สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การประเมินผลของโปรแกรมที่ช่วยในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ; ส่วนที่ 2 แบคทีเรียแกรมบวก

นางสาวกรกช ชมะรัตน์

นางสาวอังคณา เจริญพรวรนาม

ปว
ก1521
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....83981
วัน,เดือน,ปี.....23 ก.ย. 2551

b.....11983334.....
i.....

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Evaluation of Software to Facilitate Identification of Foodborn Bacteria ; Part II Gram Positive Bacteria

Miss Korakoch Chamarat

Miss Angkana Charoenpornvoranam

A Special Project Submitted 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การประเมินผลของโปรแกรมที่ช่วยในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ส่วนที่ 2 แบคทีเรียแกรมบวก

นักศึกษา กรกช ชมะรัตน์ รหัส 47050111

อังคณา เจริญพรวรนาม รหัส 47050175

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การประเมินผลของโปรแกรมที่ช่วยในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ; ส่วนที่ 2 แบคทีเรียแกรมบวก
นักศึกษา	นางสาวกรกช ชมะรัตน์ รหัสนักศึกษา 47050111
	นางสาวอังคณา เจริญพรวรนาม รหัสนักศึกษา 47050175
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	พ.ศ. 2550
อาจารย์ผู้ควบคุมโครงงานพิเศษ	รศ.ดวงใจ โอชัยกุล
	ผศ.ดร.สาวิตรี วทัญญูไพศาล

บทคัดย่อ

ได้มีการนำแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 9 ชนิดที่มีอยู่ในโปรแกรม FBIdent เวอร์ชั่น 1.0 มาทดสอบคุณสมบัติพื้นฐานและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ได้แก่ การย้อมแกรมเพื่อศึกษาการติดสีแกรมและรูปร่างของจุลินทรีย์ การทดสอบการเคลื่อนที่ การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดส การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเทรต การทดสอบความสามารถในการย่อยอาร์จินีน การทดสอบความสามารถในการสร้างอินโดล การทดสอบความสามารถในการใช้เซลโลไบโอส การทดสอบความสามารถในการผลิตแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส การทดสอบความสามารถในการผลิตกรดจากน้ำตาลกลูโคส การทดสอบความสามารถในการผลิตกรดจากน้ำตาลดีไซโลส และการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดจากน้ำตาลแมนนิทอล เพื่อศึกษาผลของเชื้อแบคทีเรียที่มีผลต่อการทดสอบทางชีวเคมีต่างๆ และเมื่อนำผลการทดสอบที่ได้นี้เปรียบเทียบกับข้อมูลในโปรแกรม FBIdent เวอร์ชั่น 1.0 เมื่อเลือกกรณีทราบชื่อสกุลแบคทีเรีย พบว่าผลการทดสอบที่ได้ตรงกับผลในโปรแกรม ภาพที่ได้จากการทดสอบนำไปบันทึกเพิ่มเติมลงในโปรแกรม เพื่อให้โปรแกรมมีความสมบูรณ์มากขึ้น โดยถือเป็นการพัฒนาโปรแกรมเพื่อให้เหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา อีกทั้งยังเป็นแนวทางในการพัฒนาฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์กลุ่มอื่นต่อไปในอนาคตอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Evaluation of Software to Facilitate Identification of Foodborn Bacteria; Part II Gram Positive Bacteria	
Student	Miss Korakoch Chamarat	Student ID. 47050111
	Miss Angkana Charoenpornvoranam	Student ID. 47050175
Program	Biotechnology	
Department	Applied Biology	
Academic Year	2007	
Seminar Advisor	Assoc.Prof. Duangjai Ochaikul	
Seminar Co-Advisor	Asst.Prof.Dr. Savitri Vatanyoopaisarn	

ABSTRACT

Nine strains of Gram positive bacteria which appears in FBI dent version 1.0 were selected to study morphology and biochemical tests . The tests were carried out according to the advice in the software on the menu of "the species are known". The tests done in this project were Gram staining , motility test , catalase test , oxidase test , nitrate reduction test , arginine dihydrolase test , indole test , utilize of cellobiose , gas production from glucose , acid production from glucose , acid production from D-xylose and acid production from mannitol . The results from all test when compared to what suggest in FBI dent version 1.0 were match . Photographs taken from the results were put into this program in order to make program more complete . This special project improved FBI dent version 1.0 program which can be used in a small micro-biological laboratory . It was also an appoarch to develope the data base of the other microorganisms in the future.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีอันเนื่องมาจากคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทางภาควิชาหลายท่าน ดังนั้นคณะผู้จัดทำจึงขอขอบคุณ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล และ ผศ. ดร. สาวิตรี วทัญญูไพศาล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขในการทำโครงงานพิเศษ และขอขอบคุณ รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง ประธานกรรมการที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขให้โครงงานพิเศษมีความสมบูรณ์มากขึ้น อีกทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษให้เสร็จสมบูรณ์

คณะผู้จัดทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	ก
สารบัญรูปภาพ	ง
สารบัญตาราง	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	6
2.1 โปรแกรม FBIdent เวอร์ชั่น 1.0	6
2.4.1 อนุกรมวิธาน	6
2.4.2 การตรวจสอบ	8
2.2 การตรวจสอบหาชนิด (Identification)	14
2.3 เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิดต่างๆ	15
2.3.1 *Bacillus cereus* DMST 5040	15
2.3.2 *Bacillus coagulans* TISTR 17163	16
2.3.3 *Bacillus subtilis* TISTR 6633	17
2.3.4 *Lactobacillus casei* TISTR 390	17
2.3.5 *Lactobacillus lactis* TISTR 1401	18
2.3.6 *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053	18
2.3.7 *Listeria monocytogenes* DMST 11256	19
2.3.8 *Pediococcus halophilus* TISTR 429	19
2.3.9 *Staphylococcus aureus* TISTR 25923	20
2.4 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี	21
2.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	21
2.4.2 การศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.3 การติดสีแกรม	21
2.4.4 การทดสอบแคตาเลส (Catalase Test)	22
2.4.5 การทดสอบออกซิเดส (Oxidase Test)	22
2.4.6 การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท (Nitrate reduction Test)	23
2.4.7 การทดสอบการย่อยอาร์จินีน (Arginine dihydrolase Test)	24
2.4.8 การทดสอบอินโดล (Indole Test)	24
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการทดลอง	26
3.1 เชื้อจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ	26
3.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ	26
3.3 วิธีการทดลอง	27
3.3.1 การทำเชื้อให้บริสุทธิ์	27
3.3.2 การจัดจำแนกจุลินทรีย์	28
3.4 การประเมินผลการทดสอบการใช้โปรแกรม	30
บทที่ 4 ผลการทดลอง	31
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	31
4.1.1 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรม	31
4.1.2 ลักษณะโคโลนี	34
4.2 การทดสอบทางชีวเคมี	36
4.2.1 *Bacillus cereus*	36
4.2.2 *Bacillus coagulans*	37
4.2.3 *Bacillus subtilis*	37
4.2.4 *Lactobacillus casei*	38
4.2.5 *Lactobacillus lactis*	39
4.2.6 *Leuconostoc mesenteroides*	39
4.2.7 *Listeria monocytogenes*	40
4.2.8 *Pediococcus halophilus*	41
4.2.8 *Staphylococcus aureus*	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	43
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก ก	46
ภาคผนวก ข	49
ภาคผนวก ค	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงการพิมพ์ค้นหา *Bacillus subtilis*	7
2.2	แสดงอนุกรมวิธานและลักษณะเฉพาะของ *Bacillus subtilis*	8
2.3	แสดงวิธีการตรวจสอบกรณีทราบว่าเป็น *Pseudomonas aeruginosa*	9
2.4	แสดงการตรวจสอบรูปร่างและการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย	10
2.5	แสดงขั้นตอนการตรวจสอบทางชีวเคมีแบบต่างๆ	11
2.6	แสดงตัวอย่างเมื่อเสร็จสิ้นการตรวจสอบ	12
2.7	แสดงตัวอย่างแบบฟอร์มสำหรับพิมพ์รายงานผลการตรวจสอบ	13
2.8	แสดงวิธีการใช้งานส่วนวิธีการทดสอบทางชีวเคมี	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงผลการย้อมแกรมของแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 9 ชนิด	31
4.2 แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อทดสอบ 9 ชนิด	34
4.3 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus cereus* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับโปรแกรม FBI dent V.1.0	37
4.4 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus coagulans* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับโปรแกรม FBI dent V.1.0	37
4.5 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus subtilis* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับโปรแกรม FBI dent V.1.0	38
4.6 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Lactobacillus casei* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับโปรแกรม FBI dent V.1.0	38
4.7 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Lactobacillus lactis* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับโปรแกรม FBI dent V.1.0	39
4.8 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับโปรแกรม FBI dent V.1.0	40
4.9 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Listeria monocytogenes* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับโปรแกรม FBI dent V.1.0	40
4.10 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Pediococcus halophilus* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับโปรแกรม FBI dent V.1.0	41
4.11 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับโปรแกรม FBI dent V.1.0	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

ในทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการนำเอาโปรแกรมคอมพิวเตอร์เข้ามาช่วยในการจัดเก็บข้อมูลของสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหน่วยงานด้านธนาคารชีวภาพ เพื่อช่วยให้ง่ายต่อการสืบค้นประวัติและคุณสมบัติของสิ่งมีชีวิตนั้น ระบบการจัดเก็บข้อมูลเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตด้วยคอมพิวเตอร์นี้ ถือได้ว่าเป็นส่วนหนึ่งของชีวสารสนเทศศาสตร์ (De Paoli, 2005)

การตรวจสอบจุลินทรีย์ตัวอย่างที่ได้จากแหล่งต่างๆ ยังคงมีความสำคัญมาจนถึงปัจจุบัน ทั้งในแง่การวินิจฉัยชนิดของเชื้อเพื่อใช้หาสาเหตุของโรค หรือเพื่อป้องกันอันตรายของการติดเชื้อ ชุดทดสอบแบบรวดเร็วที่จำหน่ายในปัจจุบัน ที่มีการยอมรับแพร่หลายมักนำเข้าจากต่างประเทศ มีทั้งยี่ห้อที่ใช้หลักการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี เช่น API system (บริษัท bioMerieux, France), Biolog system (บริษัท Biolog, USA) (Busse และคณะ, 1996) หรือการตรวจสอบโดยใช้ชนิดของกรดไขมันบนผนังเซลล์ MicroID system (บริษัท Warner-Lambert, USA) (Buyer,2002) ซึ่งนอกจากจะต้องใช้ชุดตรวจสอบจากบริษัทแล้วยังต้องซื้ออุปกรณ์เสริม ได้แก่ อุปกรณ์ช่วยในการอ่านผล (Microstation Reader) และซอฟแวร์ช่วยในการแปลผลประกอบ หรือกรณีการตรวจสอบสปีชีส์ด้วยกรดไขมันต้องมีแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatrography) ด้วย เป็นต้น ส่วนการตรวจสอบสารพันธุกรรม ต้องมีการใช้ไพรเมอร์ (primer) หรือ โพรบ (probe) ที่เหมาะสม จึงมักจะใช้กับการตรวจสอบเชื้อโรคที่มีการทำโพรบออกมาจำหน่ายแล้ว หรืองานที่ต้องการหาความสัมพันธ์ทาง phylogenetics มากกว่า (Busse และคณะ, 1996) แม้ว่าชุดตรวจสอบจะช่วยลดระยะเวลาในการตรวจสอบได้เร็วขึ้น เมื่อเทียบกับการใช้วิธีดั้งเดิม แต่ก็มีราคาสูงสำหรับห้องปฏิบัติการในประเทศส่วนใหญ่ รวมทั้งสถาบันอุดมศึกษา ที่มีงบประมาณจำกัด วิธีการดั้งเดิมที่ใช้ตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีในหลอดทดลอง และรูปร่างเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์จึงยังมีความสำคัญและยังใช้แพร่หลายในประเทศไทย

Bhodhipadma และคณะ (1996) ได้ใช้โปรแกรม CDS/ISIS version 3.07 ซึ่งเป็นโปรแกรมจัดการสารสนเทศในยุคแรกๆ ที่นิยมใช้กับการสืบค้นข้อมูลของห้องสมุดในมหาวิทยาลัยในประเทศไทย มาประยุกต์ใช้ในการเก็บข้อมูลสายพันธุ์แบคทีเรียบางกลุ่มที่ปรากฏอยู่ใน Bergy's Manual of Determinative Bacteriology 9th edition อย่างไรก็ตามเนื่องจาก CDS/ISIS รุ่นดังกล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สร้างให้ทำงานในระบบปฏิบัติการ DOS และจอเป็นแบบ monochrome ในขณะที่ Microsoft Window ยังไม่เป็นที่แพร่หลาย โปรแกรมประยุกต์นั้นจึงไม่สามารถใช้งานได้แล้วในปัจจุบัน

