บทที่ 3

วิธีการวิจัย

งานวิจัยเรื่องศึกษาการออกแบบพื้นที่สร้างรัง เสียง และจุลินทรีย์ในมูลนก ของนกแอ่นรังขาว ประกอบด้วยงานวิจัยย่อย 3 เรื่อง คือ

งานวิจัยย่อยที่ 1. การออกแบบพื้นที่สร้างรัง

งานวิจัยย่อยที่ 2 เสียงของนกแอ่นกินรัง

งานวิจัยย่อยที่ 3 การตรวจสอบจุลินทรีย์ในมูลของนก

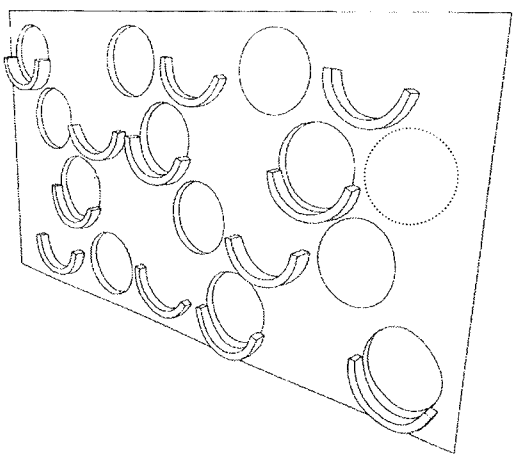
มีรายละเอียดดังนี้

งานวิจัยย่อยที่ 1 การออกแบบพื้นที่สร้างรังของนกแอ่นรังขาว

ทำการพัฒนาวัสดุ รูปแบบ และการประดิษฐ์ และออกแบบแผงไม้ ดำเนินการเป็นสองระยะ คือระยะที่ 1 เป็นการวิจัยที่ใช้งบประมาณส่วนตัว ทำการออกแบบแผงไม้และทำการทดทดสอบการใช้งาน ในปีพ.ศ. 2550-2551

ระยะที่ 2 เป็นการวิจัยที่ใช้งบประมาณของคณะวิทยาศาสตร์ (ทุน 50,000 ปี 2552) และ ทุนวช.ปี 2553 ทำการออกแบบแผงไม้สองกลุ่มชิ้นงาน กลุ่มที่หนึ่งเป็นไม้อัดทำเป็นฉาก 1 รูปแบบ ทำการทดสอบในปลายปี 2551 กลุ่มที่สองเป็นไม้กระดานทำเป็นมุมฉากและมุมป้าน ทำการวิจัยทดสอบการใช้งานในปี พ.ศ. 2552-2553

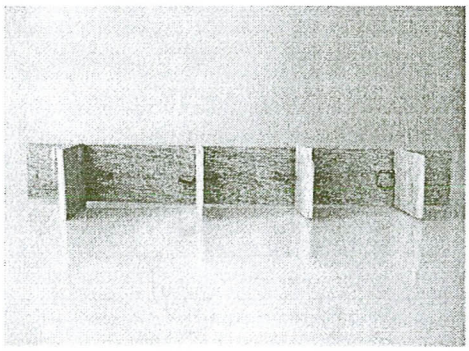
การวิจัยระยะที่ 1 ได้ผลลัพธ์คือ แผงไม้ที่นกเข้าทำรังและเพิ่มจำนวนรังได้ดี ซึ่งนำไปจดอนุสิทธิบัตร จำนวน 1 ชิ้นงาน (รูปที่ 3.1) ทำการทดสอบที่วัดสุทธวาตวราราม จังหวัดสมุทรสาคร



รูปที่ 3.1 ภาพลายเส้น "แผงไม้พื้นที่สร้างรังของนกอีแอ่น"
(ที่มา: เอกสารประกอบการของอนุสิทธิบัตร รายละเอียดสิ่งประดิษฐ์
อนุสิทธิบัตรเลขที่ 0803001488)

