บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. **การศึกษาหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและระยะเวลาในการบ่มเชื้อ(Incubation period) เพื่อใช้ในการแยกเชื้อจากน้ำปลา**

1.1 <u>ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาทดสอบ</u> มี 7 ชนิด ดังนี้ Tryptone yeast extract agar(ภาคผนวก ก หมายเลข 20) , Lochhead's skim milk agar(ภาคผนวก ก หมายเลข 8) , Proteose peptone agar(ภาคผนวก ก หมายเลข 15) , Complex medium of Dundus(ภาคผนวก ก หมายเลข 3) , Brain heart infusion agar(ภาคผนวก ก หมายเลข 2) , Tryptic soy agar(ภาคผนวก ก หมายเลข 19) , Nutrient agar(ภาคผนวก ก หมายเลข 12) อาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดผสมโซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 20 เปอร์เซ็นต์

1.2 <u>การเก็บตัวอย่างน้ำปลา</u> เก็บตัวอย่างจากน้ำปลาอายุประมาณ 1 เดือน จากถังหมักน้ำปลาซึ่งใช้ปลาหมักกับเกลือในอัตราส่วน 3 : 1(จำนวนปลาประมาณ 30 กิโลกรัม ใช้ปลาไส้ตันและเกลือเม็ดจากจังหวัดชุมพร ซึ่งเริ่มหมักประมาณวันที่ 23 กันยายน 2528) การเก็บตัวอย่างน้ำปลาเป็นแบบสุ่ม 3 ระดับ คือระดับผิวบน ระดับกลาง และระดับล่างของถังหมัก ระดับละ 6 จุด จุดละประมาณ 5 มิลลิลิตร โดยใช้ลูกยางและปิเปตที่ปราศจากเชื้อดูดน้ำปลาใส่ในฟลาสก์ที่ปราศจากเชื้อ นำมาเขย่าให้เข้ากันก่อนนำไปใช้

1.3 <u>การแยกเชื้อ</u> ดูดตัวอย่างน้ำปลามา 1 มิลลิลิตร มาทำการเจือจางด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ต่อจากนั้นใช้วิธี Standard plate count technique เพื่อหาจำนวนแบคทีเรียโดยการดูดน้ำปลาที่ทำให้เจือจางแล้วลงใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อ(Petri dish) ที่ปราศจากเชื้อแล้วจานละ 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำอาหารวุ้นแต่ละชนิด(ในข้อ 1.1.)ที่กำลังหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 45 - 50 °C. เทผสมลงไปจานละ 15 -

20 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำ แล้วหมุนจานเพื่อให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอทั่วจาน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง แยกบ่มในสภาพที่มีออกซิเจนและในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน (ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนนั้นใช้ GasPak Anaerobic jar) นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียทุกวันจนกระทั่งถึงวันที่ไม่มีแบคทีเรียเพิ่มจำนวนขึ้นอีก โดยยึดถือเอาวันสุดท้ายที่แบคทีเรียไม่เพิ่มจำนวนขึ้นอีกนี้เป็นช่วงระยะเวลาในการบ่มเชื้อที่เหมาะสม (Incubation period) สำหรับงานวิจัยต่อไป

การนับจำนวนของแบคทีเรีย นับเฉพาะจานเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีแบคทีเรียระหว่าง 30 - 300 โคโลนี คำนวนหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด เลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนและชนิดของแบคทีเรียขึ้นมากที่สุดเพื่อใช้ในงานวิจัยต่อไป

2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทั้งปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในระยะ 253 วัน ของกระบวนการหมัก

2.1 วัตถุดิบที่ใช้ ใช้ปลาไส้ตัน(*Stolephorus sp.*) และเกลือเม็ดจากจังหวัดชุมพร จำนวนปลา 15 กิโลกรัมต่อเกลือเม็ด 5 กิโลกรัม คลุกเคล้าให้เข้ากันใส่ในถังหมักที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 14 นิ้ว เริ่มหมักวันที่ 9 มิถุนายน 2529

