สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การประเมินผลของโปรแกรมที่ช่วยในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ; ส่วนที่ 1 แบคทีเรียแกรมลบ

ธิดา อินทรชาธร

สลิตา มีศิลป์

ปน.
ว5817
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....83975
วัน,เดือน,ปี.....23 ก.ย. 2551

b.....11983139
i.....

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2550

Evaluation of Software to Facilitate Identification of Foodborne Bacteria ; Part I Gram Negative Bacteria

Thida Intharachatorn

Salita Meesin

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Biotechnology Program

Department of Applied Biology, Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

โครงงานพิเศษเรื่อง การประเมินผลของโปรแกรมที่ช่วยในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ส่วนที่ 1 แบคทีเรียแกรมลบ

นักศึกษา ธิดา อินทรชาธร รหัส 47050131

สลิตา มีศิลป์ รหัส 47050167

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดวงใจ โอชัยกุล

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร.สาวิตรี วทัญญูไพศาล

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ ผศ.ดร.สาวิตรี วทัญญูไพศาล	

.....

(รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โครงงานพิเศษเรื่อง การประเมินผลของโปรแกรมที่ช่วยในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ; ส่วนที่ 1 แบคทีเรียแกรมลบ

นักศึกษา ธิดา อินทรชาธร รหัส 47050131

สลิตา มีศิลป์ รหัส 47050167

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2550

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดวงใจ โอชัยกุล

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร.สาวิตรี วทัญญูไพศาล

บทคัดย่อ

โปรแกรม FBIdent เวอร์ชัน 1.0 เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งพัฒนาโดย คมรัชกร (2548) โครงงานนี้ได้นำเชื้อแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดที่ระบุอยู่ในโปรแกรมมาศึกษาคุณสมบัติพื้นฐาน และคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ เช่น การศึกษารูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย การเคลื่อนที่ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส ความสามารถในการสร้างอินโดล การทดสอบเมทิลเรด การทดสอบเมทิลคาร์บินอล การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส การรีดิวซ์ไนเตรท ความสามารถในการย่อยอาร์จินิน การสร้างเอนไซม์ดีอะมิเนส ความสามารถในการย่อยเจลาติน ความสามารถในการใช้ซิเตรท ความสามารถในการใช้ดี-กลูโคส และเมื่อนำผลการทดสอบที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลของโปรแกรม FBIdent เวอร์ชัน 1.0 พบว่าผลการทดสอบที่ได้มีเพียงสองการทดสอบที่ไม่ตรงกับผลในโปรแกรมคือ การทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย *Morganella morganii* และการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสของเชื้อ *Providencia rettgeri* จึงได้นำผลการทดลองทั้งหมดมาปรับปรุงและทำการพัฒนาเพื่อให้โปรแกรม FBIdent เวอร์ชัน 1.0 มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และสามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ได้

Special Project Title	Evaluation of Software to Facilitate Identification of Foodborne Bacteria ; Part I Gram Negative Bacteria
Student	Miss Thida Intharachatorn 47050131
	Miss Salita Meesin 47050167
Program	Biotechnology
Department	Applied Biology
Academic Year	2007
Special Project advisor	Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul
Special Project co - advisor	Asst. Prof. Dr. Savitri Vatanyoopaisarn

ABSTRACT

Software FBIdent version 1.0 was developed by Komruchagorn (2005) in order to facilitate the identification of some food industrially important bacteria. This project has evaluated the use of such program in the part of some Gram negative bacteria. Fourteen strains were observed their morphology and biochemical reactions according to the suggestion of the program. Those test were Gram staining, motility test, catalase test, indole test, methyl red test, Voges Proskauer test, urease test, nitrate reduction test, arginine dihydrolase test, deaminase test, gelatin hydrolysis, citrate and glucose utilization. The results of all labolatory tests were then compared to the data shown in the program. It was found that two test, motility of *Morganella morganii* and urease production of *Providencia rettgeri,* did not match with those in the FBIdent program but the rest of the tests were correct.

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความอนุเคราะห์จาก รศ.ดวงใจ โอชัยกุล อาจารย์ที่ปรึกษา และผศ.ดร.สาวิตรี วทัญญูไพศาล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางในการทำโครงงานพิเศษ และตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ซึ่งทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่ให้คำปรึกษา ให้วิชาความรู้ตลอดเวลาที่ผ่านมา

ขอขอบคุณ คุณพยอม เกียรติกำจร คุณอนิทัศน์ ทองจันทร์และนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษเป็นอย่างดี กรุณาให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับใช้ในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้อง ตลอดจนเพื่อนๆ ทุกคนที่มีส่วนในการช่วยสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษนี้จนสำเร็จไปได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2550

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ข

สารบัญ ง

สารบัญตาราง ซ

สารบัญรูปภาพ ฌ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ 2

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 โปรแกรม FBIdent เวอร์ชั่น 1.0 5

2.1.1 อนุกรมวิธาน 5

2.1.2 การตรวจสอบ 6

2.1.3 วิธีการทดสอบทางชีวเคมี 7

2.2 แบคทีเรีย 8

2.2.1 โครงสร้างของแบคทีเรีย 8

2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 11

2.3.1 ปฏิกิริยาการติดสีแกรม 11

2.3.2 รูปร่าง 11

2.3.3 ขนาด 11

2.3.4 การจัดเรียงตัวของเซลล์ 11

2.3.5 โครงสร้างอื่นๆ 11

2.4 ลักษณะของโคโลนี 11

2.5 การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี 12

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5.1 การทดสอบการเคลื่อนที่	12
2.5.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส	12
2.5.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างอินโดล	12
2.5.4 การทดสอบเมทิลเรด-เมทิลคาร์บินอล	12
2.5.5 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส	13
2.5.6 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท	13
2.5.7 การทดสอบความสามารถในการย่อยอาร์จินิน	13
2.5.8 การทดสอบดีอะมิเนส	13
2.5.9 การทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน	14
2.5.10 การทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรท	14
2.5.11 การทดสอบความสามารถในการใช้ดี-กลูโคส	14
2.6 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	14
2.6.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งตามส่วนผสมหรือองค์ประกอบของอาหาร	14
2.6.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งตามประโยชน์ที่ใช้	15
2.7 คุณสมบัติของแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ในการทดลอง	16
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	22
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	22
3.2 สารเคมี	22
3.3 อุปกรณ์	23
3.4 วิธีการทดลอง	24
3.4.1 เก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์	24
3.4.2 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย	25
3.4.3 การตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ขั้นพื้นฐาน	25
3.4.3.1 การศึกษารูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย	25
3.4.3.2 การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility Test)	25
3.4.4 การทดสอบทางชีวเคมี	26
3.4.4.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส (Catalase Test)	26

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.4.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างอินโดล (Indole Test) 27

3.4.4.3 การทดสอบเมทิลเรด (Methyl Red Test) 27

3.4.4.4 การทดสอบเมทิลคาร์บินอล (Voges Proskauer Test) 27

3.4.4.5 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (Urease Test) 28

3.4.4.6 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท (Nitrate Reduction Test) 28

3.4.4.7 การทดสอบความสามารถในการย่อยอาร์จินิน (Arginine Dihydrolase Test) 28

3.4.4.8 การทดสอบดีอะมิเนส (Deaminase Test) 28

3.4.4.9 การทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน (Gelatin Hydrolysis Test) 29

3.4.4.10 การทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรท (Citrate Utilization Test) 29

3.4.4.11 การทดสอบความสามารถในการใช้ดี-กลูโคส (Utilization of Glucose) 29

บทที่ 4 ผลการทดลอง 31

4.1 ผลการทดลอง 31

4.1.1 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรม 31

4.1.2 ลักษณะโคโลนี 35

4.1.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี 40

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 51

5.1 สรุปผลการทดลอง 51

5.2 ข้อเสนอแนะ 52

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก ก	55
ภาคผนวก ข	60
ภาคผนวก ค	63

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

4.1 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรม 31
4.2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย 35
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Aeromonas caviae* 40
4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Edwardsiella tarda* 41
4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Enterobacter intermedius* 42
4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Escherichia coli* 43
4.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Hafnia alvei* 43
4.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Klebsiella pneumoniae* 44
4.9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Morganella morganii* 45
4.10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Providencia rettgeri* 45
4.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Pseudomonas aeruginosa* 46
4.12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Salmonella anotum* 47
4.13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Salmonella enteritidis* 48
4.14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Salmonella lexington* 48
4.15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Serratia* sp. 49
4.16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Shigella sonnei* 50

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่

2.1 แสดงการพิมพ์ค้นหา *Salmonella bongori* 5

2.2 แสดงวิธีการตรวจสอบกรณีทราบว่าเป็น *Pseudomonas aeruginosa* 6

2.3 แสดงการตรวจสอบรูปร่างและการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย 7

2.4 วิธีการใช้งานส่วนการทดสอบทางชีวเคมี 7

2.5 แสดงโครงสร้างของแบคทีเรีย 9

2.6 แสดงพันธะเพปไทด์ของเพปติโดไกลแคน 9

2.7 แสดงองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย 10

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

งานวิจัยทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ อาหาร การแพทย์ สิ่งแวดล้อม ฯลฯ มากมายทั่วโลก เกี่ยวข้องกับเชื้อแบคทีเรีย ทั้งการนำมาใช้ประโยชน์ และในการศึกษาความเป็นโทษ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจสอบชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ถือเป็นจุดสำคัญที่จะนำไปสู่งานวิจัยในระดับสูงต่อไป (Buyer, 2002) ในประเทศไทยก็มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติ และตรวจสอบชนิดของแบคทีเรีย ยิ่งในปัจจุบันรัฐบาลมีนโยบายในการส่งเสริมโครงการอาหารปลอดภัยในประเทศและคาดหวังให้ประเทศไทยเป็นแหล่งอาหารของโลก ดังนั้นงานทางด้านการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมอาหาร จึงมีโอกาสที่จะพัฒนาต่อไปได้อีก

แม้ว่าการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ในปัจจุบัน จะมีวิทยาการก้าวหน้าไปมาก จากเดิมที่ใช้การตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเป็นหลัก ต่อมามีการตรวจสอบหาแอนติบอดี้ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อบางกลุ่ม จนปัจจุบันเป็นการตรวจสอบพันธุกรรม แต่ชุดการตรวจสอบที่มีจำหน่ายและให้ประสิทธิภาพเป็นที่ยอมรับในทางสากล มักต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาแพง การใช้ชุดทดสอบเหล่านี้จึงคุ้มค่าสำหรับห้องปฏิบัติการที่รับตรวจสอบแบคทีเรียในอาหารเป็นประจำ ในกรณีห้องปฏิบัติการขนาดกลางและขนาดเล็ก หรือนักวิจัยทั่วไปที่มิได้ตรวจเชื้อเป็นงานประจำรวมทั้งการเรียนการสอนสำหรับนักศึกษาในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ซึ่งยังคงใช้วิธีดั้งเดิมในการทดสอบ คือการทดสอบสีแกรม และคุณสมบัติทางชีวเคมีขั้นต้น แล้วนำไปเทียบกับเอกสารอ้างอิง (Krieg และ Holt, 1984) เพื่อตรวจหาชนิดของเชื้อต่อไป วิธีการเหล่านี้ค่อนข้างใช้เวลา และมีขั้นตอนการเตรียมอาหารมากมาย

คอมพิวเตอร์ได้นำมาประยุกต์ใช้ในงานหลากหลายเพื่อลดขั้นตอนในการจัดเก็บข้อมูลและการค้นหาข้อมูลทางเอกสาร คมรัชกร ราชสมบัติ (2548) ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์มาตรฐาน ได้แก่ Microsoft Access XP มาใช้ในการรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับรูปร่าง การติดสีแกรม และคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่มีความสำคัญด้านอาหารจำนวน 31 จีนัส ได้แก่ *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Listeria*,

Brochothrix และ *Lactobacillus* อย่างน้อย 339 สปีชีส์ และใช้ Visual Basic 6.0 พัฒนาซอฟแวร์เพื่อช่วยในการตรวจสอบชนิดของเชื้อแบคทีเรียเหล่านั้น และใช้ชื่อว่า "โปรแกรม FBIdent เวอร์ชั่น 1.0" จึงเป็นโปรแกรมที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้เป็นโปรแกรมจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมอาหาร ทั้งในด้านที่เป็นประโยชน์และโทษโดยเน้นไปที่คุณสมบัติทางชีวเคมีที่สามารถปฏิบัติการและดูผลการทดสอบได้ง่าย สามารถจำแนกเชื้อได้ถึงระดับสปีชีส์ เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ในระดับเล็กจนถึงระดับกลาง แต่เนื่องจากโปรแกรมนี้ยังไม่ได้ทดสอบการนำไปใช้งานในห้องปฏิบัติการจริง จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น โครงงานนี้ได้ทำการประเมินผลการใช้โปรแกรมนี้ โดยนำเชื้อแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดที่มีอยู่ในโปรแกรมมาศึกษารูปร่าง การติดสีแกรม ลักษณะการเจริญและการทดสอบทางชีวเคมีบางประการ เพื่อดูว่าโปรแกรมที่พัฒนาขึ้นมานี้มีความถูกต้องน่าเชื่อถือมากน้อยเพียงใด

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อพัฒนาโปรแกรม FBIdent เวอร์ชั่น 1.0 ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากขึ้น เหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาได้

1.2.2 เพื่อดูว่าโปรแกรม FBIdent เวอร์ชั่น 1.0 ที่ช่วยในการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร (กรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรีย) มีความถูกต้องมากน้อยเพียงใด

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

นำเชื้อแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดที่มีอยู่ในโปรแกรม (กรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรีย) มาทดสอบทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี พร้อมทั้งบันทึกภาพเพื่อนำภาพที่ได้ไปลงในโปรแกรมเพื่อให้โปรแกรมมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และประเมินผลตามการทดสอบทางชีวเคมีที่จัดทำไว้ในโปรแกรมที่ช่วยในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ว่ามีความถูกต้องน่าเชื่อถือมากน้อยเพียงใด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เป็นแนวทางให้เกิดการวิจัยแบบบูรณาการโดยประยุกต์ใช้คอมพิวเตอร์เพิ่มประสิทธิภาพให้กับงานทางจุลชีววิทยา

1.4.2 เป็นแนวทางในการพัฒนาฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆต่อไปในอนาคต

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1.5.1 รวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์แกรมลบที่มีในโปรแกรม FBIdent เวอร์ชั่น 1.0 จากแหล่งเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ ซึ่งมีจุลินทรีย์ดังนี้

1. *Aeromonas caviae*
2. *Edwardsiella tarda.*
3. *Enterobacter intermedius*
4. *Escherichia coli*
5. *Hafnia alvei*
6. *Klebsiella pneumoniae* DMST 8216
7. *Morganella morganii*
8. *Providencia rettgeri*
9. *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781
10. *Salmonella anotum*
11. *Salmonella enteritidis* DMST 10633
12. *Salmonella lexington* DMST 4412
13. *Serratia* sp.
14. *Shigella sonnei*

1.5.2 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย

1.5.3 นำเชื้อจุลินทรีย์มาตรวจสอบขั้นพื้นฐาน

1. การศึกษารูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย
2. การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility Test)

1.5.4 นำเชื้อจุลินทรีย์มาทดสอบทางชีวเคมีตามโปรมแกรมที่สร้างขึ้น ซึ่งมีการทดสอบดังนี้

1. การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส (Catalase Test)
2. การทดสอบความสามารถในการสร้างอินโดล (Indole Test)
3. การทดสอบเมทิลเรด (Methyl Red Test)
4. การทดสอบเมทิลคาร์บินอล (Voges Proskauer Test)
5. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (Urease Test)
6. การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท (Nitrate Reduction Test)
7. การทดสอบความสามารถในการย่อยอาร์จินิน (Arginine Dihydrolase Test)

8. การทดสอบดีอะมิเนส (Deaminase Test)

9. การทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน (Gelatin Hydrolysis Test)

10. การทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรท (Citrate Utilization Test)

11. การทดสอบความสามารถในการใช้ดี-กลูโคส (Utilization of Glucose)

1.5.5 บันทึกภาพถ่ายของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์ และผลการทดสอบทางชีวเคมีต่างๆ จากนั้นนำภาพถ่ายและผลการทดสอบไปบันทึกลงในโปรแกรม FBIdent เวอร์ชั่น 1.0 เพื่อให้โปรแกรมที่สร้างขึ้นมีความสมบรูณ์มากขึ้น

1.5.6 ประเมินผลการทดสอบต่างๆ ของโปรแกรมที่ช่วยในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อดูว่าโปรแกรมที่สร้างขึ้นมามีความถูกต้อง น่าเชื่อถือมากน้อยเพียงใด

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

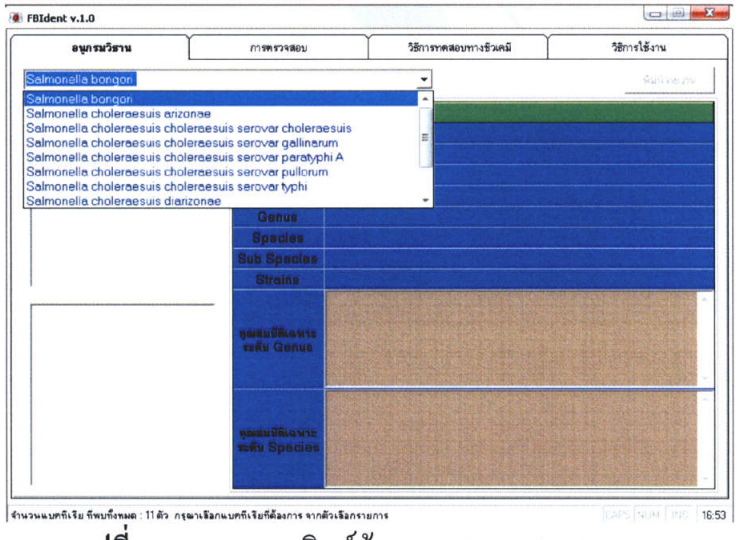
2.1 โปรแกรม FBIdent เวอร์ชั่น 1.0 (คมรัชกร, 2548)

โปรแกรม FBIdent เวอร์ชั่น 1.0 เป็นโปรแกรมจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมอาหาร โดยเน้นไปที่คุณสมบัติทางชีวเคมีที่สามารถปฏิบัติการและดูผลการทดสอบได้ง่าย ซึ่งเหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ในระดับเล็กจนถึงระดับกลาง โดยใช้หลักการเขียนโปรแกรมด้วย Visual Basic 6.0 และให้สามารถทำงานได้ในระบบปฏิบัติการของ Microsoft Windows XP โดยมีส่วนต่างๆและวิธีการใช้งานดังนี้