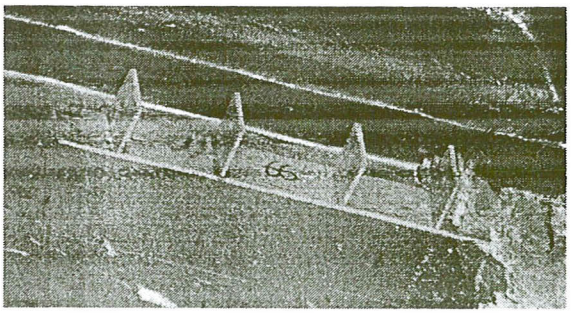
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 18 มิ.ย. 2555
243327
เลขทะเบียน
เลขเรียกหนังสือ

ผลการทดสอบระยะที่ 2 กลุ่มแผงไม้อัด (รูปที่ 3.2) ทำการทดสอบที่วัดสุทธิวาตวราราม จังหวัดสมุทรสาคร พบว่านกใช้งานในแผ่นไม้นี้ได้เร็วเช่นกัน (ดังรูปที่ 3.3)

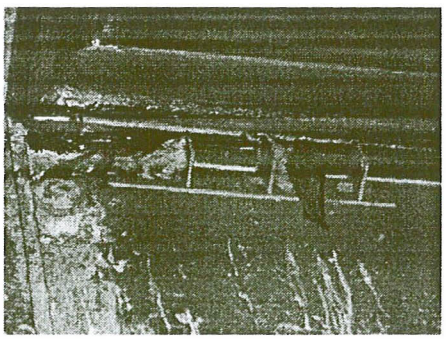


รูปที่ 3.2 แผงไม้อัดแบบแผ่นยาวมีฉากกั้น

ผลการใช้งานของนกในเวลาประมาณ 1 ปี นกในพื้นที่ในการสร้างรังตรงมุม ขนาดของรังเท่ากับรังปกติ ซึ่งพบรังบนแผงไม้อยู่หลายแผ่น เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการทำรังในพื้นที่ว่างเปล่าของห้องแล้ว การติดตั้งแผงไม้นี้ ทำให้สามารถได้รังมากขึ้น และเร็วกว่าไม่ติดตั้งแผงไม้ ดังนั้นแผงไม้นี้จึงสามารถใช้งานได้



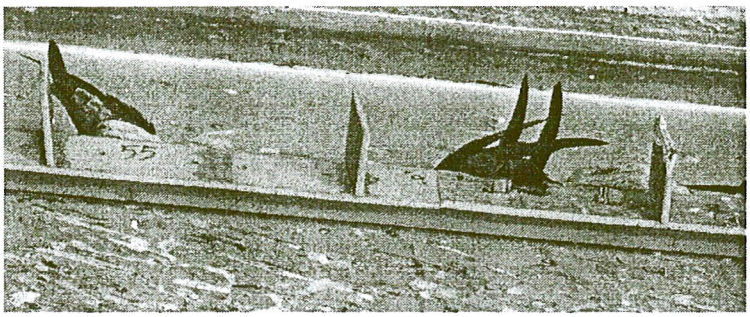
(3.3 ก)



(3.3 ข)

รูปที่ 3.3 ก. และ ข. แผงไม้อัดแบบแผ่นยาวมีฉากกั้นที่มีรังนก

ช่วงเวลาต่อมา พบว่าแผงไม้นี้มีข้อด้อยในเรื่องความไม่แข็งแรงของแผงกั้น หลุดร่วงง่าย ทำให้ชำรุด ดังรูปที่ 3.4 การชำรุดอาจเกิดขณะนกเข้าเกาะ จึงพบว่านกจึงเลือกทำรังที่ด้านบนของแผ่นไม้ที่ชำรุด ซึ่งไม่เป็นไปตามความต้องการของงานวิจัย เนื่องจากรังด้านบนเป็นรังที่มีขนาดเล็ก