คมรัชกร ราชสมบัติ และคณะ (2548) ได้พัฒนาโปรแกรมช่วยในการตรวจสอบแบคทีเรียที่สำคัญในอาหารขึ้นใหม่เพื่อให้ทันสมัย โดยใช้หลักการเขียนโปรแกรมด้วย Visual Basic 6.0 และให้สามารถทำงานได้ในระบบปฏิบัติการของ Microsoft Window xp โดยจะได้รวบรวมฐานข้อมูลของวิธีตรวจสอบทางชีวเคมี และภาพถ่ายของลักษณะโคโลนีของเชื้อ การติดสีแกรม เพื่อให้สืบค้นง่าย ประหยัดเวลาในการสืบค้น โดยให้ผู้ใช้สามารถใช้วิธีการดั้งเดิมในการตรวจสอบ แล้วใช้โปรแกรมช่วยค้นหาชื่อจีนัสและสปีชีส์ จากผลการตรวจสอบทางชีวเคมี 5-10 การทดสอบ เพื่อลดระยะเวลาในการเทียบเอกสาร และเป็นแนวทางในการประหยัดการนำเข้าซอฟแวร์จากต่างประเทศ เนื่องจากโปรแกรมที่สร้างขึ้นนี้ยังไม่สมบูรณ์ จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้โปรแกรมมีความสมบูรณ์มากขึ้น โครงงานนี้จึงทำการประเมินผลการใช้โปรแกรมที่สร้างขึ้น โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการและนำแบคทีเรียเหล่านี้มาทดสอบผลทางชีวเคมีตามที่แนะนำไว้ในโปรแกรม เพื่อดูว่ามีความถูกต้องน่าเชื่อถือมากน้อยแค่ไหน

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อพัฒนาโปรแกรมที่ช่วยในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร (FBI dent Version 1.0) ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากขึ้น เหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาได้

1.2.2 เพื่อดูว่าโปรแกรมที่สร้างขึ้นมา (FBI dent Version 1.0) มีความถูกต้องมากน้อยเพียงใด

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นแกรมบวกบางตัวที่มีอยู่ในโปรแกรม ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรียแล้วมาทดสอบทางชีวเคมีและดูลักษณะรูปร่าง พร้อมทั้งบันทึกภาพเพื่อนำภาพที่ได้ไปลงในโปรแกรม เพื่อให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น และประเมินผลของโปรแกรมที่ช่วยในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารว่ามีความถูกต้องน่าเชื่อถือมากน้อยเพียงใด

โดยแบคทีเรียที่ทราบชื่อสกุลที่นำมาทดสอบและวิธีการทดสอบของเชื้อแต่ละสปีชีส์มีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.1 *Bacillus cereus* DMST 5040

- รูปร่าง
- การเคลื่อนที่
- การติดสีแกรม
- การทดสอบการรีดิวส์ไนเตรท (Nitrate reduction test)
- การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส (Acid production from glucose)
- การทดสอบการสร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส (Gas production from glucose)

1.3.2 *Bacillus coagulans* TISTR 17163

- รูปร่าง
- การเคลื่อนที่
- การติดสีแกรม
- การทดสอบการรีดิวส์ไนเตรท (Nitrate reduction test)
- การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส (Acid production from glucose)
- การทดสอบการสร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส (Gas production from glucose)

1.3.3 *Bacillus subtilis* TISTR 6633

- รูปร่าง
- การเคลื่อนที่
- การติดสีแกรม
- การทดสอบการรีดิวส์ไนเตรท (Nitrate reduction test)
- การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส (Acid production from glucose)
- การทดสอบการสร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส (Gas production from glucose)

1.3.4 *Lactobacillus casei* TISTR 390

- รูปร่าง
- การเคลื่อนที่
- การติดสีแกรม
- การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส (Acid production from glucose)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- การทดสอบการสร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส (Gas production from glucose)
- การทดสอบความสามารถในการใช้เซลโลไบโอส (Utilization of cellobiose)

1.3.5 *Lactobacillus lactis* TISTR 1401

- รูปร่าง
- การเคลื่อนที่
- การติดสีแกรม
- การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส (Acid production from glucose)
- การทดสอบการสร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส (Gas production from glucose)
- การทดสอบความสามารถในการใช้เซลโลไบโอส (Utilization of cellobiose)

1.3.6 *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053

- รูปร่าง
- การเคลื่อนที่
- การติดสีแกรม
- การทดสอบการใช้อาร์จีนีน (Arginine dihydrolase test)
- การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส (Catalase test)
- การทดสอบการสร้างอินโดล (Indole test)

1.3.7 *Listeria monocytogenes DMST 11256*

- รูปร่าง
- การเคลื่อนที่
- การติดสีแกรม
- การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส (Catalase test)
- การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส (Oxidase test)
- การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากแมนนิทอล (Acid production from mannitol)

1.3.8 *Pediococcus halophilus* TISTR 429

- รูปร่าง
- การเคลื่อนที่
- การติดสีแกรม
- การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส (Catalase test)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- การทดสอบการรีดิวส์ไนเตรท (Nitrate reduction test)
- การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส (Oxidase test)

1.3.9 *Staphylococcus aureus* TISTR 25923

- รูปร่าง
- การเคลื่อนที่
- การติดสีแกรม
- การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส (Catalase test)
- การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส (Oxidase test)
- การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาลดีไซโลส (Acid production from D-xylose)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพื่อเป็นแนวทางให้เกิดการวิจัยแบบบูรณาการโดยประยุกต์ใช้คอมพิวเตอร์ในการเพิ่มประสิทธิภาพให้กับงานทางจุลชีววิทยา

1.4.2 เป็นแนวทางในการพัฒนาฐานข้อมูล ที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 โปรแกรม FBIdent เวอร์ชั่น 1.0

โปรแกรม FBIdent เวอร์ชั่น 1.0 เป็นโปรแกรมจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมอาหาร ทั้งในด้านที่เป็นประโยชน์และโทษ โดยเน้นไปที่คุณสมบัติทางชีวเคมีที่สามารถปฏิบัติการและดูผลการทดสอบได้ง่าย สามารถจำแนกเชื้อได้ถึงระดับสปีชีส์(species) เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ในระดับเล็กจนถึงระดับกลาง

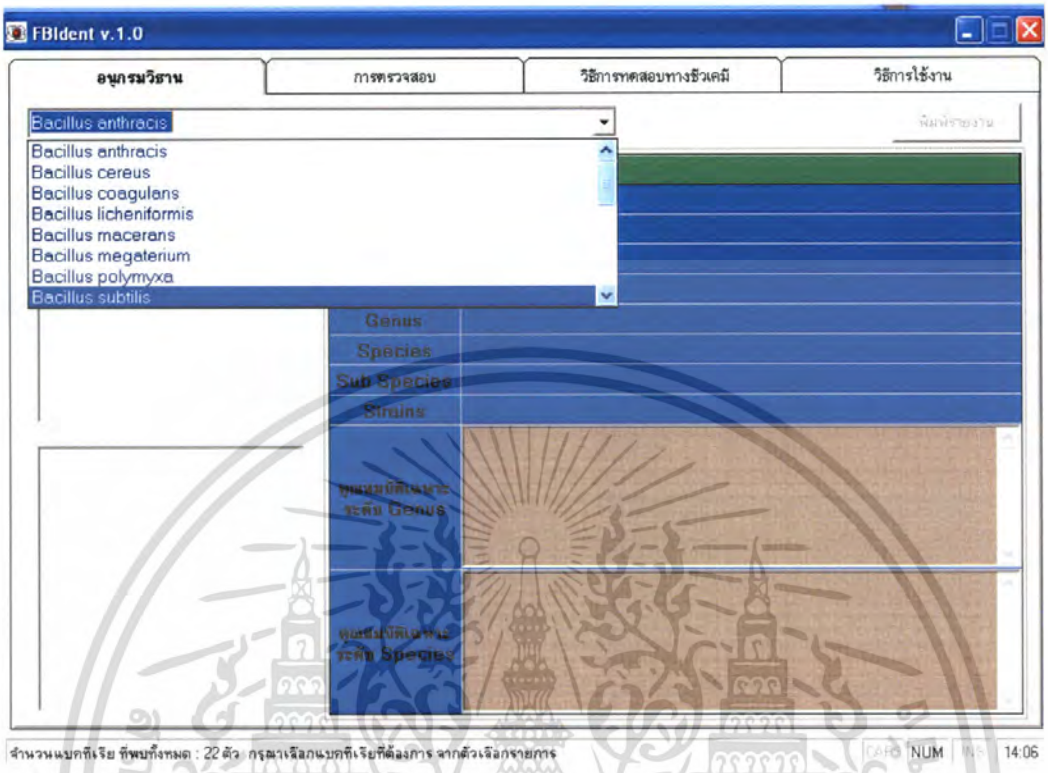
2.1.1 อนุกรมวิธาน

ส่วนนี้จะเป็นข้อมูลของแบคทีเรียที่มีความเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมอาหาร โดยจะแสดงชื่อไฟลัม (Phylum) คลาส (Class) ออร์เดอร์ (Order) แฟมิลี่ (Family) จีนัส (Genus) และ สปีชีส์ (Species) ของแบคทีเรียแต่ละชนิด รวมไปถึงรายละเอียดคุณสมบัติเฉพาะในระดับจีนัสและสปีชีส์ โดยจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ฉบับปรับปรุงครั้งที่ 9 ปีพุทธศักราช 2537

วิธีการใช้งานส่วนอนุกรมวิธาน

พิมพ์ชื่อจีนัส หรือสปีชีส์ของแบคทีเรียที่ต้องการทราบข้อมูล โดยอาจจะพิมพ์ทั้งหมด หรือบางส่วนของคำก็ได้ เช่น หากต้องการดูข้อมูลของ *Bacillus subtilis* อาจจะเลือกพิมพ์เฉพาะคำว่า bacillus หรือ subtilis หรือบางส่วนของคำเช่น bacill หรือ subti แล้วกดเอ็นเทอร์(enter) ที่คีย์บอร์ด (Keybord) โปรแกรมจะแสดงรายชื่อแบคทีเรียที่มีส่วนตรงกับคำที่พิมพ์ทั้งหมดออกมา หากมีตัวเดียวโปรแกรมจะแสดงผลทันที แต่หากคำที่พิมพ์นั้นไปพ้องกับชื่อแบคทีเรียอื่นอีกหลายชนิด สามารถเลือกดูได้ โดยกดที่แถบเมนูตัวเลือกทางขวามือของช่องที่พิมพ์ หรือกดปุ่มลูกศรขึ้นลงที่คีย์บอร์ดเพื่อเลือกแบคทีเรียที่ต้องการได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

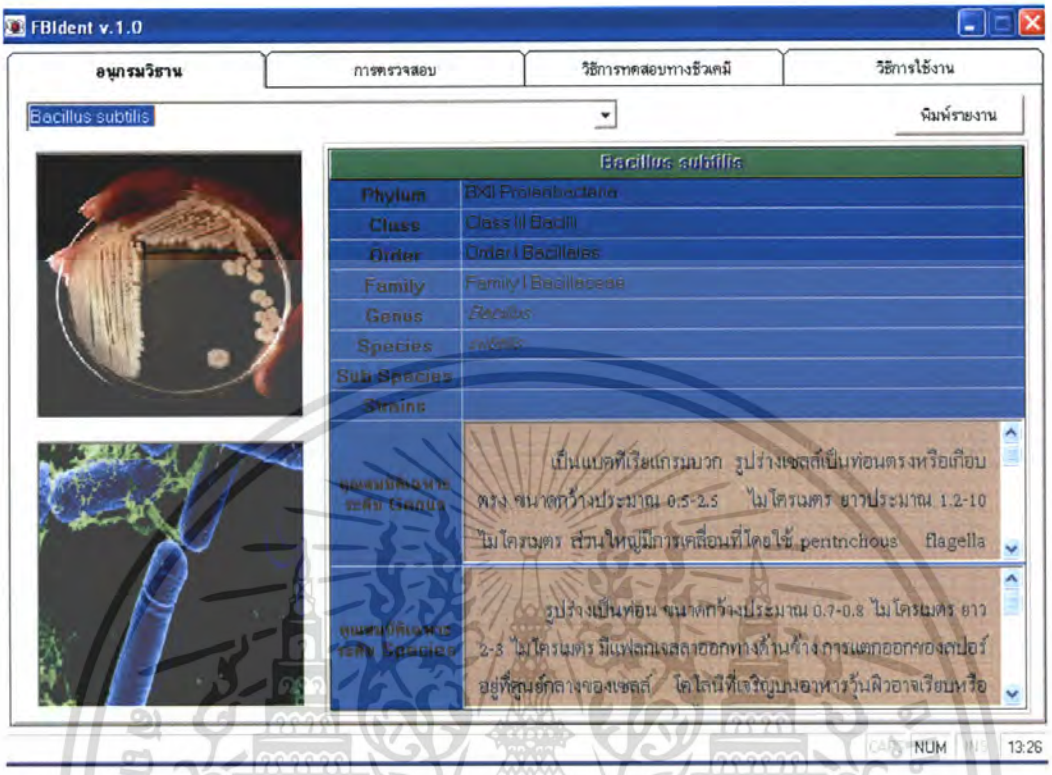


รูปที่ 2.1 แสดงการพิมพ์ค้นหา *Bacillus subtilis*

ที่มา : คมรัชกร (2548)

