เอกสารอ้างอิง

เกรียงศักดิ์ สายธนู, เกรียงศักดิ์ พูนสุข และ สงคราม เหลืองทองคำ "การแพร่กระจายของวิบริโอ พาราฮีโมลัยติคัสในน่านน้ำไทย ผลการสำรวจปี 2521-2524" การสัมมนาครั้งที่ 2 การวิจัยคุณภาพน้ำและคุณภาพทรัพยากรมีชีวิตในน่านน้ำไทย หน้า 255-262 สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ, 2524.

_____. "โคลิฟอร์มและวิบริโอตามชายฝั่งทะเลตะวันออกและตะวันตก การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อหลังจากการเก็บตัวอย่าง" การสัมมนาครั้งที่ 2 การวิจัยคุณภาพน้ำและคุณภาพทรัพยากรมีชีวิตในน่านน้ำไทย หน้า 262-272 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2524.

บังอร เกษมศานต์ และ อรุณ รัตกุล "อุตสาหกรรมกุ้งแช่เย็น" วารสารการประมง ปีที่ 25 ประจำเดือนตุลาคม เล่มที่ 4, 2515 : 429-447.

ประมง, กรม สถิติการประมงแห่งประเทศไทย 2522 เอกสารฉบับที่ 12/2524 งานเศรษฐกิจการประมงและแผนงาน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 2524.

มาลา สุพงษ์พันธุ์, "การประมงปลาหมึกในอ่าวไทย" วารสารประมง ปีที่ 32 ประจำเดือนมกราคม เล่มที่ 1, 2522 : 99-106.

เศรษฐกิจการพาณิชย์, กรม สถิติการส่งสินค้าออก แยกตามชนิดสินค้า (พ.ศ. 2523-2525) กระทรวงพาณิชย์, 2525.

American Public Health Association "Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water" American Public Health Association Inc., New York, N.Y. 1960.

APHA-AWWA-WPCF Standard Methods For the Examination of Water 15th ed. Washington D.C. 1980.

Baer, E.F, Duran, A.P., Leininger, H.V., Read, R.B., Schwab, A.H. and A. "Microbiological Quality of Frozen Breaded Fish and Shellfish Products" Applied and Environmental Microbiclogy. 31(3), (1976) : 337-341.

Barnes, D. Robert. Invertebrate Zoology 4th ed. W.B. Saunders Company. Japan. 1980.

Barrow, G.I. and Miller, D.C. Vibrio in Microbiology in Agriculture Fisheries and Food (Skinner, F.A. and Carr, J.G. ed.) pp. 181-186. Academic Press Inc,1976.

Cann, D.C. "Fish Handling and Processing with Particular Reference to Bacteriological Aspects" FAO/United Nations Development Programme (Technical Assistance) Reports on Fisheries. THA/69/16, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1971.

Carroll, B.J., Reese, G.B. and Ward, B.Q. "Microbiological Study of Iced shrimp : Expects form the 1965 Iced-Shrimp Symposium" United State Department of the Inferior, U.S. government Printing Office, Washington D.C. 1968.

Collin, C.H. and Potricia, M. Lyne. Microbiological Method,Butterworths, London. 1976.

Desmarchelier, P. "Vibrio parahaemolyticus and other Vibrios" Food Technology in Austrialia. 30 (1978) : 339-345.

Elliott, R.P., Clark, D.S. and Lewis, K.H. Micro-Organism In Food I Their significance and methods of enumeration 2nd ed. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), Toronto, 1978.

Elliott, R.P. and Michener, H. David "Microbiological Process Report Microbiological Standards and Handling Codes for Chilled and Frozen Foods. A Review." Applied Microbiology 9(1961) : 452-468.

Fieger, E.A. "Problems In Handling Fresh and Frozen Shrimp" Food Technology, 4 (1950) : 409-411.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Species Catalogue Vol. I Shrimps and Prawns of the World, Rome, 1980.

Foster, J.F., Fowler, J.L. and Decay, J. "A Microbiological Survey of Various Fresh and Frozen Seafoods Products" Journal of Food Protection, 40 (5), (1977) : 300-303.

Frazier, W.C. Preservation By Use of Low Temperature in Food Microbiology 2nd ed., pp. 109-122, McGraw-Hill, Inc., New York, 1967.

Gardiner, S. Mary Biology of the Invertebrates McGraw-Hill Book Company, New York, 1972.

Green, Margaret "Bacteriology of Shrimp II Quantitative studies on Freshly caught and Iced Shrimp" Food Research 14 (1949, a) : 365-380.

