหยดสี safranin ประมาณ 1 นาที ล้างด้วยน้ำประปา ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope) กำลังขยาย 100 X ผลที่ได้ คือ แบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงน้ำเงินส่วนแกรมลบจะติดสีแดง

ข. สีย้อมแฟลกเจลลา (flagella stain) (ดัดแปลงจาก Baron and Finegold, 1990)

1. stock solution A

ฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์	5 มิลลิลิตร
กรดแทนนิก (tannic acid)	1 กรัม

2. stock solution B

crystal violet	1.2 กรัม
ethyl alcohol 25 เปอร์เซ็นต์	10 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วกรองก่อนเก็บไว้ใช้งาน

3. สารละลายสำหรับการนำไปใช้งาน (working solution)

ผสมสารละลาย A และ B ในอัตราส่วน A:B = 10:1 แล้วกรองก่อนนำไปใช้งาน (ควรเตรียมแต่พอใช้ในแต่ละครั้งเนื่องจากสีที่ผสมแล้วอายุการใช้งานจะสั้นมาก)

วิธีย้อม

1.ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (normal saline solution) ลงบนสไลด์ที่สะอาด 1 ห่วง โดยให้น้ำเกลือนูนสูง

2.ใช้เข็ม (needle) แตะโคโลนีที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง (MacConkey agar หรือ TSI) อายุประมาณ 1 วัน 1-2 โคโลนี แล้วนำไปจ่อที่หยดน้ำเกลือโดยยกปลายเข็มให้ลอยอยู่ 2-3 นาที และเห็นรอยเชื้อกระจายในหยดน้ำเกลือ

3. ปิดด้วยแผ่นแก้วบาง (cover glass) จะเห็นว่าด้านหนึ่งมีช่องว่างอยู่

4.ใช้หลอดหยดดูดสีแล้วนำปลายหลอดไปจ่อที่ขอบแผ่นแก้วบางด้านข้าง สีจะถูกดูดเข้าไป รอจนสีถูกดูดจนถึงด้านตรงข้ามกับที่จ่อปลายหลอดจึงยกหลอดหยดออก ปล่อยให้สีกระจายไปจนเต็มแผ่นแก้วเอง

5. ตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดากำลังขยาย 100 X

ค. การเตรียมการทดสอบด้วยชุดทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียทางชีวเคมี (api 20 E) น้ำยาและอาหารทดสอบอื่นๆ (Atlas, 1993; Baumann and Schubert; 1984; Mars, 1994)

1. api 20 E เป็นชุดทดสอบคุณสมบัติของเชื้อทางชีวเคมีอย่างเร็ว ซึ่งสามารถทดสอบคุณสมบติทั้งหมดได้ 20 คุณสมบัติ คือ bata-galactosidase (ONPG), arginine dihydrolase(ADH), lysine decarboxylase (LDC), ornithine decarboxylase (ODC), citrate utilization (CIT), hydrogensulfide production (H_2S), urease (URE), tryptophane deaminase (TDA), indole production (IND), acetoin production (VP), gelatinase (GEL), glucose fermentation (GLU), mannitol fermentation (MAN),

inositol fermentation (INO), sorbitol fermentation (SOR), rhamnose fermentation (RHA), sucrose fermentation (SAC), melibiose fermentation (MEL), amygdalin fermentation (AMY), arabinose fermentation (ARA), nitrite production, reduction to nitrogen gas

วิธีเตรียมการทดสอบ

เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลาย McFarland เบอร์ 0.5 จากนั้นใช้หลอดหยดที่ผ่านการฆ่าเชื้อดูดสารละลายเชื้อใส่ในช่องต่างๆ นำแถบ api นี้ใส่ในถาดที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้ออยู่ในหลุมเรียบร้อยแล้ว ปิดฝา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง หากช่องกลูโคสให้ผลบวกหรือให้ผลเป็นบวกตั้งแต่ 3 ช่องขึ้นไป สามารถทดสอบในขั้นตอนต่อไปได้ แต่หากช่องกลูโคสให้ผลลบหรืออีกกรณีหนึ่งคือให้ผลบวกไม่เกิน 2 ช่อง ให้บ่มต่ออีก 18-24 ชั่วโมง ก่อนที่จะทดสอบขั้นตอนต่อไป

2. การเตรียมอาหารทดสอบ glucose oxidation-fermentation test

ชั่ง OF basal medium 9.6 กรัม/ลิตร ผสมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วเติมน้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับ pH ให้ได้ 6.8 ± 0.2 นำไปต้มให้เดือด ใส่อาหารในหลอดฝาเกลียวประมาณ 1ใน 3 ของหลอด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3. การเตรียมน้ำยาทดสอบ oxidase test

ชั่ง tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1 กรัม ละลายในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร (ควรเตรียมก่อนใช้งาน)

4. การเตรียมน้ำยาทดสอบ catalase test

ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 3 เปอร์เซ็นต์

5. การเตรียมอาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (motility medium)

peptone	10 กรัม
NaCl	5.0 กรัม
agar	4.0 กรัม
beef extract	3.0 กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร คนให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ± 0.2 ต้มให้วุ้นละลายแล้วดูดใส่หลอดทดลองประมาณ 1 ใน 3 ของหลอด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

6. การเตรียม phenol red broth base สำหรับทดสอบการหมักย่อยน้ำตาล นอกเหนือจากน้ำตาลในชุดทดสอบ api 20 E คือ แลคโตส และ L-อะราบิโนส