รูปที่ 3.4 แผงไม้อัดมีฉากกั้นที่ชำรุดและนกทำรังที่ด้านบนของแผ่นไม้

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงพัฒนาแผงไม้ให้มีความแน่นหนาขึ้นโดยเปลี่ยนจากไม้อัดเป็นไม้ฝาบ้าน มีการติดกาวและตอกตะปูเพิ่มความแข็งแรง ดังแสดงในรูปที่ 3.5-3.7

งานวิจัยในกลุ่มแผงไม้ที่ใช้ฝาบ้านนี้ ใช้งบประมาณส่วนหนึ่งจากคณะวิทยาศาสตร์ ร่วมกับงบประมาณส่วนหนึ่งจากทุน วช. ปี 53 โดยทำการออกแบบแผงไม้สามรูปแบบ และทำการทดสอบกับบ้านรังนกในจังหวัดสมุทรสงคราม จังหวัดชุมพร จังหวัดนราธิวาส และที่วัดช่องลม จังหวัดสมุทรสาคร

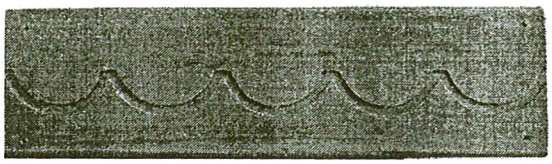
การออกแบบรูปแบบของแผงไม้กลุ่มไม้ฝาบ้าน มีหลักการแนวคิดดังนี้

ก. พื้นไม้และฉาก มีความแข็งแรง โดยเลือกวัสดุเป็นแผ่นไม้กระดานฝาบ้าน มีความหนาประมาณ 80-100 มิลลิเมตร ขนาดหน้ากว้าง 13 เซ็นติเมตรเท่ากันตลอดแผ่น ซึ่งเศษไม้ประเภทนี้ มักถูกจำหน่ายในรูปของ “ไม่ศอก” ขายปลีก มัดละ 10 แผ่น ราคาแผ่นละประมาณ 18 บาท ซึ่งเป็นราคาที่ยอมรับได้ หากมีการผลิตในรูปอุตสาหกรรมอาจหาไม้ที่มีราคาถูกกว่า และแข็งแรงกว่า หรือหาวัสดุสังเคราะห์อื่นที่ราคาถูกกว่า

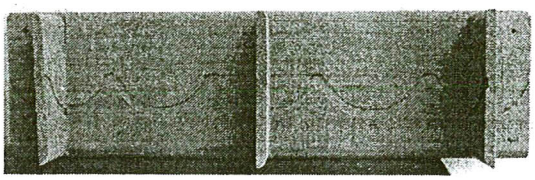
ข. มีการใช้ฉากกั้น (มุมฉากหรือมุมป้าน) เพื่อแยกรังนกออกจากกัน เป็นการลดผลกระทบที่เกิดจากการมีปฏิสัมพันธ์กันระหว่างเพื่อนบ้านซึ่งอาจทำให้รังร่วงได้ง่าย

ค. มีร่องรูปตัวยู เพื่อให้นกเกาะกับไม้กระดานในขณะทำรัง จะช่วยให้นกสร้างรังได้ง่ายขึ้น และถ้ารังถูกสร้างในบริเวณที่เป็นตัวยู รังจะแน่นหนาขึ้น

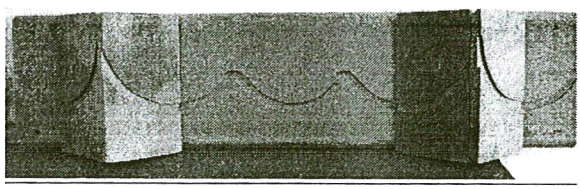
จากแนวคิดข้างต้น จึงประดิษฐ์แผงไม้ออกมาสามรูปแบบ แบบที่ 1 แผ่นไม้พื้นที่สร้างรัง 180 องศา เป็นชุดควบคุม และสองแบบที่เหลือคือชุดทดลอง ได้แก่ แบบที่ 2 แผ่นไม้พื้นที่สร้างรังมุม 90 องศา และแบบที่ 3 แผ่นไม้พื้นที่สร้างรังมุม 130 องศา (ทั้งสามแบบแสดงในรูปที่ 3.5-3.7)