2.1.1 อนุกรมวิธาน

ส่วนนี้จะเป็นข้อมูลของแบคทีเรีย โดยจะแสดงชื่อไฟลัม (Phylum) คลาส (Class) ออเดอร์ (Order) แฟมิลี่ (Family) จีนัส (Genus) และสปีชีส์ (Species) ของแบคทีเรียแต่ละชนิด รวมไปถึงรายละเอียดคุณสมบัติเฉพาะในระดับจีนัสและสปีชีส์ โดยจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ฉบับปรับปรุงครั้งที่ 9 ปีพุทธศักราช 2537

โดยพิมพ์ชื่อจีนัสหรือสปีชีส์ของแบคทีเรียที่ต้องการทราบข้อมูล โดยอาจพิมพ์ทั้งหมดหรือบางส่วนของคำก็ได้ เช่น หากต้องการดูข้อมูลของ *Salmonella* sp. อาจเลือกพิมพ์เฉพาะคำว่า Salmonella แล้วกดเอ็นเทอร์ (Enter) ที่คีย์บอร์ด (Keybord) โปรแกรมจะแสดงรายชื่อแบคทีเรียที่มีส่วนตรงกับคำที่พิมพ์ออกมา (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 แสดงการพิมพ์ค้นหา *Salmonella bongori*

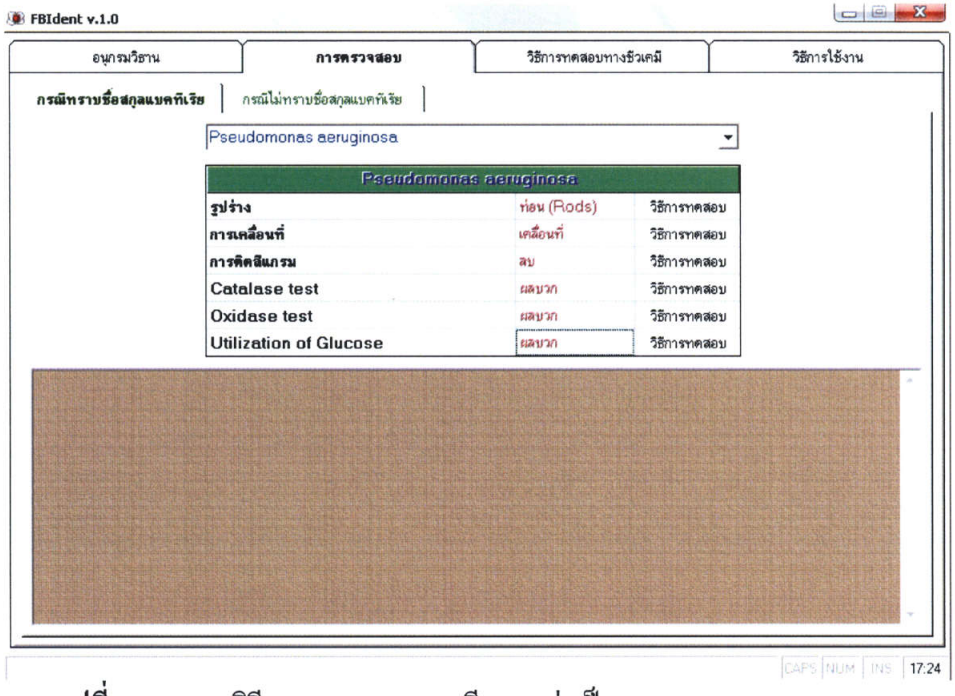
ที่มา : คมรัชกร (2548)

2.1.2 การตรวจสอบ

ส่วนนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนย่อยคือ กรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรีย และกรณีที่ไม่ทราบชื่อสกุลแบคทีเรีย

วิธีการใช้งานกรณีทราบชื่อสกุลแบคทีเรีย

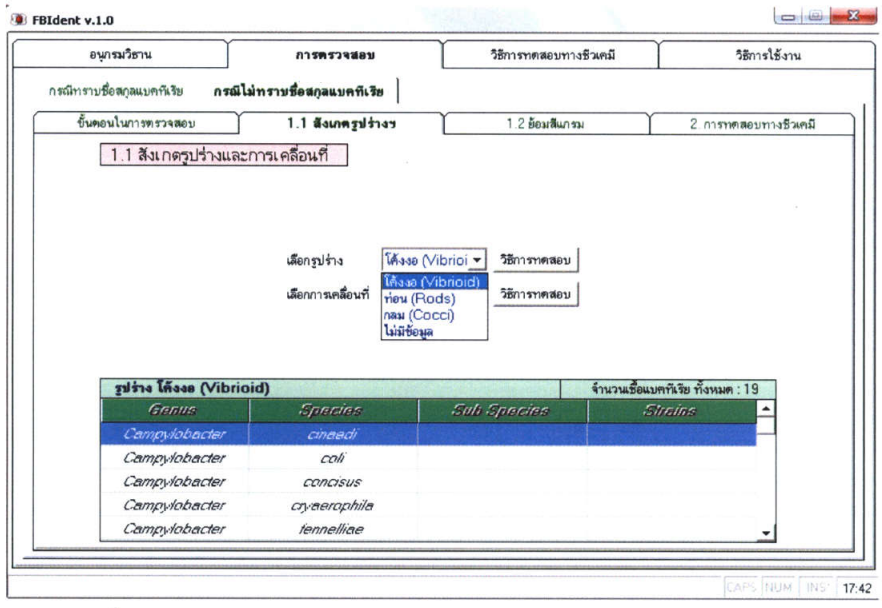
โดยทำการพิมพ์ชื่อสกุลของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ ลงในช่องสำหรับกรอกข้อมูลแล้วกดเอ็นเทอร์ที่คีย์บอร์ด โปรแกรมจะแสดงวิธีการตรวจสอบแบคทีเรียออกมา 6 วิธี ตัวอย่างเช่น ต้องการตรวจสอบ *Pseudomonas aeruginosa* ให้พิมพ์คำว่า Pseudomonas aeruginosa แล้วกดเอ็นเทอร์ที่คีย์บอร์ด ดังตัวอย่างในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงวิธีการตรวจสอบกรณีทราบว่าเป็น *Pseudomonas aeruginosa*
ที่มา : คมรัชกร (2548)

วิธีการใช้งานกรณีไม่ทราบชื่อสกุลแบคทีเรีย

ให้กดปุ่มตรงคำว่า กรณีไม่ทราบชื่อสกุลแบคทีเรีย ก็จะมีวิธีการทดสอบแสดงดังรูปที่ 2.3 จากนั้นก็เลือกผลการทดสอบว่าเป็นแบบใด จากนั้นจะมีชื่อแบคทีเรียที่มีลักษณะดังกล่าวแสดงออกมา

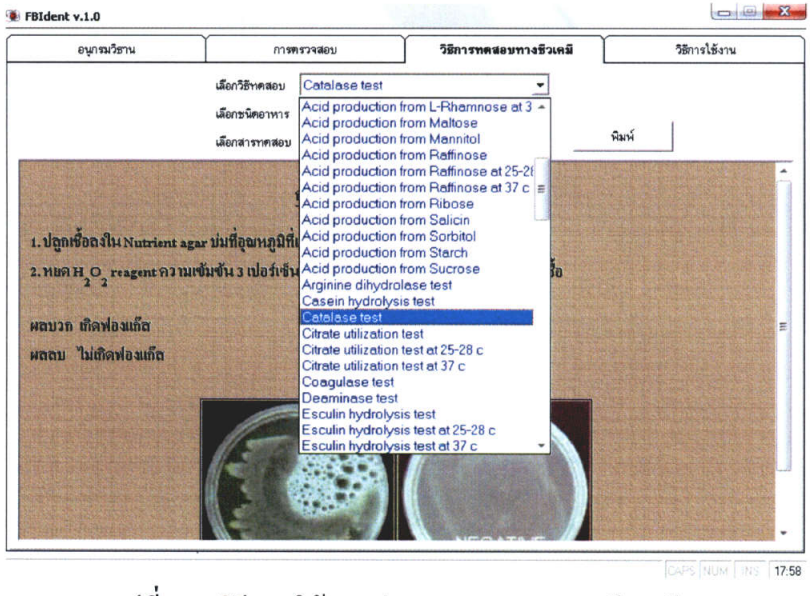


รูปที่ 2.3 แสดงการตรวจสอบรูปร่างและการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย

ที่มา : คมรัชกร (2548)

2.1.3 วิธีการทดสอบทางชีวเคมี

ในส่วนนี้มี 3 ช่องให้เลือก ได้แก่ช่องเลือกวิธีทดสอบ ช่องเลือกชนิดอาหาร และช่องเลือกสารทดสอบ เมื่อเลือกรายการที่ต้องการทดสอบแล้วโปรแกรมจะแสดงรายละเอียดของรายการที่เลือกออกมา (รูปที่ 2.4)



รูปที่ 2.4 วิธีการใช้งานส่วนการทดสอบทางชีวเคมี

ที่มา : คมรัชกร (2548)

2.2 แบคทีเรีย (Bacteria)

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ต้องอาศัยกล้องจุลทรรศน์จึงจะมองเห็น จัดอยู่ในกลุ่มโปรคารีโอต (procaryote) กล่าวคือ เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่มีโครงสร้างภายในเซลล์แบบง่ายๆ (รูปที่ 2.5) คือ มีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตและกรดอะมิโน โดยจะมีลักษณะเหมือนร่างแหห่อหุ้มของเหลว (protoplasm) อยู่ภายในนิวเคลียส (nucleus) ของแบคทีเรียจะเป็นลักษณะของสายดีเอ็นเอ (DNA) คู่ ขดเป็นวงกลมลอยอยู่ โดยไม่มีผนังห่อหุ้มดีเอ็นเอไว้ การสืบพันธุ์จะเป็นแบบไม่อาศัยเพศ กล่าวคือ เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเต็มที่แล้วก็จะแบ่งออกเป็น 2 เซลล์เท่ากัน (binary fission) และทั้งสองเซลล์นี้ก็จะแบ่งเซลล์ต่อไปเมื่อเจริญเต็มที่แล้ว (สันทัด, 2544)

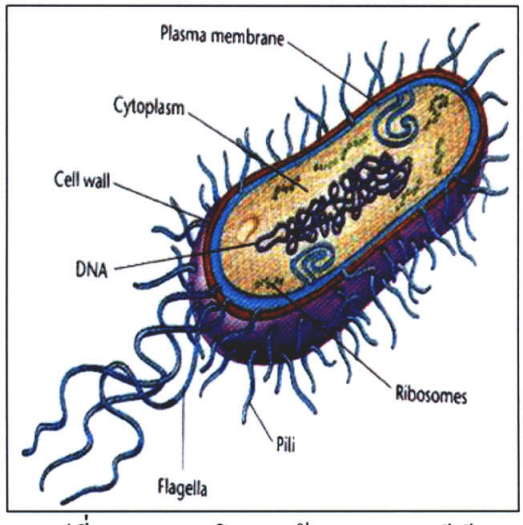
2.2.1 โครงสร้างของแบคทีเรีย (นงลักษณ์และปรีชา, 2547)

2.2.1.1 แบคทีเรียมีไรโบโซม ชนิด 70s และสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอ

2.2.1.2 ผนังเซลล์ (cell wall) ผนังเซลล์มีความหนา 10-15 นาโนเมตร เป็นโครงสร้างที่ทำให้เซลล์แบคทีเรียคงรูปร่างอยู่ได้ ผนังเซลล์ประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิด คือเอ็น-อะซีทิล-กลูโคซามีน (N-acetylglucosamine, NAG) และกรดเอ็น-อะซีทิลมิวรามิก (N-acetyl muramic acid, NAM) เอ็น- อะซีทิลกลูโคซามีนและกรดเอ็น- อะซีทิลมิวรามิก มีการเชื่อมต่อกันเพื่อเป็นชั้นเพปทิโด-ไกลแคน (peptidoglycan) (รูปที่ 2.6)

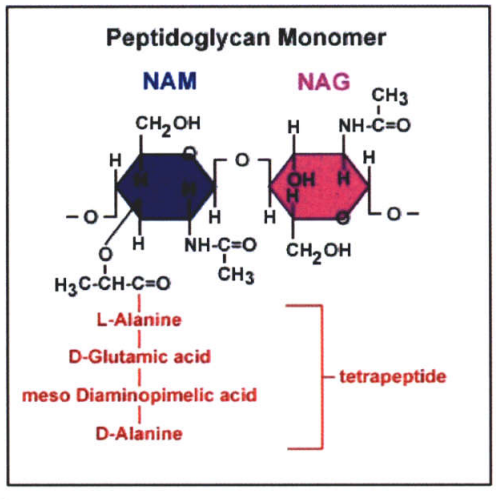
องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (รูปที่ 2.7) มีความซับซ้อนมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก กล่าวคือ เซลล์ของแกรมลบประกอบด้วยเพปทิโดไกลแคนเพียงประมาณร้อยละ 5-20 เท่านั้น อีกทั้งยังประกอบด้วยลิโพโปรตีน ลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ (LPS) และยังมีกรดไดอะมิโนพิมิลิกแทนที่กรดอะมิโนไลซีน แต่มีจำนวนเพปไทด์บริดจ์น้อยกว่าของแบคทีเรียแกรมบวก

ในแบคทีเรียแกรมบวก (รูปที่ 2.7) ผนังเซลล์มีองค์ประกอบเป็นเพปทิโดไกลแคนถึงร้อยละ 90 และยังพบกรดไทโคอิคด้วย อีกทั้งมีกรดอะมิโนน้อยชนิดกว่าแกรมลบ ในด้านความหนาของผนังเซลล์ แบคทีเรียแกรมบวกหนากว่า คือหนาประมาณ 25-30 มิลลิไมโครเมตร แต่ของแกรมลบหนาประมาณ 15-20 มิลลิไมโครเมตร นอกจากนี้ปริมาณไขมันที่พบมากกว่าในแบคทีเรียแกรมลบยังมีสมบัติเป็นโอแอนติเจน (O-antigen) และเอนโดทอกซิน (endotoxin) และยังเป็นเครื่องกั้นไม่ให้ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์บางชนิด ความแตกต่างที่สำคัญของแบคทีเรียแกรมลบ คือ มีเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) ล้อมรอบเพปทิโดไกลแคนไว้ เมมเบรนนี้มีไขมันมากถึงร้อยละ 11-22 ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบยึดกับเพปทิโดไกลแคนที่อยู่ข้างใต้ด้วยลิโพโปรตีน (Braun's lipoprotein)



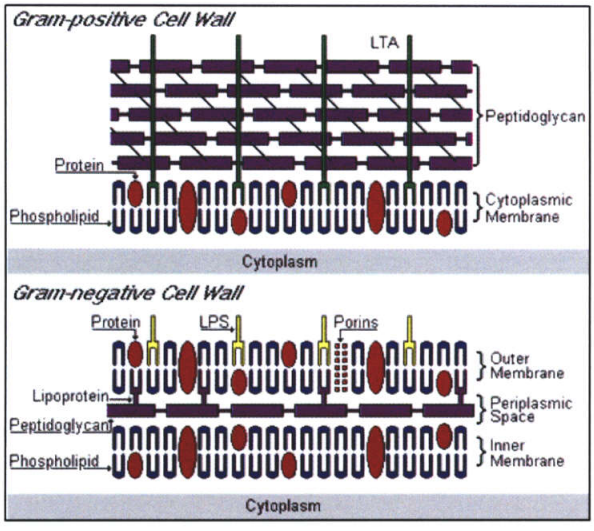
รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของแบคทีเรีย

ที่มา : Anonymous A (2007)



รูปที่ 2.6 แสดงพันธะเพปไทด์ของเพปติโดไกลแคน

ที่มา : Anonymous (2001)



รูปที่ 2.7 แสดงองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

ที่มา : Anonymous B (2007)

2.2.1.3 แคปซูล (Capsule) เป็นส่วนที่อยู่นอกผนังเซลล์ สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และทนต่อการทำลายของเม็ดเลือดขาว พบแคปซูลในแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น แบคทีเรียที่มีแคปซูลมักก่อโรครุนแรง

2.2.1.4 พิไล (Pilli) มีลักษณะเป็นขนคล้ายแฟลกเจลลา แต่มีขนาดเล็ก มีลักษณะเป็นท่อกลวง ไม่มีหน้าที่ในการเคลื่อนที่แต่ช่วยให้เกาะยึดติดกับผิววัสดุ และเซ็กซ์พิไล (Sex pilli) ช่วยในการถ่ายทอดสารพันธุกรรม (DNA) ในการคอนจูเกชัน (Conjugation)

2.2.1.5 มีโซโซม (Mesosome) เป็นส่วนที่เยื่อหุ้มเซลล์บางส่วนยื่นเว้าเข้าไปในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) จะพบบริเวณที่จะมีการแบ่งเซลล์

2.2.1.6 แฟลกเจลลา (Flagella) เป็นโครงสร้างที่ใช้ในการเคลื่อนที่ พบมากในแบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้เป็นส่วนใหญ่ แฟลกเจลลาประกอบด้วยเส้นใยเส้นเดี่ยวๆ ซึ่งต่างจากแฟลกเจลลาของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ แบคทีเรียอาจมีแฟลกเจลลา 1 เส้นจนถึงหลายร้อยเส้น และอยู่ได้หลายตำแหน่ง ส่วนของแฟลกเจลลา ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ เบซัลบอดี (basal body) ส่วนที่เป็นตะขอ (hook) และ และส่วนที่เป็นเส้นยาวออกจากผนังเซลล์ (filament)

2.2.1.7 พลาสมิด (Plasmid) เป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซมของแบคทีเรีย โครงสร้างของพลาสมิดเป็นดีเอ็นเอวงแหวน และมีลักษณะเป็นเกลียวคู่ มีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ขนาดเล็กมีเพียง 2-3 ยีนจนถึงขนาดใหญ่ที่ประกอบด้วยหลายร้อยยีน ซึ่งพลาสมิดสามารถจำลองตัวเอง

ได้และสามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียอื่นๆ ได้ พลาสมิดมีหลายชนิด บางชนิดควบคุมการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ของเซลล์ บางชนิดควบคุมการดื้อต่อยาปฏิชีวนะต่างๆ