ชั่ง phenol red broth base 16 กรัม/ลิตร เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรทั้งหมด ละลายน้ำกลั่นโดยลดอัตราส่วนที่จะนำไปผสมกับสารละลายน้ำตาล ปรับ pH ให้ได้ 7.3 ±0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วชั่งน้ำตาลในอัตรา 1 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรทั้งหมด ละลายน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่ลดจากการละลาย phenol red broth base นำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพื่อขจัดแบคทีเรียที่ปนเปื้อน และนำสารละลายนี้ผสมกับสารละลาย phenol red broth base แล้วดูดใส่หลอดทดลองฝาเกลียวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

7. การเตรียม phenol red broth base สำหรับการทดสอบการหมักย่อยน้ำตาล D-glucose แล้วให้แก๊ส

ชั่ง phenol red broth base 16 กรัม/ลิตร เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วเติมน้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.3 ± 0.2 ดูดสารละลายใส่หลอดทดลองฝาเกลียวที่ใส่หลอดดักแก๊ส (durham tube) ไว้แล้ว โดยใส่ให้ท่วมหลอดดักแก๊สนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

8. การเตรียมอาหารสำหรับการทดสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิและความเค็มต่าง ๆ

เตรียม 1 เปอร์เซ็นต์ ทริปโตน (tryptone)โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมเกลือที่ระดับ 0, 3 ,6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ดูดใส่หลอดทดลอง ส่วนการทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ นั้น ใช้ทริปโตน 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ดูดใส่หลอดทดลอง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ง. หลักการและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรีย (นันทนา, 2537; ชัยวุฒิ, 2539; Baumann and Schubert, 1984; Mars.,1994)

1. การทดสอบการเจริญบนอาหาร TCBS (Thiosulfate citrate bile salt sucrose)

หลักการ: อาหาร TCBS agar เป็นอาหารพิเศษที่เหมาะสำหรับการเจริญของแบคทีเรียสกุล *Vibrio* spp. เนื่องจาก pH เป็นด่างทำให้เชื้อวิบริโอเจริญได้ดีและยับยั้งการเจริญของ enteric bacteria อื่นๆ โดยน้ำดี (oxgall) จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และมีบรอมไธมอลบลู (bromthymol blue) เป็นอินดิเคเตอร์ ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลซูโครสได้จะมีกรดเกิดขึ้นทำให้ได้โคโลนีสีเหลือง ส่วนที่ไม่สามารถหมักย่อยได้จะให้โคโลนีสีเขียวน้ำเงิน

การทดสอบ ขีดเชื้อลงบนอาหาร TCBS ให้ได้โคโลนีเดี่ยว แล้วบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง

การอ่านผล มีเชื้อเจริญบนอาหารให้โคโลนีสีเหลือง เป็นแบคทีเรียวิบริโอที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลซูโครสได้ หากให้โคโลนีสีเขียวแสดงว่าไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลซูโครสได้

2. การทดสอบการเจริญบนอาหาร MacConkey agar

หลักการ: MacConkey agar ประกอบด้วยโปรตีน เกลือน้ำดี โซเดียมคลอไรด์ น้ำตาลแลคโตส วุ้น และสี 2 ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อนี้ใช้สี crystal violet และเกลือน้ำดี ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้แบคทีเรียแกรมลบเจริญได้ดี และแบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตสจะให้โคโลนีสีแดงหรือสีชมพู ซึ่งเป็นผลจากสีของ neutral red ในภาวะที่เป็นกรด (pH ต่ำกว่า 6.8) สำหรับแบคทีเรียที่ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตส โคโลนีจะใสไม่มีสีและไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การทดสอบ ขีดเชื้อบนอาหาร MacConkey agar ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง

การอ่านผล แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และหากให้โคโลนีสีแดงหรือชมพูแสดงว่าสามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตสได้ ส่วนแบคทีเรียที่ไม่สามารถเจริญได้แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก

3. การทดสอบ Glucose oxidation-fermentation test

หลักการ: เป็นการทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาพที่มีหรือไม่มีออกซิเจน การใช้น้ำตาลเหล่านี้จะให้กรดหรือทั้งกรดและแกส ในการทดสอบจะเพาะเชื้อลงไปในอาหาร 2 หลอด หลอดหนึ่งคลุมอาหารที่เพาะเชื้อด้วย mineral oil หรือพาราฟินเหลว ส่วนอีกหลอดไม่ต้องคลุม แบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลในภาวะที่มีออกซิเจนจะให้กรดในหลอดที่ไม่คลุม แต่จะไม่สามารถให้กรดในหลอดที่มีพาราฟินคลุมอยู่ สำหรับแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน หรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสได้จะให้กรดทั้ง 2 หลอด ส่วนแบคทีเรียที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลได้ทั้ง 2 สภาวะจะไม่สามารถให้กรดได้ การเกิดกรดจะทำให้ pH ของอาหารลดต่ำลง ส่งผลให้เปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารทดสอบ O/F Basal medium ผสมน้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบ ใช้เข็มแทงเชื้อลงไปในอาหาร 2 หลอด หลอดหนึ่งเติมพาราฟินเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยให้พาราฟินสูงกว่าอาหารทดสอบประมาณ 1 เซ็นติเมตร ส่วนอีกหลอดไม่ต้องเติม แล้วบ่มเชื้อไว้ 24-48 ชั่วโมง