รูปที่ 3.5 แบบที่ 1 แผ่นไม้พื้นที่สร้างรังที่มุม 180 องศา



รูปที่ 3.6 แบบที่ 2 แผ่นไม้พื้นสร้างรังที่มุม 90 องศา



รูปที่ 3.7 แบบที่ 3 แผ่นไม้พื้นที่สร้างรังที่มุม 130 องศา

ทำการทดสอบการเข้าทำรังกับแผงไม้กลุ่มไม้ฝาบ้าน โดยการติดตั้งภายในอาคารบ้านรังนก 3 จังหวัดได้แก่ จังหวัดสมุทรสาคร สมุทรสงคราม ชุมพร และนราธิวาส การติดตั้งเป็นไปอย่าง (random) รูปแบบละเท่าๆ กัน รวม 84 แผ่น ตั้งแต่เดือน กุมภาพันธ์ 2552 ทำการตรวจสอบการเข้าใช้งานของนกโดยเจ้าของบ้านรังนก ซึ่งส่งข้อมูลในรูปภาพถ่าย สรุปผลการทดสอบการเข้าใช้งานของนกในเดือน ตั้งแต่ติดตั้งจนถึงพฤษภาคม 2553

ติดตั้งแผงไม้ทั้งสามแบบในบ้านรังนกที่บริเวณสูงสุดติดกับเพดานเท่าที่จะทำได้ ในลักษณะติดสนิท ให้ผิวด้านหลังของแผ่นไม้แนบไปกับผนัง และร่องรูปตัวยูตั้งขึ้นทุกแผ่น จำนวนแผ่นมีดังนี้

ตารางที่ 3.1 จำนวนแผงไม้กลุ่มไม้ฝาบ้าน 3 รูปแบบ ที่ติดตั้งในบ้านรังนกจังหวัดต่างๆ

	จำนวนแผงไม้ (แผ่น)				
รูปแบบแผงไม้	สมุทรสงคราม	นราธิวาส	สมุทรสาคร	ชุมพร	รวม
แบบที่ 1แผ่นไม้พื้นที่สร้างรังมุม 180 องศา	10	6	2	10	28
แบบที่ 2 แผ่นไม้พื้นที่สร้างรังมุม 90 องศา	10	6	2	10	28
แผ่นไม้พื้นที่สร้างรังมุม 130 องศา	10	6	2	10	28

การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดสอบความแตกต่างในการเลือกใช้งานบนแผ่นไม้ โดยที่แผ่นที่บันทึกว่ามีการใช้งาน เมื่อปรากฏรังนกอย่างน้อย 1 รังสร้างบนแผ่นไม้ ในช่วงเวลา 1 ปีนี้ ทดสอบความแตกต่างโดย χ^2-test ที่ p-value = 0.01

เกณฑ์การพิจารณา "แผงไม้พื้นที่สร้างรังที่เหมาะสม" เมื่อเป็นไปตามดังนี้ "มีรังปรากฏบนแผ่นไม้อย่างน้อย 3 รัง รังมีความกว้างอย่างน้อย 2 เซ็นติเมตร และรังมีความสำเร็จในการสืบพันธุ์"