_____. "Bacteriology of shrimp IV coliform bacteria in shrimp." Food Research 14 (1949, b) : 380-404.

Larkin, P. Edward, Listsky, Warrien and Fuller, E. James. "Incidence of Fecal Streptococci and Coliform Bacteria in Frozen Fish Products." American Journal of Public Health, 46 (1956) : 464-468.

Lee, A. "What constitutes and infective dose of a food poisoning organism?" Food Technology in Australia, 30 (1978) : 335-338

Leunette, E.H, Spaulding, E.H. and Truant, J.P. Manual of Clinical Microbiology 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1974.

Liston, J. and Matehes, R. Fish, Crustaceans and Precooked Seafoods in Intersociety/Agence Commettee on Methods for the Microbiological Examination of Foods, pp. 507-520. American Public Health Association, Inc., Washington D.C. 1976.

Liston, J., Matches, R.J. and Baross, J. Survival and Growth of Pathogenic Bacteria in Seafoods in Fish Inspection and Quality Control (Kreuzer, Rudolf ed.) pp. 246-249. Fishing News (Books) Limited, London, 1971.

Morita, Y. Richard "Marine Psychrophilic Bacteria" Oceanography and Marine Biology Annual Review 4 (1966) : 105-121

Neufeld, N. Influence of Bacteriological Standards on the Quality of Inspected Fisheries Products. in Fish Inspection and Quality Control (Kreuzer, Rudolf ed.) pp. 234-239, Fisheries News (Books) Limited, London, 1971.

Nickerson, T. John and Sinskey, J. Antony. The Preservation of Foods by Freezing in Microbiology of Foods and Food Processing pp. 104-116. American Elsevier Publishing Company, New York, 1972.

Pelezar, J. Michael and Reid, D. Roger. Microbiology McGraw-Hill Book Company, New York, 1972.

Poonsuk, Kriengsak Media Tests & Reagents For Medical Bacteria and Fungi Chulalongkorn University, 1978.

Raj, H. and Liston, J. "Detection and Enumeration of Fecal Indicator Organism in Frozen Sea Foods. I Escherichia coli." Applied Microbiology, 9 (1961, a) : 171-174.

Raj, H., Wiebe, W.J. and Liston, J. "Detection and Enumeration of Fecal Indicator Organism in Forzen Sea Foods. II Enterococci" Applied Microbiology, 9 (1961, b) : 295-303.

Rohf, F. Jame and Sokal, R. Robert. Introduction to Biostatistics W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1973

Salle, A.J. Bacteriology of the Sea in Fundamental Principles of Bacteriology 5th ed. pp. 531-545. McGraw-Hill Book Company Inc., United Stated of America, 1961.

Shannon, E.L., Clark, W.S. and Reinbold, G.W. "Chlorine Resistance of Enterococci" Journal of Milk and Food Technology, 28 (1965) : 120-123.

Shewan, J. M. "The Microbiology of Fish and Fishery Product a Process Report" J. Appl. Bact. 34 (2), (1971) ; 299-315.

Surkiewiez, F. Bernnard, Hyndman, B. James and Yancey, V. Mary. "Bacteriological Survey of the Frozen Prepared Food Industry II Frozen Breaded Raw Shrimp" Applied Microbiology 15 (1), (1967) : 1-9.

Swartzentruber, A. et al "Microbiological Quality of Frozen Shrimp and Lobster tail in the Retail Market" Applied and Environmental Microbiology 40 (4), (1980) : 765-769.

Thatcher, F. Hygienic and Safety Aspects of Quality Control in Fish Inspection and Quality Control (Kreuzer, Rudolf ed.) pp.222-225, Fishing News (Books) Limited, London, 1971.

Tonney, F.O., Greer, F.E. and Danforth, T.F. "The Minimal Chlorine Death Points of Bacteria I Vegetative Forms." American Journal Public Health, 18 (1928) : 1259-1263.

Vanderzant, C. and Nickelson, R. "Survival of Vibrio Parahaemolyticus in Shrimp Tissue Under Various Environmental Conditions" Applied Microbiology, 23 (1), (1972) : 34-37.

Virgilio, R, González, C, Mendoza, Silvia, Avendaño, Sonia and Muñoz, Nubia "Bacteriological Analyses of Frozen Shrimps 1. Total Plate Count Coliforms and Enterococci in Precooks Frozen Chilean Shrimp" Journal of Food Science, 35 (1970, a): 842-844.

———. "Bacteriological Analyses of Frozen Shrimp 2. Staphylocccci in Precooked Frozen Chilean Shrimp". Journal of Food Science, 35 (1970, b) : 845-849

W.H.O. International Standards For Drinking - Water, 3rd ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1971.