2.2 การเก็บตัวอย่างน้ำปลา ใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.2. โดยเก็บเป็นระยะๆตั้งแต่น้ำปลาหมักอายุ 1 วันถึงประมาณ 253 วัน โดยบันทึกอุณหภูมิทั้งภายในและภายนอกถังหมักด้วยเทอร์โมมิเตอร์ทุกครั้งที่มีการเก็บตัวอย่าง

2.3 ศึกษาปริมาณและชนิดของแบคทีเรีย นำตัวอย่างน้ำปลามาปั่นให้ตกตะกอนโดยใช้หลอดทดลองชนิดมีฝาเกลียวปิดที่ปราศจากเชื้อแล้วที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เพื่อแยกเอาเศษของปลาออกไป นำส่วนน้ำใสไปทำให้เจือจางด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ที่ปราศจากเชื้อแล้วจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ทำ 3 ซ้ำโดยใช้อาหารวุ้นที่คัดเลือกแล้วว่าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพียง 1 ชนิดผสมกับโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซ็นต์(ไม่เติมเกลือ) 5 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับแยกเชื้อโดยคาดหมายว่าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือจะเหมาะสมสำหรับแยกเชื้อชนิดที่ไม่ทนเค็ม อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ จะ

เหมาะสมสำหรับพวกเชื้อที่ทนเค็มได้เล็กน้อยส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ นั้นจะเหมาะสมสำหรับเชื้อที่ชอบเค็มสูง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องในสภาพมีออกซิเจน นาน 8 วันสำหรับเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือและเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ และนาน 14 - 20 วัน สำหรับเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำมานับจำนวนโคโลนีของเชื้อทั้งหมดเพื่อคำนวณหาจำนวนเริ่มต้นและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียตามความแตกต่างของโคโลนี ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์เก็บไว้บนอาหารวุ้นเอียง(agar slant) ที่ผสมเกลือตามความเหมาะสมเพื่อเป็น stock culture สำหรับใช้ศึกษาต่อไป

จัดกลุ่มของแบคทีเรียตามความแตกต่างของรูปร่างเซลล์และการติดสีแกรมพร้อมทั้งนับจำนวนของแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม โดยการนำเอาแบคทีเรียจากจานเลี้ยงเชื้อเดียวกันกับที่ใช้นับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด นำมาย้อมสีแกรม ถ้าจำนวนของจำนวนแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อไม่เกิน 100 โคโลนีจะนำมาย้อมทุกโคโลนี ถ้าจำนวนแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อมีมากกว่า 100 โคโลนีจะใช้วิธีแบ่งครึ่งจานเลี้ยงเชื้อในแนวที่มีการกระจายของชนิดของแบคทีเรียใกล้เคียงกันแล้วเลือกย้อมเพียง 1 ส่วนโดยย้อมทุกโคโลนี ในกรณีที่โคโลนีติดกันมาก ๆ จะใช้วิธีนับโคโลนีที่มีลักษณะเหมือน ๆ กันก่อนแล้วเลือกตัวแทนมาย้อมเพียง 2 - 3 โคโลนี หลังจากย้อมแกรมแล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

วิธีการย้อมสีแกรม สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือและเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ นำมาศึกษาการติดสีแกรมตามวิธีของ Gram ที่ดัดแปลงโดย Hucker (72) สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ ใช้วิธีการย้อมสีแกรมของ H.P.Dussault (73) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ กระจายเชื้อกับน้ำเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ บนสไลด์ที่สะอาดทิ้งไว้ให้แห้งเองที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นล้างผลึกเกลือออกด้วย กรดอะซีติคเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที เทกรดทิ้งแล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ย้อมด้วยคคริสตอลไวโอเลต นาน 3 นาทีแล้วล้างน้ำออก หยดสารละลายแกรมไอโอดีนให้ท่วมนาน 1 นาทีล้างน้ำออก ผ่านเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ไม่เกิน 15 วินาที ล้างน้ำทันทีแล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ ย้อมด้วย Ziehl - Neelson's carbofuchsin 20 - 30 วินาที ล้างน้ำแล้วซับให้แห้ง