งานวิจัยย่อยที่ 2 เสียงของนกแอ่นกินรัง

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บข้อมูลภาคสนาม

การบันทึกเสียงร้อง

นกแอ่นกินรัง ที่เข้าออกพื้นที่อาศัยกับพื้นที่หากิน มักจะร้อง(calling) และทำเสียงสะท้อนเพื่อค้นหาทิศทาง ทำการบันทึกเสียงร้องของนกในพื้นที่อาศัย (nesting colony) ในเวลากลางวันที่วัดสุทธิวาตวราราม จังหวัดสมุทรสาคร เสียงร้องที่บันทึกเป็นเสียงที่นกร้องออกมาในภาวะปกติในพื้นที่อาศัยนั้น จึงเป็นเสียงรวมของหลายๆ ตัว เลือกช่วงเวลาที่มีนกจำนวนน้อยเพื่อให้ได้เสียงร้องเดี่ยวและชัดเจนมากที่สุด บันทึกเสียงพร้อมบันทึกภาพพฤติกรรมของนกเพื่อวิเคราะห์พฤติกรรมการเปล่งเสียงร้อง ทำการวิเคราะห์ทางกายภาพของเสียงร้องโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Avisoft ซึ่งถูกต้องตามกฎหมายลิขสิทธิ์ที่มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การบันทึกและวิเคราะห์กายภาพของเสียงสะท้อน

ก. ขออนุญาตจากเจ้าของบ้าน เพื่อวางตาข่าย (mist net) ตรงทางเข้า-ออก

ในเวลากลางวันและเวลาเย็นใกล้ค่ำ ช่วงเวลาที่นกเข้ารัง เมื่อนกติดตาข่าย นำนกแยกออกมาบันทึกเสียงสะท้อนตามวิธีในข้อ ข. เมื่อทำการทดลองเสร็จแล้วได้ปล่อยนกกลับที่เดิม โดยนกไม่ได้เป็นอันตรายใดๆ

ข. ทำการแยกเดี่ยวนกในห้องมืดขนาด 3.5 ม.x 5 ม. X 4 ม. บันทึกเสียงสะท้อนที่นกเปล่งออกมา ทำการบันทึกเป็นช่วง ครั้งละ 1 นาที โดยใช้นกประมาณ 10 ตัว และทำการทดสอบในสภาพมีแสงกับไม่มีแสง(มืด) โดยใช้ห้องทดลองเดียวกัน เมื่อนกบินและเปล่งเสียงสะท้อนเป็นเสียงคลิก ในขณะไม่มีแสง ทำการบันทึกเสียงไว้ และเปิดไฟฟ้าหลอดฟลูออเรสเซนต์ขนาด 40 W 30 in. daylight จำนวน 1 ดวง บันทึกการทำเสียงสะท้อนของนกติกต่อกัน คัดเลือกเสียงที่ชัดเจนที่สามารถวิเคราะห์ได้ หลังจากแปลงแฟ้มข้อมูลเป็น file .wav แล้ว นำไปวิเคราะห์เสียงสะท้อนโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปAvisolf Lab ที่ถูกต้องตามกฎหมาย ในความอนุเคราะห์ของภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

<u>งานวิจัยย่อยที่ 3 การวิเคราะห์จุลินทรีย์ในมูลนก</u>

1. การเก็บตัวอย่างมูลนกและการแยกเชื้อจุลินทรีย์

1.1 การเก็บตัวอย่างมูลนก

เก็บตัวอย่างมูลนกจากบริเวณพื้นที่ในวัดช่องลมจังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดชุมพร และจังหวัดจันทบุรี โดยเก็บเป็นจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งในแต่ละครั้งจะเก็บตัวอย่างจำนวน 5 ถุง โดยเก็บในกล่องควบคุมความเย็นเพื่อรักษาจุลินทรีย์ให้ใกล้เคียงกับธรรมชาติมากที่สุดและรีบทำการตรวจแยกเชื้อและจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ทันที

1.2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์และการจัดจำแนก

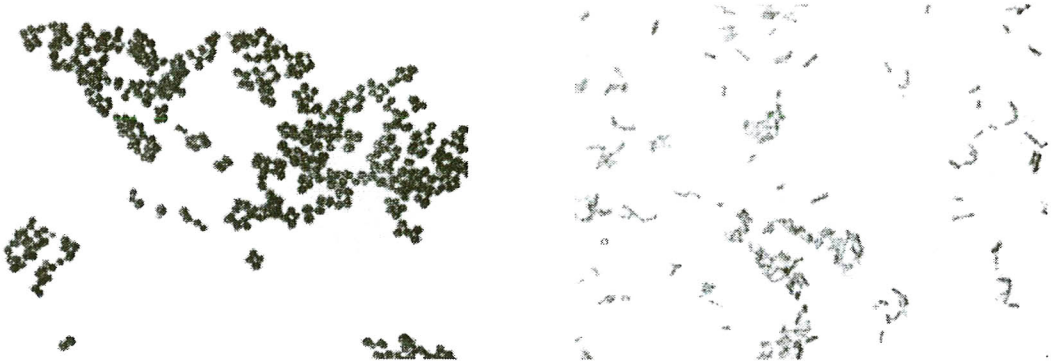
1.2.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์