2.2.1.8 เอนโดสปอร์ (endospore) เป็นโครงสร้างที่พบในแบคทีเรียบางชนิด เป็นโครงสร้างที่ทำให้แบคทีเรียมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เอนโดสปอร์เกิดขึ้นภายในเซลล์และสร้างได้ 1 สปอร์ต่อ 1 เซลล์จะไม่ถือว่าเป็นการสืบพันธุ์ แต่ถือว่าเป็นการดำรงชีพ

2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) (ศุภยางค์, 2547)

2.3.1 ปฏิกิริยาการติดสีแกรม (Gram's reaction) สามารถแบ่งแบคทีเรียตามลักษณะของการติดสีออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ พวกที่ติดสีม่วงของ crystal violet เรียกว่า 'Gram-positive bacteria' และพวกที่ติดสีแดงของ safranin ที่เรียกว่า 'Gram-negative bacteria' เมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้น Gram-positive bacteria บางชนิดมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของการติดสี Gram-stain เป็นการติดสีของ 'Gram-variable'

2.3.2 รูปร่าง (shape) แบคทีเรียมีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปกลม (coccus/cocci) รูปแท่ง (bacillus/bacilli) อาจจะมีลักษณะเป็นแท่งตรง (regular rod) อาจมีปลายมน (rounded ends) บางชนิดเป็นรูปแท่งกลมสั้นคล้ายรูปไข่ (coccoid) แท่งที่ไม่ตรง (irregular rod) คือมีขนาดความกว้างของเซลล์ที่ไม่สม่ำเสมอทั้งแท่ง

2.3.3 ขนาด (size) แบคทีเรียมีขนาดประมาณ 0.2 ถึง 2 μm พวก coccus ใช้วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (diameter) ส่วน bacillus หรือ spiral ใช้วัดขนาดที่ความกว้าง(width) ของเซลล์ bacillus บางชนิดมีขนาดและรูปร่างของเซลล์แตกต่างกันภายใต้สภาวะแวดล้อมเดียวกัน เรียกว่า 'pleomorphism'

2.3.4 การจัดเรียงตัวของเซลล์ (cell arrangement) โดยเฉพาะ cocci ซึ่งอยู่กันเป็นกลุ่มที่มีลักษณะเฉพาะจะช่วยชี้เอกลักษณ์(identify) เช่น อยู่เป็นคู่ เซลล์อยู่ต่อกันเป็นสายยาว เซลล์อยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น

2.3.5 โครงสร้างอื่นๆ เช่น แคปซูล เอนโดสปอร์ แฟลกเจลลา

2.4 ลักษณะของโคโลนี (Colony characteristics) (ศุภยางค์, 2547)

ศึกษาดูลักษณะของกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า 'colony' บนวุ้นเลี้ยงเชื้อ (agar) แบคทีเรียที่เจริญรวมเป็นกลุ่มจะมีลักษณะแตกต่างกันตามชนิด ตั้งแต่ขนาดของ diameter รูปแบบ (form) ส่วนเว้าส่วนโค้งของผิวหน้า (elevation) ขอบ (margin) ตลอดจนรงควัตถุ (pigment) ที่ผลิต ซึ่งทำให้ colony ของแบคทีเรียหลายชนิดมีสีแตกต่างกันตามธรรมชาติ

2.5 การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (นันทนา, 2537)

2.5.1 การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility Test)

การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ เนื่องจากเชื้อมีแฟลกเจลลา ซึ่งทำให้เชื้อที่สามารถเคลื่อนที่ได้เคลื่อนที่จากบริเวณเดิมไปยังบริเวณใหม่ซึ่งจะเกิดการเจริญและแบ่งตัวยังบริเวณนั้นต่อไป ถ้าต้องการทดสอบเพื่อให้เห็นลักษณะการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างชัดเจน จะต้องเติม 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อแบคทีเรียเจริญทวีจำนวน จะนำ TTC ซึ่งไม่มีสีเข้าสู่เซลล์ แล้วรีดิวส์ TTC เป็นตะกอนของเม็ดสีแดง (Formazan pigment) ให้เห็นตรงบริเวณที่มีการเจริญทวีจำนวนของแบคทีเรีย

2.5.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส (Catalase Test)

การทดสอบเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส โดยปกติในขบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน อะตอมของไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจน ทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลสเพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ให้ก๊าซออกซิเจน และน้ำ

2.5.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างอินโดล (Indole Test)

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย ในการผลิตอินโดลจากทริปโตเฟน (Trytophan) โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อ Indole broth ประกอบด้วย trytophan rich peptone และโซเดียมคลอไรด์ เมื่อทริปโตเฟนในเปปโตนถูกออกซิไดซ์โดยแบคทีเรียให้ indole, skatole และ indoleacetic acid (โดยเอนไซม์ trytophanase) ซึ่งสามารถตรวจผลที่ได้จากการตรวจสอบ indole โดยใช้ alcoholic *p*-dimethylaminobenzaldehyde โดยอินโดลจะทำปฏิกิริยากับอัลดีไฮด์ให้ผลผลิตเป็นสีแดงในส่วนที่เป็นแอลกอฮอล์

รีเอเจนต์ที่ใช้ในการตรวจสอบอินโดลคือ Kovac's reagent และ Ehrlich's reagent แต่ Ehrlich's reagent มีความไวมากกว่า Kovac's reagent และใช้ในการตรวจสอบอินโดลที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกลุ่มแอนแอโรปส์ และกลุ่มที่เป็น Nonfermentative gram negative bacteria สำหรับ Kovac's reagent ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae

2.5.4 การทดสอบเมทิลเรด-เมทิลคาร์บินอล (Methyl Red-Voges Proskauer Test)

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตกรดปริมาณมากๆ จากน้ำตาลกลูโคส และให้ผลผลิตที่เรียกว่า อะซิโตอิน(acetoin) หลักการทดสอบนี้ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae

แบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกจะสามารถผลิตกรดอินทรีย์มากมายหลายชนิด เช่น *Escherichia coli* จะผลิตกรดแลคติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก

เป็นต้น ส่วนกลุ่มที่สองจะให้ butylenes glycol เช่น *Klebsiella* sp. และ *Enterobacter* sp. ผลิตกรดอินทรีย์บ้าง และผลิตให้ 2, 3 -butanediol เป็นผลผลิตหลัก

MR Test ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียกลุ่มที่ให้กรด เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อที่จะผลิตและรักษาความเป็นกรดของอาหารเลี้ยงเชื้อจากการใช้กลูโคสไว้ให้มีค่าพีเอชต่ำกว่า 4.4 ซึ่งปริมาณกรดที่แบคทีเรียผลิตมากๆ นี้สามารถเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีแดง

VP Test เป็นการตรวจสอบการมีอยู่ของสารอะซิโตอิน (acetylmethyl carbinol หรือ acetoin) ซึ่งเป็นผลผลิตที่มีพีเอชเป็นกลาง และเป็นสารตัวกลางในการผลิต butylenes glycol

2.5.5 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (Urease Test)

การทดสอบหาเอนไซม์ยูรีเอส โดยดูผลจากการย่อยยูเรียให้ได้แอมโมเนีย ซึ่งทำให้พีเอชเพิ่มขึ้น และเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ของฟีนอลเรดจากสีเหลืองเป็นสีแดง อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ คือ Urea agar ซึ่งไม่มีส่วนประกอบที่เป็นโปรตีน หรือมีโปรตีนน้อย ป้องกันการที่ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจากการดึงหมู่อะมิโนออกของโปรตีน แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส เช่น *Proteus* sp.

2.5.6 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท (Nitrate Reduction Test)

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการรีดิวส์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ หรือ ก๊าซไนโตรเจน แบคทีเรียที่สามารถหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน และใช้สารอนินทรีย์ เช่น ไนเตรต เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน แบคทีเรียบางชนิดสามารถรีดิวส์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ และสามารถรีดิวส์จากไนไตรต์ให้เป็นแอมโมเนีย เช่น *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นแอโรปส์ที่สามารถหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนได้

2.5.7 การทดสอบความสามารถในการย่อยอาร์จินิน (Arginine Dihydrolase Test)

แบคทีเรียหลายชนิดสามารถใช้เอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสเปลี่ยนกรดอะมิโนชนิดต่างๆ เช่น อาร์จินิน ให้ได้เอไมน์ หรือ ไดเอไมน์ และคาร์บอนไดออกไซด์ได้ เมื่อกรดอะมิโนถูกนำเข้าสู่เซลล์ และถูกนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน อาจถูกดึงคาร์บอนไดออกไซด์โดยขบวนการที่เรียกว่า Decarboxylation เป็นการทำให้โมเลกุลของกรดอะมิโนเล็กลง เกิดเอมีน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้พีเอชมีค่าสูงเป็นด่างมากขึ้น

2.5.8 การทดสอบดีอะมิเนส (Deaminase Test)

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย ในการดึงหมู่อะมิโนออกจากฟีนิลอะลานิน ซึ่งเป็นประโยชน์ในการจำแนก *Proteus* sp., *Morganella* sp. และ *Providencia* sp. ออกจาก Enterobacteriaceae แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ฟีนิลอะลานินดีอะมิเนส สามารถเกิดกระบวนการดึงหมู่อะมิโนออกจากฟีนิลอะลานิน และให้ keto acid, phenylpyruvic acid เป็นผลผลิตข้างเคียง

และ α- keto acid ทำปฏิกิริยากับเฟอร์ริค คลอไรด์ (Ferric chloride) ซึ่งเป็นรีเอเจนต์ที่ใช้ทดสอบให้สารประกอบที่มีสีเขียวเกิดขึ้น

2.5.9 การทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน (Gelatin Hydrolysis Test)

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เจลาติเนส หรือ คอลลาจิเนสในการย่อยสลายเจลาติน ซึ่งเป็นโปรตีนที่ได้จากคอลลาเจนทำให้เจลาตินเสียลักษณะของการเป็นเจลและเป็นของเหลวที่อุณหภูมิต่ำ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ เช่น Starch gelatin agar และ Nutrient gelatin medium

2.5.10 การทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรท (Citrate Utilization Test)

การจำแนกแบคทีเรียแกรมลบโดยอาศัยความสามารถในการใช้ซิเตรต เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยแบคทีเรียที่สามารถใช้ซิเตรตได้ จะผลิตเอนไซม์ Citriase ย่อยซิเตรตให้ผลผลิตเป็นออกซาโลอะซิเตต (Oxaloacetate) และอะซิเตต (Acetate) และยังมีเอนไซม์อีกชนิดคือ Oxaloacetate decarboxylase ซึ่งสามารถย่อยอะซิเตตเป็นไพรูเวต (Pyruvate) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดการรวมตัวกับโซเดียม และน้ำ ได้เป็นโซเดียมคาร์บอเนตและสารที่มีฤทธิ์เป็นด่าง ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชสูงขึ้น และเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์บรอมไธมอลบลูในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Citrate Agar, Simmons จากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

2.5.11 การทดสอบความสามารถในการใช้ดี-กลูโคส (Utilization of Glucose)

การทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้หรือไม่ และผลิตกรดอย่างเดียวหรือผลิตกรดและแก๊สหลังกระบวนการหมัก อาหารที่ใช้ทดสอบจะผสมน้ำตาลที่ต้องการทดสอบ เช่น กลูโคส ซูโครส รวมทั้งใส่หลอดดักแก๊ส (Durham tube) เพื่อเก็บแก๊สที่แบคทีเรียสร้างและเติมอินดิเคเตอร์เพื่อบอกสภาวะความเป็นกรดด่าง (ศุภยางค์, 2547)

2.6 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (นงลักษณ์และปรีชา, 2547)

อาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ

2.6.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งตามส่วนผสมหรือองค์ประกอบของอาหาร

2.6.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ทราบส่วนประกอบทางเคมีที่แน่นอน (Artificial media หรือ Non- synthetic media)

อาหารเลี้ยงเชื้อนี้ประกอบด้วยเนื้อเยื่อพืชหรือสัตว์ ซึ่งมีสารอินทรีย์อยู่มากมาย เช่น ประกอบด้วย เพปโทน (Peptone) สารสกัดจากเนื้อ (Meat extract) สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) เป็นต้น ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ที่ใช้กันมากในห้องปฏิบัติการคือ อาหารเหลวเอ็นบี (NB) อาหารแข็งเอ็นเอ (NA) ซึ่งใช้เลี้ยงแบคทีเรีย

2.6.1.2 อาหารสังเคราะห์ (Synthetic media หรือ Chemical defined media)

อาหารสังเคราะห์เป็นอาหารที่ทราบองค์ประกอบทางเคมีอย่างแน่นอน เช่น อาหารเลี้ยง Lactobacilli มีหลายสิบชนิด

2.6.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งตามประโยชน์ที่ใช้

2.6.2.1 เอ็นริชมีเดีย (Enriched media)

เป็นอาหารที่ใช้เฉพาะกับแบคทีเรียบางชนิดที่เลี้ยงยาก เพราะเลี้ยงในอาหารธรรมดาได้ยาก หรือไม่เจริญในอาหารธรรมดาเลย อาหารชนิดนี้ต้องเติมสารบางอย่าง เช่น เลือด ซีรัม หรือสารที่สกัดจากเนื้อเยื่อหรือสัตว์ เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียลงในอาหารเอ็นบีหรือเอ็นเอหรือ อาหารชนิด เตตราโอเนตมีเดีย (Tetrathionate media) จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของ *Salmonella thyphosa* แต่ยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli*

2.6.2.2 อาหารคัดเลือก (Selective media)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกจุลินทรีย์ที่ต้องการออกจากจุลินทรีย์อื่นที่ปะปนอยู่ โดยการเติมสารเคมีบางอย่างเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ โดยไม่มีผลต่อจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่ง เช่น การเติมสีคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก โดยไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ

2.6.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่บอกความแตกต่าง (Differential media)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกชนิดของแบคทีเรีย ที่เจริญปะปนอยู่ในอาหารนั้นโดยอาศัยความแตกต่างของโคโลนี เช่น บลัดอะการ์มีเดีย (Blood agar media) เป็นอาหารวุ้นที่มีการเติมเลือด ถ้าแบคทีเรียนั้นย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้จะเกิดบริเวณใสๆ (Clear zone) ขึ้นรอบๆ โคโลนีของแบคทีเรียซึ่งแสดงว่าได้เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolysis) ส่วนแบคทีเรียพวกไม่ทำลายเม็ดเลือดแดงจะไม่เกิดบริเวณใสๆ รอบโคโลนี จึงใช้แยกแบคทีเรียเหล่านี้ได้

2.6.2.4 อาหารที่ใช้วิเคราะห์ (Assay media)

เป็นอาหารที่มีองค์ประกอบพิเศษเพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณของวิตามิน กรดอะมิโนและสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังใช้ในการตรวจสอบประสิทธิภาพของสารเคมีที่ใช้ยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ด้วย

2.6.2.5 อาหารที่ใช้ตรวจนับจุลินทรีย์ (Media for enumeration of microorganism)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์บางชนิด เช่น จุลินทรีย์ในน้ำหรือนม องค์ประกอบของอาหารจะต้องเหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านั้น

2.6.2.6 อาหารที่ใช้ศึกษาสมบัติของจุลินทรีย์ (Media for characterization of microorganism)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตรวจสอบคุณสมบัติในการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร รวมทั้งคุณสมบัติที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

2.6.2.7 อาหารใช้เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ (Maintenance media)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เก็บรักษาเชื้อที่มีชีวิตให้นานที่สุด โดยเชื้อยังคงมีคุณสมบัติเหมือนเดิมจึงมีการลดองค์ประกอบบางอย่างในอาหารเพื่อให้เชื้อมีการเจริญเติบโตน้อยลง และปลดปล่อยของเสียน้อยลง เช่น น้ำตาลกลูโคสในอาหารจะเพิ่มการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้สร้างกรดได้มากและทำให้เชื้อตายเร็ว ดังนั้นจึงต้องลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสให้น้อยลง

2.7 คุณสมบัติของแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ในการทดลอง

1. *Aeromonas caviae*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนปลายมน ขนาดกว้างประมาณ 0.3-1.0 ไมโครเมตร อาจต่อกันเป็นเส้นยาวๆ หรืออยู่เป็นคู่ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่ออกมาจากขั้ว (polar flagella) โดยทั่วไปมี 1 เส้น มีบางชนิดไม่เคลื่อนที่ เมแทบอลิซึมมีทั้งแบบใช้การหายใจ (respiration) และใช้การหมัก (fermentation) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 22-28 องศาเซลเซียส ผลการทดสอบออกซิเดสและคาตาเลสเป็นบวก สามารถรีดิวซ์ไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ และย่อยเจลาตินได้

โทษของเชื้อ *Aeromonas caviae*

เชื้อชนิดนี้มักพบในน้ำหรือท่อน้ำทิ้ง บางชนิดเป็นเชื้อก่อโรคในกบ ปลา และมนุษย์ โดยเฉพาะปลาจะพบมาก (คมรัชกร, 2548)

2. *Edwardsiella tarda*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรงขนาดเล็ก กว้างประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 2.0-3.0 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) ดำรงชีวิตเป็นแบบใช้สารอินทรีย์เป็นอาหารโดยตรง (chemoorganotroph) เมแทบอลิซึมมีทั้งแบบใช้การหายใจ (respiration) และใช้การหมัก (fermentation) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส พบในช่องลำไส้ของสัตว์เลือดเย็นรวมไปถึงสัตว์เลือดอุ่นในน้ำ

โทษของเชื้อ *Edwardsiella tarda*

จัดเป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์ เช่น ปลาไหล ปลาดุก และสัตว์อื่นๆ พบน้อยที่ก่อโรคกับมนุษย์และทำให้เกิดโรค Enteric redmouth disease ในสัตว์น้ำ (เจษฎา, 2540)

3. *Enterobacter intermedium*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน กว้างประมาณ 0.6-1.0 ไมโครเมตร ยาว 1.2-3.0 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) บางสายพันธุ์สามารถสร้างแคปซูลได้ สามารถใช้ซิเตรท และอะซีเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หมักกลูโคสเกิดกรดและแก๊ส แต่ที่อุณหภูมิ 44.5 องศาเซลเซียสจะไม่สร้างแก๊สจากกลูโคส พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในน้ำ น้ำทิ้ง ดิน พืช ผัก คนและสัตว์

โทษของเชื้อ *Enterobacter intermedium*

เชื้อนี้เป็นสาเหตุของโรคแผลพุพองและท่อปัสสาวะอักเสบ (คมรัชกร, 2548)