____. Offset Publication No. 31. "Guide to Shellfish Hygiene" World Health Organization, Genera, 1976.

William, O.B., Rees, H.B. and Cambell, L.L. "The bacteriology of gulf coast shrimp. I Experimental Procedures and quantitative result" Texas Journal Science, 4(1952) : 49-53.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

1. การเตรียมอาหารเพาะแยกเพื่อนับจำนวนแบคทีเรีย

อาหารสำหรับการเพาะแยกเพื่อนับจำนวนแบคทีเรีย ทำการเตรียมตามสูตรของ Elliott et al., (1978) และ Harrigan et al. (1976) ตามสูตรข้างล่าง โดยใช้ส่วนผสมของ Difco เป็นส่วนใหญ่และใช้น้ำกรองแทนน้ำกลั่น (Distilled Water) ส่วนการปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง จะใช้ NaOH 10 % และ HCl 10% วัดด้วย pH-meter

Alkaline Peptone Water

ส่วนผสม

Peptone	10 g.
Sodium chloride	5 g.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้ง 2 ลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 9.1 ± 1 แล้วในขวดปริมาณ 225 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121° ซ นาน 15 นาที

Baird-Parker Agar (Baird-Parker, 1962 a, b)

ส่วนผสม

Tryptone	10 g.
Beef extract	5 g.

Yeast extract	1 g.
Lithium chloride hexahydrate	5 g.
Agar	20 g.
Distilled Water	1,000 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 1,000 มล. ต้มจนส่วนผสมละลายหมดปล่อยให้เย็น ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.8 เทลงในขวด 90 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที

วิธีการเตรียมอาหารก่อนทดสอบ

นำอาหารในขวดตามสูตรข้างต้น มาละลายและทำให้มีอุณหภูมิ 45–50°ซ แล้วเติมด้วยสารละลายดังต่อไปนี้

20 % W/V filter-sterilized solution of glycine	6.3 ml.
1 % W/V filter-sterilized solution of potassium tellurite	1 ml.
20 % W/V filter-sterilized solution of sodium pyruvate	5 ml.
Oxoid egg-yolk emulsion	5 ml.

เขย่าให้เข้ากันเทลงใน petridish 15 ml ปล่อยให้ผิวหน้าแห้งที่อุณหภูมิ 55°ซ นาน 10 นาที

Blood Agar

ส่วนผสม

Beef extract	3 g.
Peptone	5 g.

Sodium chloride	5 g.
Agar	15 g.
Distilled Water	1000 g.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ต้มให้เดือด เทลงในขวดปริมาณ 200 มล. นึ่งฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที ก่อนจะใช้อุ่นที่อุณหภูมิ 45°–50°ซ เติมด้วยเลือดแกะ 10 มล. เขย่าให้เข้ากัน เทใส่ petridish 15 มล. อบให้ผิวหน้าแห้ง

Brilliant Green Agar

ส่วนผสม

Yeast extract	3 g.
Proteose peptone or polypeptone	10 g.
Sodium chloride	5 g.
Lactose	10 g.
Sucrose	10 g.
Phenol red (0.2 % Solution)	40 ml.
Brilliant green (0.5 % W/V aqueous solution)	2.5 ml.
Agar	20 g.
Distilled Water	1000 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมลงใน 960 มล. ของน้ำกลั่นต้มจนเดือด แล้วจึงเติมน้ำกลั่นอีก 40 มล. ลงไป ทิ้งให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 50–60°ซ ปรับความเป็นกรด–ด่าง ให้ได้ 6.9 ± 0.1 บรรจุ

ใส่ขวด นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที ก่อนจะใช้นำไปละลายและอุ่นที่อุณหภูมิ 45°–50°ซ เทลงใน petridish 15 มล. อบให้ผิวหน้าแห้ง

Brilliant Green Lactose Bile Broth 2 %

ส่วนผสม

peptone	10 g.
Lactose	10 g.
Ox-gall	20 g.
Brilliant green (0.5 % W/V aqueous solution)	2.66 ml.
Distilled Water	1000 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมยกเว้น Brilliant green ลงในน้ำกลั่น 1,000 มล. ปรับสภาพความเป็นกรด–ด่าง ให้ได้ 7.4 จึงค่อยเติม Brilliant green ใส่หลอดทดลองที่มี durham tube อยู่หลอดละ 10 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 10 นาที

Differcutial Reinforced Clostridium Medium (Harrigan et al.1976)

ส่วนผสม

ส่วนที่ 1 (Single Strength)

Peptone	10 g.
Lab Lemco meat extract	10 g.
Yeast extract	1.5 g.