นำตัวอย่างมูลนก 5 กรัม ใส่ในสารละลาย normal saline 0.85 % ที่ผ่านการสเตอร์ไรด์แล้วปริมาตร 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการกรองเอาเศษมูลนกออก นำสารละลายที่ได้ไปทำการเจือจางตามลำดับ ดูดสารละลายตัวอย่างมูลนกที่ได้มาเกลี่ยในจานอาหาร Nutrient agar (NA) สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย, Sabouraud dextrose agar (SDA) สำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์ และ Martin's rose bengal streptomycin agar (MRS) และ Potato dextrose agar (PDA) สำหรับเพาะเลี้ยงรา นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรีย และ 3-5 วันสำหรับยีสต์และรา สังเกตุการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์ และรา บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน นำมาแยกเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บในอาหารเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

1.2.2 การจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์

1.2.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เก็บไว้ในหลอดอาหารผิวเอียงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมาทำการเพาะเลี้ยงโดยทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหาร NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาทำการย้อมสีแกรม และดูลักษณะรูปร่างของเชื้อ



3.8 ก 3.8 ข

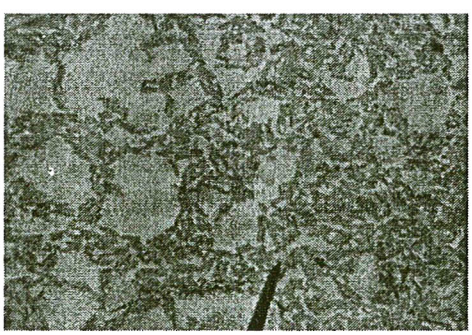
รูปที่ 3.8 การติดสีแกรมของแบคทีเรีย ก. แบคทีเรียแกรมบวก ติดสีน้ำเงินม่วง ข. แบคทีเรียแกรมลบ ติดสีแดง (ที่มา : http://ceficad.com/sitemap.aspx)

1.2.2.2 การศึกษาลักษณะบางประการและการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ

การศึกษาลักษณะของแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน (Gram positive rod)

- การทดสอบการสร้างเอ็นโดสปอร์

นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาแกรม โดยมีลักษณะเป็นแกรมบวกรูปร่างท่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการศึกษาลักษณะบางประการคือ การย้อมสีเอ็นโดสปอร์ โดยดูความสามารถในการสร้างสปอร์ของเชื้อ เพื่อจัดกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างและไม่สามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ได้ เพื่อนำไปทดสอบคุณลักษณะทางชีวเคมีต่อไป



รูปที่ 3.9 การย้อมสีเอ็นโดสปอร์ (สปอร์ติดสีเขียว เซลล์ติดสีแดง)

(ที่มา : http://technoinhome.com/front/webboard/show.php?tbl=tblwb03&id=10

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อน (Gram positive rod)

ก่อนทำการทดสอบ นำเชื้อแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบตามลำดับดังนี้

- การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (Catalase test)

หยด 3% H_2O_2 ลงบนแผ่นสไลด์ ที่สะอาดและแห้ง จากนั้นเขี่ยเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ 2 Loop แตะลงในหยดของ H_2O_2 สังเกตุการเกิดและไม่เกิดฟองก๊าซ

- การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis test)