ตัวอย่างดังรูปที่ 2.1 แสดงการพิมพ์ค้นหาแบคทีเรีย โดยใช้คำว่า “Bacillus” โปรแกรมจะแสดงรายชื่อแบคทีเรียทั้งหมดที่มีคำว่า Bacillus เป็นส่วนประกอบของคำ ที่แถบสถานะด้านล่างของโปรแกรมจะขึ้นข้อความว่า “จำนวนแบคทีเรีย ที่พบทั้งหมด 22 ตัว : กรุณาเลือกแบคทีเรียที่ต้องการ จากตัวเลือกรายการ” หมายความว่ามีแบคทีเรียที่มีคำว่า Bacillus เป็นส่วนประกอบในชื่อทั้งหมด 22 ตัว สามารถเลือกตัวที่ต้องการได้โดยกดที่ชื่อแบคทีเรียจากตัวเลือกรายการ จากตัวอย่างเลือก *Bacillus subtilis* โปรแกรมจะแสดงผลข้อมูลของ *Bacillus subtilis* ออกมาดังรูปที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 แสดงอนุกรมวิธานและลักษณะเฉพาะของ *Bacillus subtilis*

ที่มา : คมรัชกร (2548)

ในส่วนของคุณสมบัติเฉพาะระดับจีนัสและสปีชีส์ หากรายระเอียดมีความยาวมากเกินกว่าที่จะแสดงผลในหน้าต่างที่กำหนดไว้ สามารถเลื่อนอ่านได้ โดยกดเลื่อนขึ้นหรือเลื่อนลงที่แถบเลื่อนทางขวามือ หรือกดที่ช่องคุณสมบัติที่ต้องการอ่าน 1 ครั้ง แล้วเลื่อนอ่านโดยใช้ปุ่มลูกศร

2.1.2 การตรวจสอบ

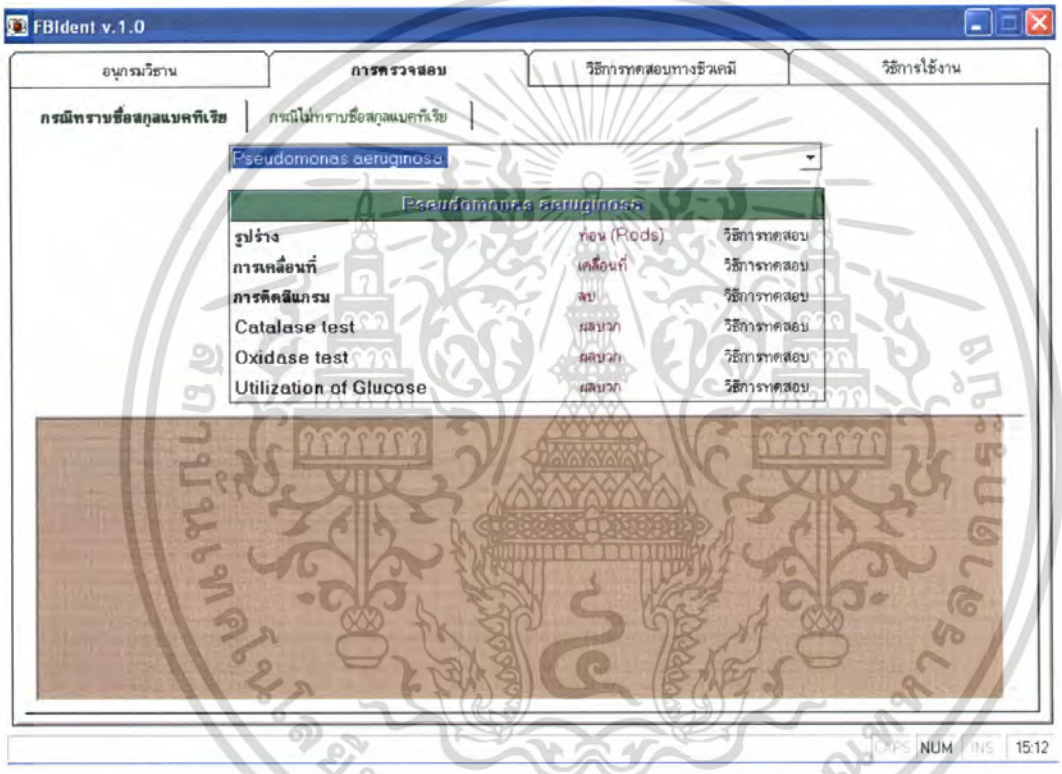
ส่วนนี้จะแบ่งออกเป็นอีก 2 ส่วนย่อยคือ กรณีที่ทราบชื่อสกุลแบคทีเรีย และกรณีที่ไม่ทราบชื่อสกุลแบคทีเรีย

2.1.2.1 วิธีการใช้งานส่วนการตรวจสอบ กรณีทราบชื่อสกุลแบคทีเรีย

เนื่องจากกรณีนี้เป็นกรณีที่ทราบชื่อสกุลแบคทีเรียแล้ว เพียงต้องการเพิ่มระดับความเชื่อมั่นว่าแบคทีเรียที่ได้มาน่าจะเป็นตัวที่ต้องการที่ใช้ในงานวิจัยจริงๆเท่านั้น การตรวจสอบจึงไม่จำเป็นต้องตรวจสอบทุกวิธี โดยโปรแกรมจะระบุวิธีการตรวจสอบให้ 6 วิธี ซึ่งแบ่งออกเป็นการตรวจสอบขั้นพื้นฐาน 3 วิธี (ประกอบไปด้วยการตรวจดูลักษณะรูปร่าง การเคลื่อนที่และการติดสีแกรมของแบคทีเรีย) และการตรวจสอบทางชีวเคมีอีก 3 วิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้งานในส่วนนี้ ให้ทำการพิมพ์ชื่อสกุลแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ ลงในช่องสำหรับกรอกข้อมูล แล้วกดเอ็นเทอร์ที่คีย์บอร์ด โปรแกรมจะแสดงวิธีการตรวจสอบแบคทีเรียออกมา 6 วิธี ตัวอย่างเช่น ต้องการตรวจสอบ *Pseudomonas aeruginosa* ให้พิมพ์คำว่า Pseudomonas aeruginosa ลงไปทั้งหมดแล้วกดเอ็นเทอร์ที่คีย์บอร์ด หรือพิมพ์บางส่วนของคำ เช่น Pseudo (ไม่จำเป็นต้องเป็นอักษรตัวใหญ่หรือเล็ก) แล้วกดเอ็นเทอร์ที่คีย์บอร์ดเพื่อไปเลือก *Pseudomonas aeruginosa* จากแถบตัวเลือกได้ ดังตัวอย่างจากรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แสดงวิธีการตรวจสอบกรณีทราบว่าเป็น *Pseudomonas aeruginosa*

ที่มา : คมรัชกร (2548)

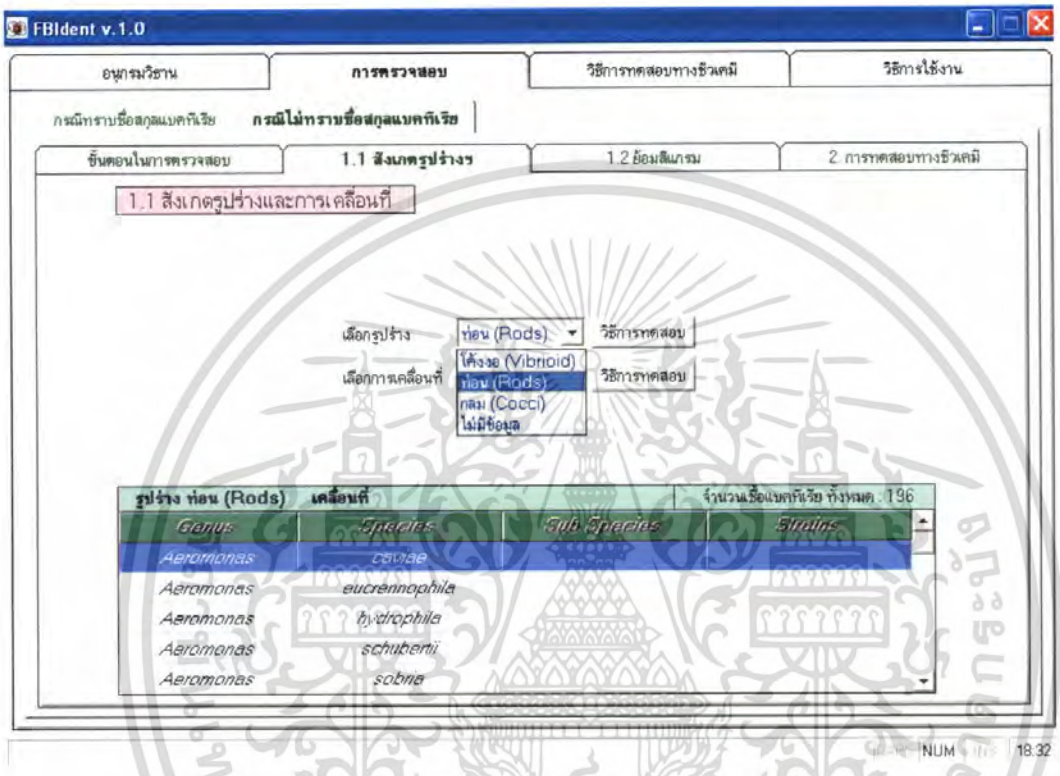
2.1.2.2 วิธีการใช้งานส่วนการตรวจสอบ กรณีไม่ทราบชื่อสกุลแบคทีเรีย

การตรวจสอบขั้นพื้นฐาน

ประกอบด้วยการสังเกตรูปร่าง การเคลื่อนที่ และการย้อมสีแกรม ซึ่งเป็นการตรวจดูทางกายภาพ สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า ในการสังเกตรูปร่างและการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย สามารถดูวิธีการทดสอบได้โดยการกดปุ่มวิธีการทดสอบ จากนั้นเลือกผลการทดสอบว่าเป็นแบบใด โดยรูปร่างของแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 3 แบบคือ แบบโค้งงอ (Vibrioid) แบบท่อน (Rods) และแบบกลม (Cocci) ซึ่งหากส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แล้วดูไม่ชัด หรือไม่แน่ใจว่ามีรูปร่างแบบใด

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถข้ามขั้นตอนนี้ หรือระบุว่า “ไม่มีข้อมูล” ได้ ส่วนการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียก็มี 2 แบบ คือ แบบเคลื่อนที่ และไม่เคลื่อนที่ หากไม่แน่ใจก็สามารถข้ามขั้นตอนนี้ หรือระบุว่า “ไม่มีข้อมูล” ได้เช่นเดียวกัน



รูปที่ 2.4 แสดงการตรวจสอบรูปร่างและการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย

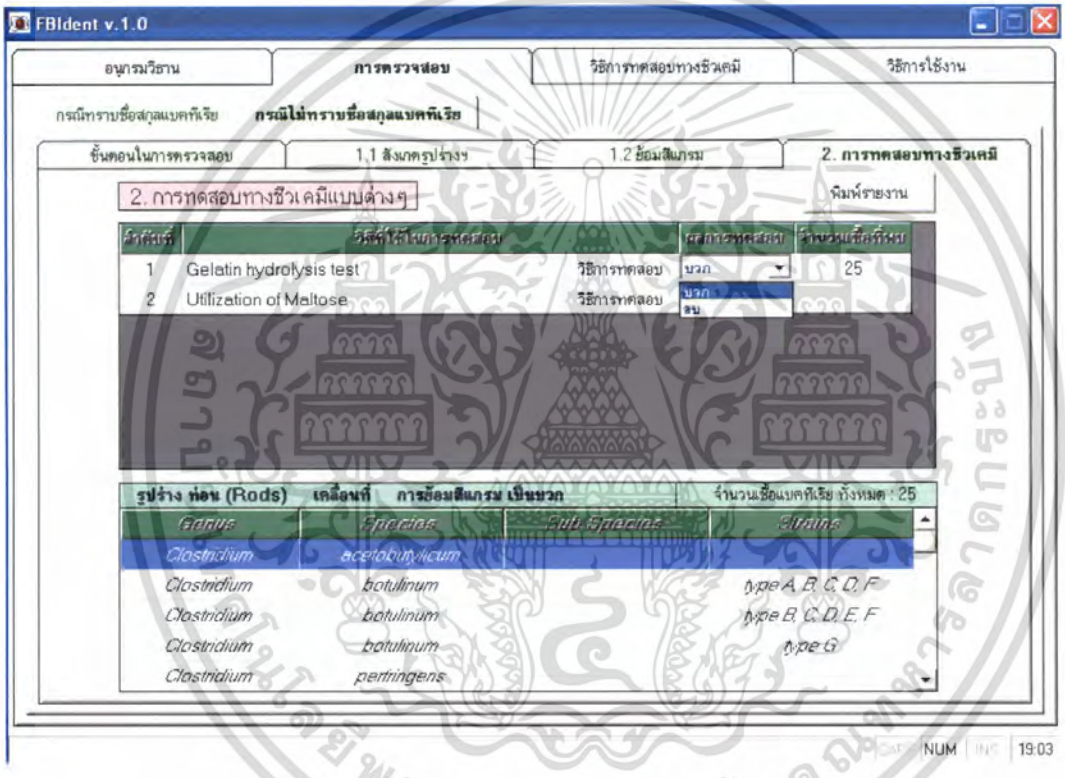
ที่มา : คมรัชกร (2548)