D-Glucose	1 g.
L-cystein monohydro chloride	0.5 g.
Sodium acetate	5.0 g.
Starch	1 g.
Distilled Water	1000 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้น D-glucose, L-cystein และ starch ในน้ำกลั่น 800 มล. ผสม starch ในน้ำประมาณ 50 มล. น้ำที่เหลือ 150 ต้มให้เดือด แล้วเทใส่ลงใน Starch solusle เสร็จแล้วผสมกับส่วนข้างบน ต้ม 30 นาที เติม D-glucose และ L-cystein ลงไป ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 7.1-7.2 เทใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มล.

Double Strength เตรียมเช่นเดียวกับข้างบนแต่เพิ่มส่วนประกอบขึ้นเป็น 2 เท่า ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มล. หลังจากปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างแล้ว เทใส่ขวดแก้ว 50 มล. และหลอดทดลองหลอดละ 10 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที

ส่วนที่ 2

เตรียม Sodium sulphite 4% และ Ferric citrate 7% ในน้ำกลั่น ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วย Millipore filter เก็บไว้ในตู้เย็น 5°ซ ก่อนใช้ผสมน้ำยาทั้ง 2 ตัวนี้

Sodium sulphite (4% aqeous solution)	1 ส่วน
Ferric citrate (7% aqeous solution)	1 ส่วน

ส่วนที่ 3

Polymyxin	350 mg.
Distilled Water	100 ml.

ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วย Millipore filter

วิธีการเตรียมก่อนการทดสอบ

1.	Double Strength DRCM	50 ml.
	ส่วนที่ 2	2 ml.
	ส่วนที่ 3	2 ml.
2.	Double Strength DRCM	10 ml.
	ส่วนที่ 2	0.4 ml.
	ส่วนที่ 3	0.4 ml.
3.	Single Strength DRCM	5 ml.
	ส่วนที่ 2	0.1 ml.
	ส่วนที่ 3	0.1 ml.

Eosin Methylene Blue Agar (Levine's EMB)

ส่วนผสม

Peptone	10 g.
Lactose	10 g.
Potassium monohydrogen phosphate	2 g.
Eosin y (2% W/V aqueous solution)	20 ml.

Methylene blue (0.25% W/V aqueous solution)	25 ml.
Agar	15 g.
Distilled Water	955 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่น 955 มล. ต้มให้เดือด เทใส่ขวดนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที ปรับสภาพความเป็นกรด–ด่างให้ได้ 7.1 ก่อนใช้จึงนำละลายและอุ่นที่อุณหภูมิ 45°–50°ซ จึงเทใส่ petri dish 15 มล. อบผิวหน้าให้แห้ง

glueose Azide Broth (Harrigan et al, 1976)

ส่วนผสม (Single Strength)

Peptone	10 g.
Yeast extract	3 g.
Sodium chloride	5 g.
Dipotassium hydrogen phosphate	5 g.
Potassium dihydrogen phosphate	2 g.
D-glucose	5 g.
Sodium azide	0.25 g.
Bromcresol purple1 % solution	3 ml.
Distilled Water	1000 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ต้มจนละลายดี ทำให้เย็นแล้วปรับสภาพความเป็นกรด–ด่างให้เป็น 6.7 ± 1 เทใส่หลอดหลองหลอดละ 10 มล. และ 5 มล.

Double Strength เตรียมเช่นเดียวกัน แต่เพิ่มส่วนผสมเป็น 2 เท่า ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มล. ปรับสภาพความเป็นกรด–ด่าง เท่าเดิม หลอดหลองหลอดละ 10 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

Lactose Broth

ส่วนผสม

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

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่น 1,000 มล. ปรับสภาพความเป็นกรด–ด่างให้เป็น 6.8 ± 1 ใส่ขวด ๆ ละ 225 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

Litmus milk

ส่วนผสม

Skim milk powder	100 g.
Litmus	5 g.
Distilled Water	1000 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่น 1,000 มล. ต้มจนละลายดี ทำให้เย็น ปรับสภาพความเป็นกรด–ด่าง ให้เป็น 6.8 กรองด้วยผ้ากรอง เทใส่หลอดหลองหลอดละ 10 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

Macconkey Broth

ส่วนผสม

Peptone	20	g.
Lactose	10	g.
Bile salts	5	g.
Sodium chloride	5	g.
Neutral red (1% Solution)	7.5	ml.
or bromcresol purple (1% Solution)	1	ml.
Distilled Water	1000	ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 1,000 มล. ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 7.6 แล้วใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 10 มล. โดยในหลอดทดลองจะมี durhum Tube บรรจุอยู่ นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclaveที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

Maltose Azide Broth (Harrigan et al.,1976)

ส่วนผสม

Proteose peptone No. 3	10	g.
Yeast extract	10	g.
Sodium chloride	5	g.
Sodium glycerophosphate hydrated	10	g.
Sodium azide	0.4	g.