4. *Escherichia coli*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรง ขนาดความกว้างประมาณ 1.1-1.5 ไมโครเมตร ยาว 2.0-6.0 ไมโครเมตร อาศัยอยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นคู่ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) หรือไม่เคลื่อนที่ก็ได้ สามารถเจริญได้บนอาหารง่ายๆ สามารถใช้อะซีเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ใช้ซิเตรทไม่ได้ สามารถหมักกลูโคส และคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ได้กรดแลกติก กรดอะซีติกและกรดฟอร์มิก ส่วนใหญ่หมักแล็กโทสได้แต่อาจช้า (คมรัชกร, 2548)

โทษของเชื้อ *Escherichia coli*

แบคทีเรียชนิดนี้ มีอยู่ตามธรรมชาติ ในลำไส้ใหญ่ของสัตว์และมนุษย์ ทำให้เกิดอาการท้องเสียบ่อยที่สุดทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ทำให้ถ่ายอุจจาระเหลวหรือเป็นน้ำ เชื้อนี้มักปนเปื้อนมากับอาหาร น้ำหรือมือของผู้ประกอบอาหาร ปกติอาจพบเชื้อเหล่านี้ได้ในอุจจาระ ถึงแม้จะไม่มีอาการให้เห็น (ชวาล , 2550)

5. *Hafnia alvei*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรง ขนาดกว้างประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ยาว 2.0-5.0 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ หรือไม่เคลื่อนที่แล้วแต่ชนิด การดำรงชีวิตเป็นแบบใช้สารอินทรีย์เป็นอาหารโดยตรง (chemoorganotroph) เมแทบอลิซึมมีทั้งแบบใช้การหายใจ (respiration) และใช้การหมัก (fermentation) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 30-37 องศาเซลเซียส พบตามผิวหน้าของมนุษย์และสัตว์ชนิดอื่นๆ รวมไปถึงนกและยังพบในน้ำ น้ำทิ้ง ดินและผลิตภัณฑ์นม

โทษของเชื้อ *Hafnia alvei*

จัดเป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์ ในเลือด ท่อปัสสาวะหรือแผลติดเชื้อ (คมรัชกร, 2548)

83975

6. *Klebsiella pneumoniae*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน ขนาดกว้างประมาณ 0.3-1.0 ไมโครเมตร ยาว 0.6-6.0 ไมโครเมตร ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ สร้างแคปซูล ไม่ต้องการอาหารเฉพาะในการเจริญ ส่วนใหญ่สามารถใช้ซิเตรทและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน หมักกลูโคสได้กรดและแก๊ส (มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่าแก๊สไฮโดรเจน) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พวกที่พบในดินและน้ำจะสามารถตรึงแก๊สไนโตรเจนได้ภายใต้สภาพที่ไม่มีอากาศ (คมรัชกร, 2548)

โทษของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae*

เชื้อนี้จัดเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการปอดบวม นอกจากนี้ยังเกิดการติดเชื้อในอวัยวะส่วนอื่นนอกจากทางเดินหายใจได้ เช่น เยื่ออ่อนในช่องปาก ผิวหนัง ลำไส้ พบได้ทั่วไปในน้ำ เมล็ดพืช ผลไม้ ผัก และแม้แต่บนผิวหนังของมนุษย์ (ชวาล , 2550)

7. *Morganella morganii*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรง ขนาดกว้างประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ยาว 2.0-5.0 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) หรือไม่เคลื่อนที่แล้วแต่ชนิด การดำรงชีวิตเป็นแบบใช้สารอินทรีย์เป็นอาหารโดยตรง (chemoorganotroph) เมแทบอลิซึมมีทั้งแบบใช้การหายใจ (respiration) และใช้การหมัก (fermentation) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 30-37 องศาเซลเซียส พบตามผิวหน้าของมนุษย์ และสัตว์ชนิดอื่นๆ รวมไปถึงนก ในน้ำ น้ำทิ้ง ดินและผลิตภัณฑ์นม

โทษของเชื้อ *Morganella morganii*

จัดเป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ซึ่งจะพบบ่อยในผู้ป่วยที่คาสายสวนปัสสาวะไว้นานเกิน 1 เดือน พบในแผลติดเชื้อ และยังเป็นแบคทีเรียที่มีส่วนในการทำให้ปลาเน่า (สมหวัง , 2539)

8. *Providencia rettgeri*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรง กว้างประมาณ 0.6-0.8 ไมโครเมตร ยาว 1.5-2.5 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) การดำรงชีวิตเป็นแบบใช้สารอินทรีย์เป็นอาหารโดยตรง (chemoorganotroph) เมแทบอลิซึมมีทั้งแบบใช้การหายใจ (respiration) และใช้การหมัก (fermentation) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส เจริญได้บนโพแทสเซียมไซยาไนด์ (KCN) ยกเว้น *P. heimbachae*

โทษของเชื้อ *Providencia rettgeri*

มักพบเชื้อนี้จากการคัดแยกได้จากอุจจาระของผู้ป่วยโรคท้องร่วง ท่อปัสสาวะอักเสบ แผลไหม้พุพอง จัดเป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์ (คมรัชกร, 2548)

9. *Pseudomonas aeruginosa*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อย แต่ไม่เป็นเกลียว เซลล์มีขนาดกว้าง 0.5-10 ไมโครเมตร ยาว 1.5-4.0 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่ออกมาจากขั้ว (polarflagella) มีแฟลกเจลลาเส้นเดียวอยู่ที่ปลายด้านใดด้านหนึ่ง (monotrichous) และมีแฟลกเจลลามากกว่าหนึ่งเส้นอยู่ที่ปลายด้านใดด้านหนึ่ง (multitrichous) ไม่สร้างปลอกหรือก้าน ไม่มีระยะพักตัว สมาชิกของสกุลนี้พบได้ทั่วไปในดิน น้ำจืด น้ำทะเลที่มีการย่อยสลายสารอนินทรีย์ บางชนิดเป็นสาเหตุของโรคพืช บางชนิดเป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์และสัตว์ ส่วนใหญ่ต้องการอาหารอย่างง่ายๆ ทุกชนิดสามารถใช้อะซีเตรทเป็นแหล่งอาหารหลักได้ ส่วนใหญ่สะสมอาหารไว้ในรูปโพลีไฮดรอกซีบิว-ทาเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB) มีส่วนน้อยที่สะสมไว้ในรูปโพลีแซคคาไรด์ สามารถเจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 4-43 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพพีเอชเป็นกลางหรือด่าง (7.0-8.5) (คมรัชกร, 2548)

โทษของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

เชื้อชนิดนี้เป็นเชื้อโรคฉวยโอกาสจะก่อให้เกิดการติดเชื้อกับผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรือป่วยมากๆ หรือผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในโรงพยาบาล บางทีจึงเรียกโรคติดเชื้อที่เกิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* ว่าโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล จากผู้ป่วยโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล 2000 คนต่อปีพบว่ามีจำนวนประมาณ 10 % ที่มีสาเหตุมาจาก *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นสาเหตุอันดับสองในการทำให้เกิดโรคปอดบวมในโรงพยาบาล และเป็นสาเหตุส่วนใหญ่ในการก่อให้เกิดโรคปอดบวม ในห้อง ICU โรคติดเชื้อจาก *Pseudomonas aeruginosa* สามารถแพร่กระจายภายในโรงพยาบาลโดยบุคลากร อุปกรณ์การแพทย์ ผิวหนัง น้ำยาฆ่าเชื้อและอาหาร โรคติดเชื้อนี้เป็นปัญหาที่รุนแรงมากในโรงพยาบาลเนื่องจากผู้ป่วยซึ่งมีอาการหนักอยู่แล้วจะเสียชีวิตเนื่องจากการติดเชื้อนี้และเชื้อนี้มักจะดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (ชวาล , 2550)

10. *Salmonella* sp.

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบเซลล์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ ส่วนใหญ่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสให้ผลผลิตเป็นกรดและก๊าซ เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 6-45.6 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสม

สำหรับการเจริญประมาณ 37 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส *Salmonella* sp. จะเจริญแข่งกับแบคทีเรียอื่นๆ ได้ดีกว่า ช่วงพีเอชในการเจริญอยู่ระหว่าง 4.1-9.0 ค่า water activity (a_w) ต่ำสุดสำหรับการเจริญประมาณ 0.93-0.95 ความสามารถในการทนร้อนแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ (นิรนาม, 2550)

โทษของเชื้อ *Salmonella* sp.

เชื้อนี้เป็นต้นเหตุที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และติดต่อระหว่างคนกับสัตว์เลี้ยงได้ แม้บริโภคอาหารที่มีเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรียเข้าในปริมาณต่ำก็ตาม เชื้อนี้เพิ่มเจริญจำนวนในอาหารได้ มักพบ *Salmonella* sp. ปนเปื้อนได้ในอาหารหลายชนิด เช่น เนื้อสัตว์ นม ไข่และผัก โดยเฉพาะสัตว์ปีกเป็นแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญของ *Salmonella* sp. แบคทีเรียชนิดนี้ไม่ทนความร้อน โดยอุณหภูมิขั้นพาสเจอร์ไรส์ก็สามารถฆ่าเชื้อนี้ได้ และอุณหภูมิของตู้เย็นก็สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ อาการที่ได้รับเชื้อ *Salmonella* sp. คือ ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และท้องเสียอย่างรุนแรง (อรทัย, 2550)

11. *Serratia* sp.

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน กว้างประมาณ 0.5-0.8 ไมโครเมตร ยาว 0.9-2.0 ไมโครเมตร มักจะเคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์สามารถสร้างแคปซูลได้ สามารถใช้ซิเตรทและอะซีเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน มีหลายสายพันธุ์ที่สร้างสีชมพูแดงเป็นรงควัตถุที่เรียกว่าโพรดิจิโอซิน (prodigiosin) การสร้างรงควัตถุขึ้นกับสภาพการเพาะเลี้ยงและอาหาร แต่บางสายพันธุ์ไม่สร้างหมักกลูโคสไม่เกิดแก๊ส หรือถ้าเกิดก็น้อยมาก (คมรัชกร, 2548)

โทษของเชื้อ *Serratia* sp.

Serratia sp.เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ เช่น โรคปอดบวม พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในน้ำ ดิน น้ำทิ้ง พืช ผัก คน และสัตว์ หรือช่องระบบทางเดินอาหารของหนูและแมลง เป็นสาเหตุของท่อปัสสาวะอักเสบ ต่อมน้ำนมอักเสบในวัว และโรคติดเชื้อจากสัตว์อื่นๆ และมักจะพบในโรงพยาบาลและสถานที่ทั่วไปที่มีความชื้นสูง เช่น อ่างล้างมือ ห้องน้ำ (Sharp , 2008)

12. *Shigella sonnei*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างแคปซูล เจริญได้ดีบนอาหารง่ายๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไม่ต้องการสารเร่งการเจริญ ไม่สามารถใช้ซิเตรท

หรือมาโลเนทเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ให้ผลการทดสอบออกซิเดสเป็นลบและคาตาเลสเป็นบวก สามารถหมักกลูโคสและคาร์โบไฮเดรตบางชนิดได้กรด แต่ไม่เกิดแก๊ส (มียกเว้นบางชนิด) มักเป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหาร เช่น โรคบิดไม่มีตัว

โทษของเชื้อ *Shigella sonnei*

เชื้อนี้มักเป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหาร เช่น โรคบิดชนิดไม่มีตัว (bacillar dysentery หรือ Shigellosis) ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อชนิดเฉียบพลันของลำไส้ใหญ่ อาการสำคัญของโรคบิดคือ ปวดท้องเกร็ง ปวดเบ่ง และถ่ายเป็นมูกเลือดซึ่งแยกกับเนื้ออุจจาระ คลื่นไส้อาเจียน ปวดหัว มีไข้ อ่อนเพลีย เสียน้ำและอิเล็กโตรไลต์ *Shigella* sp. ทุกสปีชีส์ทุกซีโรทัยป์ที่พบในปัจจุบันจะก่อโรคในมนุษย์ การเกิดโรคในมนุษย์เกิดเนื่องจากการติดเชื้อ *Shigella dysenteriae* ก่อให้เกิดความรุนแรงที่สุดซึ่งอาจจะทำให้ถึงตายได้ รองลงมาคือ *Shigella flexneri* , *Shigella bodii* และ *Shigella sonnei* ซึ่งอาการส่วนใหญ่จะเป็นแค่อาการท้องเสีย โรคนี้ติดต่อได้โดยการรับประทานอาหารหรือน้ำ ที่มีเชื้อปะปนเข้าไป (กนกรัตน์, 2541)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

1. *Aeromonas caviae*
2. *Edwardsiella tarda.*
3. *Enterobacter intermedius*
4. *Escherichia coli*
5. *Hafnia alvei*
6. *Klebsiella pneumoniae* DMST 8216
7. *Morganella morganii*
8. *Providencia rettgeri*
9. *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781
10. *Salmonella anotum*
11. *Salmonella enteritidis* DMST 10633
12. *Salmonella lexington* DMST 4412
13. *Serratia* sp.
14. *Shigella sonnei*

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารแข็งนิวเตรียนท์ (Nutrient agar)
2. อาหารเหลวนิวเตรียนท์ (Nutrient broth)
3. 2 , 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)
4. สารละลายคริสตอลไวโอเล็ต (Crystal violet solution)
5. สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine solution)
6. สารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Ethyl Alcohol)
7. สารละลายซาฟรานิน (Safranin solution)
8. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (3 % H_2O_2)
9. สารละลายเมทิลเรด (Methyl red reagent)

10. สารละลายโคแวคส์ (Kovac's reagent)
11. สารละลายแอลฟาแนฟทอล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (5% α-naphthol solution)
12. สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (40% KOH)
13. สารละลายกรดซัลฟานิลิก (Salfanilic acid solution)
14. สารละลายแอลฟา-แนฟทิลเอมีน (α-napthylamine solution)
15. สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (Ferric Chloride)
16. สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)
17. เปปโตน (Peptone)
18. สารสกัดเนื้อ (Beef extract)
19. ดี-กลูโคส (D-glucose)
20. เจลาติน (Gelatin)
21. วุ้น (Agar)
22. น้ำกลั่น
23. ยูเรีย (Urea)
24. โซเดียมคลอไรด์
25. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (Na_2HPO_4)
26. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4)
27. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)
28. กรดซัลฟิวริก เข้มข้น (conc.H_2SO_4)
29. พีนอลเรด (Phenol red)

3.3 อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง
2. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
3. เข็มเขี่ยเชื้อปลายเข็มตรง (Needle)
4. สไลด์ (Slide) และกระจกปิดสไลด์ (Cover Slide)
5. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
6. ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ
7. ตะเกียงแอลกอฮอล์
8. เครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HV-50

9. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท Mettler -Toledo (Thailand) Ltd.รุ่น PG5002
10. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Mettler-Toledo (Thailand) Ltd.รุ่น AG204
11. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท BEC THAI รุ่น cyberscan 2000
12. ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท ไซแอนติฟิคโปรโมชั่น จำกัด
13. ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของบริษัท SHEL LAB
14. ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT 123
15. ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO
16. หลอดทดลองฝาเกลียว (Test tube)
17. กระบอกตวง (Cylinder)
18. บีกเกอร์ (Beaker)
19. ปิเปตปริมาตร 1 , 5 และ 10 มิลลิลิตร
20. ชุดกรองปลอดเชื้อ
21. กล้องจุลทรรศน์
22. หลอดดักก๊าซ (Durham tube)
23. พาราฟินเหลว
24. กระดาษกรอง
25. โปรแกรม FBIdent เวอร์ชั่น 1.0
26. Oil Immersion Objective

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 เก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์

รวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์แกรมลบที่มีในโปรแกรม FBIdent เวอร์ชั่น 1.0 จากแหล่งเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ ดังนี้

3.4.1.1 สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

1. *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781

3.4.1.2 สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

1. *Aeromonas caviae*
2. *Enterobacter intermedius*
3. *Edwardsiella tarda*
4. *Hafnia alvei*

5. *Morganella morganii*

6. *Providencia rettgeri*

7. *Shigella sonnei*

3.4.1.3 ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1. *Salmonella anotum*

2. *Salmonella enteritidis* DMST 10633

3. *Salmonella lexington* DMST 4412

4. *Serratia* sp.