การใส่ข้อมูลผลการทดสอบแต่ละครั้ง โปรแกรมจะทำการคำนวณและประมวลผลจากฐานข้อมูล เพื่อค้นหาว่ามีแบคทีเรียชนิดใดบ้างที่มีคุณสมบัติตรงกับข้อมูลที่ใส่ลงไป จากนั้นจะแสดงผลออกมาในตาราง โดยจะแสดงสถานะคุณสมบัติรูปร่าง การเคลื่อนที่ และจำนวนของแบคทีเรีย รวมไปถึงรายชื่อทั้งหมดของแบคทีเรียที่ค้นพบจากฐานข้อมูล ดังตัวอย่างในรูปที่ 2.4 นอกจากนี้ยังสามารถดับเบิลคลิกที่ชื่อของแบคทีเรียในตาราง เพื่อดูรายละเอียดข้อมูลทางอนุกรม-วิธาน คุณสมบัติทั่วไปในระดับจีนัสและสปีชีส์ พร้อมภาพตัวอย่างได้ทันที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบทางชีวเคมีแบบต่างๆ

หลังจากผ่านการตรวจสอบขั้นพื้นฐานมาแล้ว ขั้นตอนต่อไปเป็นการตรวจสอบทางชีวเคมีแบบต่างๆ โปรแกรมจะทำการคำนวณ และประมวลผลเฉพาะจากจำนวนแบคทีเรียที่ค้นพบ จากขั้นตอนการตรวจสอบขั้นพื้นฐาน เพื่อค้นหาวิธีการตรวจสอบที่ดีที่สุดในการจำแนกแบคทีเรียกลุ่มที่เหลืออยู่

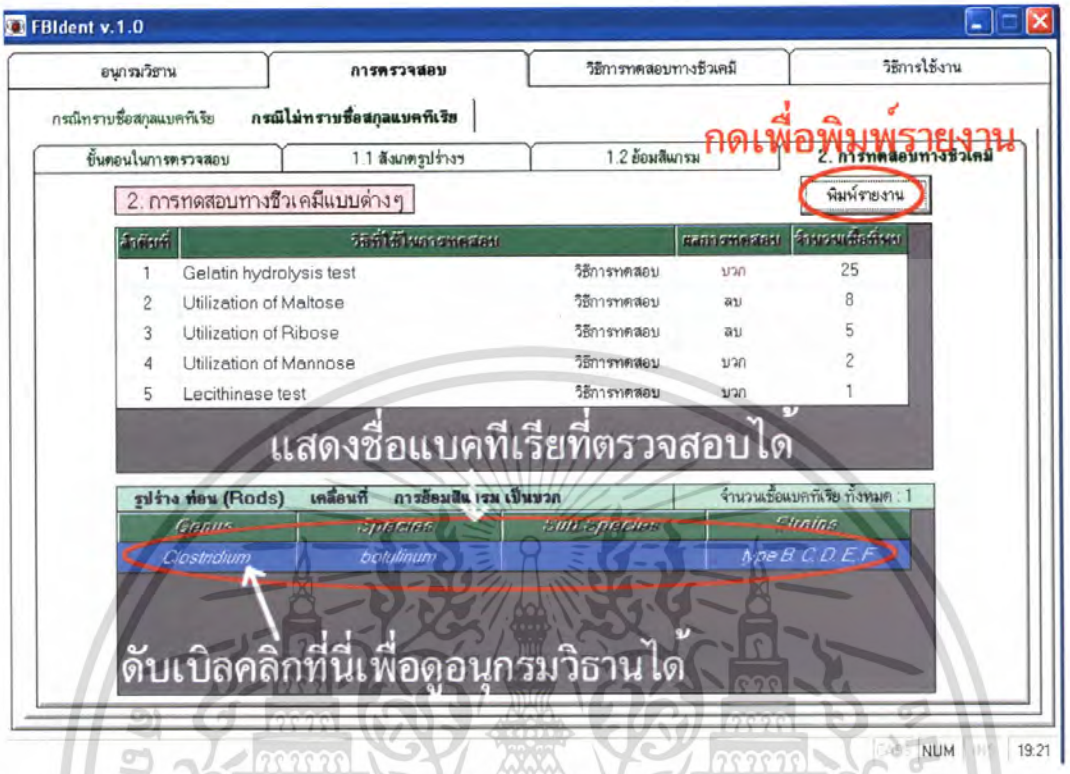


รูปที่ 2.5 แสดงขั้นตอนการตรวจสอบทางชีวเคมีแบบต่างๆ

ที่มา : คมรัชกร (2548)

ในการทดสอบทางชีวเคมีแต่ละวิธี สามารถกดดูวิธีการทดสอบได้ที่ช่อง "วิธีการทดสอบ" จะมีวิธีการทดสอบพร้อมภาพผลการทดสอบให้เห็นอย่างชัดเจน จากรูปที่ 2.5 จะเห็นว่าโปรแกรมทำการเลือกวิธีการทดสอบทางชีวเคมีที่เหมาะสม มาให้ทำการทดสอบครั้งละวิธี จนกว่าจะเหลือแบคทีเรียในตารางแสดงผล 1 ตัว ดังรูปที่ 2.6 ก็จะสามารถ ระบุได้ว่า แบคทีเรียที่ทำการตรวจสอบเป็นตัวใด มีชื่อสกุลว่าอะไร คุณสมบัติเป็นแบบไหน และจัดอยู่ในลำดับหมวดหมู่ใดตามหลักอนุกรมวิธาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

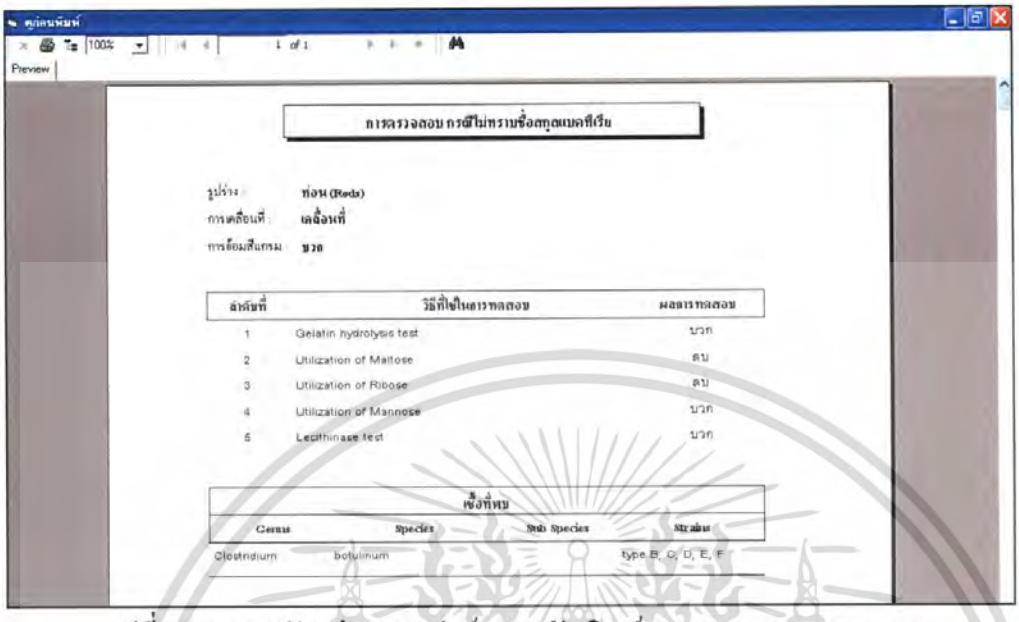


รูปที่ 2.6 แสดงตัวอย่างเมื่อเสร็จสิ้นการตรวจสอบ

ที่มา : คมรัชกร (2548)

เมื่อเสร็จสิ้นการตรวจสอบ สามารถกดที่ปุ่ม "พิมพ์รายงาน" เพื่อแสดงผลการทดสอบทั้งหมดได้ ดังรูปที่ 2.7 นอกจากนี้ยังสามารถดับเบิลคลิกที่ชื่อ Clostridium ในตาราง เพื่อดูอนุกรมวิธาน และรายละเอียดอื่นๆของ *Clostridium botulinum type B, C, D, E, F* ในหน้าอนุกรมวิธานได้ทันที และสามารถกดที่ปุ่ม "พิมพ์รายงาน" เพื่อแสดงผลในหน้านี้ได้เช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 แสดงตัวอย่างแบบฟอร์มสำหรับพิมพ์รายงานผลการตรวจสอบ

ที่มา : คมรัชกร (2548)

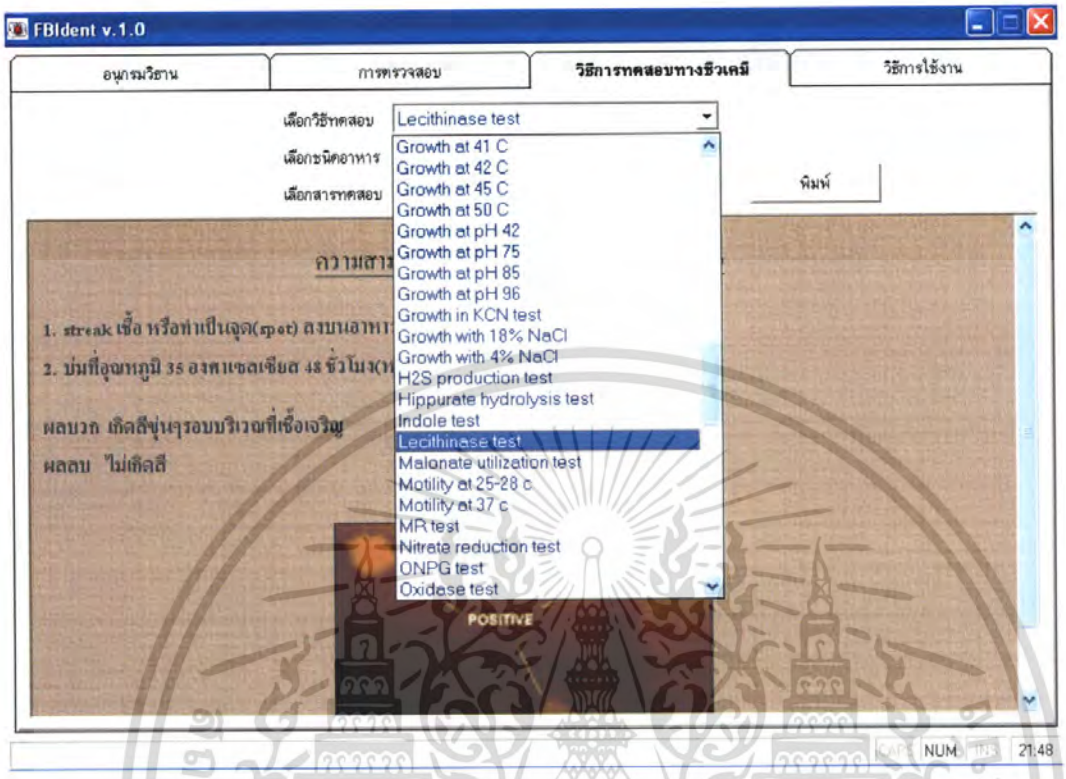
2.1.3 วิธีการทดสอบทางชีวเคมี

ส่วนนี้จะเป็นข้อมูลของวิธีการทดสอบทางชีวเคมีแบบต่างๆทั้งหมดที่ใช้ภายในโปรแกรม ตั้งแต่วิธีการทดสอบไปจนถึงการดูผลการทดสอบ ซึ่งจะรวมทั้งวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (media) และสารที่ใช้ในการทดสอบ (reagent)

วิธีการใช้งานส่วน วิธีการทดสอบทางชีวเคมี

ในส่วนนี้จะมี 3 ช่องให้เลือกได้แก่ ช่องเลือกวิธีทดสอบ ช่องเลือกชนิดอาหาร และช่องเลือกสารทดสอบ โดยแต่ละช่องเมื่อกดที่ปุ่มตัวเลือกรายการทางขวามือ (รูปสามเหลี่ยมคว่ำ) โปรแกรมก็จะแสดงรายการออกมาให้เลือก หากรายการที่เลือกเป็นช่องวิธีทดสอบ รายการที่แสดงขึ้นมาก็จะเป็นรายชื่อวิธีทดสอบทางชีวเคมีวิธีต่างๆ หากรายการที่เลือกเป็นช่องชนิดอาหาร รายการที่แสดงขึ้นมาก็จะเป็นรายชื่อของอาหารที่ใช้ในการทดสอบทางชีวเคมี และหากรายการที่เลือกเป็นช่องสารทดสอบ รายการที่แสดงขึ้นมาก็จะเป็นรายชื่อสารทดสอบที่ใช้ในการทดสอบทางชีวเคมี เป็นต้น โดยเมื่อเลือกรายการที่ต้องการแล้วโปรแกรมจะแสดงรายละเอียดของรายการที่เลือกออกมาดังตัวอย่างรูปที่ 2.8 เมื่อกดเลือกวิธีทดสอบ Lecithinase test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 แสดงวิธีการใช้งานส่วนวิธีการทดสอบทางชีวเคมี