Sodium carbonate	0.636 g.
Lactose	1.0 g.
Bromoresol purple (1% aqeous solution)	1.5 ml.
Distilled Water	1000 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มล. ปรับสภาพความเป็นกรด–ด่าง ให้เป็น 7.2 เทใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มล. 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.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 1,000 มล. ต้มจนเดือด เทใส่ขวดปรับสภาพความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.9±1 นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ก่อนใช้ละลายแล้วอุ่นให้มีอุณหภูมิ 45°–50°ซ เทใส่ petridish 15 มล. อบผิวหน้าให้แห้ง

Nutrient Agar 3 % NaCl

ส่วนผสม

Beef extract	3 g.
Peptone	5 g.
Sodium chloride	30 g.
Distilled Water	1000 ml.
Agar	15 g.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ต้มจนละลายหมด ปรับสภาพความเป็นกรด–ด่าง ให้เป็น 6.7–7.0 แล้วใส่ขวด ๆ ละ 200 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ก่อนใช้ทำการละลายและอุ่นที่อุณหภูมิ 45–50 °ซ

Peptone Salt Ditution Fluid

ส่วนผสม

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

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่น 1,000 มล. เมื่อละลายหมดดีแล้วปรับสภาพความเป็นกรด–ด่าง ให้เป็น 7.0±0.1 บรรจุใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มล. และขวด ๆ ละ 90 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

Plate Count Agar

ส่วนผสม

Tryptone	5 g.
Glucose	1 g.
Yeast extract	2.5 g.
Agar	15 g.
Distilled Water	1000 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1,000 มล. ต้มให้เดือด เมื่อเย็นลง ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 7.0±0.1 แล้วบรรจุขวด นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

Tetrathionate Brilliant Green broth

ส่วนผสม

Basal medium	
Tryptose or proteose peptone	5 g.
Bile salts	1 g.
Calcium carbonate	10 g.
Sodium thiosulphate	30 g.
Distilled Water	1000 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 1,000 มล. เก็บในที่เย็น 5–8 °ซ. ก่อนใช้จึงเติม brilliant green 0.5 % aqueous solution ลงไป 2 มล. ต้มให้เดือด 10 นาที ทำให้เย็นจึงเติม 20 มล. ของ iodine solution ลงไป เทใส่หลอดทดลองหลอดละ 10–12 มล.

วิธีการเตรียม Iodine Solution

Potassium iodide	5 g.
Iodine crystal	6 g.
Distilled Water	20 ml.

Thiosulphate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS)

ส่วนผสม

Yeast extract	5 g.
Peptone	10 g.
Sucrose	20 g.
Sodium-Thiosulphate pentahydrate	10 g.
Sodium citrate dihydrate	10 g.
Sodium cholate	3 g.
Ox-gall	5 g.
Sodium chloride	10 g.
Ferric citrate	1 g.
Bromthymol blue (0.2% solution)	20 ml.
Thymol blue (1% solution)	4 ml.
Agar	15 g.
Distilled Water	980 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่น ต้มให้เดือด ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ ทำให้เย็น ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 8.6 เทใส่ขวดก่อนใช้ต้องต้มละลาย และทำให้ขุ่นที่อุณหภูมิ 45–50 ซ เทใส่ petri dish 15 มล. ทำให้ผิวหน้าแห้ง

2. การเตรียมอาหารทดสอบแบคทีเรียทางชีวเคมี

อาหารทดสอบเชื้อตามที่ได้ทำการทดลองในบทที่ 2 จะเตรียมตามสูตรต่อไปนี้ทุกประการ ยกเว้นอาหารทดสอบแบคทีเรีย Vibrio parahaemolyticus จะต้องเติม Sodium chloride ให้เป็น 3 % เสมอ และเช่นเดียวกับอาหารเพาะแยกแบคทีเรียเพื่อการนับจำนวน ในสูตรจะเตรียมตาม Elliott (1978) และส่วนผสมหรืออาหารทดสอบบางชนิดจะใช้ของ Difco การใช้น้ำกรองแทนน้ำกลั่น (Distilled Water) การปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ใช้ NaOH 10 % และ HCl 10 %