การอ่านผล ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสีจากสีเดิม

4. การทดสอบ oxidase test

หลักการ: เป็นการทดสอบการมีเอนไซม์ไซโตโครม ออกซิเดส (cytochrome oxidase) โดยปกติจะใช้รีเอเจนต์ที่ไม่มีสีแต่จะมีสีเมื่อถูกออกซิไดซ์ รีเอเจนต์ที่ใช้มี 2 ชนิด คือ tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride หรือ dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride เมื่อถูกออกซิไดซ์จะมีสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้ม ดังนั้นแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ออกซิเดส จะสามารถออกซิไดซ์รีเอเจนต์เหล่านี้ทำให้เห็นเป็นสีน้ำเงินเข้ม

น้ำยาทดสอบ สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

การทดสอบ หยดสารละลายลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อมาขีดลงบนกระดาษกรองนั้น

การอ่านผล ผลบวกเกิดสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้มบนแผ่นกระดาษกรองภายใน 10 วินาที

ผลลบ ไม่เกิดสีดังกล่าว

5. การทดสอบ catalase test

หลักการ: เป็นการทดสอบเพื่อจำแนกแบคทีเรีย ที่สามารผลิตเอนไซม์คาตาเลส โดยปกติในขบวนการหายใจแบบใช้ออกซิแจน อะตอมของไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจนทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์คาตาเลสเพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้แตกออกได้ก๊าซออกซิเจนและน้ำ ดังนั้นการทดสอบว่าแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ชนิดนี้หรือไม่ ทำได้โดยการหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนโคโลนีถ้าเกิดฟองอากาศแสดงว่าให้ผลบวก การทดลองนี้ไม่ควรทำบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดผสมอยู่ด้วยเพราะเม็ดเลือดแดงมีเอนไซม์คาตาเลสภายในเซลล์ การแปรผลอาจผิดพลาดได้ จึงควรเคลื่อนย้ายโคโลนีมาทดสอบบนสไลด์แทน

การทดสอบ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อตรงกลางโคโลนีแตะบนสไลด์ที่สะอาด แล้วหยด 3 เปอร์เซ็นต์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนเชื้อที่อยู่บนสไลด์ สังเกตฟองอากาศที่เกิดขึ้นในทันที

การอ่านผล ผลบวก มีฟองอากาศเกิดขึ้นในทันที

ผลลบ ไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้น

6. การทดสอบ motility test

หลักการ: เป็นการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากการที่เชื้อมีแฟลกเจลลา เชื้อที่สามารถเคลื่อนที่ได้จะเคลื่อนที่จากบริเวณเดิมไปยังบริเวณใหม่ ซึ่งจะเกิดการเจริญและแบ่งตัวไปยังบริเวณนั้นต่อไป

อาหารทดสอบ motility test medium เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแทงลงไปในอาหารตรงๆ (stab) เพียงครั้งเดียว ประมาณ2/3 ของส่วนสูงอาหาร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง อ่านผล หากยังให้ผลลบให้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 1-2 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงเป็นระยะ

การอ่านผล ผลบวก เห็นการเจริญของเชื้อออกมานอกรอยที่เข็มแทง หรือไม่มีรอยการเจริญที่ชัดเจนบริเวณรอยเข็มแทงแต่อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดขุ่นกว่าเดิม

ผลลบ เห็นการเจริญของเชื้อโดยมีขอบเขตชัดเจนที่บริเวณรอยเข็มแทง แม้จะบ่มต่ออีก 2 สัปดาห์ ก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

7. การทดสอบ Beta-D-galactosidase test (ONPG)

หลักการ: เป็นการทดสอบการสร้างเอนไซม์ β-D-galactosidase โดยแบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตสได้จะสามารถถูกกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์ชนิดนี้เมื่อมีสารตั้งต้น คือ น้ำตาลแลคโตสเท่านั้น ส่วนกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้จะขาดเอนไซม์ชนิดนี้ ซึ่งในการทดสอบเอนไซม์ชนิดนี้สามารถย่อยสารตั้งต้น คือ O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) ซึ่งไม่มีสีให้อยู่ในรูปของสารประกอบ O- nitrophenol ซึ่งมีสีเหลือง

อาหารทดสอบ ชุดทดสอบ api 20 E (ONPG)

การทดสอบ ใส่สารละลายเชื้อลงในช่อง ONPG บ่มไว้ 24 ชั่วโมง

การอ่านผล ผลบวก ONPG เป็นสีเหลือง ภายใน 24 ชั่วโมง

ผลลบ ไม่มีการเปลี่ยนสีของ ONPG

8. การทดสอบ decarboxylase test (lysine, ornithine, arginine)