3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในระยะ 253 วัน ของกระบวนการหมัก

นำตัวอย่างน้ำปลา(จากการเก็บครั้งเดียวกันกับที่ใช้แยกเชื้อ ในข้อ 2) มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no. 2 เพื่อแยกเอาเศษเนื้อปลาทิ้งไป นำน้ำปลาส่วนที่กรองได้ไปวัดและวิเคราะห์สิ่งต่อไปนี้.-

3.1 วัดค่าความเป็นกรดด่าง(pH) โดยใช้ Digital pH meter , Suntex Model sp - 5A

3.2 วัดความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็นเปอร์เซ็นต์ โดยใช้ Digital salt meter, SOAR Model 1600

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen)(53,74) ตามหลักการของ Kjeldahl โดยย่อยน้ำปลาผสมน้ำ (1 : 19) 10 มิลลิลิตรใน Kjeldahl flask ด้วยกรดซัลฟุริคเข้มข้น 20 มิลลิลิตร โดยใส่ Selenium จำนวน 1 กรัมเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกริยา(Catalyst) จนกระทั่งได้น้ำยาใส และย่อยต่อไปอีก 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นถ่ายน้ำยาใสที่ได้ลงในขวดกลั่นให้หมดโดยใช้น้ำกลั่นช่วยล้างจนได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 90 มิลลิลิตร แล้วกลั่นแอมโมเนียที่เกิดขึ้นลงใน 50 มิลลิลิตรกรดบอริค 4 เปอร์เซ็นต์ และมี Mixed indicater(Methyl red กับ Bromcresal green) ผสมอยู่ประมาณ 4 หยด กลั่นจนกระทั่งปริมาตรของน้ำยาในขวดกลั่นเหลือประมาณ 1/3 ของปริมาตรเดิม ไตเตรทน้ำยาแอมโมเนียที่กลั่นได้ด้วย กรดซัลฟุริค 0.1 นอร์แมล ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจากสูตร

$$X = YN \times 28$$

เมื่อ X คือจำนวนกรัมของไนโตรเจนทั้งหมดที่มีในตัวอย่างน้ำปลา 1 ลิตร

Y คือจำนวนมิลลิลิตรของกรดซัลฟุริค 0.1 นอร์แมล ที่ใช้ในการไตเตรท

N คือ นอร์แมลิตีของกรดซัลฟุริค

3.4 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน</u> (Amino acid nitrogen) ซึ่งปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนนี้คือ ผลต่างคิดเป็นกรัมระหว่างฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน (Formaldehyde nitrogen) กับแอมโมเนียคัลไนโตรเจน(Ammoniacal nitrogen) ในน้ำปลา 1 ลิตร

3.4.1 <u>วิธีหาฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน</u>(Formaldehyde nitrogen) เตรียมฟอร์มัลดีไฮด์ให้มี pH 9 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์แมล และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์แมล ลงไปในน้ำปลาผสมน้ำ(1 : 19) 10 มิลลิลิตรจนได้ pH 7 แล้วผสมฟอร์มัลดีไฮด์ pH 9 ที่เตรียมไว้แล้วลงไปจำนวน 10 มิลลิลิตร นำไปไตเตรทด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์แมล ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจนกระทั่งได้ pH 9 โดยใช้ pH meter , Suntex Model sp - 5A ในการปรับ pH คำนวนหาปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจนจากสูตร

$$X = YN \times 28$$

เมื่อ X คือจำนวนกรัมของฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจนในน้ำปลา 1 ลิตร

Y คือจำนวนมิลลิลิตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์แมล ที่ใช้ในการไตเตรท

