

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1.1 Tryptic Soy Agar (TSA) (สำเร็จรูป)

TSA	40.0 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ละลาย TSA 40 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนวุ้นละลายเดือดประมาณ 1 นาที นิ่งมาเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.2 Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) (สำเร็จรูป)

ส่วนประกอบ

Yeast Extract	5.0 กรัม
Proteose Peptone No.3	10.0 กรัม
Sodium Thiosulfate	10.0 กรัม
Oxgall	8.0 กรัม
Saccharose	20.0 กรัม
Sodium Chloride	10.0 กรัม
Ferric Ammonium Citrate	1.0 กรัม
Bromthymol Blue	0.04 กรัม
Thymol Blue	0.04 กรัม
Agar	15.0 กรัม

ละลาย TCBS 89 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนวุ้นละลายเดือดประมาณ 10 นาที (ไม่ต้องนึ่งมาเชื้อ)

1.3 Muller Hinton Agar (สำเร็จรูป)

Muller Hinton	38 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ละลาย Muller Hinton 38 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนวุ้นละลายเดือดประมาณ 1 นาที นิ่งมาเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. การเตรียม 0.01 M PBS สำหรับ 1 ลิตร

NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.15	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.2	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดค้ให้เข้ากันในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 7.4

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ข
วิธีการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย

Antibiotic Sentivity Test

การตรวจความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะ Disc method เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก เพื่อประเมินความไวของเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดโรค ต่อยาปฏิชีวนะหลาย ๆ ชนิดพร้อม ๆ กัน

อุปกรณ์

1. Antibiotic disc ชนิดต่าง ๆ
2. เชื้อแบคทีเรีย
3. Tryptic Soy Broth
4. Hilton Muller agar plate
5. Triangle Glass or Cotton Swab
6. Forcep

วิธีการทดลอง

1. ใช้ Loop ถ่ายเชื้อ 1 โคโลนีลงใน Tryptic Soy Broth 1 ml บ่ม 37 องศาเซลเซียส ให้ได้ความขุ่นปานกลาง
2. หยด 0.1 ml ของแบคทีเรียที่ขุ่นบน Hilton Muller Agar Plate แล้วกระจายให้ทั่วด้วย Triangle Glass หรือใช้ก้านสำลิจุ่มลงใน Broth นำมา Swap บน Muller Agar Plate ให้ทั่วผิวหน้า
3. ปลอก plate ให้แห้ง 3-5 นาที แล้วจึงวาง Antibiotic Disc ลงไปด้วย Forcep ที่อุณหภูมิห้อง
4. บ่ม plate 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

การตรวจผล Inhibition Zone (วัดคร่อมแผ่น Disc ลงไปด้วย)

รายงานผล

- Resistant
- Intermediate
- Sensitive

Antibiotic diffusion zones (measured in millimeters)

Abbreviation	Antibiotic	Resistant	Mildly Sensitive	Sensitive
NA 30	Nalidixic acid	< 14	14-18	>18
E 15	Erythromycin	< 14	14-17	>17
CN 10	Gentamicin	< 13	13-14	>14
F 300	Nitrofurantoin	< 15	15-16	>16
SXT 25	Trimeth/sulfa	< 11	11-15	>15
N 30	Neomycin	< 12	12	>12
AMP 30	Ampicillin	< 12	12-13	>13
C 30	Chloramphenicol	< 13	13-17	>17
S 10	Streptomycin	< 12	12-14	>14
NV 30	Novobiocin	< 17	17	>17
S3 300	Sulphonamides	< 13	13-16	>16
OA 2	Oxolinic acid	< 14	14-18	>18
SF 300	Sulphafurazole	< 11	11-15	>15
ENR 5	Enrofloxacin	< 16	16-20	>20
FFC 30	Florfenicol	< 16	16-21	>21
PB 300	Polymyxin B	< 8	8-12	>12
K 30	Kanamycin	< 14	14-17	>17
OT 30	Oxytetracycline	< 15	15-18	>18
SOR 25	Romet 30*	< 15	15-18	>18

Source: Adapted from the National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Note: The diffusion zones listed in the following table should only be used as a guide. At present there are no standard zones established for fish bacteria.

Note: Antibiotic disks are available commercially prepared.

*Romet 30 = Sulfadimethoxine ormetoprim.

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ค
ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

- ระดับความเป็นกรด-ด่างต่อการเจริญของแบคทีเรีย

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: od

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	174.927 ^a	167	1.047	145.012	.000
Intercept	222.190	1	222.190	3.076E4	.000
species	26.125	3	8.708	1.206E3	.000
time	37.556	6	6.259	866.550	.000
ph	63.796	5	12.759	1.766E3	.000
species * time	10.626	18	.590	81.728	.000
species * ph	6.510	15	.434	60.084	.000
time * ph	18.351	30	.612	84.683	.000
species * time * ph	11.963	90	.133	18.402	.000
Error	2.427	336	.007		
Total	399.545	504			
Corrected Total	177.355	503			

a. R Squared = .986 (Adjusted R Squared = .980)

```
UNIANOVA od BY species time ph
/METHOD=SSTYPE(3)
/INTERCEPT=INCLUDE
/PLOT=PROFILE(time*ph*species)
/CRITERIA=ALPHA(0.05)
```

```
/DESIGN=species time ph species*time species*ph time*ph species*time*ph.
```

- ระดับของอุณหภูมิต่อการเจริญของแบคทีเรีย

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: OD

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	52.276 ^a	111	.471	44.036	.000
Intercept	113.310	1	113.310	1.059E4	.000
species	17.425	3	5.808	543.102	.000
time	13.201	6	2.200	205.726	.000
temp	4.498	3	1.499	140.195	.000
species * time	4.544	18	.252	23.607	.000
species * temp	7.115	9	.791	73.924	.000
time * temp	2.033	18	.113	10.563	.000
species * time * temp	3.458	54	.064	5.988	.000
Error	2.396	224	.011		
Total	167.982	336			
Corrected Total	54.671	335			

a. R Squared = .956 (Adjusted R Squared = .934)

```

UNIANOVA OD BY species time temp
/METHOD=SSTYPE(3)
/INTERCEPT=INCLUDE
/PLOT=PROFILE(time*temp*species)
/CRITERIA=ALPHA(0.05)
/DESIGN=species time temp species*time species*temp time*temp species*time
*temp.

```

- ระดับของความเค็มต่อการเจริญของแบคทีเรีย

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:OD SALI

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	89.192 ^a	167	.534	54.795	.000
Intercept	176.020	1	176.020	1.806E4	.000
species	33.626	3	11.209	1.150E3	.000
time	24.524	6	4.087	419.351	.000
salinity	12.877	5	2.575	264.221	.000
species * time	9.359	18	.520	53.344	.000
species * salinity	2.445	15	.163	16.721	.000
time * salinity	3.412	30	.114	11.670	.000
species * time * salinity	2.948	90	.033	3.361	.000
Error	3.275	336	.010		
Total	268.487	504			
Corrected Total	92.467	503			

a. R Squared = .965 (Adjusted R Squared = .947)

```
UNIANOVA ODSALI BY species time salinity
/METHOD=SSTYPE(3)
/INTERCEPT=INCLUDE
/PLOT=PROFILE(time*salinity*species)
/CRITERIA=ALPHA(0.05)
```

```
/DESIGN=species time salinity species*time species*salinity time*salinity
species*time*salinity.
```