หลักการ: แบคทีเรียหลายชนิดสามารถย่อยกรดอะมิโนให้เอมีนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) อาหารเลี้ยงเชื้อ Moeller decarboxylase mediam มีกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ lysine, arginine หรือ ornithine อย่างใดอย่างหนึ่งเป็นส่วนประกอบ รวมทั้งน้ำตาลกลูโคสและอินดิเคเตอร์ คือ bromcresol purple ในช่วงแรกของการบ่มเพาะเชื้อ แบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสจะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์เป็นสีเหลือง และอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสภาวะเป็นกรด ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสทำงาน ซึ่งหมายถึงมีการย่อยกรดอะมิโนเกิดขึ้นให้เอมีน (amine) ที่มีผลทำให้เป็นด่างมากขึ้นทำให้สีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนกลับเป็นสีม่วง ดังนั้นในหลอดควบคุมที่มีส่วนประกอบต่างๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหมือนกันแต่ไม่มีกรดอะมิโน แบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสหลอดควบคุมควรให้สีเหลือง เพราะมีการใช้น้ำตาลในสภาพที่ไม่มีอากาศเท่านั้น ส่วนแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลในสภาพที่ไม่มีอากาศไม่สามารถให้สีเหลืองก่อนได้ ดังนั้นการใช้กรดอะมิโนโดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงให้สีม่วงเข้ม ในการทดสอบจะใส่

เชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ decarboxylase medium ทั้งในหลอดที่มีกรดอะมิโนและไม่มีกรดอะมิโน หยดพาราฟินหรือ mineral oil ลงไปให้สูงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสนาน 18-24 ชั่วโมง ในการอ่านผลต้องเปรียบเทียบกับหลอดควบคุมเสมอ โดยผลบวกหลอดควบคุมเป็นสีเหลืองหลอดที่มีกรดอะมิโนเป็นสีม่วง ส่วนผลลบหลอดควบคุมเป็นสีเหลือง หลอดที่มีกรดอะมิโนเป็นสีเหลือง

อาหารทดสอบ ชุดทดสอบ api 20 E

การทดสอบ ใส่สารละลายเชื้อลงไปในช่อง ADH LDH ODH แล้วปิดทับด้วยพาราฟินเหลวที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ บ่มไว้ ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

การอ่านผล ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีส้มแดงหรือแดง

ผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง

9. การทดสอบ citrate utilization test

หลักการ: เป็นการใช้จำแนกแบคทีเรียแกรมลบ โดยอาศัยความสามารถในการใช้ซิเตรท (citrate) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยแบคทีเรียที่สามารถใช้ซิเตรทจะผลิตเอนไซม์ซิตริเอส (citriase) ย่อยซิเตรทให้เป็นออกซาโลอะซิเตทและอะซิเตท และยังมีเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งคือ ออกซาโลอะซิเตท ดีคาร์บอกซิเลส (oxaloacetate decarboxylase) ซึ่งสามารถย่อยอะซิเตทให้เป็นไพรูเวท (pyruvate) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะรวมตัวกับโซเดียมและน้ำได้เป็นโซเดียมคาร์บอเนต ($NaCO_3$) และสารประกอบที่มี pH สูงขึ้น ทำให้สีของอินดิเคเตอร์บรอมไธมอนบลูในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นน้ำเงิน

อาหารทดสอบ api 20 E

การทดสอบ ใส่สารละลายเชื้อลงในช่อง CIT จนเต็มช่อง บ่มไว้ 18-24 ชั่วโมง

การอ่านผล ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเขียวแกมน้ำเงิน หรือสีน้ำเงิน

ผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนหรือสีเหลือง

10. การทดสอบการผลิต H_2S

หลักการ: อาหารเลี้ยงเชื้อ triple sugar iron (TSI) ใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน โดยใช้ความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และซูโครสทำให้ได้กรดหรือทั้งกรดและก๊าซ และก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) แบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนจะให้กรดโดยอาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองที่ก้นหลอด และจะให้ผลผลิตเป็นด่างจากการใช้เปปโตนโดยใช้ออกซิเจนที่ผิวหน้า ทำให้ส่วนที่สัมผัสอากาศ (slant) เปลี่ยนเป็นสีแดง ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสแต่ไม่หมักย่อยแลคโตสหรือซูโครส ผิวหน้าวุ้นจะเป็นสีแดงและที่ก้นหลอดเป็นสีเหลือง ส่วนแบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยแลคโตสหรือซูโครสหรือ

ทั้ง 2 อย่างด้วย จะให้กรดมากถึงแม้จะเกิด oxidation deamination ให้แอมโมเนียที่มีคุณสมบัติทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นด่าง แต่ก็ไม่เพียงพอที่จะเปลี่ยน pH ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพกรดทั้งหลอดได้ สำหรับการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สังเกตจากรอยแตกหรือฟองอากาศ ส่วนก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จะให้สีดำที่ก้นหลอดซึ่งจะเกิดในสภาพที่เป็นกรดเท่านั้น

11. การทดสอบ urease

หลักการ: เป็นการทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease) โดยดูผลจากการย่อยยูเรีย (urea) ให้ได้แอมโมเนีย ซึ่งทำให้ pH เพิ่มขึ้นและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ คือ phenol red จากสีเหลืองเป็นสีแดง