N คือ นอร์แมลิตีของโซเดียมไฮดรอกไซด์

3.4.2 <u>วิธีหาแอมโมเนียคัลไนโตรเจน</u>(Ammoniacal nitrogen)(44) เติมแมกนีเซี่ยม 3 กรัมและน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรลงในน้ำปลาผสมน้ำ(1 : 19) 50 มิลลิลิตรแล้วกลั่นแอมโมเนียลงในกรดบอริค 4 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 50 มิลลิลิตรซึ่งมี Mixed indicater อยู่แล้วประมาณ 4 หยด กลั่นจนกระทั่งปริมาตรของน้ำยาในขวดกลั่นเหลืออยู่ประมาณ 1/4 ของปริมาตรเดิม ไตเตรทน้ำยาแอมโมเนียที่กลั่นได้ด้วยกรดซัลฟุริค 0.1 นอร์แมล ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน คำนวนหาปริมาณแอมโมเนียคัลไนโตรเจนจากสูตร

$$X = YN \times 5.6$$

เมื่อ X คือจำนวนกรัมของแอมโมเนียคัลไนโตรเจนในน้ำปลา 1 ลิตร

Y คือจำนวนมิลลิลิตรของกรดซัลฟุริค 0.1 นอร์แมล ที่ใช้ในการไตเตรท

N คือ นอร์แมลิตีของกรดซัลฟุริค

3.5 การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนอิสระ โดยใช้ Water HPLC ด้วยวิธีการแบบ " Pico - tag " Amino acid analyses ของบริษัท Millipore corperation (75)

4. การทดสอบเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสและเจลลาติเนสได้ดี

4.1 <u>การทดสอบการสร้างโปรติเอสของเชื้อ</u> ปลูกเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 8) เติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วิธี Standard plate count technique เพื่อให้เชื้อเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C. เป็นเวลา 20 วัน จากนั้นตรวจหาบริเวณใส(Clear zone) รอบๆ โคโลนีและ คัดเลือกเชื้อที่ให้บริเวณใสกว้างที่สุด

4.2 <u>การทดสอบการสร้างเจลลาติเนส</u> ปลูกเชื้อลง Medium 73 (ภาคผนวก ก หมายเลข 9) เติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วิธี Standard plate count technique เพื่อให้เชื้อเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C. เป็นเวลา 14 วัน ตรวจดูการย่อยเจลลาตินโดยราดน้ำยาแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวจนทั่วจานเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ประมาณ 5 - 10 นาที ถ้าเกิดบริเวณใส(clear zone) รอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรียแสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์เจลลาติเนสได้คัดเลือกเชื้อที่สร้างเจลลาติเนสได้ดีที่สุด

4.3 <u>การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี บางประการของเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มที่คัดเลือกได้</u> เพื่อเป็นแนวทางในการจัดจำแนกเชื้อโดยยึดแนวทางการจัดจำแนกเชื้อตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(68)

4.3.1 <u>ลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย</u> นำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Halobacterium medium agar(HMA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) ที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มเหล่านี้สามารถเจริญได้ดี ใช้เชื้อที่มีอายุ 14 วันนำมาศึกษาลักษณะรูปร่าง ขนาด สี เนื้อของโคโลนี ความโปร่งแสงหรือความทึบแสง

4.3.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การติดสีแกรม นำเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มนำมาผสมกับน้ำเกลือเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปกระจายบนสไลด์ที่สะอาดนำไปย้อมแกรมตามวิธีของ H.P.Dussault (73) ดังกล่าวไว้ในข้อ 2.3

การย้อมสีเอนโดสปอร์ นำเชื้อแบคทีเรียมาผสมกับน้ำเกลือเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปกระจายบนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งให้แห้งเองที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้น Desalt ด้วยกรดอะซีติคเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที เทกรดทิ้งปล่อยให้แห้งเองจึงนำไปย้อมสปอร์ตามวิธีการย้อมสปอร์ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ หยด Malachite green เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ลนไฟอ่อนๆ ประมาณ 1 - 2 นาที ล้างน้ำแล้วย้อมด้วยซาฟรานีน 1 นาที ล้างน้ำแล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ

การเคลื่อนที่ ปลูกเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มที่มีอายุ 14 วัน แบบปักตรง (Stab inoculation) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Motility test medium(ภาคผนวก ก หมายเลข 11) ที่เติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเชื้อเจริญออกนอกรอยปลูกแสดงว่าเคลื่อนที่ได้

4.3.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

เชื้อที่นำมาทดสอบสิ่งต่อไปนี้จะใช้เชื้ออายุ 14 วัน ปลูกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อที่ 37 °C. ตรวจผลภายใน 14 วัน