ที่มา : คมรัชกร (2548)

ทุกรายการที่เลือกในส่วนนี้ สามารถพิมพ์รายงานออกมาได้โดยกดที่ปุ่มพิมพ์รายงาน ในส่วนนี้หากมีปัญหาไม่สามารถพิมพ์ออกมาได้ สามารถแก้ไขได้โดยติดตั้งโปรแกรม Business PDF Writer เพิ่ม เพื่อให้ใช้งานส่วนนี้ได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

2.1.4 เกี่ยวกับโปรแกรม

ส่วนนี้จะอธิบายถึงส่วนประกอบต่างๆของโปรแกรม รวมไปถึงวิธีการใช้งานทั้งหมดที่เกี่ยวข้อง (คมรัชกร, 2548)

2.2 การตรวจสอบหาชนิด (Identification)

การตรวจสอบหาชนิด หมายถึง การกระทำเปรียบเทียบสิ่งที่ไม่รู้จักกับสิ่งที่รู้จักแล้ว แต่ด้วยเหตุผลที่ว่าไม่เคยพบเลยว่าจุลินทรีย์จะมีลักษณะเหมือนกันหมด นักอนุกรมวิธานบางท่านจึงหลีกเลี่ยงไปใช้คำว่า determine หรือ determination แทน การเทียบเคียงถือว่าเป็นภาคปฏิบัติของการจัดจำแนกและการให้ชื่อ เช่น ตรวจสอบแบคทีเรียที่เราสนใจว่าจะจัดเข้าหมวดหมู่ใดในระบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การจัดจำแนก จากใหญ่ไล่ไปหาเล็ก เช่น หาว่าอยู่ในอันดับไหน วงศ์อะไร มีชื่อ สกุล และชื่อชนิดว่าอย่างไร ขึ้นอยู่ว่าเราต้องการตรวจสอบถึงลำดับขั้นทางอนุกรมวิธานขั้นไหน

ในทางปฏิบัติเมื่อเราแยกเชื้อแบคทีเรียได้จากตัวอย่าง อาจเป็นดิน น้ำ อากาศ ผลิตภัณฑ์อาหาร เป็นต้น ถ้าต้องการตรวจสอบว่าเป็นเชื้ออะไรก่อนอื่นต้องทำเชื้อให้บริสุทธิ์ ดูคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา เช่น รูปร่าง การเรียงตัวของเซลล์ คุณสมบัติการติดสีแกรม ซึ่งสิ่งที่กล่าวมาเป็นการวินิจฉัยเบื้องต้น ที่มีความสำคัญจะจัดแบคทีเรียอยู่ในอันดับไหน วงศ์อะไรได้ หลังจากนั้นก็ทดสอบคุณสมบัติทางด้านชีวเคมี เช่น ความสามารถในการใช้น้ำตาลต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน การสร้างเอนไซม์บางชนิด ความสัมพันธ์กับออกซิเจน และอื่นๆเท่าที่จำเป็นแล้วนำคุณสมบัติที่ทดสอบได้ของเชื้อที่ไม่ทราบชนิด (Unknown sample) เอาไปเปรียบเทียบกับคุณสมบัติของเชื้อที่ทราบแล้ว ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้มีการบรรยายลักษณะต่างๆไว้อย่างครบถ้วนในหนังสือคู่มือ เช่น Bergey's manual of Determinative Bacteriology เป็นต้น และอาจจะต้องอาศัยหนังสือทางด้านอนุกรมวิธานของแบคทีเรียหลายเล่ม จึงจะทำให้การเทียบเคียงถูกต้องที่สุด (ดวงพร, 2537)

2.3 เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิดต่างๆ (http://textbookofbacteriology.net)

2.3.1 *Bacillus cereus*

Phylum	Proteobacteria
Class	Bacilli
Order	Bacillales
Family	Bacillaceae
Genus	*Bacillus*
Species	*cereus*

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นรูปท่อนตรง ขนาด 0.3 – 2.2 x 1.2 – 7.0 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ สร้างสปอร์และสร้างสารพิษซึ่งจะขับสารพิษออกมาขณะปนเปื้อนอยู่ในอาหาร ช่วงอุณหภูมิในการเติบโตอยู่ระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส แต่บางสายพันธุ์เติบโตได้ที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส สำหรับค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดนี้อยู่ระหว่าง 6-7 สามารถเติบโตได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจน และจะสร้างสารพิษเมื่ออยู่ภายใต้สภาพที่มีออกซิเจนน้อย *B. cereus* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ในดิน ฝุ่นละออง ผลิตภัณฑ์จากพืช เช่น ข้าว ธัญพืช แป้ง ผลิตภัณฑ์จากแป้ง เครื่องเทศ ผลิตภัณฑ์จากสัตว์และเครื่องปรุงแต่งรสต่างๆ นอกจากนี้ยังพบในอุจจาระของคนที่มีสุขภาพปกติได้ประมาณ 15% อาหารที่พบว่ามีการปนเปื้อนของ *B. cereus* จนทำให้เกิดอาการอาเจียนได้แก่ อาหารประเภทข้าวและแป้ง เช่น มักกะโรนี ข้าวผัดและเนยแข็ง ส่วนอาหารที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อจนทำให้เกิดอาการท้องร่วง ได้แก่ ผักต่างๆ สลัด อาหารที่มีเนื้อสัตว์เป็นส่วนประกอบ ซอส ซุป และอาหารที่มีแป้งและครีมเป็นส่วนประกอบ

อันตรายของ *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่สร้างสารพิษ การเกิดพิษมี 2 ลักษณะอาการ คือ ทำให้อาเจียน (Emetic illness) และทำให้ท้องเสีย (Diarrhea illness) อาการอาเจียนมักเกิดจากการได้รับสารพิษชนิดที่มีความคงทน ที่สามารถมีชีวิตรอดได้ในอุณหภูมิสูงและค่าความเป็นกรดด่างสูง โดยผู้ป่วยจะเกิดอาการคลื่นไส้และอาเจียน ภายหลังจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษเข้าไป 11-15 ชั่วโมง แต่โดยทั่วไปมักปรากฏอาการภายหลังจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษเข้าไป 30 นาที ถึง 6 ชั่วโมง

ส่วนอาการท้องเสียมักเกิดจากสารพิษชนิดที่ไม่ทนความร้อนและกรด ตามปกติใช้เวลาฟักตัวประมาณ 6-12 ชั่วโมง หลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษของเชื้อ อาการประกอบด้วย การปวดท้องและถ่ายอุจจาระเหลว เนื่องจากมีน้ำมาก โดยทั่วไปอาการจะทรงอยู่ไม่เกิน 24 ชั่วโมง แล้วจะทุเลาลง *B. cereus* เป็นเชื้อชนิดที่ก่อปัญหากับอุตสาหกรรมการจัดบริการอาหารที่ต้องมีการเตรียมอาหารจำนวนมาก หรือต้องจัดเตรียมอาหารขึ้นล่วงหน้าเป็นเวลานานๆ ก่อนนำไปบริโภค เพราะหากในระหว่างการปรุงและการเก็บรักษามีการปฏิบัติที่ไม่ถูกสุขลักษณะหรือไม่สะอาด จะทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้ขึ้น ซึ่งกว่าที่จะนำอาหารไปบริโภค เชื้อชนิดนี้อาจเพิ่มจำนวนในอาหารมากขึ้นเรื่อยๆได้

2.3.2 *Bacillus coagulans*

Phylum	Proteobacteria
Class	Bacilli
Order	Bacillales
Family	Bacillaceae
Genus	*Bacillus*
Species	*coagulans*

Bacillus coagulans เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเซลล์เป็นท่อนตรงหรือเกือบตรง ขนาดกว้างประมาณ 0.5-2.5 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 1.2-10 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่มีการเคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา สร้างเอ็นโดสปอร์ 1 อันต่อ 1 เซลล์ ดำรงชีวิตแบบ chemoorganotroph เมแทบอลิซึมมีทั้งแบบ fermentation และ respiration แล้วแต่ชนิดของเชื้อ ใช้ไฮโดรเจนเป็นแหล่งพลังงานได้ มีความต้องการอาหารแตกต่างกัน สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 25-75 องศาเซลเซียส ทนเกลือได้อยู่ในช่วงน้อยกว่า 2-25 เปอร์เซ็นต์ พบในอาหารที่เป็นกรด เช่น น้ำมะเขือเทศคั้นกระป๋อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.3.3 *Bacillus subtilis*

Phylum	Proteobacteria
Class	Bacilli
Order	Bacillales
Family	Bacillaceae
Genus	*Bacillus*
Species	*subtilis*

Bacillus subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก หายใจโดยใช้ออกซิเจน มีลักษณะเป็นรูปท่อนตรง สามารถที่จะผลิต robust endospores ในการเป็นปฏิปักษ์ต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ และ เอนโด-สปอร์ เป็น widespread มีการเรียงตัวทั้งแบบ ลูกโซ่และแบบเดี่ยว โคโลนีมีสีครีมหรือน้ำตาล โดยบริเวณผิวของ cell จะเป็นแผ่นโครงสร้างจะประกอบด้วย capsule , proteinaceous surface layer , several layers ของ peptidoglycan sheeting และ protein บริเวณส่วนนอกของพื้นผิว plasma membrane มักพบในดิน อาหาร อากาศ หญ้าแห้งที่ใช้เลี้ยงสัตว์ ทำให้อาหารเน่าเสีย ทำให้นมและครีมแข็งเป็นก้อน เป็นสาเหตุทำให้ขนมปังเป็นเมือก

B.subtilis เป็นแบคทีเรียที่ใช้อย่างกว้างขวางในการผลิตเอนไซม์ ทางด้านอุตสาหกรรม จึงนำไปประยุกต์ในการผลิตเอนไซม์ เช่น amylase, protease เป็นต้น เช่นถ้าเป็น amylase ก็อาจนำไปใช้ใน Starch conversion to high fructose corn syrup (HFCS), Desizing of textiles, Paper industry, Detergents

2.3.4 *Lactobacillus casei*

Phylum	Proteobacteria
Class	Bacilli
Order	Lactobacillales
Family	Lactobacillaceae
Genus	*Lactobacillus*
Species	*casei*

Lactobacillus casei เป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยทั่วไปพบเรียงเป็นลูกโซ่ เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ มีการหมักแบบ heterofermentation คือ สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้กรดแลคติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือจะเป็นกรดอะซิติก ฟอร์มิก ซักซินิก คาร์บอนไดออกไซด์ หรือเอทานอล สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 5-53 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30-40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมคือ 5.5-5.8 หรือน้อยกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลง ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

83981

พบได้ทั่วไปในผลิตภัณฑ์เนื้อ น้ำ น้ำทิ้ง เบียร์ ไวน์ ผลไม้และน้ำผลไม้ ผักดอง แป้งหมัก เป็นปรสิตในปาก พบในทางเดินอาหาร และช่องคลอดของสัตว์เลือดอุ่น ปกติไม่เป็นเชื้อก่อโรค สามารถคัดแยกได้จากนม เนยแข็ง ใช้เป็นหัวเชื้อในโรงงานทำเนยแข็ง

2.3.5 *Lactobacillus lactis*

Phylum	Proteobacteria
Class	Bacilli
Order	Lactobacillales
Family	Lactobacillaceae
Genus	*Lactobacillus*
Species	*lactis*

Lactobacillus lactis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น ขนาดกว้างประมาณ 0.5-1.2 ไมโครเมตร ยาวไม่ถึง 2 ไมโครเมตร ผิวของโคโลนีมีลักษณะขรุขระ โดยทั่วไปพบเรียงเป็นลูกโซ่ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการหมักแบบ homofermentation สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้กรดแลคติกอย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์

สามารถคัดแยกได้จากนม เนยแข็ง และหัวเชื้อ (starter cultures) ในโรงงานทำเนยแข็ง

2.3.6 *Leuconostoc mesenteroides*

Phylum	Proteobacteria
Class	Bacilli
Order	Lactobacillales
Family	leuconostocaceae
Genus	*Leuconostoc*
Species	*mesenteroides*

Leuconostoc mesenteroides เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมรี ขนาดประมาณ 0.5-0.7 x 0.7-1.2 ไมโครเมตร เรียงเป็นคู่เป็นสาย ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เจริญค่อนข้างช้า มีโคโลนีขนาดเล็กและเป็นเมือกบนอาหารที่มีซูโครสเป็นส่วนประกอบจึงไม่นิยมนำมาใช้ในการหมักกรดแลคติก ดำรงชีวิตแบบ heterofermentation อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 30 องศาเซลเซียส หมักกลูโคสได้ทั้งกรดและแก๊ส โดยผลิตภัณฑ์หลักคือเอทานอล และกรดแลคติก หรืออาจจะมีกรดอะซิติกปนมาด้วย สามารถแยกได้จากแหล่งต่างๆ เช่น หญ้า ฟางข้าว กะหล่ำปลีดอง เป็นเชื้อต้นตอในการทำเนยเหลว เนยแข็ง เพราะให้กลิ่นหอมของไดอะซีทิล (diacetyl; 2-3-butanedione) จากซิเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.7 *Listeria monocytogenes*