อาหารทดสอบ api 20 E

การทดสอบ ใส่สารละลายเชื้อลงในช่อง URE บ่มไว้ 18-24 ชั่วโมง

การอ่านผล ผลบวก อาหารเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือส้ม

ผลลบ อาหารเป็นสีเหลือง

12. การทดสอบ indole

หลักการ: เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตอินโดล (indole) จากทริปโตเฟน (tryptophan) โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อ indole broth ประกอบด้วย tryptophan rich peptone และโซเดียมคลอไรด์ เมื่อทริปโตเฟนในเปปโตนถูกออกซิไดซ์โดยเอนไซม์ทริปโตเฟนเนส (tryptophanase) ให้อินโดล, สคาโตล (skatole) และ อินโดลอะซิติก แอซิด (indoleacetic acid) สามารถตรวจสอบอินโดลที่ได้โดยใช้ alcoholic p-dimethylaminobenzaldehyle โดยอินโดลจะทำปฏิกิริยากับอัลดีไฮด์ (aldehyle) ให้ผลผลิตเป็นสีแดง ในส่วนที่เป็นแอลกอฮอล์ (alcoholic layer)

อาหารทดสอบ api 20 E

การทดสอบ ใส่สารละลายเชื้อลงในช่อง IND บ่มไว้ 24 ชั่วโมง ทดสอบการสร้างอินโดลโดยหยดน้ำยาทดสอบ IND ลงไปหลังจากผ่านการบ่ม

การอ่านผล ผลบวก อาหารเปลี่ยนเป็นวงสีแดง (red ring)

ผลลบ ไม่มีวงสีแดงเกิดขึ้น

13. การทดสอบ VP (VogesProskauer test)

หลักการ: เป็นการตรวจสอบการมีอยู่ของสารอะเซโตอิน (acetoin หรือ acetylmethyl carbind) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการผลิต butylene glycol การทดสอบใช้รีเอเจนต์ 2 ชนิด คือ α-naphthol และ 40 เปอร์เซ็นต์ โปแทสเซียมไฮดร็อกไซด์ (KOH) ลงในเชื้อที่บ่มไว้แล้วเขย่าให้เข้ากัน เพื่อให้ออกซิเจนจากในอากาศเข้าไปผสมด้วย ถ้ามีอะเซโตอินมันจะถูกออกซิไดซ์ในสภาพที่มีออกซิเจนและเป็นด่างได้ผลผลิตเป็นไดอะซิติล (diacetyl) และไดอะซิติลนี้จะทำปฏิกิริยากับกลุ่ม

ควอนิดีน (quanidine) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเปปโตนในสภาพที่เป็นด่าง โดยมี α- napthol เป็นตัวคาตาลิสต์ และทำให้ผลเป็นสารประกอบสีแดง

อาหารทดสอบ ชุดทดสอบ api 20 E

การทดสอบ ใส่สารละลายเชื้อลงในช่องทดสอบ VP บ่มเชื้อไว้ 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่รีเอเจนต์ตัวแรกคือ VP1 (alpha-naphthol) ลงไป 1 หยด แล้วใส่รีเอเจนต์ตัวที่ 2 คือ VP2 (KOH) 1 หยด วางทิ้งไว้ 10 นาที สังเกตการเกิดสี

การอ่านผล ผลบวก เกิดสีชมพู

ผลลบ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

14. การทดสอบ gelatinase test

หลักการ: เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) ในการย่อยสลายเจลาติน (gelatin) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบมีหลายอย่าง เช่น starch gelatin agar หรือ nutrient gelatin medium ที่ประกอบด้วยเปปโตน น้ำล้างเนื้อ และ เจลาติน ซึ่งแตกต่างจากการใช้ starch gelatin agar การใช้ nutrient gelatin medium จะตรวจสอบคุณสมบัติความแข็งของเจลาติน ซึ่งจะอยู่ในสภาพของเหลวที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส แต่จะมีสภาพเป็นของแข็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังนั้น เมื่อเจลาตินถูกย่อยด้วยเอนไซม์เจลาติเนสแล้ว เจลาตินจะไม่มีสภาพเป็นเจลหรือแข็งตัวที่ 4 องศาเซลเซียสอีก

อาหารทดสอบ ชุดทดสอบ api 20 E

การอ่านผล ผลบวก สารสีดำกระจายจากก้นหลอดไปทั่วซึ่งหมายถึงว่าเจลาตินถูกย่อยสลาย

ผลลบ ไม่มีการกระจายของสารสีดำ

15. การทดสอบการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่างๆ (กลูโคส, แมนนิทอล, อินโนซิทอล, ซอร์บิทอล, แรมโนส, ซูโครส, เมลลิไบโอส, อะมิกการิน, อราไบโนส, L-อะราไบโนส, แลกโตส) และการสร้างแก๊สจากการหมักย่อยน้ำตาล D-กลูโคส

อาหารทดสอบ ชุดทดสอบ api 20 E และ phenol red broth base ผสมน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบ ใส่สารละลายเชื้อลงในชุดทดสอบ api 20 E สำหรับการทดสอบการหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส, แมนนิทอล, อินโนซิทอล, ซอร์บิทอล, แรมโนส, ซูโครส, เมลลิไบโอส, อะมิกการิน และ อะราไบโนส ส่วนการทดสอบการหมักย่อย L-อราไบโนส, แลกโตสและการสร้างแก๊สใน D-กลูโคส ทดสอบโดยการใส่เชื้อลงในอาหาร phenol red broth base ผสมน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อไว้ 18-24 ชั่วโมง

การอ่านผล ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อใน api 20 E เปลี่ยนเป็นสีเหลือง และหากมีการสร้างแก๊สในการหมักย่อย D-กลูโคสด้วยจะปรากฏฟองอากาศในหลอดดักแก๊ส (durham tube)

ผลลบ ไม่มีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อและไม่มีฟองอากาศในหลอดดักแก๊ส

16. การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ (4 , 20, 30, 35, 40, 42 และ 45 องศาเซลเซียส)

การทดสอบ ใส่เชื้อลงในอาหาร tryptone broth 1 เปอร์เซ็นต์ (W/V) ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง สังเกตเชื้อมีความขุ่น หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ 25 ไมโครลิตร ลงในอาหาร tryptone broth แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 24 -48 ชั่วโมง

การอ่าน ผล ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่นเมื่อเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ

ผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อใสเหมือนหลอดควบคุม

17. การทดสอบการเจริญในระดับความเค็มต่างๆ (0, 3, 6, 8, 10 เปอร์เซ็นต์)

การทดสอบ เลี้ยงเชื้อในอาหาร tryptone broth 1 เปอร์เซ็นต์ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง สังเกตเชื้อมีความขุ่น ถ่ายเชื้อ 25 ไมโครลิตร ลงในอาหาร tryptone broth 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมเกลือความเข้มข้นต่างๆ นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สังเกตความขุ่นเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้เติมเชื้อ

การอ่านผล ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่นเมื่อเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้เติมเชื้อ

ผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อใสเหมือนหลอดควบคุม

18. การทดสอบ O/129 (2,4-diamine-6,7-isopropyl pterdine phosphate)

การทดสอบ ละลายเชื้อในน้ำเกลือที่ปลอดเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลาย MacFarland เบอร์ 0.5 ใช้สำลีพันไม้จุ่มสารละลายเชื้อป้ายบนอาหาร MHA ให้ทั่ว ต่อจากนั้นวางแผ่นยา O/129 10 และ 150 μg ลงบนผิวหน้า บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

การอ่านผล เกิดรอยใส (clear zone) รอบๆ โคโลนี แสดงว่าไม่มีการดื้อต่อยาของเชื้อแบคทีเรีย หากไม่เกิดรอยใสแสดงว่ามีการดื้อต่อยานั้น

จ. วิธีเตรียมสารละลาย McFarland เบอร์ต่าง ๆ (สารละลายมาตรฐาน $BaSO_4$) (นันทนา, 2537)

1. เตรียม 0.048 M $BaCl_2$: $BaCl_2$ 1.175 % (W/V)

2. เตรียม 0.36 N H_2SO_4 : H_2SO_4 1 % (V/V)

Tube No.	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Approx.cell density (x 10^8cell/ml)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

ฉ. สารละลาย Davidson's fixative (Elston, 1990)

ส่วนผสมสำหรับการเตรียมสารละลาย 2 ลิตร

เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์	600	มิลลิลิตร
ฟอร์มัลดีไฮด์ 37-40 เปอร์เซ็นต์	400	มิลลิลิตร
น้ำทะเลที่ผ่านการกรอง	200	มิลลิลิตร
น้ำประปา	600	มิลลิลิตร
glacial acetic acid	200	มิลลิลิตร

ช. ขั้นตอนการ Dehydration (Bancroft, 1967)

นำพลาสติกสี่เหลี่ยมที่มีชิ้นเนื้อเยื่อบรรจุอยู่ใส่ในเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ ซึ่งตัวอย่างจะถูกแช่ในสารละลายต่างๆ ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	แอลกอฮอลล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
2	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
3	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
4	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์ซนต์	1
5	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
6	แอบโซลูทแอลกอฮอล์	1
7	ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์	1
8	ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์	1

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
9	ไซลีน (xylene)	1
10	ไซลีน	1
11	พาราพลาสท์ (paraplast)	1
12	พาราพลาสท์	1

ซ. สีย้อมฮีมาท็อกไซลินและอีโอซิน (Hematoxylin & Eosin; H&E) (Humason, 1962; Bancroft, 1967)

วิธีเตรียมสีฮีมาท็อกไซลิน

ฮีมาท็อกไซลิน (hematoxylin crystal)	1	กรัม
เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์	10	มิลลิลิตร
โปแทสเซียม อลัม ($KAI(SO_4)_2.12\ H_2O$	20	กรัม
เมอคิวริก อ๊อกไซด์ (mercuric oxide)	0.5	กรัม
กรดอะซิติก (acetic acid)	2 -3	หยด
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

ละลายโปแทสเซียมอลัม 20 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลิลิตร นำไปต้มจนเดือด และละลายสีฮีมาท็อกไซลินในเอทานอล 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเติมในสารละลายโปแทสเซียมอลัม ต้มต่ออีก 0.5 นาที แล้วเติมเมอคิวริกออกไซด์ 0.5 กรัม ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว แล้วเติมกรดอะซิติกเข้มข้น 2-3 หยด สามารถเก็บไว้ได้ 1-2 เดือน และกรองทุกครั้งก่อนใช้งาน

วิธีเตรียมสีอีโอซิน (Eosin)

อีโอซิน (Eosin Y. Cl 45380)	1	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1,000	มิลลิลิตร
กรดอซิติกเข้มข้น	5	มิลลิลิตร

ผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน

ขั้นตอนการย้อมสี

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	ไซลีน	2
2	ไซลีน	2
3	ไซลีน	2
4	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
5	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
6	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
7	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
8	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
9	น้ำกลั่น	1
10	ฮีมาท็อกไซลิน	4
11	น้ำประปา	1
12	น้ำกลั่น	1
13	แอลกอออล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
14	อีโอซิน	2
15	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
16	แอลกอออล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
17	แอบโซลูทแอลกอฮอล์	2
18	ไอโซโพรพิวแอลกอฮอล์	2
19	ไอโซโพรพิว แอลกอฮอล์	2
20	ไซลีน	2
21	ไซลีน	2
22	ไซลีน	2