การสร้างเอนไซม์คาตาเลส หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ลงบนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ HMA ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลเป็นบวก

การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส นำกระดาษกรอง Whatman no.1 ที่ชุบสารละลาย Tetramethyl papaphenylene diamine dihydrochloride เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาค

ผนวก ข หมายเลข 10) จนชุ่ม นำมาวางบนจานเลี้ยงเชื้อที่สะอาดใช้ Platinum loop แตะเชื้อแบคทีเรียนำมาชีดลงบนกระดาษกรองดังกล่าว สังเกตุดุการเปลี่ยนแปลงภายใน 1 นาที ถ้ามีสีม่วงเกิดขึ้นตามแนวที่ชีดเชื้อ แสดงว่าเชื้อนั้นมีเอนไซม์ ไซโตโครมออกซิเดส

การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลวยูเรีย(ภาคผนวก ก หมายเลข 21) สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของฟีนอลเรดในอาหารจากสีเหลืองส้มเป็นสีชมพู แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสย่อยยูเรียแล้วได้แอมโมเนีย ทำให้อาหารมีสภาพเป็นด่าง บันทึกผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสี บันทึกผลเป็นลบ

การรีดิวส์ไนเตรท ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลว Halobacterium medium broth เติมโปตัสเซี่ยมไนเตรท 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตรวจผลโดยใช้น้ำยาทดสอบไนไตรท์ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย ก และสารละลาย ข (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) โดยหยดน้ำยาดังกล่าวลงไปอย่างละ 5 หยดตามลำดับ ถ้าอาหารมีสีแดงแสดงว่าไนเตรทถูกรีดิวส์เป็นไนไตรท์ บันทึกผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีแดงในอาหารต้องนำไปทดสอบต่อโดยใส่ผงสังกะสีลงไปเล็กน้อย ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่าไนเตรทถูกรีดิวส์ด้วยผงสังกะสีให้ผลเป็นลบที่แท้จริง ถ้าไม่มีสีแดงเกิดขึ้นบันทึกผลเป็นบวก เพราะไนเตรทถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์โดยแบคทีเรีย และไนไตรท์ถูกใช้ต่อไปเปลี่ยนเป็นไนโตรเจนแก๊สในที่สุด

การสร้างอินโดล ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลว Halobacterium medium broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 6) ซึ่งเพิ่มจำนวนทริปโตนเป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสารอินโดลที่เกิดขึ้นโดยใช้น้ำยาโคแวค(ภาคผนวก ข หมายเลข 4) โดยหยดโคแวค 2 - 3 หยดลงในหลอดทดสอบที่ใช้เลี้ยงเชื้อเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ถ้าเกิดสีแดงลอยอยู่บนผิวหน้าอาหาร แสดงว่าเชื้อนั้นมีความสามารถสร้างอินโดลได้ บันทึกผลเป็นบวก

การทดสอบ Oxidative fermentative (O - F test) เป็นการทดสอบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในแบบ Oxidation หรือ Fermentation (ภาคผนวก ก หมายเลข 13) โดยปลูกเชื้อแบบปักตรง(Stab inoculation)ในหลอดอาหาร

2 หลอด แล้วเทพาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อแล้วปิดทับ 1 หลอดสูงประมาณ 1 นิ้ว อีกหลอดหนึ่งปล่อยไว้เฉยๆ ตรวจผลวันเว้นวัน เชื้อที่เป็น Oxidizer จะให้กรดในหลอดที่ไม่มีพาราฟินปิดทับ ถ้าเป็น Fermenter จะให้กรดทั้ง 2 หลอดหรือในหลอดที่ปิดพาราฟินอย่างเดียวโดยสังเกตการเกิดกรดจากการเปลี่ยนสีของบรอมไธมอลบลูจากเขียวเป็นเหลือง

	หลอดที่ไม่ได้ราดทับด้วยพาราฟิน	หลอดที่ราดทับด้วยพาราฟิน
Oxidation	เหลือง	เขียว
Fermentation	เหลือง	เหลือง
Fermentation	เขียว	เหลือง
No action on glucose	ฟ้าหรือเขียว	เขียว