Phylum	Proteobacteria
Class	Bacilli
Order	Bacillales
Family	Listeriaceae
Genus	*Listeria*
Species	*monocytogenes*

Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปท่อนสั้น มักเรียงตัวเป็นสายต่อกัน 3-5 เซลล์ หรือมากกว่านั้น เซลล์อายุ 18-24 ชั่วโมง จะเรียงตัวแบบพาลิเสด ไม่สร้างสปอร์หรือแคปซูล อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตคือ 37 องศาเซลเซียส แต่สามารถเติบโตได้ทุกอุณหภูมิจนต่ำถึง 2.5 องศาเซลเซียส สามารถอยู่รอดในที่มีโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ 4 องศาเซลเซียส นานถึง 8 สัปดาห์ และสามารถทนความร้อนได้ดี สามารถพบได้ทั่วไปในน้ำ น้ำเสีย อุจจาระ คน และสัตว์ จึงสามารถปนเปื้อนลงไปในอาหารได้ง่าย ในระหว่างขั้นตอนการบรรจุการขนส่ง และการวางจำหน่าย สำหรับอาหารที่มักพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้แก่ นม เนื้อ ไก่ อาหารทะเล ส่วนในผักไม่พบหรือพบน้อยมาก นอกจากนี้ยังสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิตู้เย็นและทนความร้อนได้ดีกว่าแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ชนิดอื่น จึงสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่นนม เนื้อสัตว์ ผัก และไส้กรอก เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค Listeriosis ซึ่งมีอาการโลหิตเป็นพิษและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ มักพบในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอ หรือทารกที่เกิดจากมารดาที่ได้รับเชื้อขณะตั้งครรภ์ และยังมีรายงานว่าที่ผู้เสียชีวิตเนื่องจากบริโภคอาหารที่มีเชื้อปะปนอยู่ ดังนั้นแบคทีเรียชนิดนี้จึงเป็นดัชนีตัวหนึ่งแสดงถึงความปลอดภัยของอาหารด้วย

2.3.8 *Pediococcus halophilus*

Phylum	Proteobacteria
Class	Bacilli
Order	Lactobacillalcs
Family	Lactobacillaceae
Genus	*Pediococcus*
Species	*halophilus*

Pediococcus halophilus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม อยู่เป็นคู่หรือ tetrad เนื่องจากมีการแบ่งตัวแบบ 2 ระนาบ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ ดำรงชีวิตแบบ chemoorganotroph มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหมักแบบ homofermentation ผลที่ได้คือกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 25-40 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเจริญได้เมื่อมีโซเดียมคลอไรด์ มักพบในผักที่เอามาดอง เบียร์ที่เสีย ผลิตภัณฑ์นม และผลิตภัณฑ์อาหาร ไม่ก่อโรคต่อพืชและสัตว์

2.3.9 *Staphylococcus aureus*

Phylum	Proteobacteria
Class	Bacilli
Order	Bacillales
Family	staphylococcaceae
Genus	*Staphylococcus*
Species	*aureus*

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะกลม เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น หรือเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ไม่เคลื่อนที่ โคโลนีมีสีเหลืองหรือสีทองเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศที่มีออกซิเจน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโต คือ 35-40 องศาเซลเซียส ช่วง pH หรือความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการเติบโตอยู่ที่ 7-7.5 ส่วนค่า Aw (ปริมาณน้ำอิสระในอาหารที่จุลินทรีย์นำไปใช้ในการเติบโต) ต่ำสุดสำหรับการเติบโตในสภาพมีออกซิเจนประมาณ 0.86 สภาพไม่มีออกซิเจนประมาณ 0.90

Staphylococcus aureus จะมีชีวิตอยู่ได้ในอากาศ ฝุ่นละออง ขยะมูลฝอย น้ำ อาหารและนม หรืออาหารบรรจุเสร็จ สภาวะแวดล้อมภายนอกมนุษย์และสัตว์ ซึ่งมนุษย์และสัตว์นั้นเป็นแหล่งของเชื้อชนิดนี้ โดยจะพบอยู่ตามทางเดินหายใจ ลำคอ หรือ เส้นผมและผิวหนังถึง 50 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่านี้ในคนที่มีสุขภาพดี และอาจพบเชื้อชนิดนี้ 60-80 เปอร์เซ็นต์ ในผู้ที่สัมผัสโดยตรงกับผู้ป่วยหรือผู้ที่สัมผัสกับสภาพแวดล้อมในโรงพยาบาล ตลอดจนผู้ประกอบอาหาร รวมทั้งในขั้นตอนของการบรรจุและสภาพแวดล้อมภายนอกนั้นก็เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน สิ่งที่ต้องคำนึงถึงอีกอย่างหนึ่งก็คือ การเก็บอาหารไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมเป็นผลให้อาหารที่มีการปนเปื้อนอยู่แล้วมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อและสร้างสารพิษได้อย่างรวดเร็ว อาหารที่มักพบเชื้อปนเปื้อนได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื้อสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์จากไข่ อาหารประเภทสลัด เช่น ไข่ ทูน่า เนื้อไก่ มันฝรั่ง และมักกะโรนี ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ครีมพาย เอแคลร์ ชอคโกแลต แซนวิช และผลิตภัณฑ์นมที่เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม และเก็บไว้เป็นเวลานานก่อนรับประทาน *Staphylococcus aureus* บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ คือ เอนเทอโรทอกซิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนได้ดี และเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยในมนุษย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารพิษชนิดนี้ทนความร้อนถึงระดับ 143.3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วินาทีได้ ดังนั้น อุณหภูมิในการหุงต้มธรรมดาหรืออุณหภูมิน้ำเดือดจึงไม่สามารถทำลายสารพิษชนิดนี้ได้ โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อนี้ เรียกว่า Staphyloenterotoxicosis และStaphylorenterotoxemia

2.4 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (ดวงพร ,2537)

2.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตรวจสอบการติดสีแกรม ขนาด รูปร่าง และการจัดเรียงของเซลล์ โดยการย้อมสีแกรม แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์และศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.4.2 การศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่

ตรวจสอบได้ 2 วิธี วิธีแรกศึกษาการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย โดยวิธี hanging drop technique แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ วิธีที่สอง คือ นำเชื้อแบคทีเรียอายุประมาณ 24 ชั่วโมง มา stab ลงในอาหาร motility test บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรือที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง ถ้าเชื้อกระจายไปจากแนวที่ stab ไว้ แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในเคลื่อนที่

2.4.3 การติดสีแกรม

การย้อมสีวิธีนี้มีความสำคัญที่สุด และใช้กันอย่างแพร่หลาย สามารถใช้ศึกษารูปร่างลักษณะและการจัดเรียงตัวของเซลล์ และทำให้จำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ โดยผลจากการย้อมสี จะพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต และแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของซาฟรานิน

กลไกการติดสีแกรมของแบคทีเรียเกี่ยวข้องกับโครงสร้างและองค์ประกอบของผนังเซลล์ ในแบคทีเรียแกรมลบจะมีสารพวกไขมันที่มากกว่าของแบคทีเรียแกรมบวก และยังมีชั้นของผนังเซลล์บางกว่าด้วย ในกระบวนการย้อมสี เมื่อล้างออกด้วยแอลกอฮอล์ จะไปละลายไขมัน ทำให้รูเปิดของผนังเซลล์กว้างขึ้น จึงยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ของสีคริสตัลไวโอเลต-ไอโอดีนคอมเพล็กซ์หลุดออกมา เมื่อย้อมสีซาฟรานินจึงติดสีแดงของซาฟรานิน

แต่ในแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยกว่าและมีความซับซ้อนขององค์ประกอบที่ผนังเซลล์น้อยกว่า เมื่อล้างสีด้วยแอลกอฮอล์ เซลล์จะเหี่ยว เพราะเกิดการสูญเสียน้ำ เยื่อหุ้มเซลล์มีรูขนาดเล็กลง สารประกอบโมเลกุลใหญ่ของสีละลายออกมาไม่ได้ เซลล์ยังคงติดสีม่วง เมื่อย้อมทับด้วยซาฟรานิน จึงย้อมไม่ติดสีแดง

บางครั้งการย้อมสีแกรม อาจมีปัญหาทำให้ผลการย้อมไม่เป็นไปตามทฤษฎี เช่น แบคทีเรียแกรมบวกในบางสภาพอาจให้ผลแตกต่างในการย้อมคือไม่ติดสีแกรมบวก หรืออายุของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ ถ้าเชื้อแก่ แบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดอาจสูญเสียความสามารถในการติดสีคริสตัลไวโอเลต ทำให้ติดสีแกรมลบแทน หรือขึ้นกับสภาพแวดล้อมของแบคทีเรีย หรือขึ้นอยู่กับวิธีการเกลี่ยเชื้อ วิธีการย้อมสี และคุณภาพของสีที่ใช้ เป็นต้น

วิธีการย้อมสีแบบแกรม มีประโยชน์ในการจำแนกแบคทีเรียออกเป็นแกรมบวกและแกรมลบ แต่สำหรับจุลินทรีย์ชนิดอื่นจะติดสีย้อมชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น เช่น ยีสต์ ติดสีแกรมบวก (นงลักษณ์และปรีชา, 2547)

2.4.4 การทดสอบแคตาเลส (Catalase test)

การทดสอบเอนไซม์แคตาเลสได้มีการใช้มานานในการแยกแบคทีเรีย staphylococci ออกจาก streptococci และใช้ในการแยกแบคทีเรียอื่นๆด้วย

Mcleod และ Gordon ได้แบ่งแบคทีเรียตามความสามารถในการสร้างแคตาเลส ส่วนพวกที่ไม่สามารถสร้างแคตาเลสมักมีแนวโน้มว่าจะตาย ถ้าในอาหารไม่มีน้ำตาล หรือไม่ก็เป็นเพราะมันสร้าง H_2O_2 หรือเกิด H_2O_2 สะสมจากการที่เชื้อถูกแสงและอากาศ สาร H_2O_2 เป็นสารพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต จึงมีข้อแนะนำว่าควรจะเก็บ stock culture ไว้ในที่อากาศจำกัดและมืด

กลไกการทำงานของแคตาเลส

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2\,H_2O + O_2\uparrow$$

ถ้ามีการสร้างฟองออกซิเจน (O_2) ถือว่าได้เป็นผลบวก ได้มีการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ H_2O_2 ในการทดสอบแคตาเลส โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 1.5-30 พบว่า ความเข้มข้นระหว่างร้อยละ 0.5-5.0 ให้ผลดีและ 1 หยดของ H_2O_2 ร้อยละ 3 ให้ผลดีที่สุด และในการทดสอบต้องใช้เชื้ออายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง เพราะแคตาเลสจะมีอยู่เฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น ดังนั้น การอ่านผลลบผิดพลาด (false negative) สามารถเกิดขึ้นได้ถ้าใช้เชื้ออายุมาก ข้อควรระวังอีกอย่างคือ ห้ามเอาเชื้อที่เลี้ยงบน blood containing medium เพราะในอาหารนี้จะมีแคตาเลส วัตถุประสงค์ของการทดสอบ คือ ศึกษาดูความสามารถของแบคทีเรียในการสลาย H_2O_2 โดยเอนไซม์แคตาเลส ถ้าได้จะทำให้เกิดฟองแก๊สขึ้น ซึ่งเป็นแก๊สออกซิเจน

2.4.5 การทดสอบออกซิเดส (Oxidase test)

การทดสอบออกซิเดสใช้ในการจัดจำแนกสกุลต่างๆของแบคทีเรีย การพบเอนไซม์ออกซิเดสเกิดจากการฉีดสารละลายผสมของ α -naphthol และ p-phenylene diamine เข้าไปในสัตว์จะเกิดสีน้ำเงินขึ้น ซึ่งเป็นสีของ indophenol blue ปฏิกิริยานี้เรียกว่า nadi reaction ต่อมามีการศึกษาในพืชด้วย พบว่าเป็น intracellular enzyme เรียกว่า indophenol oxidase หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

respiratory enzyme (cytochrome oxidase = cytochrome C oxidase) ซึ่งไซโตโครมชนิดนี้ประกอบด้วย ไซโตโครม เอ และ เอ 3 พบใน aerobic respiratory bacteria รวมทั้งพวก enterobacteriaceae สำหรับพวก obligate anaerobic bacteria จะไม่มี cytochrome oxidase system จึงไม่สามารถเจริญในที่มีออกซิเจน

ไซโตโครมจะประกอบด้วยฮีม (heme) ซึ่งมีธาตุเหล็ก ทำให้อยู่ในสภาพรีดักชันออกซิเดชัน ดังสมการ

$$2 \text{ reduced cytochrome C} + 2H^{+} + \frac{1}{2}O_2 \xrightarrow{\text{cytochrome}} 2 \text{ reduced cytochrome C} + H_2O$$