5. *Klebsiella pneumoniae* DMST 8216

6. *Escherichia coli*

นำจุลินทรีย์มาทำการแยกให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ โดยลาก (Streak) บนอาหารแข็งนิวเตรียนท์ (Nutrient agar) นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้มาใช้ในการศึกษาต่อ

3.4.2 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop) เขี่ยเชื้อจำนวน 1 ลูป แล้วลาก (Streak) ลงบนอาหารแข็งที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียในหลอดทดลอง นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันทับปิดปากหลอดทดลองให้สนิท เก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (Subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์ และทุกครั้งก่อนทำการทดสอบ

3.4.3 การตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ขั้นพื้นฐาน

3.4.3.1 ศึกษารูปร่างของจุลินทรีย์และการติดสีแกรม

นำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งนิวเตรียนท์ (Nutrient agar) (ภาคผนวก ก) อายุ 24 ชั่วโมง มาย้อมแกรมโดยใช้สไลด์ และกระจกปิดสไลด์ที่สะอาด หยดน้ำกลั่นลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด ในปริมาณเล็กน้อย ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อจากหลอดทดลองในปริมาณเล็กน้อย นำเชื้อที่ติดมากับปลายลวดลงผสมกับหยดน้ำกลั่นบนแผ่นสไลด์ เกลี่ยเชื้อที่ต้องการย้อมบนสไลด์ ทิ้งให้แห้งแล้วจึงนำไปลนผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์เชื้อติดกับสไลด์ เตรียมสไลด์แบบนี้เชื้อละแผ่น หยดสารละลายคริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet solution) (ภาคผนวก ข) ลงบนเชื้อที่เกลี่ย 1-2 นาที ระวังอย่าให้สีแห้ง เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ทิ้งลงอ่างน้ำ แล้วล้างด้วย

น้ำสะอาดโดยปล่อยให้น้ำผ่านเบาๆ แล้วหยดสารละลายแกรมไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสารละลายแกรมไอโอดีนทิ้ง ล้างผ่านน้ำ ชะสีออกด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Ethyl Alcohol) (ภาคผนวก ข) นานประมาณ 30 วินาที แล้วล้างผ่านด้วยน้ำสะอาดทันที จากนั้นซับด้วยกระดาษซับ แล้วย้อมทับด้วยสารละลายซาฟรานิน (Safranin Solution) (ภาคผนวก ข) ให้ท่วมรอยสเมียร์นาน 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างผ่านน้ำเบาๆ ซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งให้แห้ง แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้ Oil Immersion Objective ให้แสงจ้ามากๆ ถ่ายบันทึกรูปแบคทีเรียที่เห็นบนสไลด์แต่ละแผ่น ดูรูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ และการติดสีแกรมของแบคทีเรีย การติดสีแตกต่างกันมีประโยชน์ในการแยกพวกแบคทีเรีย เพราะการที่มีปฏิกิริยาต่อสีไม่เหมือนกัน ย่อมแสดงว่าส่วนประกอบทางเคมีของแบคทีเรียชนิดนั้นแตกต่างกัน

ผลบวก เซลล์ติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเล็ตจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก

ผลลบ เซลล์ติดสีแดงของซาฟานินจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ

3.4.3.2 การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility Test)

ปลูกเชื้อลงบนอาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility medium) (ภาคผนวก ก) โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายตรงที่ฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเชื้อแต่ละชนิดแทงลงในอาหารตรงๆ ลึกประมาณ 3/4 ของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง ถ้าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้จะมีรอยการเจริญออกจากรอยที่แทงไว้ ถ้าต้องการทดสอบเพื่อให้เห็นลักษณะการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างชัดเจน จะต้องเติม 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อแบคทีเรียเจริญทวีจำนวน จะนำ TTC ซึ่งไม่มีสีเข้าสู่เซลล์ แล้วรีดิวส์ TTC เป็นตะกอนของเม็ดสีแดง (Formazan pigment) ให้เห็นตรงบริเวณที่มีการเจริญของแบคทีเรีย

ผลบวก เชื้อเจริญไปจากแนวที่แทงกระจายไปทั่วหลอด

ผลลบ เชื้อเจริญเฉพาะบริเวณแนวที่แทง

3.4.4 การทดสอบทางชีวเคมี

3.4.4.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส (Catalase Test)

ปลูกเชื้อลงในอาหารแข็งนิวเตรียนท์ (Nutrient agar) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเกลี่ยลงบนสไลด์ที่สะอาด แล้วหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (3 % H_2O_2) (ภาคผนวก ข) ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลสได้ให้ผลเป็นบวกแต่ถ้าไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลสได้ให้ผลเป็นลบ การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลสต้องใช้เชื้อที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมง เพราะเอนไซม์แคตาเลสจะมีอยู่เฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น

ดังนั้น ผลลบปลอม (false negative reaction) อาจเกิดขึ้นได้หากใช้เชื้อที่มีอายุเกิน 24 ชั่วโมง และไม่ควรใช้เชื้อที่เลี้ยงจากอาหารที่มีเลือดผสม เพราะในเม็ดเลือดแดงมีเอนไซม์แคตาเลส จึงอาจให้ผลบวกปลอม (false negative reaction)

ผลบวก เกิดฟองแก๊ส

ผลลบ ไม่เกิดฟองแก๊ส

3.4.4.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างอินโดล (Indole Test)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลวทริปโตน (Tryptone broth) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทดสอบการสร้างอินโดลโดยหยดสารละลายโคแวคส์ (Kovac's reagent) (ภาคผนวก ข) 1-2 หยด ถ้ามีวงแหวนสีชมพูอมม่วงหรือสีแดงเกิดที่ผิวหน้าแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ Tryptophanase ย่อยทริปโตเฟนในอาหารได้อินโดล

ผลบวก เกิดสีแดงที่ผิวชั้นบน

ผลลบ ไม่เกิดสี

3.4.4.3 การทดสอบเมทิลเรด (Methyl Red Test)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเอ็มอาร์-วีพี (MR-VP medium) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยหยดสารละลายเมทิลเรด (Methyl red reagent) (ภาคผนวก ข) 5-6 หยดลงไปต่อปริมาตรอาหาร 5 มิลลิลิตรที่มีเชื้อ ถ้าเกิดสีแดงขึ้นแสดงว่าแบคทีเรียสร้างกรดออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลบวก เกิดสีแดงสด

ผลลบ เกิดเหลืองหรือส้ม

3.4.4.4 การทดสอบเมทิลคาร์บินอล (Voges Proskauer Test)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเอ็มอาร์-วีพี (MR-VP medium) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทดสอบโดยถ่ายเชื้อมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่สะอาดเติมสารละลายแอลฟาแนฟทอล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (5% α-naphthol solution) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (40% KOH) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นภายใน 5 นาที แสดงว่าแบคทีเรียมีการผลิตอะซิโตอิน

ผลบวก สีแดงภายใน 5 นาที

ผลลบ สีเหลือง

3.4.4.5 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (Urease Test)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารแข็งยูเรีย (Urea agar) (ภาคผนวก ก) ในหลอดอาหารเอียง (Slant) โดยใช้เชื้อที่มีอายุน้อย เพื่อป้องกันมิให้มีการปะปนของเซลล์ที่ตายแล้ว หรือสิ่งเจือปนอื่นๆ ที่เกิดจากการเจริญของเซลล์ ซึ่งจะไปรบกวนผลการทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ตรวจผลการทดสอบทุกวัน เป็นเวลา 2-3 วัน ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีบานเย็นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างยูรีเอสย่อยสลายยูเรียได้

ผลบวก อาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีบานเย็น

ผลลบ อาหารไม่เปลี่ยนสี

3.4.4.6 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท (Nitrate Reduction Test)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลวไนเตรท (Nitrate broth) (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบโดยการหยด Salfanilic acid solution และ α-napthylamine solution (ภาคผนวก ข) อย่างละ 5 หยด หากมีสีแดงเกิดขึ้นแสดงว่าไนเตรทถูกรีดิวซ์กลายเป็นไนไตรท์ ถ้าไม่มีสีแดงเกิดขึ้นให้เติมผงสังกะสีลงไป ถ้าไม่มีสีแดงเกิดขึ้นแสดงว่าแบคทีเรียสามารถรีดิวซ์ไนไตรท์เป็นแอมโมเนีย หรือก๊าซไนโตรเจน

ผลบวก เกิดสีแดงปนตะกอน แต่ไม่เปลี่ยนสียังให้ทดสอบต่อโดยเติมผงสังกะสี

หลังจากเติมผงสังกะสีแล้วไม่เปลี่ยนสี

ผลลบ หลังจากเติมผงสังกะสีแล้วเปลี่ยนเป็นสีแดงให้ลงผลเป็นลบ

3.4.4.7 การทดสอบความสามารถในการย่อยอาร์จินิน (Arginine Dihydrolase Test)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลวอาร์จินิน (Thornley's) ที่เติมอาร์จินิน และไม่เติมอาร์จินินซึ่งใช้เป็นหลอดควบคุม (ภาคผนวก ก) เทพาราฟินเหลวทับให้หนาประมาณ 4-5 มิลลิเมตร ลงในแต่ละหลอด นำไปบ่มที่ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยเปรียบเทียบการเปลี่ยนสีของอาหารกับหลอดควบคุม

ผลบวก อาหารเป็นสีม่วงหรือม่วงแดง(หลอดควบคุมเป็นสีเหลือง)

ผลลบ อาหารเป็นสีเหลือง (ทั้งสองหลอด)

3.4.4.8 การทดสอบดีอะมิเนส (Deaminase Test)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการลงในอาหารแข็งฟีนิลอะลานินดีอะมิเนส (Phenylalanine Deaminase Agar) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมหรืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24

ชั่วโมง และทำหลอดควบคุมโดยไม่เติมเชื้อ ทดสอบโดยเติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (Ferric chloride) (ภาคผนวก ข) ลงไปหลอดละ 5 หยด เขย่าหลอดเบาๆ เพื่อให้เชื้อหลุดจากอาหาร สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร และสารตรวจสอบที่หยดลงไปภายในเวลา 5 นาที เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม

ผลบวก อาหารเปลี่ยนเป็นสีเขียวทันที

ผลลบ อาหารไม่เปลี่ยนสี ยังคงเป็นสีเหลืองของเฟอร์ริกคลอไรด์

3.4.4.9 การทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน (Gelatin Hydrolysis Test)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลวเจลาติน (Nutrient gelatin broth) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (หรืออุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยนำหลอดที่มีเชื้อ และ อาหารเหลวเจลาตินที่ยังไม่ได้เพาะเชื้อ (ควบคุม) ใส่ในตู้เย็นหรือแช่ในน้ำเย็น ประมาณ 5-10 นาที หรือจนกว่าหลอดควบคุมเกิดการแข็งตัว

ผลบวก อาหารยังเป็นของเหลวเหมือนเดิม ไม่เกิดการแข็งตัวเหมือนหลอดที่ยังไม่มีเชื้อ

ผลลบ อาหารเกิดการแข็งตัวเช่นเดียวกับหลอดที่ยังไม่มีเชื้อ

3.4.4.10 การทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรท (Citrate Utilization Test)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการลงในอาหารซิมมอนส์ซิเตรต (Simmon's citrate agar) (ภาคผนวก ก) ในหลอดอาหารเอียง (Slant) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อที่สามารถใช้ซิเตรทได้จะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ในอาหารจากสีเขียวกลายเป็นสีน้ำเงิน

ผลบวก มีการเจริญ อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

ผลลบ ไม่มีการเจริญ อาหารเป็นสีเขียวเหมือนเดิม

3.4.4.11 การทดสอบความสามารถในการใช้ดี-กลูโคส (Utilization of Glucose)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลว Utilization Test medium (ภาคผนวก ก) โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และใส่หลอดดักแก๊สที่ผ่านการฆ่าเชื้อไว้ในหลอดทดสอบด้วย บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูการเปลี่ยนสีของอาหารและการเกิดแก๊สในอาหาร

ผลบวก เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลือง และมีแก๊สเกิดขึ้น หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างใดอย่างหนึ่ง ให้ถือเป็นผลบวก

ผลลบ อาหารไม่เปลี่ยนสี และไม่เกิดแก๊ส

3.4.5 บันทึกภาพถ่ายของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์ และผลการทดสอบทางชีวเคมีต่างๆ จากนั้นนำภาพถ่ายและผลการทดสอบไปบันทึกลงในโปรแกรม FBIdent เวอร์ชั่น 1.0 เพื่อให้โปรแกรมที่สร้างขึ้นมีความสมบรูณ์มากขึ้น

3.4.6 ประเมินผลการทดสอบต่างๆ ของโปรแกรมที่ช่วยในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารในกรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรีย เพื่อดูว่าโปรแกรมที่สร้างขึ้นมามีความถูกต้อง น่าเชื่อถือมากน้อยเพียงใด

บทที่ 4

ผลการทดลอง

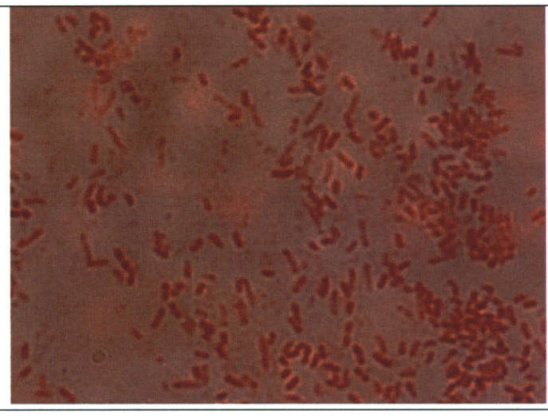
4.1 ผลการทดลอง

เชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่รวบรวมได้จากแหล่งเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ยกเว้น *Pseudomonas aeruginosa* ที่อยู่ในวงศ์ Pseudomonadaceae และถูกนำมาใช้ในการทดสอบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีดังนี้

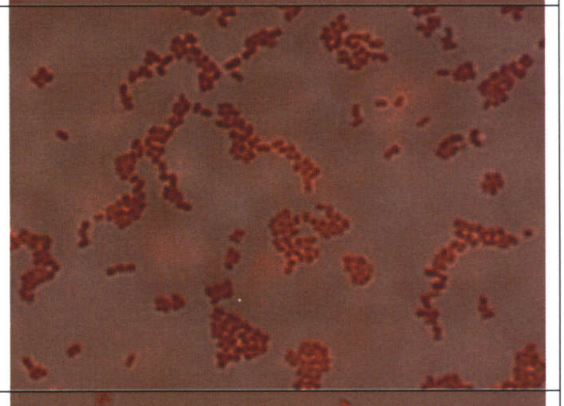
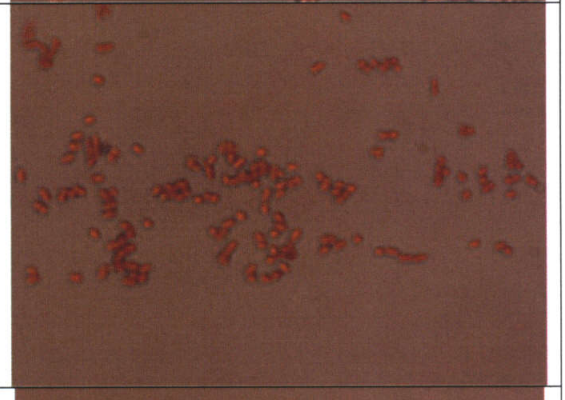
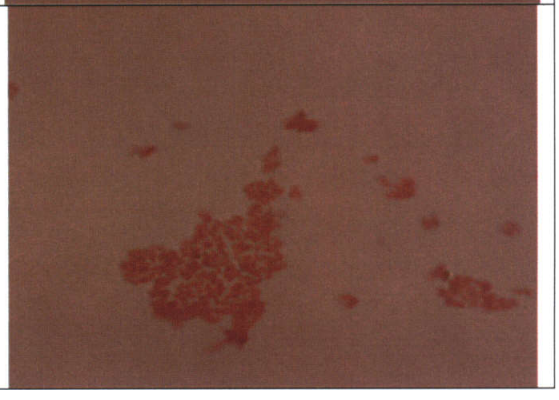
4.1.1 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรม

จากการย้อมแกรมเพื่อศึกษารูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียแกรมลบ 14 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ *Aeromonas caviae, Edwardsiella tarda, Enterobacter intermedium, Escherichia coli, Hafnia alvei, Klebsiella pneumoniae* DMST 8216, *Morganella morganii, Providencia rettgeri*, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781, *Salmonella anotum, Salmonella enteritidis* DMST 10633, *Salmonella lexington* DMST 4412, *Serratia* sp. และ *Shigella sonnei* พบว่าเซลล์แบคทีเรียย้อมติดสีแดงของซาฟานิน และมีลักษณะรูปร่างเป็นท่อน ดังตารางที่ 4.1

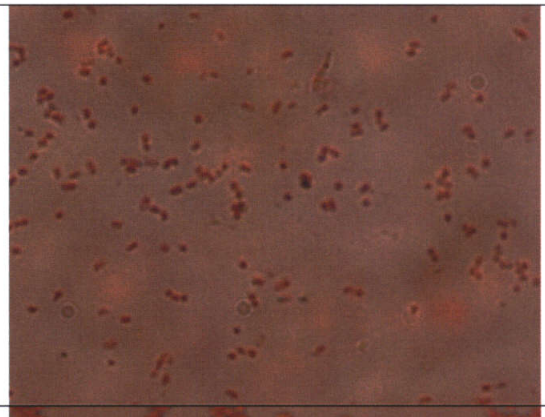
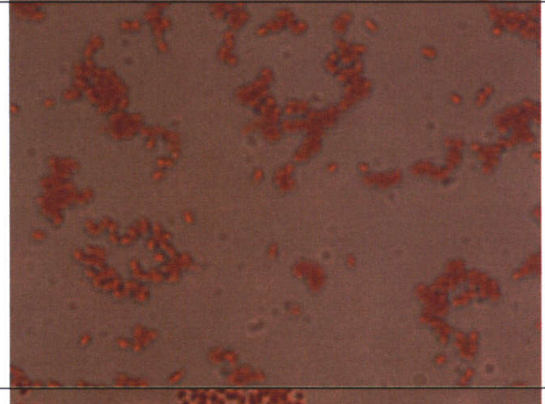
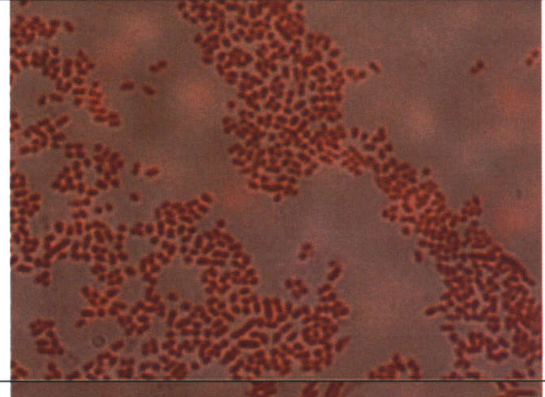
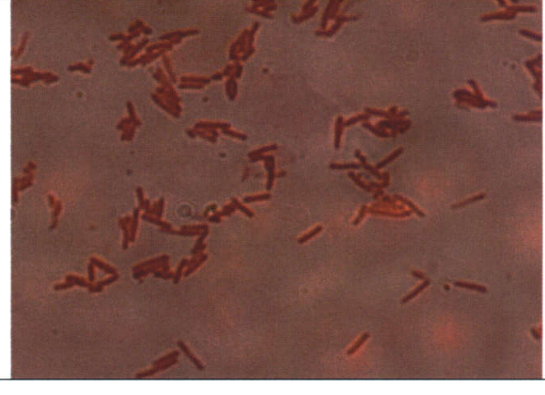
ตารางที่ 4.1 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 14 สายพันธุ์

เชื้อแบคทีเรีย	ลักษณะรูปร่าง	ภาพถ่ายลักษณะรูปร่าง และการติดสีแกรมของแบคทีเรีย
Aeromonas caviae	ท่อน ปลายมน	