ใช้แผ่นแก้วบางที่ทาด้วยน้ำยาเปอร์เม้าท์ปิดทับ แล้วนำไปศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

ฌ. สารเคมีและวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

การเตรียมสารละลายคงสภาพ (fixative solution) และสารละลายบัฟเฟอร์รักษาสภาพเนื้อเยื่อ (washing buffer)

สารเคมีและวิธีการเตรียม

1. โซเดียมคาโคไดเลทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M pH 7.4

โซเดียมไดเมทธิลอะซิเนท (sodium dimethyl acenate)	19.9 กรัม
น้ำกลั่น	500 มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมไดเมทธิลอะซิเนทในน้ำกลั่นโดยใช้เครื่องช่วยคนสารละลาย เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้วจึงเติมกรดไฮโดรคลอริค (hydrochloric acid) 0.2 M ปริมาตร 27 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 473 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันและทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้งานในขั้นตอนต่อไป

2. สารละลายคงสภาพเนื้อเยื่อขั้นแรก (primary fixative)

กลูตาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ความเข้มข้น 2.5 เปอรเซ็นต์	20 มิลลิลิตร
โซเดียมคาโคไดเลทบัฟเฟอร์ 0.1 M (จากข้อ 1)	50 มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) 10 เปอร์เซ็นต์	30 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดลงในน้ำกลั่น บรรจุในขวดสีชาปิดฝาให้มิดชิดและนำเก็บในตู้เย็น

3 สารละลายบัฟเฟอร์รักษาสภาพเนื้อเยื่อ (washing buffer)

โซเดียมคาโคไดเลทบัฟเฟอร์ 0.1 M (จากข้อ 1)	50 มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) 10 เปอร์เซ็นต์	100 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	94 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกัน บรรจุในขวดสีชาปิดฝาให้มิดชิดและนำเก็บในตู้เย็น

4. สารละลายคงสภาพเนื้อเยื่อขั้นสุดท้าย (post fixative)

ออสเมียมเตตราออกไซด์ (osmium tetraoxide, OsO_4) 1 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาทางจุลทรรศน์อิเลคตรอน

เลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone broth เป็นเวลาประมาณ 10 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นของเชื้อ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งไป ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ 4-5 ครั้ง

ก.ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) (Hayat, 1970)

1. แช่ตัวอย่างในสารละลายคงสภาพเนื้อเยื่อขั้นแรก (primary fixative) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.นำไปหมุนเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 5,000 รอบ/นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์รักษาสภาพเนื้อเยื่อ (washing buffer) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที (หากรอทำขั้นตอนต่อไปสามารถเก็บรักษาในบัฟเฟอร์นี้ แล้วแช่ในตู้เย็นข้ามคืน)

3.นำตัวอย่างแช่ในสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ออสเมียมเตราออกไซด์ 1-2 ชั่วโมง (post fixative)

4. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

5. เพิ่มความคมชัดให้แก่ตัวอย่าง (En block-stain) โดยย้อมตัวอย่างใน 2 เปอร์เซ็นต์ uranyl acetate 20 นาที

6. ขั้นตอนการ Dehydration โดยแช่ตัวอย่างในสารละลายตามลำดับดังนี้

Ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

Ethanol 80 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

Ethanol 90 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

Ethanol 100 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

7. ขั้นตอน Infiltration (การนำสารเข้าสู่เนื้อเยื่อ)

7.1 Propylene oxide 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

7.2 Propylene oxide : Epoxy resin, (1:1) 1-2 ชั่วโมง

7.3 Propylene oxide : Epoxy resin, (1:2) 1-2 ชั่วโมง

7.4 Pure epoxy resin 2-3 ชั่วโมง

8. ขั้นตอน Embedding

8.1 หยด Pure epoxy resin ลงในแคปซูลประมาณ 1 ใน 4 แล้วไล่ฟองอากาศออก

8.2 นำตัวอย่างเทลงบนกระดาษ แล้วเขี่ยใส่ลงในแคปซูล โดยให้ตัวอย่างอยู่ตรงก้นของแคปซูล

8.3 ตรวจดูฟองอากาศ เติม Pure Epoxy resin วางไว้ 2-3 ชั่วโมง

9. ขั้นตอน Polymerlization โดยนำตัวอย่างใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ค้างคืน

10. ขั้นตอนการตัดเซกชัน (section) และ ย้อมสี โดยนำตัวอย่างไปตัดเซกชันด้วยเครื่องอัลตราไมโครโตม (ultramicrotome)ให้ได้ความหนา 60-90 นาโนเมตร แล้วย้อมด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ uranyl acetate และ lead citrate นำตัวอย่างที่พร้อมสำหรับการศึกษาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM

ข.ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบลำแสงส่องกราด (SEM) (เวคิน, 2529)

1. แช่ตัวอย่างในสารละลายคงสภาพเนื้อเยื่อขั้นแรก (primary fixative) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2. นำไปหมุนเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 5,000 รอบ/นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์รักษาสภาพเนื้อเยื่อ (washing buffer) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที (หากรอทำขั้นตอนต่อไปสามารถเก็บรักษาในบัฟเฟอร์นี้แล้วแช่ในตู้เย็นข้ามคืน)