วิธีการตรวจสอบออกซิเดส มี 2 วิธี

2.4.5.1 วิธีของ Kovacs ควรใช้ tetramethyl-p- phenylene diamine ซึ่งจะถูกออกซิไดส์โดยไซโตโครม ซี ได้สารสีม่วง

2.4.5.2 วิธีของ Gaby และ Hadley แล้วดัดแปลงโดย Ewing และ Johnson สารทดสอบใช้ dimethyl-p-phenylene diamine และ α- naphthol

ข้อควรระวัง สารทดสอบต้องใหม่ และจะถูกออกซิไดส์โดยออกซิเจนในอากาศ ต้องเก็บในขวดสีน้ำตาล สำหรับสิ่งมีชีวิตที่มีไซโตโครม ซี เล็กน้อย จะเกิดสีม่วงหรือน้ำเงินหลังจากเวลาตรวจสอบ เรียกว่าเป็น weak-positive หรืออาจเป็น auto oxidation ก็ได้ วัตถุประสงค์ของการทดสอบ คือ เพื่อให้ทราบวิธีการตรวจสอบออกซิเดสที่ใช้มากในการจัดจำแนกสกุลของแบคทีเรีย

2.4.6 การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท (Nitrate reduction Test)

แบคทีเรียมีการรีดิวซ์ NO^{-}_{3} ได้หลายแบบ ถ้าเป็นแบบ assimilation NO^{-}_{3} ถูกรีดิวซ์เป็น NH_3 โดยมี NO^{-}_{2} เป็นสารตัวกลาง NH_3 ที่เกิดขึ้นเซลล์เอาไปสังเคราะห์กรดอะมิโน และสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ ส่วนแบบ dissimilation (หรือ respiration) NO^{-}_{3} หรือ NO^{-}_{2} เป็นตัวรับอิเล็คตรอนตัวสุดท้าย ในกรณีที่ขาดออกซิเจน สามารถเกิดขึ้นได้กับแบคทีเรียที่ใช้อากาศในการเจริญ เรียก nitrate respiration ทำให้เจริญในสภาพที่ไม่มีอากาศได้

การรีดิวซ์ NO^{-}_{3} ไม่ว่าจะเป็นแบบ assimilate หรือ dissimilate จะเป็น nitrate reductase (nitratase) ดังสมการ

$$NO^{-}_{3} \xrightarrow[\text{reductase}]{\text{nitrate}} NO^{-}_{2} \longrightarrow NH_3$$

ถ้าแบคทีเรียเปลี่ยน NO^{-}_{3} ไปเป็นแก๊สต่างๆ เช่น N_2 หรือ กรดไนตรัส เรียกว่า denitrification ซึ่งสัมพันธ์กับการรีดิวซ์ NO^{-}_{3}

การสลายตัวของ NO^{-}_{3} เมื่อเชื้อเจริญในอาหาร NB ที่มี KNO_3 ร้อยละ 0.1 เราสามารถทดสอบ NO^{-}_{2} ที่เกิดขึ้นโดยหยดกรดซัลฟานิลิค (salfanilic acid) ก่อนและตามด้วย α-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

napthylamine การรวมตัวระหว่างกรดซัลฟานิลิคและ NO^-_2 จะได้ diazonium salt (diazotized sulfanilic acid) จะรวมตัวกับ α- napthylamine เกิดสีแดงของ water-soluble azo dye ถึงว่าผลทดสอบเป็นบวก เพราะว่ามี NO^-_2 ถ้าไม่เกิดสีแดงแสดงว่า NO^-_3 อาจจะถูกรีดิวซ์เป็น NH_3 หรือ เป็น N_2 โดยกระบวนการ denitrification หรือ NO^-_3 ไม่ถูกรีดิวซ์ จึงทดสอบต่อ โดยใช้ผงสังกะสี ซึ่งจะรีดิวซ์ NO^-_3 เป็น NO^-_2 จะเกิดสีแดง (แสดงว่ามี NO^-_3 อยู่ ผลการทดสอบเป็นลบ) ถ้าไม่เกิดสีแดงแสดงว่าไม่มี NO^-_3 อยู่ ผลการทดสอบเป็นบวก ข้อควรระมัดระวังจะต้องไม่ใส่ผงสังกะสีมากเกินไป ไม่เช่นนั้นไฮโดรเจนที่ปล่อยออกมาจะรีดิวซ์ NO^-_3 ต่อไปเป็น NH_3 วัตถุประสงค์ของการทดสอบ คือ ให้เข้าใจวิธีการทดสอบการรีดิวซ์ NO^-_3 ซึ่งมีโอกาสจะทดสอบผิดมาก ถ้าเข้าใจไม่ถูกต้อง

2.4.7 การทดสอบการย่อยอาร์จินีน (Arginine dihydrolase test)

การตรวจสอบการย่อยอาร์จินีนของแบคทีเรีย จะช่วยในการแยกแบคทีเรียพวก pseudomonas และ enterobacter และ beta hemolytic streptococci มีการศึกษาถึงการย่อยสลายการย่อยอาร์จินีน พบว่า arginine dihydrolase system ประกอบด้วย arginine desimidase และ citrulline ureidase (citrullinase) วัตถุประสงค์ของการทดสอบ คือ ศึกษาวิธีการทดสอบการใช้อาร์จินีนโดย arginine dihydrolase

2.4.8 การทดสอบการสร้างอินโดล (Indole Test)

การทดสอบความสามารถในการสร้างอินโดล ใช้แยกแบคทีเรีย *Escherichia* ออกจาก *Klebsiella-Enterobacter* สิ่งมีชีวิตจะสร้างสารอินโดลจากกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophane) โดย tryptophanase ในอาหารทดสอบจะต้องมีทริปโตเฟน ซึ่งกรดอะมิโนชนิดนี้อาจจะไม่มีในอาหารเปปโตนทั่วๆไปก็ได้ ดังนั้นจึงนิยมใช้เคซีนไดเจส (casein digest) หรือ ทริปโตนก็ได้ อาหารที่ใช้ควรมีส่วนผสมของเคซีนไดเจสหรือทริปโตนร้อยละ 1 และไม่จำเป็นต้องใส่อาหารอื่นๆลงไปอีก ถ้าแบคทีเรียที่ทดสอบเจริญได้ ถ้าไม่สามารถเจริญได้ก็จำเป็นต้องใส่อาหารที่ช่วยให้แบคทีเรียนั้นเจริญได้ แต่ข้อควรระวังคือ ในอาหารทดสอบจะต้องไม่มีน้ำตาลกลูโคสเพราะจะไปยับยั้งการสร้างอินโดล ออกซิเจนก็มีอิทธิพลต่อการสร้างอินโดล เช่น พวก facultative organism (*E. coli*) จะสร้างอินโดลมากขึ้นเมื่อมีการบ่มในที่มีอากาศ

การทดสอบการสร้างอินโดลมีหลายวิธี เช่น วิธีของ Ehrlich-Boehme ใช้ p-dimethylaminobenzaldehyde-HCl ละลายในแอลกอฮอล์ และเติมโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต จะเกิดสีแดงถ้ามีอินโดล ต่อมา Kovacs ได้ดัดแปลงวิธีของ Ehrlich-Boehme โดยใช้ เอมิลแอลกอฮอล์แทนเอทิลแอลกอฮอล์ ซึ่งวิธีของ Kovacs ปัจจุบันยังคงนิยมใช้อยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นในการทดสอบการสร้างอินโดล คือ สาร pyrrole (indole = benzopyrrole) ในสารละลายเอซิดแอลกอฮอล์อย่างอ่อนที่มี p-dimethylaminobenzaldehyde ใช้ความร้อนเป็นตัวเร่งจะเกิดสีม่วงแดง ถ้าไม่ใช้ความร้อนต้องใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุและวิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

- *Bacillus cereus* DMST 5040
- *Bacillus coagulans* TISTR 17163
- *Bacillus subtilis* TISTR 6633
- *Lactobacillus casei* TISTR 390
- *Lactobacillus lactis* TISTR 1401
- *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053
- *Listeria monocytogenes* DMST 11256
- *Pediococcus halophilus* TISTR 429
- *Staphylococcus aureus* TISTR 25923

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Motility Test Medium
- Nutrient broth
- Nutrient agar
- Arginine broth (Thornley's)
- Tryptone broth
- Fermentation carbohydrate medium
- Utilization test medium

3.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ

- หลอดฝาเกลียว
- ที่วางหลอด
- สไลด์
- กระจกปิดสไลด์
- บีกเกอร์ 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- กระบอกตวง 500 มล.
- ขวดดูแรน 500 มล.
- แท่งแก้วคน
- ช้อนตักสาร
- จานเพาะเชื้อ
- ลวดเขี่ยเชื้อ
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- เข็มเขี่ยเชื้อ
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น BVT 123 ของบริษัท ISSCO
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น Modell 600
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) ยี่ห้อ HIRAYAMA Modell HV-50
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) 37°C ของบริษัทไซแอนติฟิคโปรโมชั่นจำกัด
- ตู้เย็น

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การทำเชื้อให้บริสุทธิ์

จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการทดลองมี 9 สปีชีส์ 6 จีนัส ดังนี้

- *Bacillus cereus* DMST 5040
- *Bacillus coagulans* TISTR 17163
- *Bacillus subtilis* TISTR 6633
- *Lactobacillus casei* TISTR 390
- *Lactobacillus lactis* TISTR 1401
- *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053
- *Listeria monocytogenes* DMST 11256
- *Pediococcus halophilus* TISTR 429
- *Staphylococcus aureus* TISTR 25923

ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยและกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

นำจุลินทรีย์เหล่านี้มา cross streak ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bacillus coagulans TISTR 17163 ใช้อาหาร NA

Bacillus cereus DMST 5040 ใช้อาหาร NA

Bacillus subtilis TISTR 6633 ใช้อาหาร NA

Staphylococcus aureus TISTR 25923 ใช้อาหาร NA

Pediococcus halophilus TISTR 429 ใช้อาหาร MRS

Leuconostoc mesenteroides TISTR 053 ใช้อาหาร MRS

Lactobacillus lactis TISTR 1401 ใช้อาหาร MRS

Lactobacillus casei TISTR 390 ใช้อาหาร MRS

Listeria monocytogenes DMST 11256 ใช้อาหาร NA

จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้มาใช้ในการจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยดูลักษณะสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีบางประการตามที่โปรแกรม FBI dent เวอร์ชัน 1.0 ระบุไว้ (ในกรณีทราบชื่อสกุลของแบคทีเรีย)

3.3.2 การจัดจำแนกจุลินทรีย์

การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวก (Sharpe and Fryer , 1966 ., Krieg and Hott , 1986)

นำเชื้ออายุ 18-24 ชั่วโมงจากอาหารเลี้ยงเชื้อมาทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้

3.3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โดยการตรวจสอบการติดสีแกรม รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.3.2.2 การเคลื่อนที่ (Motility test)

ปลูกเชื้อลงบนอาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test medium) (ภาคผนวก ก ข้อ 1) โดยแทงเข็มเขี่ยเชื้อลงไปจนสุดหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ถ้าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้จะมีรอยการเจริญออกจากรอยที่แทงไว้

3.3.2.3 การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส (Catalase test)

นำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารอายุ 24 ชั่วโมง มาเกลี่ยลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนเชื้อ ถ้ามีฟองแก๊สแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลสให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่เกิดฟองแก๊สแสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลสได้ผลเป็นลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.4 การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส (Oxidase test)

หยดสารละลายเตตระเมทิลพาราไดเอมีนไดไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงบนกระดาษจนชุ่มแล้วใช้ลวดเขี่ยเชื้อจากอาหารแข็งป้ายบนกระดาษกรอง ถ้าเกิดสีม่วงขึ้นภายใน 10 วินาที แสดงว่าให้ผลเป็นบวก สีที่เกิดขึ้นเนื่องจากแบคทีเรียมีการสร้าง Cytochrome oxidase โดยเตตระเมทิลพาราฟีนิลลีนไดเอมีนไดไฮโดรคลอไรด์ ถูกออกซิไดส์โดยOxidase cytochrome c จะเกิดสีม่วงของ Nurster's blue ถ้าไม่เกิดสีม่วงแสดงว่าแบคทีเรียไม่สร้างเอนไซม์ Cytochrome oxidase

3.3.2.5 การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท (Nitrate reduction test)

ปลูกเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หยด salfanilic acid solution และ α-napthylamine solution ถ้าเกิดสีแดงปนตะกอนแสดงว่าให้ผลเป็นบวก แต่การไม่เปลี่ยนสียังไม่ถือว่าผลเป็นลบ ให้ทดสอบโดยเติมผงสังกะสี หลังจากเติมผงสังกะสีแล้ว หากไม่เปลี่ยนสีให้ลงเป็นผลบวก แต่ถ้าเปลี่ยนเป็นสีแดงให้ลงเป็นผลลบ

3.3.2.6 การทดสอบการใช้อาร์จีนีน (Arginine dihydrolase test)