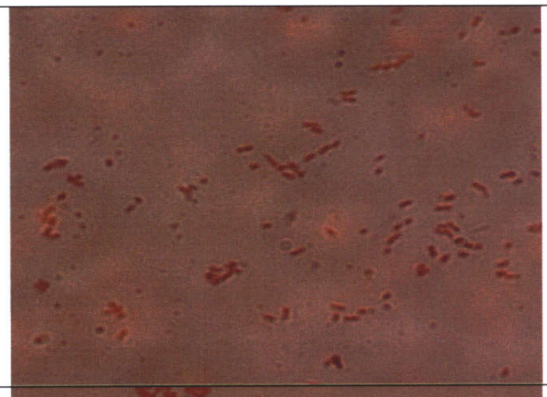
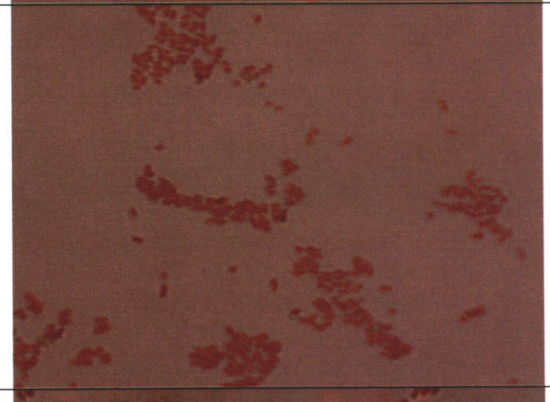
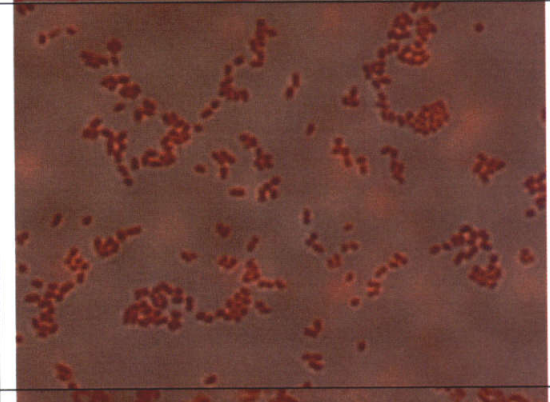
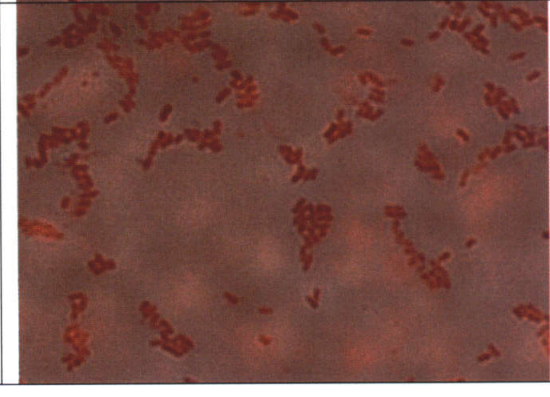
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	ลักษณะรูปร่าง	ภาพถ่ายลักษณะรูปร่าง และการติดสีแกรมของแบคทีเรีย
Edwardsiella tarda	ท่อนตรงยาว	
Enterobacter intermedius	ท่อนสั้น	
Escherichia coli	ท่อนสั้น	
Hafnia alvei	ท่อนสั้น	

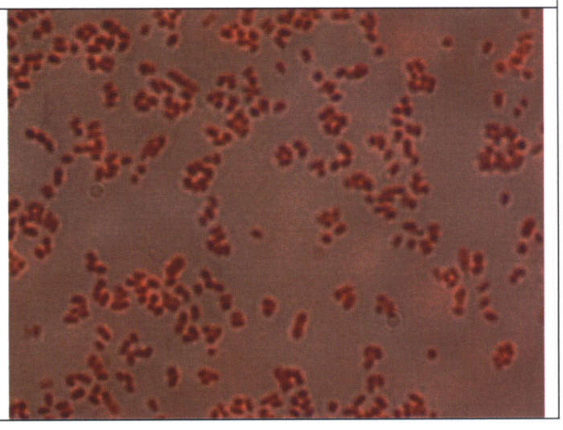
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	ลักษณะรูปร่าง	ภาพถ่ายลักษณะรูปร่าง และการติดสีแกรมของแบคทีเรีย
Klebsiella pneumoniae DMST 8216	ท่อนสั้น	
Morganella morganii	ท่อนสั้น	
Providencia rettgeri	ท่อนสั้น	
Pseudomonas aeruginosa TISTR 781	ท่อนตรงยาว หรือโค้งเล็กน้อย	

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	ลักษณะรูปร่าง	ภาพถ่ายลักษณะรูปร่าง และการติดสีแกรมของแบคทีเรีย
Salmonella anotum	ท่อนสั้น	
Salmonella enteritidis DMST 10633	ท่อนสั้น	
Salmonella lexington DMST 4412	ท่อนสั้น	
Serratia sp.	ท่อนสั้น	

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	ลักษณะรูปร่าง	ภาพถ่ายลักษณะรูปร่าง และการติดสีแกรมของแบคทีเรีย
Shigella sonnei	ท่อนสั้น	

4.1.2 ลักษณะโคโลนี

จากการนำแบคทีเรียทั้ง 14 สายพันธุ์ มาลาก (cross streak) บนอาหารแข็งนิวเตรียนท์ เพื่อศึกษาลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแต่ละชนิด พบว่า *Aeromonas caviae, Edwardsiella tarda, Enterobacter intermedium, Escherichia coli, Hafnia alvei, Klebsiella pneumoniae* DMST 8216, *Morganella morganii, Providencia rettgeri, Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781, *Salmonella anotum, Salmonella enteritidis* DMST 10633, *Salmonella lexington* DMST 4412, *Serratia* sp. และ *Shigella sonnei* มีลักษณะโคโลนีดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแกรมลบ 14 สายพันธุ์

เชื้อแบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ภาพถ่ายลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
Aeromonas caviae	โคโลนีลักษณะกลมขอบเรียบ สีครีม ทึบแสง ขนาด 1-2 มิลลิเมตร	

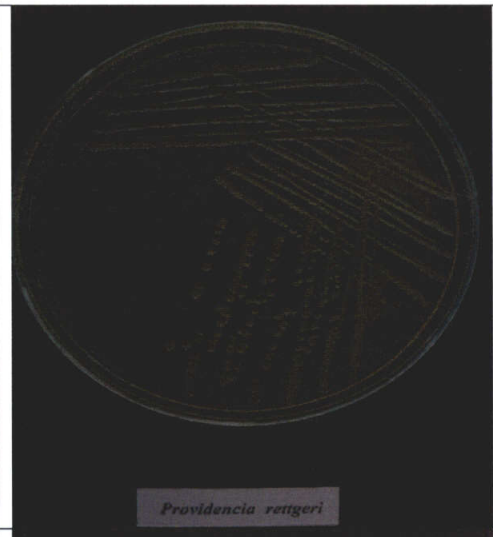
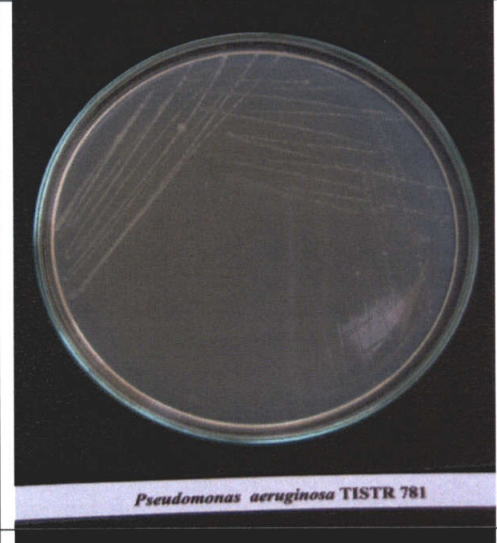
ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ภาพถ่ายลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
Edwardsiella tarda	โคโลนีลักษณะบาง ผิวเรียบ สีใส ขนาด 0.2 – 0.5 มิลลิเมตร	
Enterobacter intermedium	โคโลนีลักษณะเป็นเมือก ผิวเรียบ ขนาด 0.5 - 1 มิลลิเมตร	
Escherichia coli	โคโลนีลักษณะกลมนูน มีผิวเรียบมัน ทึบแสง ขนาด 1- 2 มิลลิเมตร	

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ภาพถ่ายลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
Hafnia alvei	โคโลนีลักษณะ กลมเล็ก สีใส ขนาด 0.5-1 มิลลิเมตร	
Klebsiella pneumoniae DMST 8216	โคโลนีลักษณะกลม นูน สีครีม เป็นเมือก ขนาด 0.8-1 มิลลิเมตร	
Morganella morganii	โคโลนีลักษณะกลมนูน สีครีม ขนาด 1- 2 มิลลิเมตร	

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ภาพถ่ายลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
Providencia rettgeri	โคโลนีลักษณะกลม สีขาวขุ่น ผิวเรียบ ขนาด 1- 2 มิลลิเมตร	
Pseudomonas aeruginosa TISTR 781	โคโลนีมีขนาดเล็กมาก สีใส ขนาด 0.2- 0.5 มิลลิเมตร	
Salmonella anotum	โคโลนีลักษณะกลม ขอบเรียบ ขนาด 0.5-1 มิลลิเมตร	

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ภาพถ่ายลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
Salmonella enteritidis DMST 10633	โคโลนีลักษณะ กลม ขอบเรียบ สีครีม ทึบแสง ขนาด 1- 2 มิลลิเมตร	
Salmonella lexington DMST 4412	โคโลนีลักษณะ กลม ขอบเรียบ สีครีมทึบแสง ขนาด 1- 2 มิลลิเมตร	
Serratia sp.	โคโลนีลักษณะกลม ผิวเรียบ มักมีสีชมพู สีแดง ขนาด 0.5 - 1.5 มิลลิเมตร	

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ภาพถ่ายลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
Shigella sonnei	โคโลนีกลมนูนโปร่งใส ขอบเรียบ มัน ไม่มีสี ขนาด 1- 2 มิลลิเมตร	

4.1.3 ผลการทดสอบเปรียบเทียบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่นำมาใช้ในการทดสอบ

1. *Aeromonas caviae*

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรียตามข้อมูลในโปรแกรม FBI dent เวอร์ชั่น 1.0 พบว่า *Aeromonas caviae* มีการศึกษารูปร่าง การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การทดสอบแคตาเลส ความสามารถในการย่อยอาร์จีนิน และความสามารถในการย่อยเจลาติน จากการทดลองพบว่า *Aeromonas caviae* มีรูปร่างเป็นท่อนปลายมน ติดสีแดงของซาฟานินเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีการเคลื่อนที่ สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส สามารถย่อยอาร์จินินได้และสามารถย่อยเจลาตินได้ ซึ่งจากการทดลองผลที่ได้ตรงกับข้อมูลที่มีในโปรแกรม แสดงดังตารางที่ 4.3 และภาพจากการทดสอบแสดงดังภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Aeromonas caviae* ระหว่างผลจากโปรแกรมและผลจากการทดลอง

การทดสอบ	ผลจากโปรแกรม	ผลจากการทดลอง
รูปร่าง	ท่อนปลายมน	ท่อน
การเคลื่อนที่	เคลื่อนที่	เคลื่อนที่

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

การทดสอบ	ผลจากโปรแกรม	ผลจากการทดลอง
การติดสีแกรม	ลบ	ลบ
Catalase Test	+	+
Arginine Dihydrolase Test	+	+
Gelatin Hydrolysis Test	+	+

2. *Edwardsiella tarda*

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรียตามข้อมูลในโปรแกรม FBI dent เวอร์ชั่น 1.0 พบว่า *Edwardsiella tarda* มีการศึกษารูปร่าง การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การทดสอบแคตาเลส ความสามารถในการใช้ซิเตรท และความสามารถในการสร้างอินโดล จากการทดลองพบว่า *Edwardsiella tarda* มีรูปร่างเป็นท่อนตรงยาว ติดสีแดงของซาฟานินเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีการเคลื่อนที่ สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส ไม่สามารถใช้ซิเตรท และสามารถสร้างอินโดลได้ ซึ่งจากการทดลองผลที่ได้ตรงกับข้อมูลที่มีในโปรแกรม แสดงดังตารางที่ 4.4 และภาพจากการทดสอบแสดงดังภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Edwardsiella tarda* ระหว่างผลจากโปรแกรมและผลจากการทดลอง

การทดสอบ	ผลจากโปรแกรม	ผลจากการทดลอง
รูปร่าง	ท่อน	ท่อนตรงยาว
การเคลื่อนที่	เคลื่อนที่	เคลื่อนที่
การติดสีแกรม	ลบ	ลบ
Catalase Test	+	+
Citrate Utilization Test	-	-
Indole Test	+	+

3. *Enterobacter intermedius*

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรียตามข้อมูลในโปรแกรม FBI dent เวอร์ชั่น 1.0 พบว่า *Enterobacte intermedius* มีการศึกษารูปร่าง การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การทดสอบแคตาเลส การทดสอบดีอะมิเนส และความสามารถในการสร้างอินโดล จากการทดลองพบว่า *Enterobacter intermedius* มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของซาฟานินเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีการเคลื่อนที่ สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ดีอะมิเนส และไม่สามารถสร้างอินโดลได้ ซึ่งจากการทดลองผลที่ได้ตรงกับข้อมูลที่มีในโปรแกรม แสดงดังตารางที่ 4.5 และภาพจากการทดสอบแสดงดังภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Enterobacter intermedius* ระหว่างผลจากโปรแกรมและผลจากการทดลอง

การทดสอบ	ผลจากโปรแกรม	ผลจากการทดลอง
รูปร่าง	ท่อน	ท่อนสั้น
การเคลื่อนที่	เคลื่อนที่	เคลื่อนที่
การติดสีแกรม	ลบ	ลบ
Catalase Test	+	+
Deaminase Test	-	-
Indole Test	-	-

4. *Escherichia coli*

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรียตามข้อมูลในโปรแกรม FBI dent เวอร์ชั่น 1.0 พบว่า *Escherichia coli* มีการศึกษารูปร่าง การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การทดสอบแคตาเลส ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท และการทดสอบเมทิลคาร์บินอล จากการทดลองพบว่า *Escherichia coli* มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของซาฟานินเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีการเคลื่อนที่ สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส สามารถรีดิวซ์ไนเตรท และไม่สามารถผลิตอะซิโตอิน ซึ่งจากการทดลองผลที่ได้ตรงกับข้อมูลที่มีในโปรแกรม แสดงดังตารางที่ 4.6 และภาพจากการทดสอบแสดงดังภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Escherichia coli* ระหว่างผลจากโปรแกรมและผลจากการทดลอง

การทดสอบ	ผลจากโปรแกรม	ผลจากการทดลอง
รูปร่าง	ท่อน	ท่อนสั้น
การเคลื่อนที่	เคลื่อนที่	เคลื่อนที่
การติดสีแกรม	ลบ	ลบ
Catalase Test	+	+
Nitrate Reduction Test	+	+
VP Test	-	-

5. *Hafnia alvei*

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรียตามข้อมูลในโปรแกรม FBI dent เวอร์ชั่น 1.0 พบว่า *Hafnia alvei* มีการศึกษารูปร่าง การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การทดสอบแคตาเลส การทดสอบดีอะมิเนส และความสามารถในการสร้างอินโดล จากการทดลองพบว่า *Hafnia alvei* มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของซาฟานินเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีการเคลื่อนที่ สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ดีอะมิเนส และไม่สามารถสร้างอินโดลได้ ซึ่งจากการทดลองผลที่ได้ตรงกับข้อมูลที่มีในโปรแกรม แสดงดังตารางที่ 4.7 และภาพจากการทดสอบแสดงดังภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Hafnia alvei* ระหว่างผลจากโปรแกรมและผลจากการทดลอง

การทดสอบ	ผลจากโปรแกรม	ผลจากการทดลอง
รูปร่าง	ท่อน	ท่อนสั้น
การเคลื่อนที่	เคลื่อนที่	เคลื่อนที่
การติดสีแกรม	ลบ	ลบ
Catalase Test	+	+
Deaminase Test	-	-
Indole Test	-	-

6. *Klebsiella pneumoniae* DMST 8216

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรียตามข้อมูลในโปรแกรม FBI dent เวอร์ชั่น 1.0 พบว่า *Klebsiella pneumoniae* มีการศึกษารูปร่าง การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การทดสอบแคตาเลส การทดสอบดีอะมิเนส และความสามารถในการสร้างอินโดล จากการทดลองพบว่า *Klebsiella pneumoniae* มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของซาฟานินเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่มีการเคลื่อนที่ สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ดีอะมิเนส และไม่สามารถสร้างอินโดลได้ ซึ่งจากการทดลองผลที่ได้ตรงกับข้อมูลที่มีในโปรแกรม แสดงดังตารางที่ 4.8 และภาพจากการทดสอบแสดงดังภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Klebsiella pneumoniae* DMST 8216 ระหว่างผลจากโปรแกรมและผลจากการทดลอง

การทดสอบ	ผลจากโปรแกรม	ผลจากการทดลอง
รูปร่าง	ท่อน	ท่อนสั้น
การเคลื่อนที่	ไม่เคลื่อนที่	ไม่เคลื่อนที่
การติดสีแกรม	ลบ	ลบ
Catalase Test	+	+
Deaminase Test	-	-
Indole Test	-	-

7. *Morganella morganii*

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรียตามข้อมูลในโปรแกรม FBI dent เวอร์ชั่น 1.0 พบว่า *Morganella morganii* มีการศึกษารูปร่าง การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การทดสอบแคตาเลส การทดสอบยูรีเอส และความสามรถในการสร้างอินโดล จากการทดลองพบว่า *Morganella morganii* มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของซาฟานินเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีการเคลื่อนที่ สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอส และสามารถสร้างอินโดลได้ซึ่งจากการทดลองผลที่ได้ไม่ตรงกับข้อมูลที่มีในโปรแกรม แสดงดังตารางที่ 4.9 และภาพจากการทดสอบแสดงดังภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.9 เปรียบเทียบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Morganella morganii* ระหว่างผลจากโปรแกรมและผลจากการทดลอง

การทดสอบ	ผลจากโปรแกรม	ผลจากการทดลอง
รูปร่าง	ท่อน	ท่อนสั้น
การเคลื่อนที่	ไม่เคลื่อนที่	เคลื่อนที่
การติดสีแกรม	ลบ	ลบ
Catalase Test	+	+
Urease Test	+	+
Indole Test	+	+

8. *Providencia rettgeri*

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรียตามข้อมูลในโปรแกรม FBI dent เวอร์ชั่น 1.0 พบว่า *Providencia rettgeri* มีการศึกษารูปร่าง การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การทดสอบแคตาเลส การทดสอบยูรีเอส และความสามารถในการสร้างอินโดล จากการทดลองพบว่า *Providencia rettgeri* มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของซาฟานินเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีการเคลื่อนที่ สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอส และสามารถสร้างอินโดลได้ ซึ่งจากการทดลองผลที่ได้ไม่ตรงกับข้อมูลที่มีในโปรแกรม แสดงดังตารางที่ 4.10 และภาพจากการทดสอบแสดงดังภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.10 เปรียบเทียบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Providencia rettgeri* ระหว่างผลจากโปรแกรมและผลจากการทดลอง