Broth sugar (Harrigan et al, 1976)

ส่วนผสม

Meat extract	3 g.
Peptone	10 g.
Sodium chloride	5 g.
Distilled Water	1000 ml.
Bromthymol blue (0.2% aqueous solution)	15 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น และปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 7.1–7.2 แล้วจึงเติม indicator แบ่งใส่ขวดแก้วขวดละ 200 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoctave

ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ก่อนใช้เติมคาร์โบไฮเดรต 6 ชนิด ได้แก่ arabinose, maltose, mannitol, lactose, sucrose และ starch แต่ละชนิดลงใน BS ให้เป็น 1 % เขย่าให้เข้ากันจึงเทใส่หลอดแก้วเล็กประมาณ 2 มล.

Decarboxylase medium (Falkon's)

ส่วนผสม

Peptone	5 g.
Yeast extract	3 g.
Glucose	1 g.
Bromcresol purple (0.2 % solution)	10 ml.
Distilled Water	1000 ml.

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 6.7 เทใส่ขวดแก้วขวดละ 200 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

วิธีเตรียมอาหารก่อนการทดสอบ

เติม amino âcid ที่ต้องการทดสอบลงไปให้เป็น 0.5 % ละลายให้ดี แล้วเทใส่หลอดแก้วขนาดเล็กประมาณ 2 มล.

หมายเหตุ amino âcid ที่เติมต้องฆ่าเชื้อก่อน ผสมในอาหารให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ เทใส่หลอดแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้ว

Hugh-Leifson medium (O.F. medium)

ส่วนผสม

Peptone	2 g.
Sodium chloride	5 g.
Potassium monohydrogen phosphate	0.3 g.
Glucose	10 g.
Bromthymol blue (0.2 % solution)	15 g.
Agar	3 g.
Distilled water	985 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 985 มล. ต้มให้เดือด ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 7.1 เทใส่หลอดแก้วเล็ก 5 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

Indole Test Medium

มี 2 ชนิด คือ

1. Tryptone Broth สำหรับทดสอบในแบคทีเรีย Vibrio parahaemolyticus
2. Peptone water สำหรับทดสอบแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ

Tryptone Broth

ส่วนผสม

Tryptone	10 g.

Sodium chloride	30 g.
Distilled Water	1000 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่น เทใส่ขวด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที เวลาใช้เทใส่หลอดเล็ก ประมาณ 2 มล.

Peptone water

ส่วนผสม

Peptone	10 g.
Sodium chloride	5 g.
Distilled water	1000 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่น ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 7.2±0.1 เทใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที

MR-VP Broth

ส่วนผสม

Proteose peptone	5 g.
Glucose	5 g.
Potassium monohydrogen phosphate	5 g.
Sodium chloride	5 g.
Distilled water	1000 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่น ต้มและคนเบา ๆ เทใส่ขวด ๆ ละ 200 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที เทใส่หลอดแก้วเล็กเพื่อการทดสอบ

Nitrate Broth

ส่วนผสม

Beef extract	3 g.
Peptone	10 g.
Sodium chloride	5 g.
Potassium nitrate	1.0 g.
Distilled water	1000 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่น จนละลายหมด เทใส่ขวด ๆ ละ 200 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที เทใส่หลอดแก้วเล็ก

Simmons Citrate Agar (Simmons's)

ส่วนผสม

Magnesium sulphate heptahydrate	0.2 g.
Ammonium dihydrogen phosphate	1 g.
Potassium monohydrogen phosphate	1 g.
Sodium citrate dihydrate	2 g.
Sodium chloride	5 g.

Bromthymol blue (0.2% solution)	40 ml.
Agar	15 g.
Distilled Water	15 g.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ต้มให้เดือด ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.9±1 นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ก่อนใช้ละลายแล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 45–50 °ซ เทใส่หลอดแก้ว แล้วเอียงทำเป็น slant ปล่อยไว้จนแข็ง

Triple Sugar Iron Agar

ส่วนผสม

สูตรที่ 1

Tryptone or polypeptone	20 g.
Sodium chloride	5 g.
Lactose	10 g.
Sucrose	10 g.
Glucose	1 g.
Ferrous ammonium sulphate	0.2 g.
Sodium thiosulphate	0.2 g.
Phenol red (0.2 % solution)	12 ml.
Agar	13 g