3. นำตัวอย่างที่ได้มาเจือจางให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร และหยดลงบนแผ่นสไลด์ที่ผ่านการเคลือบ (coat) ด้วย poly -L-lysine แล้ว

4. นำตัวอย่างแช่ในสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ออสเมียมเตราออกไซด์ 1-2 ชั่วโมง (post fixative)

5. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

6. นำตัวอย่างมาผ่านขั้นตอนการ Dehydration ในสารละลายตามลำดับดังนี้

Ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
Ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
Ethanol 80 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
Ethanol 90 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
Ethanol 100 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที

7. ทำตัวอย่างให้แห้งที่จุดวิกฤติ (critical point drying: CPD) โดยนำตัวอย่างเข้าเครื่อง Samdri จนตัวอย่างแห้งสนิท

8. นำตัวอย่างที่แห้งสนิทมาติดบนแผ่นทองเหลือง (stub) โดยใช้เทปกาว 2 หน้า ทิ้งไว้ให้แห้งหรืออาจเก็บในตู้เย็นค้างคืน

9. ขั้นตอนการฉาบทอง (coating) โดยการให้แกสเฉื่อย (Ar) ไปกระตุ้นอิออนของทองคำ (Au) ให้หลุดออกมาไปฉาบตัวอย่าง (ion sputter) เป็นเวลา 4 นาที ซึ่งจะได้ความหนาในการฉาบทอง 20-30 นาโนเมตร นำตัวอย่างที่พร้อมจะดูไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ SEM

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 1 มาตรฐานสำหรับแปรผลความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ

ชนิดยา	ค่ามาตรฐานของเส้นผ่านศูนย์กลางรอยใส (มม.) (sensitive)
Chloramphenical 30 µg	≥ 18
Oxolinic acid 2 µg	≥11
Norfloxacin 10 µg	≥17
Sulfamethoxazole 23.75 µg / Trimethoprim 1.25 µg	≥ 16
Tetracycline 30 µg	≥19

ที่มา : มาลิน, 2532 อ้างโดย นันทนา, 2537

ยาที่ก่อให้เกิดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยใสมากกว่าค่ามาตรฐานช่วง sensitive ถือว่าเชื้อความไวต่อยานั้นๆ (sensitive) แต่หากค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยใสน้อยกว่าค่ามาตรฐานถือว่าเชื้อมีโอกาสต่อต้านยานี้ (resistant)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยป่วยจากฟาร์มเอกชนตำบลนาทับ อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา

ชนิดเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลางรอยใส (มม.)				
	SXT	OA	C	NOR	OT
V. pelagius II	30	22	29	28	12
V. mediterranei	33	21	31	24	29
Pseudomonas	27	22	24	27	18

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยป่วยจากฟาร์มเอกชนอำเภอยะหริ่ง (เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1)

ชนิดเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลางรอยใส (มม.)				
	SXT	OA	C	NOR	OT
V. pelagius II	0	21	13	22	12
V. splendidus I	31	22	33	29	27
V. nereis	30	18	29	24	24
V. alginolyticus	21	20	27	22	23
V. carcharriae	25	20	27	22	23
V. mediterranei	28	18	27	22	23
Pseudomonas	28	22	23	25	0

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยป่วยจากฟาร์มเอกชนอำเภอยะหริ่ง (เก็บตัวอย่างครั้งที่ 2)

ชนิดเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลางรอยใส (มม.)				
	SXT	OA	C	NOR	OT
V. mediterranei	30	18	29	27	21

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความไวต่อยาด้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยป่วยที่ติดเชื้อรุนแรงจากหน่วยวิจัยเพาะฟักสัตว์น้ำของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี

หอยตัวที่	ส่วนที่นำมาเพาะเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลางรอยใส (มม.)				
		SXT	OA	C	NOR	OT
1	เลือด	28	26	35	27	28
	ตุ่มหนอง	29	22	33	27	26
2	เลือด	27	22	33	26	24
3	เลือด	30	23	34	29	26
	แผล	26	24	34	28	27
4	เลือด	28	23	33	27	27
	ตุ่มหนอง	26	23	33	29	26
5	เลือด	29	24	35	27	28
	แผล	26	23	34	26	26
6	เลือด	28	25	33	28	26
	ตุ่มหนอง	30	26	35	28	27
7	เลือด	27	24	35	27	28
8	เลือด	28	23	34	28	26
	ตุ่มหนอง	26	22	32	26	25
9	เลือด	28	24	34	28	-

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ใช้ในการฉีดเชื้อเข้าสู่หอยปกติ โดยเตรียมความเข้มข้นของเชื้อจากการวัดความขุ่น (OD)

ชนิดเชื้อแบคทีเรีย	OD	ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย (cfu/ ml)
V. nereis	0.100	9.3×10^{7}
V. carcharae	0.109	1.3×0^{8}
V. mediterranei	0.109	1.28×10^{8}
V. pelagius II	0.103	8.6×10^{7}
V. splendidus I	0.106	1.34×10^{8}
V. alginilyticus	0.110	8.6×10^{7}
Pseudomonas sp.	0.104	1.28×10^{8}
Alcaligenes sp.	0.108	8×10^{7}