เขี่ยเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร Starch agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน เมื่อครบกำหนดเวลานำจานอาหารเลี้ยงเชื้อมาหยดด้วยสารละลาย Iodine ให้ท่วม สังเกตการเกิดหรือไม่เกิดบริเวณใสรอบๆรอยขีดเชื้อ

- การทดสอบการหมักน้ำตาลกลูโคส (Glucose fermentation test)

เขี่ยเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารทดสอบ Glucose fermentation บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมงสังเกตการสร้างกรดโดยการเปลี่ยนสีของอาหารและดูการสร้างก๊าซในหลอดดักก๊าซ

- การทดสอบการเจริญบนอาหาร Mannitol salt agar

เขี่ยเชื้อแล้วเพาะเลี้ยงโดยการ streak บนอาหาร Mannitol salt agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะสีโคโลนีสีเหลือง และรอบๆโคโลนีเกิดตะกอนสีขาวขุ่น หรือโคโลนีมีสีแดง และรอบๆโคโลนีไม่เกิดตะกอนขาวขุ่น

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม (Gram positive cocci)

ก่อนทำการทดสอบ นำเชื้อแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบตามลำดับดังนี้

- การทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส (Catalase test)

ทำเช่นเดียวกับการทดสอบเชื้อในกลุ่มแกรมบวกรูปร่างท่อน

- การทดสอบการเจริญ ลักษณะโคโลนี และการสร้างสีบนอาหาร Mannitol salt agar

ทำเช่นเดียวกับการทดสอบเชื้อในกลุ่มแกรมบวกรูปร่างท่อน

- การทดสอบความสามารถในการฮีโมไลด์เลือด (Blood hemolysis)

เขี่ยเชื้อลงบนอาหาร Blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง ดูโคโลนีมีสีเขียวจัดอยู่ในกลุ่มชนิดแอลฟา การเกิดบริเวณใสรอบรอยขีดเชื้อจัดอยู่ในกลุ่มเบต้า และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆบนอาหารโดยโคโลนีมีสีขาวจัดอยู่ในกลุ่มแกมมา

- การทดสอบการย่อยเอ็ชคูลิน (Esculin hydrolysis test)

เขี่ยเชื้อมา streak บนอาหาร Bile-esculin agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูการเปลี่ยนหรือไม่เปลี่ยนเป็นสีดำของอาหาร

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน (Gram negative rod)

ก่อนทำการทดสอบ นำเชื้อแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบตามลำดับดังนี้

- การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test)

เตรียมกระดาษกรองขนาด 1x4 เซนติเมตร หยด 1% Tetramethyl paraphenylene diamine hydrochloride บนกระดาษพอหมาดๆ เขี่ยเชื้อแตะบนกระดาษกรองดังกล่าวแล้วสังเกตสีบนกระดาษกรองภายในเวลา 10 วินาที

- การทดสอบการหมักน้ำตาลกลูโคส (Glucose fermentation test)

ทำเช่นเดียวกับการทดสอบแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อน

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน (Gram negative rod) ใน Family Enterobacteriaceae (Lactose positive)

นำเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อนใน Family Enterobacteriaceae มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารNA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตามลำดับดังนี้

- การทดสอบการหมักน้ำตาลแลคโตส (Lactose fermentation test)

เขี่ยเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Macconkey agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดหรือไม่เกิดบริเวณใสสีเหลืองบนอาหาร

- การทดสอบการสร้างสารอินโดล (Indole test)

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptone บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วเติม Kovacs' reagent 0.5 มล. ลงไป แล้วสังเกตการเกิดหรือไม่เกิดวงแหวนสีแดงที่ชั้นบนของอาหาร

- การทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน (Citrate utilization test)

เขี่ยเชื้อโดยใช้ลูป streak บนผิวหน้าอาหารเอียง Simmons' Citrate agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (จนถึง 7 วัน) สังเกตการเปลี่ยนหนือไม่เปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

- การทดสอบ MR-VP (Methyl Red Test - Vogas-Proskauer Test)