สูตรที่ 2

Beef extract	3 g.
Yeast extract	3 g.
Peptone	15 g.
Proteose peptone	5 g.
Glucose	1 g.
Lactose	10 g.
Sucrose	10 g.
Ferrous sulphate	0.2 g.
Sodium chloride	5 g.
Sodium thiosulphate	0.3 g.
Phenol red (0.2 % solution)	12 ml.
Agar	12 g.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่น 988 มล. ต้มให้เดือดปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 7.5±0.1 นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 45–50 °ซ เทใส่หลอด $\frac{1}{3}$ ของหลอดแก้วเล็ก วางเอียงให้เกิด slant ทิ้งไว้จนแข็ง

Tryptone Broth with 0%, 8% and 10% NaCl

ส่วนผสม

Tryptone	10 g.
Distilled Water	1000 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่น เทใส่ขวด แล้วจึงเติม Sodium chloride ให้เป็น 0 %, 8 % และ 10 % นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

Urea medium (Christensen's Urea medium)

ส่วนผสม

ส่วนที่ 1

Peptone	1 g.
Sodium chloride	5 g.
Potassium dihydrogen phosphate	2.0 g.
Phenol red (0.2% solution)	6.0 ml.
Agar	20 g.
Distilled water	1000 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันในน้ำกลั่น ต้มให้เดือด ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 0.8 แบ่งใส่ขวดละ 200 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อบ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

ส่วนที่ 2

Glucose	50 g.
Distilled water	100 ml.

ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วย Millipore filter เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5°ซ

ส่วนที่ 3

Urea	20 g.
Distilled	100 g.

ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วย Millipore filter เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5°ซ

วิธีเตรียมอาหารเพื่อการทดสอบ

ส่วนที่ 1

ละลายแล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 45–50°ซ	200 มล.

ส่วนที่ 2

Glucose solution	0.4 มล.

ส่วนที่ 3

Urea solution	20 มล.

เขย่าให้เข้ากัน เทใส่หลอดแก้วเล็กวางเอียงให้เกิด slant ทิ้งไว้จนแข็ง เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5°ซ

3. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบแบคทีเรีย

สารเคมีที่ใช้ทดสอบแบคทีเรีย มีหลายชนิด โดยเตรียมตามสูตรของ Elliott et al. (1978) ดังต่อไปนี้

Cytochrome Oxidase Reagents

1. 1% α – Naphthol solution เตรียมโดยการใช้ α - Naphthol 1 กรัม ละลายใน Absolute alcohol 100 มล.

2. Phenylene-diamine solution เตรียมโดยใช้ N, N-dimethyl - p -phenylene-diamine dihydrochloride 1 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร เขย่าเก็บในตู้เย็น

Gram's staining method Reagents (Hucker's) ประกอบด้วย

1. Crystal Violet solution
2. Iodine solution
3. Counterstain

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.

วิธีการเตรียม

ละลาย crystal violet ลงในแอลกอฮอล์ และ ammonium oxalate ลงในน้ำกลั่น ต่อมาจึงผสมสารละลายทั้ง 2 เข้าด้วยกัน ต้องผสมก่อนใช้ 24 ชั่วโมง

Iodine solution

Iodine solution

ส่วนผสม

Iodine	1 g.
Potassium iodide	2 g.
Distilled water	100 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น และคนจนกว่าละลายหมด

Safranin O Solution

ส่วนผสม

Safrain O	0.25 g.
Ethyl alcohol	10 ml.
Distilled water	100 ml.

วิธีการเตรียม

ละลาย Safranin O ลงใน Ethyl alcohol แล้วจึงค่อยเติมน้ำกลั่นจนครบ

Indole Reagent (Kovac's)

ส่วนผสม

Paradimethylaminobenzadehyde	5 g.
Isoamyl (or normal amyl) alcohol	75 ml.
Hydrochloric acid (conc)	25 ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมที่ 1 ลงในส่วนผสมที่ 2 แล้วจึงค่อยผสมกับส่วนที่ 3

Methyl Red Solution

ส่วนผสม

Methyl red	0.1	g.
Ethyl alcohol	300	ml.
Distilled water	500	ml.

วิธีการเตรียม

ละลาย methyl red ลงในแอลกอฮอล์ แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไป

Solution A

ส่วนผสม

Sulfanilic acid	1	g.
Acetic acid (5N aqueous solution)	125	ml.

วิธีการเตรียม

ละลาย salfanilic acid อย่างช้าลงใน acetic acid จนหมด

Solution B.

ส่วนผสม

α- Naphthylamine	0.5	g.
acetic acid (5N aqueous solution)	100	ml.