การทดสอบ	ผลจากโปรแกรม	ผลจากการทดลอง
รูปร่าง	ท่อน	ท่อนสั้น
การเคลื่อนที่	เคลื่อนที่	เคลื่อนที่

ตารางที่ 4.10 (ต่อ)

การทดสอบ	ผลจากโปรแกรม	ผลจากการทดลอง
การติดสีแกรม	ลบ	ลบ
Catalase Test	+	+
Urease Test	-	+
Indole Test	+	+

9. *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรียตามข้อมูลในโปรแกรม FBI dent เวอร์ชั่น 1.0 พบว่า *Pseudomonas aeruginosa* มีการศึกษารูปร่าง การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การทดสอบแคตาเลส ความสามารถในการใช้กลูโคส จากการทดลองพบว่า *Pseudomonas aeruginosa* มีรูปร่างเป็นท่อนตรงยาว ติดสีแดงของซาฟานินเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีการเคลื่อนที่ สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส และสามารถใช้น้ำกลูโคสได้ ซึ่งจากการทดลองผลที่ได้ตรงกับข้อมูลที่มีในโปรแกรม แสดงดังตารางที่ 4.11 และภาพจากการทดสอบแสดงดังภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.11 เปรียบเทียบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 ระหว่างผลจากโปรแกรมและผลจากการทดลอง

การทดสอบ	ผลจากโปรแกรม	ผลจากการทดลอง
รูปร่าง	ท่อน	ท่อนตรงยาว
การเคลื่อนที่	เคลื่อนที่	เคลื่อนที่
การติดสีแกรม	ลบ	ลบ
Catalase Test	+	+
Utilization of Glucose	+	+

10. *Salmonella anotum*

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรียตามข้อมูลในโปรแกรม FBI dent เวอร์ชั่น 1.0 พบว่า *Salmonella anotum* ไม่มีข้อมูลในโปรแกรม แต่ในโปรแกรมจะมีข้อมูลของ Salmonella สปีชีส์อื่น ซึ่งมีการศึกษารูปร่าง การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การทดสอบแคตาเลส และการทดสอบเมทิลเรด จึงได้นำ *Salmonella anotum* มาทำการทดสอบเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้น จากการทดลองพบว่า *Salmonella anotum* มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของซาฟานินเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีการเคลื่อนที่ สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส และสามารถสร้างกรดได้ ซึ่งผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.12 และภาพจากการทดสอบแสดงดังภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.12 ผลจากการทดลองคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Salmonella anotum.*

การทดสอบ	ผลจากโปรแกรม	ผลจากการทดลอง
รูปร่าง	ไม่มีผลระบุในโปรแกรม	ท่อนสั้น
การเคลื่อนที่	ไม่มีผลระบุในโปรแกรม	เคลื่อนที่
การติดสีแกรม	ไม่มีผลระบุในโปรแกรม	ลบ
Catalase Test	ไม่มีผลระบุในโปรแกรม	+
MR Test	ไม่มีผลระบุในโปรแกรม	+

11. *Salmonella enteritidis* DMST 10633

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรียตามข้อมูลในโปรแกรม FBI dent เวอร์ชั่น 1.0 พบว่า *Salmonella enteritidis* ไม่มีข้อมูลในโปรแกรม แต่ในโปรแกรมจะมีข้อมูลของ Salmonella สปีชีส์อื่น ซึ่งมีการศึกษารูปร่าง การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การทดสอบแคตาเลส และการทดสอบเมทิลเรด จึงได้นำ *Salmonella enteritidis* มาทำการทดสอบเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้น จากการทดลองพบว่า *Salmonella enteritidis* มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของซาฟานินเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีการเคลื่อนที่ สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส และสามารถสร้างกรดได้ ซึ่งผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.13 และภาพจากการทดสอบแสดงดังภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.13 ผลจากการทดลองคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Salmonella enteritidis* DMST 10633

การทดสอบ	ผลจากโปรแกรม	ผลจากการทดลอง
รูปร่าง	ไม่มีผลระบุในโปรแกรม	ท่อนสั้น
การเคลื่อนที่	ไม่มีผลระบุในโปรแกรม	เคลื่อนที่
การติดสีแกรม	ไม่มีผลระบุในโปรแกรม	ลบ
Catalase Test	ไม่มีผลระบุในโปรแกรม	+
MR Test	ไม่มีผลระบุในโปรแกรม	+

12. *Salmonella lexington* DMST 4412

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรียตามข้อมูลในโปรแกรม FBI dent เวอร์ชั่น 1.0 พบว่า *Salmonella lexington* ไม่มีข้อมูลในโปรแกรม แต่ในโปรแกรมจะมีข้อมูลของ Salmonella สปีชีส์อื่น ซึ่งมีการศึกษารูปร่าง การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การทดสอบแคตาเลส และการทดสอบเมทิลเรด จึงได้นำ *Salmonella lexington* มาทำการทดสอบเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้น จากการทดลองพบว่า *Salmonella lexington* มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของซาฟานินเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีการเคลื่อนที่ สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส และสามารถสร้างกรดได้ ซึ่งผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.14 และภาพจากการทดสอบแสดงดังภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.14 ผลจากการทดลองคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Salmonella lexington* DMST 4412

การทดสอบ	ผลจากโปรแกรม	ผลจากการทดลอง
รูปร่าง	ไม่มีผลระบุในโปรแกรม	ท่อนสั้น
การเคลื่อนที่	ไม่มีผลระบุในโปรแกรม	เคลื่อนที่
การติดสีแกรม	ไม่มีผลระบุในโปรแกรม	ลบ
Catalase Test	ไม่มีผลระบุในโปรแกรม	+
MR Test	ไม่มีผลระบุในโปรแกรม	+

13. *Serratia* sp.

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรียตามข้อมูลในโปรแกรม FBI dent เวอร์ชั่น 1.0 พบว่า *Serratia* sp. มีการศึกษารูปร่าง การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การทดสอบแคตาเลส และความสามารถในการย่อยอาร์จินิน จากการทดลองพบว่า *Serratia* sp. มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของซาฟานินเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีการเคลื่อนที่ สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส และไม่สามารถย่อยอาร์จินิน ซึ่งจากการทดลองผลที่ได้ตรงกับข้อมูลที่มีในโปรแกรมแสดงดังตารางที่ 4.15 และภาพจากการทดสอบแสดงดังภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.15 เปรียบเทียบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Serratia* sp. ระหว่างผลจากโปรแกรมและผลจากการทดลอง

การทดสอบ	ผลจากโปรแกรม	ผลจากการทดลอง
รูปร่าง	ท่อน	ท่อนสั้น
การเคลื่อนที่	เคลื่อนที่	เคลื่อนที่
การติดสีแกรม	ลบ	ลบ
Catalase Test	+	+
Arginine Dihydrolase Test	-	-

14. *Shigella sonnei*

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรียตามข้อมูลในโปรแกรม FBI dent เวอร์ชั่น 1.0 พบว่า *Shigella sonnei* มีการศึกษารูปร่าง การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การทดสอบแคตาเลส ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท และการทดสอบเมทิลคาร์บินอล จากการทดลองพบว่า *Shigella sonnei* มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของซาฟานินเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีการเคลื่อนที่ สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส สามารถรีดิวซ์ไนเตรท และไม่สามารถผลิตอะซิโตอิน ซึ่งจากการทดลองผลที่ได้ตรงกับข้อมูลที่มีในโปรแกรมแสดงดังตารางที่ 4.16 และภาพจากการทดสอบแสดงดังภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.16 เปรียบเทียบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Shigella sonnei* ระหว่างผลจากโปรแกรมและผลจากการทดลอง

การทดสอบ	**ผลจากโปรแกรม**	**ผลจากการทดลอง**
รูปร่าง	ท่อน	ท่อนสั้น
การเคลื่อนที่	ไม่เคลื่อนที่	ไม่เคลื่อนที่
การติดสีแกรม	ลบ	ลบ
Catalase Test	+	+
Nitrate Reduction Test	+	+
VP Test	-	-

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเพื่อทำการประเมินผลของโปรแกรม FBIdent เวอร์ชัน 1.0 โดยใช้แบคทีเรียแกรมลบทั้งหมด 14 ชนิด พบว่า 1. *Aeromonas caviae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นท่อนปลายมน สามารถเคลื่อนที่ได้ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส มีความสามารถในการย่อยอาร์จินิน และมีความสามารถในการย่อยเจลาตินได้ 2. *Edwardsiella tarda* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นท่อนตรงยาว สามารถเคลื่อนที่ได้ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส ไม่มีความสามารถในการใช้ซิเตรท และมีความสามารถในการสร้างอินโดล 3. *Enterobacter intermedius* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น สามารถเคลื่อนที่ได้ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส ไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ดีอะมิเนส และไม่มีความสามารถในการสร้างอินโดล 4. *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น สามารถเคลื่อนที่ได้ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส มีความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท และไม่มีความสามารถในการสร้างอะซิโตอิน 5. *Hafnia alvei* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น สามารถเคลื่อนที่ได้ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส ไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ดีอะมิเนส และไม่มีความสามารถในการสร้างอินโดล 6. *Klebsiella pneumoniae* DMST 8216 เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ไม่สามารถเคลื่อนได้ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส ไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ดีอะมิเนส และไม่มีความสามารถในการสร้างอินโดล 7. *Morganella morganii* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น สามารถเคลื่อนที่ได้ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส และมีความสามารถในการสร้างอินโดล 8. *Providencia rettgeri* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น สามารถเคลื่อนที่ได้ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส และมีความสามารถในการสร้างอินโดล 9. *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นท่อนตรงยาวหรือโค้งเล็กน้อย สามารถเคลื่อนได้ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส และมีความสามารถในการใช้ดีกลูโคส 10. *Salmonella anotum* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น สามารถเคลื่อนที่ได้ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส และมีความสามารถในการสร้างกรด

11. *Salmonella enteritidis* DMST 10633 เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น สามารถเคลื่อนที่ได้ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส และมีความสามารถในการสร้างกรด 12. *Salmonella lexington* DMST 4412 เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น สามารถเคลื่อนได้ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส และมีความสามารถในการสร้างกรด 13. *Serratia* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น สามารถเคลื่อนที่ได้ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส และไม่มีความสามารถในการย่อยอาร์จินิน 14. *Shigella sonnei* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ไม่สามารถเคลื่อนได้ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส และมีความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท จากการทดสอบลักษณะทางสัญฐานวิทยาและทางชีวเคมีพบว่ามีเพียง 2 การทดสอบที่มีผลไม่ตรงกับผลของโปรแกรม คือ การทดสอบการเคลื่อนที่ของ *Morganella morganii* พบว่าเชื้อนี้สามารถเคลื่อนที่ได้ ขณะที่ข้อมูลจากโปรแกรมแสดงผลว่าไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสของเชื้อ *Providencia rettgeri* จากการทดสอบพบว่าเชื้อนี้มีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ยูรีเอส ขณะที่ข้อมูลจากโปรแกรมแสดงผลว่าไม่มีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ยูรีเอส และจากการค้นคว้าเพิ่มเติมจากหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974) พบว่าทั้ง *Morganella morganii* สามารถเคลื่อนที่ได้ และ *Providencia rettgeri* สามารถการสร้างเอ็นไซม์ยูรีเอส ซึ่งตรงกับผลจากการทดสอบ สำหรับเชื้อ *Salmonella anotum, Salmonella enteritidis* และ *Salmonella lexington* ไม่มีข้อมูลในโปรแกรม แต่ได้นำเชื้อเหล่านี้มาทำการทดสอบตามข้อมูลที่มีในโปรแกรมโดยใช้ *Salmonella* sp. ผลการทดสอบให้ข้อมูลตรงกับในโปรแกรม แต่ถ้าต้องการจัดจำแนกลงถึงสปีชีส์จะต้องมีการทดสอบเพิ่มเติมจากข้อมูลที่มีในโปรแกรม ถึงจะจัดจำแนกได้ว่าเป็น Salmonella สปีชีส์ใด

ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการทดสอบและการค้นคว้าเอกสารเพิ่มเติมจะได้นำไปปรับปรุงแก้ไขข้อมูลในโปรแกรม FBIdent เวอร์ชัน 1.0 ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากกว่าเดิมเพื่อให้สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ได้จริง

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาลักษณะการเจริญ การติดสีแกรมและการทดสอบทางชีวเคมีควรใช้เชื้อที่มีอายุระหว่าง 18- 24 ชั่วโมง ซึ่งจะให้ผลการทดสอบที่เห็นผลชัดเจน

2. ในการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ควรบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อให้เชื้อมีการเจริญได้ดีก่อนนำมาทำการทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

กนกรัตน์ ศิริพานิชกร. 2541. *โรคติดเชื้อ*. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณะสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ: บริษัทโอลิสติก พับลิชชิ่ง จำกัด.

คมรัชกร ราชสมบัติ. 2548. *การพัฒนาฐานข้อมูลแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหาร*. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เจษฎา อินทุเศรษฐ. 2540. [Online] Available : www.fisheries.go.th/DOF_THAI/Division/Health_new/ aahri-new/thai/newsletter_th/Y_07_V_1.htm - 30k -

ชวาล จิตติเดชารักษ์ . 2550. [Online] Available : http://www.thnanocare.com/page3.html

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. *จุลชีววิทยาทั่วไป* . พิมพ์ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นันทนา อรุณฤกษ์ . 2537 . *การจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์* . พิมพ์ครั้งที่ 1 . ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา . สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ . กรุงเทพฯ

ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย. 2547 . *การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรัมบวกและกรัมลบ* . พิมพ์ครั้งที่ 1 . สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย . กรุงเทพฯ

สมหวัง ด่านชัยวิจิตร.2539. *แนวทางในการป้องกันการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะจากการสวนปัสสาวะ*. วิธีการป้องกันโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล. พิมพ์ครั้งที่ 2 . กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์เรือนแก้วการพิมพ์ : หน้า 175-197.

สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์. 2544. แบคทีเรีย. [Online] Available : http://www.tistr.or.th/t/publication/page_area_show_bc.asp?i1=81&i2=4

อรทัย . 2550 .โลกของไบโอเทคโนโลยี. [Online] Available : http://crazybioz.spaces.live.com/ blog/cns!DDCD0956568521AC!111.entry

นิรนาม. 2550. [Online] Available : http://cyberlab.lh1.ku.ac.th/elearn/faculty/aid/id77/chicken/chicken1.htm

Anonymous. 2001. [Online] Available : student.ccbcmd.edu/.../bacpath/u1fig8a.html

Anonymous. 2004. [Online] Available : National Food Institute Thailand http://www.gogi-foods.com/index

Anonymous A. 2007. [Online] Available : www.esa.int/esaHS/SEMQRH7LURE_iss_3.html

Anonymous B. 2007. [Online] Available : www.cehs.siu.edu/fix/medmicro/genmicr.htm

Basilio J. Ania. 2007. [Online] Available : http://en.wikipedia.org/wiki/Serratia

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology .1974.

Sharp. 2008. [Online] Available : http://www.sharp-th.com/th/th-news-sh.php?id=55&new_id=1

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็งนิวเตรียนท์ (Nutrient Agar)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเหลวนิวเตรียนท์ (Nutrient Broth)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility Test Medium)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone or gelysate	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 7.4±0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5-8 องศาเซลเซียส การนำมาใช้ ให้นำมาหลอมละลายในน้ำเดือด และปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จึงนำมาเติม 2 , 3 , 5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เทใส่หลอดทดลองฝาเกลียว ปริมาตรหลอดละ 8 มิลลิลิตร

4. อาหารเหลวทริปโตน (Tryptone Broth)

Tryptone หรือ trypticase	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 6.9 ± 0.2 เทใส่หลอดทดลองฝาเกลียว ปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารซิมมอนส์ซิเตรต (Simmon's Citrate Agar)

$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$(NH_4)H_2PO_4$	1.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
Sodium Citrate	2.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Bromothymol blue	0.08	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารเอ็มอาร์–วีพี (MR–VP Medium)

Buffer peptone	0.7	กรัม
K_2HP0_4	0.5	กรัม
Glucose	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 6.9 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. อาหารเหลวยูเรีย (Urea Broth)

Urea	20.0	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Monopotassium phosphate	2	กรัม
Phenol red	0.012	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ยกเว้น Urea ปรับ pH 6.8±0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ส่วน Urea ให้นำมาฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำมาผสมรวมกัน เทอาหารลงในหลอดทดลองฝาเกลียวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตรหลอดละ 1.5-3.0 มิลลิลิตร

8. อาหารเหลว Utilization test medium

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
แหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบ	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ต้มส่วนผสมทั้งหมดจนละลาย แล้วเติม Bromthymol blue 1.6 % 4 มิลลิลิตร เตรียมอาหารใส่หลอดทดลองฝาเกลียว ปริมาตรหลอดละ 6 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที ยกออกมาแช่ในน้ำเย็น ทั้งนี้เพื่อป้องกันน้ำตาลแตกตัว เพราะจะเสียคุณสมบัติของน้ำตาลแต่ละชนิดไป

9. อาหาร Nutrient gelatin

Gelatin	40.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม

Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10. อาหาร Arginine broth (Thornley's)

L(+) Arginine HCl (หลอดเปรียบเทียบไม่ต้องเติม)	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
K_2HPO_4	0.3	กรัม
Phenol red	0.01	กรัม
Agar	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมด แล้วปรับ pH เป็น 7.2±0.1 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

11. อาหาร Phenylalanine Deaminase Agar

Yeast extract	3	กรัม
L-Phenylalanine or	1	กรัม
DL-Phenylalanine	2	กรัม
Na_2HPO_4	2	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	2	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

12. อาหาร Nitrate broth

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Potassium nitrate	1	กรัม
น้ำกลั่น	1	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. สารละลายแอมโมเนียมออกซาเลตคริสตอลไวโอเล็ต (Amonium oxalate crystal violet solution)

สารละลาย ก

คริสตอลไวโอเล็ต	3.0	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95%	20.0	มิลลิลิตร

สารละลาย ข

แอมโมเนียมออกซาเลต	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย ก และ ข เข้าด้วยกัน กรองก่อนนำไปใช้

2. สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine solution)

ไอโอดีนคริสตอล	1.0	กรัม
โพแทสเซียมไอโอไดด์	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

ละลายไอโอดีนและโพแทสเซียมไอโอไดด์ในน้ำกลั่นปริมาณน้อยๆ ก่อน แล้วเติมน้ำให้ครบแล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

3. สารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Ethyl Alcohol)

เอทิลแอลกอฮอล์ 95%	400.0	มิลลิลิตร
อะซีโตน	300.0	มิลลิลิตร

4. สารละลายซาฟรานิน (Safranin solution)

ซาฟรานิน	0.25	มิลลิลิตร
เอทิลแอลกอฮอล์ 95%	20.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลายซาฟรานินด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ เติมน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน กรองก่อนนำไปใช้

5. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (3 % H_2O_2)

H_2O_2	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย H_2O_2 ในน้ำกลั่นเก็บใส่ขวดสีชา

6. สารละลายเมทิลเรด (Methyl red reagent)

Methyl red	0.8	กรัม
Ethanol 95%	300.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	200.0	มิลลิลิตร

ละลาย Methyl red ใน Ethanol 95% แล้วจึงเติมน้ำกลั่น

7. สารละลายโคแวคส์ (Kovac's reagent)

P-dimethylaminobenzaldehyde	10.0	กรัม
Alcohol	150.0	มิลลิลิตร
HCl conc.	50.0	มิลลิลิตร

ละลาย P-dimethylaminobenzaldehyde ในแอลกอฮอล์ โดยทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส จนกระทั่งละลายหมด ปล่อยให้เย็น เติม HCL conc. ช้าๆ เก็บในขวดหยดสีชาและเอาไว้ในตู้เย็น สารทดสอบควรมีสีเหลืองอ่อน

8. สารละลายแอลฟาแนฟทอล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (5% α-naphthol solution)

α-napthylamine	0.5	กรัม
Acetic acid 5 N	100.0	มิลลิลิตร

เตรียม Acetic acid 5 N โดยเท acetic acid 17.4 N ลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้น ละลาย α-napthylamine 0.5 กรัม ใน Acetic acid 5 N 100 มิลลิลิตร

9. สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (40% KOH)

KOH	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย KOH ในน้ำกลั่นแล้วเก็บใส่ขวดสีชา

10. Salfanilic acid solution

Salfanilic acid	0.8	กรัม
Acetic acid 5 N	100.0	มิลลิลิตร

เตรียม Acetic acid 5 N โดยเท acetic acid 17.4 N ลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้น ละลาย Salfanilic acid 0.8 กรัม ใน Acetic acid 5 N 100 มิลลิลิตร

11. สารละลาย Ferric chloride

Ferric chloride	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย Ferric chloride ในน้ำกลั่น เก็บใส่ขวดสีชา

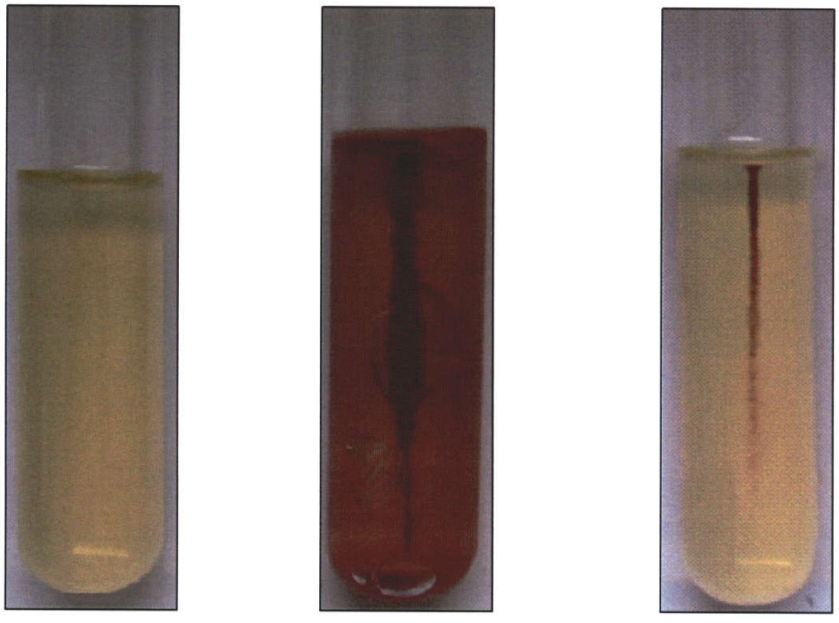
12. Bromthymol blue 1.6 %

Bromthymol blue	1.6	กรัม
Ethyl alcohol	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย Bromthymol blue ใน Ethyl alcohol เก็บใส่ขวดสีชา

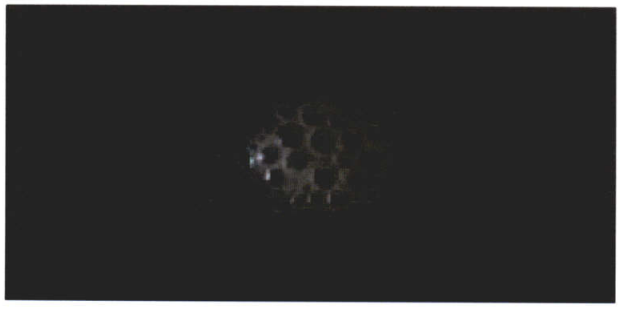
ภาคผนวก ค

1. การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility Test)



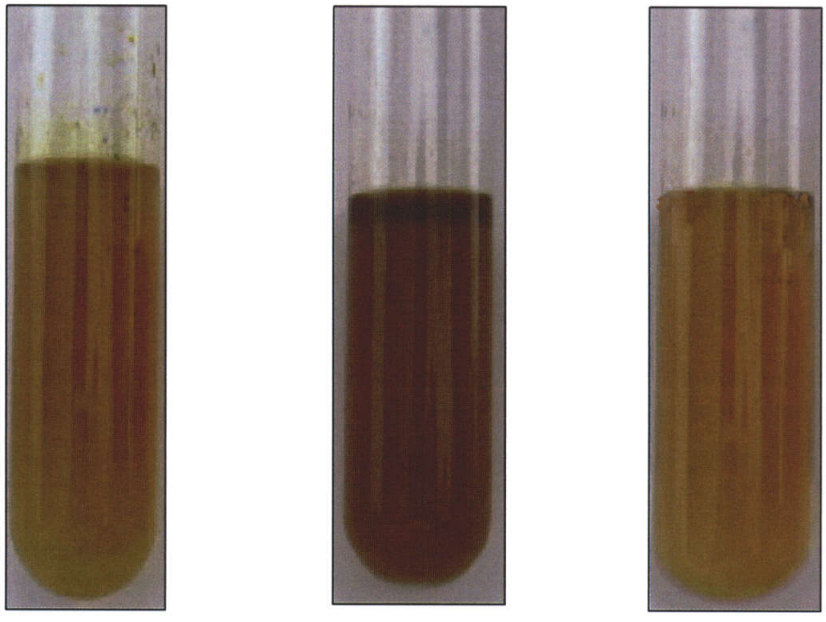
Control **Positive** **Negative**

2. การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส (Catalase Test)



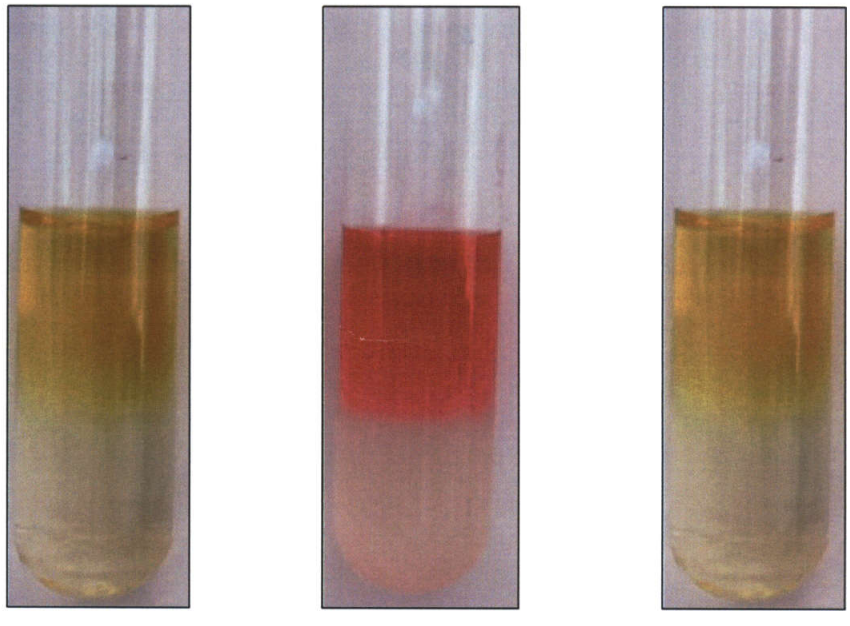
Positive

3. การทดสอบความสามารถในการสร้างอินโดล (Indole Test)



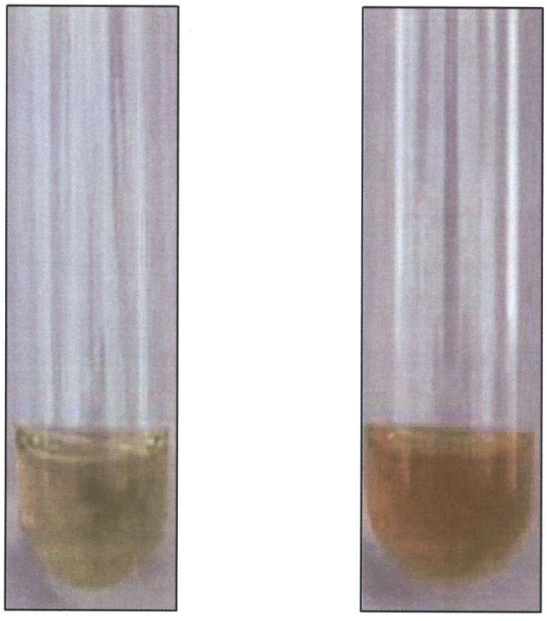
Control **Positive** **Negative**

4. การทดสอบเมทิลเรด (Methyl Red Test)



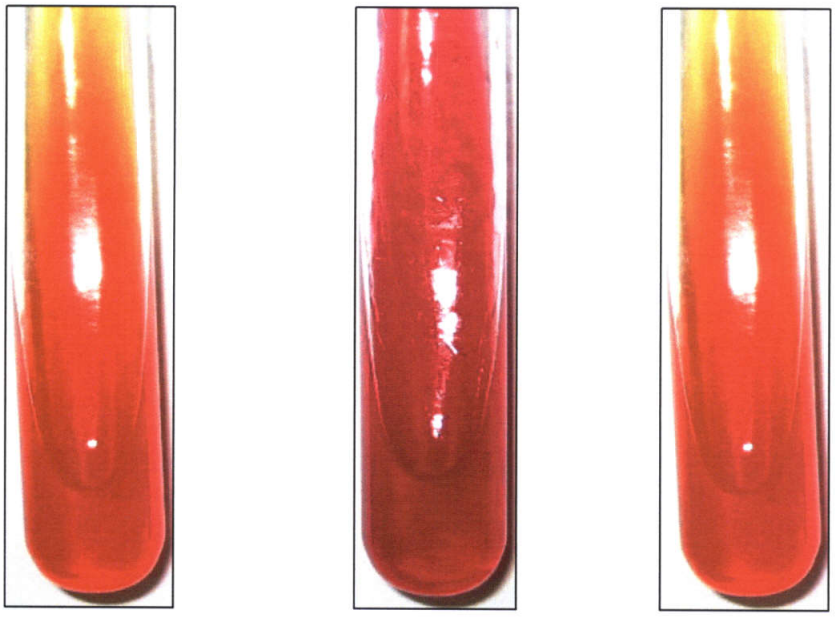
Control **Positive** **Negative**

5. การทดสอบเมทิลคาร์บินอล (Voges Proskauer Test)



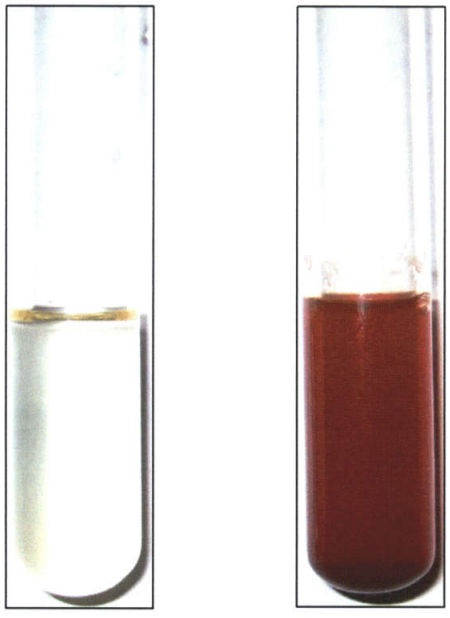
Control **Negative**

6. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (Urease Test)



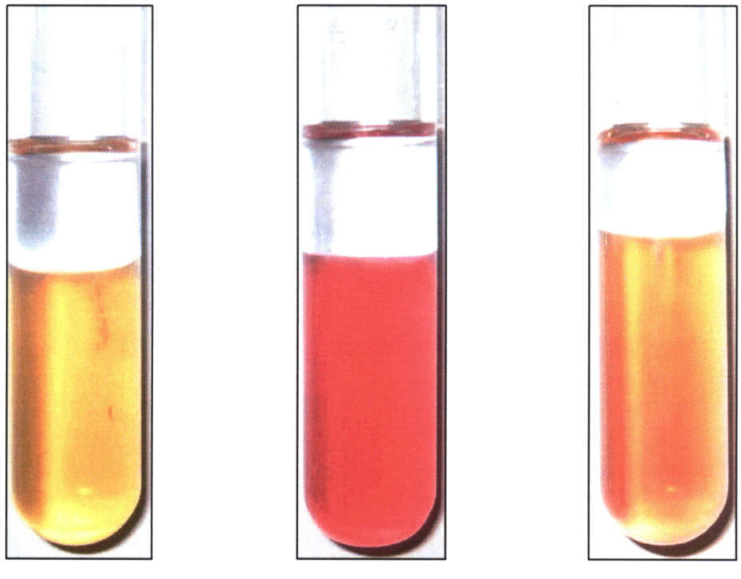
Control **Positive** **Negative**

7. การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท (Nitrate Reduction Test)



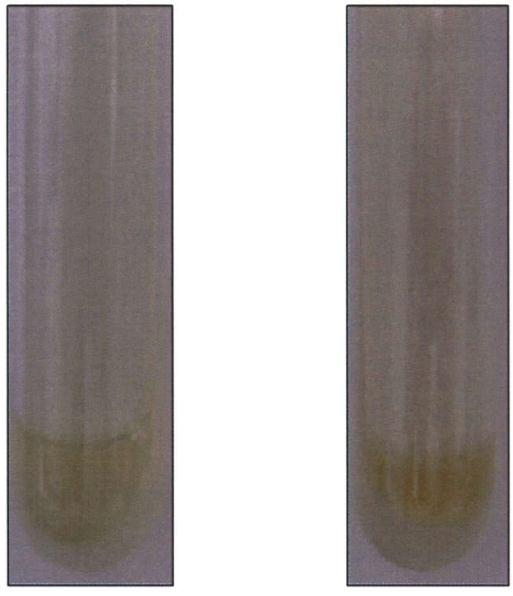
Control **Positive**

8. การทดสอบความสามารถในการย่อยอาร์จินิน (Arginine Dihydrolase Test)



Control **Positive** **Negative**

9. การทดสอบดีอะมิเนส (Deaminase Test)

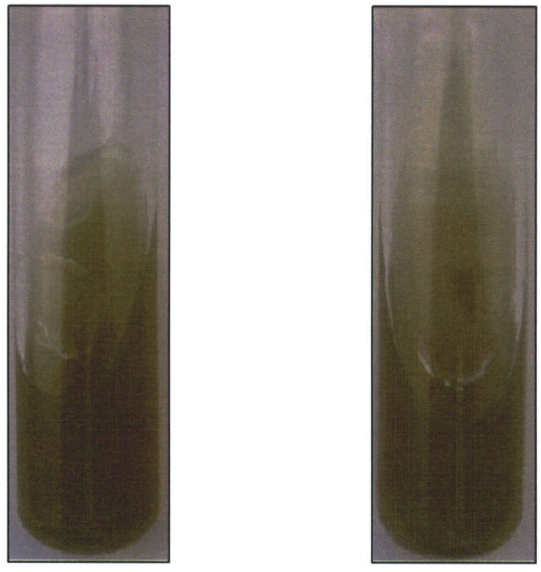


Control **Negative**

10. การทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน (Gelatin Hydrolysis Test)

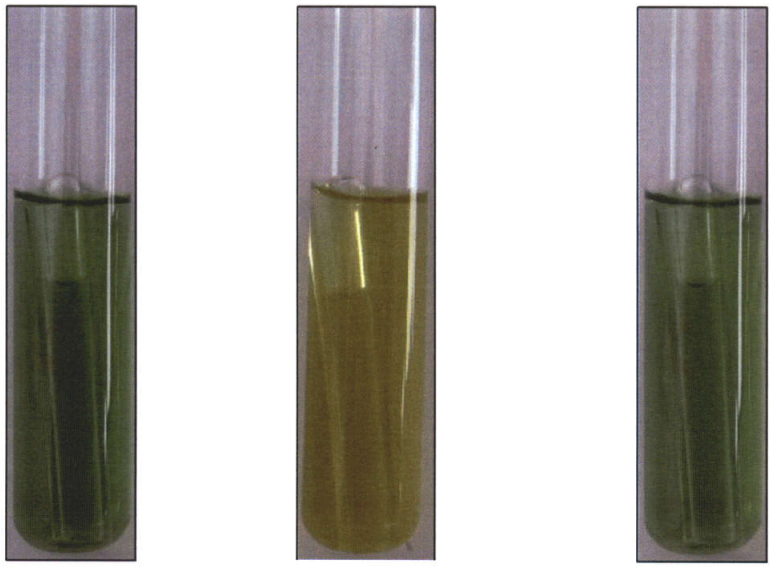
Control **Positive**

11. การทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรท (Citrate Utilization Test)



Control **Negative**

12. การทดสอบความสามารถในการใช้ น้ำตาลดี-กูลโคส (Utilization of Glucose)



Control **Positive** **Negative**