เขี่ยเชื้อลงในอาหาร MR-VP บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน เชื้อที่จะทดสอบ MR นำมาหยดด้วย Methyl red 5-6 หยด สังเกตการเกิดสีแดงในหลอดอาหาร

เชื้อที่จะทดสอบ VP หยด 10% ของ Alpha naphthol ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเติม KOH 20% ลงไป 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที สังเกตการณ์เกิดสีแดงในหลอดอาหาร

- การทดสอบความสามารถในการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide (H_2S) production)

นำเชื้อมาทดสอบบนอาหาร TSI agar โดยการ stap และ streak ลงไปในอาหาร และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลทุกวันเป็นเวลา 5 วัน โดยดูการเปลี่ยนสีของอาหาร

โดยถ้าเชื้อใช้น้ำตาล Glucose ได้อย่างเดียว อ่านผลเป็น K/A พบส่วนล่างของอาหาร (Butt) เป็นสีเหลือง (Acidic) และบริเวณ Slant เป็นสีแดง (Alkaline)

ถ้าเชื้อใช้น้ำตาลได้มากกว่า 1 ชนิด อ่านผลเป็น A/A จะเห็นทั้งส่วนล่างและ Slant เป็นสีเหลือง

ถ้าเชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลทั้ง 3 ชนิดได้ แต่จะใช้โปรตีนในอาหารแทนทำให้อาหารมีฤทธิ์เป็นด่างจึงเกิดสีแดงทั้งหมด อ่านผลเป็น K/K หรือ K/N

ถ้าเชื้อสร้าง H_2S ได้ จะเห็นเป็นตะกอนสีดำและเกิดก๊าซดันอาหารให้ยกขึ้นหรือแตกออกได้

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน (Gram negative rod) ใน Family Enterobacteriaceae (Lactose negative)

นำเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน Family Enterobacteriaceae กลุ่ม Lactose negative มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตามลำดับคือ

- การทดสอบการสร้าง Indole

ทำเช่นเดียวกับการทดสอบในกลุ่ม lactose positive

- การทดสอบความสามารถในการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide (H_2S) production)

ทำเช่นเดียวกับการทดสอบในกลุ่ม lactose positive

- การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส (Urease)

เขี่ยเชื้อมา streak ลงบนอาหาร Urea agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจผลทุกวันเป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเหลืองเป็นสีชมพู

- การศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ (โดยวิธี Hanging drop)

ใช้ลูปแตะน้ำไปหยดที่กลางสไลด์ 1 หยด แล้วเขี่ยเชื้อไปวางที่ตำแหน่งกลางหยดน้ำ นำสไลด์หลุม มาปิดทับกับกระจกปิดสไลด์โดยให้บริเวณนูนของหยดน้ำที่มีเชื้อ อยู่ตำแหน่งตรงกับหลุมของสไลด์ นำ ไปส่องดูการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.2.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราและการจัดจำแนก

นำเชื้อราบริสุทธิ์ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาทำการเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญ จากนั้นนำมาทำสไลด์คัลเจอร์ (Slide culture) เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อรา โดยสังเกตลักษณะโครงสร้างเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบลักษณะของเชื้อราที่พบกับหนังสือของ Watanabe (1994), สิรินาถ และ วันทนา (2541) และ เยาวภา (2539)

1.2.2.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของและการจัดจำแนกยีสต์ *Cryptococcus neoformans*

นำเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร SDA ให้เชื้อเจริญอายุ 48-72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะโคโลนี และทดสอบความสามารถในการเจริญในอาหาร Bird seed agar (BSA) ซึ่งถ้าเจริญได้เชื้อจะให้โคโลนีสีดำ จากนั้นนำเชื้อยีสต์ที่สร้างโคโลนีสีดำได้ มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Urease test เพื่อดูความสามารถในการย่อยยูเรีย โดยถ้าเชื้อมีเอนไซม์ Urease จะเจริญบนอาหารและทำให้อาหารเปลี่ยนสีเป็นสีชมพู