การทดสอบเมทิลเรด ปลูกเชื้อในอาหาร MR - VP (ภาคผนวก ก หมายเลข 10) ตรวจผลทุก 3 วัน โดยแบ่งอาหารมาประมาณ 2 - 3 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำยาเมทิลเรด(ภาคผนวก ข หมายเลข 7) ลงไป 2 - 3 หยด ถ้าเกิดสีแดงในอาหารบันทึกผลเป็นบวก ถ้าเกิดสีเหลืองบันทึกผลเป็นลบ

การทดสอบ Acetyl methyl carbinol(Voges - Proskauer test) ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหาร MR - VP (ภาคผนวก ก หมายเลข 10) ตรวจผลทุก 3 วัน โดยแบ่งอาหารมาประมาณ 2 - 3 มิลลิลิตร เติมน้ำยาทดสอบ สารละลาย ก และสารละลาย ข(ภาคผนวก ข หมายเลข 11) ลงไปอย่างละ 2 - 3 หยด ถ้าอาหารมีสีชมพูเกิดขึ้นภายใน 10 นาที บันทึกผลเป็นบวก ส่วนหลอดที่ไม่เกิดสีชมพูให้ตั้งทิ้งไว้เพื่อดูผลภายใน 24 ชั่วโมง ถ้าไม่มีสีชมพูเกิดขึ้นบันทึกผลเป็นลบ

ความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรท ปลูกเชื้อลงในอาหาร Phenol red broth base (ภาคผนวก ก หมายเลข 14) คาร์โบไฮเดรทที่ใช้ทดสอบได้แก่ กลูโคส แลคโตส มอล-โตส อราบิโนส แมนนิตอล ฟรุคโตส กาแลคโตส ซอร์บิตอล ซูโครสและเด็กซ์ตินโดยเติมลงไป 1 เปอร์เซ็นต์ สังเกตการสร้างกรดและแก๊ส ถ้าแบคทีเรียใช้คาร์โบไฮเดรทได้จะสร้างกรดขึ้นมาทำให้อาหารที่มีฟีนอลเรดเป็นดัชนีเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง ถ้าแบคทีเรียทำให้เกิดแก๊สได้แก๊สจะ

I17434268

เข้าไปแทนที่อาหารในหลอดดักแก๊ส

การย่อยแป้ง ปลูกเชื้อแบคทีเรียแบบจุด(Point inoculation)ลงบนอาหาร HMA (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) เติมแป้ง ø.2 เปอร์เซ็นต์ ในจานเลี้ยงเชื้อ ตรวจดูการย่อยแป้งโดยราดน้ำยาไอโอดีน(Logol's solution)(ภาคผนวก ข หมายเลข 5) ให้ทั่วจานเลี้ยงเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใส (clear zone) รอบๆ โคโลนี แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยแป้งบริเวณนั้นได้ บันทึกผลเป็นบวก

การย่อยไขมัน ปลูกเชื้อแบคทีเรียแบบจุด (Point inoculation) ลงบนอาหารทดสอบไขมัน(ภาคผนวก ก หมายเลข 7) ในจานเลี้ยงเชื้อ ถ้าเกิดตะกอนขาวขุ่นรอบๆ โคโลนีของแบคทีเรียแสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสย่อยทวีน 8ø ได้

การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ปลูกเชื้อแบบปักตรง (Stab inoculation) ลงในอาหาร Triple sugar iron agar(ภาคผนวก ก หมายเลข 18) ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีดำ บันทึกผลเป็นบวก

การใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน ปลูกเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Simon citrate agar(ภาคผนวก ก หมายเลข 16) ถ้าบรอมไธมอลบลูเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าแบคทีเรียสามารถใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนได้ บันทึกผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ บันทึกผลเป็นลบ