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมที่ 1 ลงในส่วนที่ 2 อย่างช้าจนครบจำนวน

Voges-Proskauer Test Reagent

ประกอบด้วย

1. 5 % α- Naphthol Solution เตรียมโดยใช้ α-Naphthol 5 g. ละลายใน absolute alcohol 100 ml.

2. 40 % KOH - creatine solution เตรียมโดยใช้ KOH (Potassium hydroxide) 40 g. และ creatine 0.3 g. ลงในน้ำกลั่น 100 ml.

ภาคผนวก ข.

ตาราง MPN (Most Probable Number) ที่ใช้ในการหาปริมาณของแบคทีเรีย ได้แก่ Fecal Streptococci, Coliforms, Escherichia coli และ Clostridium perfringens โดยตารางที่ 1 เป็นตาราง MPN ที่ได้จาก AOAC(1980) และ Elliott et al.,(1978) ส่วนตารางที่ 2 เป็นตาราง MPN จาก AOAC (1980) APHA-AWWA-WPCF (1980) และ W.H.O. (1971)ดังนี้

ตารางที่ 1 Most Probable Number (MPN) ต่อกรัมของตัวอย่าง 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

ตารางที่ 2 Most Probable Numbers ต่อ 100 มล. ของตัวอย่าง โดยใช้จำนวน 5 หลอดในสัดส่วนความเจือจางทางอนุกรมเรขาคณิต

Number of Positive Tubes			MPN	Number of Positive Tubes			MPN	Number of Positive Tubes			MPN	Number of Positive Tubes			MPN	Number of Positive Tubes			MPN	Number of Positive Tubes			MPN
10 mL	1 mL	0.1 mL		10 mL	1 mL	0.1 mL		10 mL	1 mL	0.1 mL		10 mL	1 mL	0.1 mL		10 mL	1 mL	0.1 mL		10 mL	1 mL	0.1 mL	
0	0	0		1	0	0	2.0	2	0	0	4.5	3	0	0	7.8	4	0	0	13	5	0	0	23
0	0	1	1.8	1	0	1	4.0	2	0	1	6.8	3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
0	0	2	3.6	1	0	2	6.0	2	0	2	9.1	3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
0	0	3	5.4	1	0	3	8.0	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
0	0	4	7.2	1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
0	0	5	9.0	1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	36	5	0	5	95
0	1	0	1.8	1	1	0	4.0	2	1	0	6.8	3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
0	1	1	3.6	1	1	1	6.1	2	1	1	9.2	3	1	1	1	4	1	1	21	5	1	1	46
0	1	2	5.5	1	1	2	8.1	2	1	2	12	3	1	2	..	4	1	2	26	5	1	2	64
0	1	3	7.3	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
0	1	4	9.1	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	36	5	1	4	110
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
0	2	0	3.7	1	2	0	6.1	2	2	0	9.3	3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
0	2	1	5.5	1	2	1	8.2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	70
0	2	2	7.4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	95
0	2	3	9.2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	60	5	2	5	180
0	3	0	5.6	1	3	0	8.3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
0	3	1	7.4	1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	33	5	3	1	110
0	3	2	9.3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	39	5	3	2	140
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	45	5	3	3	180
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	52	5	3	4	210
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	36	4	3	5	69	5	3	5	260
0	4	0	7.5	1	4	0	11	2	4	0	15	3	4	0	21	4	4	0	34	5	4	0	130
0	4	1	9.4	1	4	1	13	2	4	1	17	3	4	1	24	4	4	1	40	5	4	1	170
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20	3	4	2	28	4	4	2	47	5	4	2	220
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23	3	4	3	32	4	4	3	64	5	4	3	280
0	4	4	15	1	4	4	19	2	4	4	25	3	4	4	36	4	4	4	82	5	4	4	350
0	4	5	17	1	4	5	22	2	4	5	28	3	4	5	40	4	4	5	89	5	4	5	430
0	5	0	9.4	1	5	0	13	2	5	0	17	3	5	0	25	4	5	0	41	5	5	0	240
0	5	1	11	1	5	1	15	2	5	1	20	3	5	1	29	4	5	1	48	5	5	1	350
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23	3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	540
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	26	3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	920
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	1,600
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32	3	5	5	45	4	5	5	81				

ประวัติผู้เขียน

นางสาวมิ่งขวัญ พรประเสริฐสุข เกิดปี พ.ศ. 2500 ที่จังหวัดสิงหบุรี สำเร็จการศึกษา ศึกษาศาสตรบัณฑิต จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (ปทุมวัน) (เกียรตินิยมอันดับสอง) ปีการศึกษา 2522