การเกิดแอมโมเนียจากการใช้อาร์จินีน ปลูกเชื้อแบบปักตรง(Stab inoculation) ตลอดความลึกของอาหารวุ้นอาร์จินีน (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ซึ่งมีฟีนอลเรดเป็นดัชนี เทพาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อปิดทับผิวหน้าอาหารในหลอดหนาประมาณ 1 นิ้ว ตรวจผลทุกวันเว้นวัน ถ้าแบคทีเรียสามารถใช้อาหารจากอาร์จินีนได้จะทำให้เกิดแอมโมเนียในอาหาร สีของอาหารจะเปลี่ยนจากสีแดงอมส้มเป็นสีบานเย็นบันทึกผลเป็นบวก

การเจริญใน Anaerobic agar ปลูกเชื้อแบบปักตรง(Stab inoculation)ตลอด

ความลึกของอาหาร Thioglycolate agar(ภาคผนวก ก หมายเลข 17) สังเกตการเจริญของแบคทีเรีย ถ้าเจริญบนผิวหน้าของอาหารแสดงว่าเป็นแบคทีเรียพวก Aerobe ถ้าสามารถเจริญในส่วนลึกของอาหารได้แสดงว่าเป็นแบคทีเรียพวก Facultative anaerobe

5. การทดลองนำเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มสร้างโปรติเอสที่คัดเลือกได้มาหมักน้ำปลาเปรียบเทียบกับการหมักตามธรรมชาติ

5.1 <u>การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์</u> เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 และ 4.2 ซึ่งมีคุณสมบัติชอบเค็มและสร้างโปรติเอสได้ดี(เชื้อIsolate 1) ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว Medium 73 เติมเกลือ 25 เปอร์เซ็นต์ ฟลาสก์ละ 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ Incubator shaker ที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที บ่มนาน 7 วัน แล้วนำไปเข้าเครื่องปั่นแยกสาร(Refrigerated centrifuge ,Becman Model J2 - 21) ที่ประมาณ 2460 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บเอาเฉพาะเซลล์แบคทีเรียนำมาล้างด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปทำการนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยวิธี Standard plate count technique อีกส่วนหนึ่งนำไปใช้ในการหมักน้ำปลา

5.2 <u>การเตรียมหมักน้ำปลา</u> ผสมปลาไส้ตัน(เป็นปลาจากจังหวัดชุมพรที่แช่น้ำแข็งไว้ประมาณ 22 วัน) กับเกลือเม็ด(จากจังหวัดชุมพรเช่นกัน) ในอัตราส่วน 3 : 1 โดยน้ำหนัก โดยชั่งปลาจำนวน 750 กรัมใส่ในโหลแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.4 นิ้ว เติมเกลือเม็ดจำนวน 250 กรัม คลุกเคล้าปลากับเกลือให้เข้ากันทุกส่วน จำนวน 2 โหลโดยให้โหลหนึ่งเป็นโหลควบคุมอีกโหลหนึ่งเติมเชื้อบริสุทธิ์ในลักษณะเซลล์เปียกจำนวน 1 กรัม คลุกเคล้าเชื้อกับปลาหมักให้เข้ากัน ปิดฝาโหลหมักด้วยพลาสติกวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง(เริ่มหมักในวันที่ 21 มิถุนายน 2530)

5.3 <u>การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและจุลชีววิทยาของกระบวนการหมักน้ำปลา</u> โดยเก็บตัวอย่างน้ำปลาเป็นระยะตั้งแต่หลังจากใส่เชื้อเรียบร้อยแล้วจนกระทั่ง 73 วัน โดยเก็บแบบสุ่มครั้งละประมาณ 30 มิลลิลิตร และบันทึกอุณหภูมิทั้งภายนอกและภายในถังหมักด้วยเทอร์โมมิเตอร์ ตัวอย่างน้ำปลาที่เก็บได้ส่วนหนึ่งนำไปแยกเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Complex medium of

sehgal and Gibbons ที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 25 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ใส่ลงไป อีกส่วนหนึ่งนำไปตรวจวัดปริมาณเกลือ ค่าความเป็นกรดด่าง(pH) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน แอมโมเนียคัลไนโตรเจนและไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน ตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นเพื่อตรวจสอบการย่อยสลาย