ปลูกเชื้อลงใน arginine broth (Thornley's) (ภาคผนวก ก ข้อ 4) ที่เติม arginine และไม่เติม arginine (หลอดควบคุม) จากนั้นเทน้ำมันทับให้หนา 4-5 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจผลภายใน 4 วัน ถ้าเกิดสีม่วงหรือม่วงแดงให้ผลเป็นบวก ถ้าเป็นสีเหลืองให้เป็นผลลบ

3.3.2.7 การทดสอบการสร้างอินโดล (Indole test)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหาร Tryptophane Broth (ภาคผนวก ก ข้อ 5) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบการสร้างอินโดลโดยหยดสารละลายโคแวคส์ (kovac's reagent) 1-2 หยด ถ้ามีสีแดงบนผิวอาหารเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ Tryptophanase ย่อยสลายทริปโตเฟนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อินโดล ถ้าไม่เกิดสีให้ผลเป็นลบ

3.3.2.8 การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส

ถ่ายเชื้อที่ต้องการลงในอาหาร Fermentation carbohydrate medium (ภาคผนวก ก ข้อ 6) โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตการสร้างกรด ถ้าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้จะสร้างกรดขึ้น ทำให้อินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีจากสีเขียวปนสีเหลืองให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีให้ผลเป็นลบ

3.3.2.9 การทดสอบการสร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส

ถ่ายเชื้อที่ต้องการลงในอาหาร Fermentation carbohydrate medium โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบ โดยใส่หลอดดักแก๊สไว้ในหลอดทดสอบด้วย บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตการสร้างแก๊สในหลอดดักแก๊ส ถ้าเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส โดยอาหารจะเปลี่ยนสีหรือไม่เปลี่ยนสีก็ได้ ให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่เกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส ให้ผลเป็นลบ

3.3.2.10 การทดสอบความสามารถในการใช้เซลโลไบโอส

ถ่ายเชื้อที่ต้องการลงในอาหาร Utilization test medium (ภาคผนวก ก ข้อ 7) โดยใช้เซลโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอน ใส่หลอดดักแก๊สที่ผ่านการฆ่าเชื้อไว้ในหลอดทดสอบด้วย บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีและการเกิดแก๊สในอาหาร โดยถ้าเกิดการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลือง และมีแก๊สเกิดขึ้น หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างใดอย่างหนึ่ง ให้ถือว่าผลเป็นบวก ถ้าอาหารไม่เปลี่ยนสีและไม่เกิดแก๊สให้ผลเป็นลบ

3.3.2.11 การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาลดีไซโลส

ถ่ายเชื้อที่ต้องการลงในอาหาร Fermentation carbohydrate medium โดยใช้น้ำตาลดีไซโลส เป็นส่วนประกอบ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตการสร้างกรด ถ้าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลดีไซโลสได้จะสร้างกรดขึ้น ทำให้อินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีให้ผลเป็นลบ

3.3.2.12 การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากแมนนิทอล

ถ่ายเชื้อที่ต้องการลงในอาหาร Fermentation carbohydrate medium โดยใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นส่วนประกอบ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตการสร้างกรด ถ้าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลแมนนิทอลได้จะสร้างกรดขึ้น ทำให้อินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีให้ผลเป็นลบ

3.4 การประเมินผลการทดสอบการใช้โปรแกรม

การประเมินผลของโปรแกรมที่ช่วยในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ในส่วนของแบคทีเรียแกรมบวก (กรณีทราบชื่อสกุลของแบคทีเรีย) จะทำการประเมินผลความถูกต้องและน่าเชื่อถือของผลการทดสอบทางชีวเคมีต่างๆ ดังที่กล่าวไว้

ในส่วนที่ได้ผลการทดสอบที่แตกต่างกัน จะทำการตรวจสอบซ้ำและหาข้อมูลเพิ่มเติมจากแหล่งต่างๆ เพื่อดูผลการทดสอบที่ถูกต้อง เพื่อที่จะนำมาแก้ไขและปรับปรุงให้โปรแกรม FBI dent เวอร์ชั่น 1.0 มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และมีประสิทธิภาพมากที่สุด นอกจากนี้ จะทำการถ่ายภาพเพื่อที่จะนำมาใช้ประกอบผลการทดสอบในโปรแกรม FBI dent เวอร์ชั่น 1.0 อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

4.1.1 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรม

จากการย้อมแกรมเพื่อดูรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 9 ชนิด โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเชื้อ *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* และ *Bacillus subtilis* มีรูปร่างเป็นท่อนตรงหรือเกือบตรง *Lactobacillus casei* มีรูปร่างเป็นท่อนยาว *Lactobacillus lactis* มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น *Listeria monocytogenes* มีรูปร่างเป็นท่อน *Leuconostoc mesenteroides* มีรูปร่างกลมรี *Pediococcus halophilus* และ *Staphylococcus aureus* มีรูปร่างกลม ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 9 ชนิดนี้ติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต แสดงดังตารางที่ 4.1

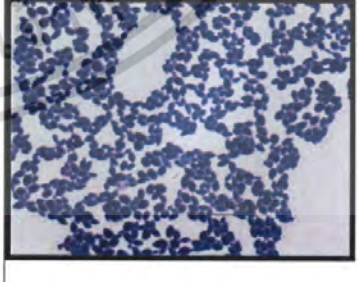
การติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกมีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และมีความซับซ้อนขององค์ประกอบที่ผนังเซลล์น้อยกว่า เมื่อล้างสีด้วยแอลกอฮอล์ เซลล์จะเหี่ยว เพราะเกิดการสูญเสียน้ำ เยื่อหุ้มเซลล์มีรูขนาดเล็กลง สารประกอบโมเลกุลใหญ่ของสีละลายออกมาไม่ได้ เซลล์ยังคงติดสีม่วง เมื่อย้อมทับด้วยซาฟรานิน จึงย้อมไม่ติดสีแดง (นงลักษณ์และปรีชา ,2547)

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการย้อมแกรมของแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 9 ชนิด

เชื้อทดสอบ	ลักษณะรูปร่าง	ภาพถ่ายลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของเชื้อทดสอบ
Bacillus cereus	รูปร่างเป็นท่อนตรง หรือเกือบตรง มีเอนโดสปอร์	

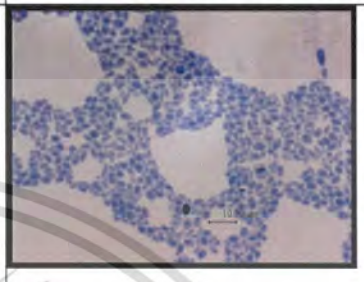
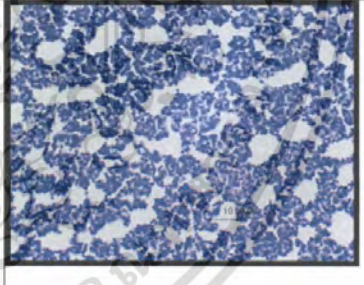
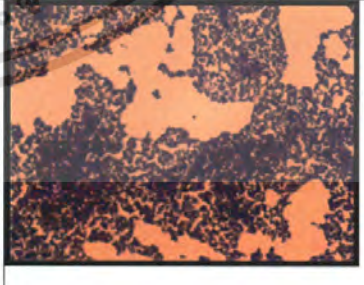
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

เชื้อทดสอบ	ลักษณะรูปร่าง	ภาพถ่ายลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของเชื้อทดสอบ
Bacillus coagulans	รูปร่างเป็นท่อนตรง หรือเกือบตรง มีเอนโดสปอร์	
Bacillus subtilis	รูปร่างเป็นท่อนตรง หรือเกือบตรง มีเอนโดสปอร์	
Lactobacillus casei	รูปร่างเป็นท่อนยาว	
Lactobacillus lactis	รูปร่างเป็นท่อนสั้นถึงกลมรี	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

เชื้อทดสอบ	ลักษณะรูปร่าง	ภาพถ่ายลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของเชื้อทดสอบ
Leuconostoc mesenteroides	รูปร่างกลมรี	
Listeria monocytogenes	มีรูปร่างเป็นท่อน	
Pediococcus halophilus	รูปร่างกลม	
Staphylococcus aureus	รูปร่างกลม	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ลักษณะโคโลนี

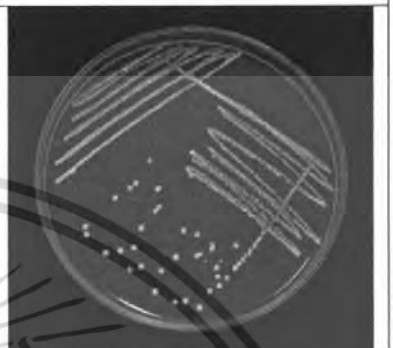
จากการนำเชื้อทดสอบทั้ง 9 ชนิด มาทำการ cross streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อดูลักษณะโคโลนีของเชื้อแต่ละชนิด โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน พบว่า *Bacillus cereus* , *Bacillus coagulans* , *Listeria monocytogenes* , *Pediococcus halophilus* และ *Staphylococcus aureus* มีโคโลนีผิวเรียบ สีครีม ทึบแสง *Bacillus subtilis* มีโคโลนีผิวเรียบหรือขรุขระ สีครีม ทึบแสง *Lactobacillus casei* และ *Leuconostoc mesenteroides* มีโคโลนีผิวเรียบ สีขาว *Lactobacillus lactis* มีโคโลนีผิวขรุขระ สีครีม แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อทดสอบ 9 ชนิด

เชื้อทดสอบ	ลักษณะโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ภาพถ่ายลักษณะโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ
Bacillus cereus	โคโลนีผิวเรียบ สีครีม ทึบแสง ขอบหยัก	
Bacillus coagulans	โคโลนีผิวเรียบ สีครีม ทึบแสง ขอบเรียบ	
Bacillus subtilis	โคโลนีผิวเรียบหรือขรุขระ สีครีม ทึบแสง ขอบเรียบ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

เชื้อทดสอบ	ลักษณะโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ภาพถ่ายลักษณะโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ
Lactobacillus casei	โคโลนีผิวเรียบ สีขาว ขอบเรียบ	
Lactobacillus lactis	โคโลนีผิวขรุขระ สีครีม ขอบเรียบ	
Leuconostoc mesenteroides	โคโลนีผิวเรียบ ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	
Listeria monocytogenes	โคโลนีผิวเรียบ สีครีม ทึบแสง ขอบเรียบ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

เชื้อทดสอบ	ลักษณะโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ภาพถ่ายลักษณะโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ
Pediococcus halophilus	โคโลนีผิวเรียบ สีครีม ทึบแสง ขอบเรียบ	
Staphylococcus aureus	โคโลนีผิวเรียบ สีครีม ทึบแสง ขอบเรียบ	

4.2 การทดสอบทางชีวเคมี

4.2.1 *Bacillus cereus*

จากการทดสอบทางชีวเคมีตามโปรแกรม FBI dent ในกรณีที่ทราบชื่อสกุลแบคทีเรีย เชื้อ *B. cereus* มีการทดสอบดังนี้ การเคลื่อนที่ ความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการสร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส และความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท ผลการทดสอบพบว่า *B. cereus* สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยเชื้อจะมีรอยการเจริญออกจากรอยที่แทงไว้ สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสได้ โดยอาหารที่ใส่เชื้อจะมีการเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลือง แต่ไม่สามารถสร้างแก๊สได้ และสามารถรีดิวซ์ไนเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยเกิดสีแดงปนตะกอน ซึ่งผลที่ได้ตรงกับผลจากโปรแกรม FBIdent Version 1.0 แสดงดังตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus cereus* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับโปรแกรม FBI dent V.1.0

วิธีการทดสอบของ เชื้อ *B. cereus*	ผลการทดสอบ	ผลจากโปรแกรม FBI dent V.1.0
การเคลื่อนที่	+	+
Acid production from glucose	+	+
Gas production from glucose	-	-
Nitrate reduction test	+	+

4.2.2 *Bacillus coagulans*

จากการทดสอบทางชีวเคมีตามโปรแกรม FBI dent ในกรณีที่ทราบชื่อสกุลแบคทีเรีย เชื้อ *B. coagulans* มีการทดสอบดังนี้ การเคลื่อนที่ ความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการสร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส และความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท ผลการทดสอบพบว่า *B. coagulans* สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสได้ แต่ไม่สามารถสร้างแก๊สได้ และสามารถรีดิวซ์ไนเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ซึ่งผลที่ได้ตรงกับผลจากโปรแกรม FBIdent Version 1.0 แสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus coagulans* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับโปรแกรม FBI dent V.1.0

วิธีการทดสอบของเชื้อ *B. coagulans*	ผลการทดสอบ	ผลจากโปรแกรม FBI dent V.1.0
การเคลื่อนที่	+	+
Acid production from glucose	+	+
Gas production from glucose	-	-
Nitrate reduction test	+	+

4.2.3 *Bacillus subtilis*

จากการทดสอบทางชีวเคมีตามโปรแกรม FBI dent ในกรณีที่ทราบชื่อสกุลแบคทีเรีย เชื้อ *B. subtilis* มีการทดสอบดังนี้ การเคลื่อนที่ ความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการสร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส และความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท ผลการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดสอบพบว่า *B. subtilis* สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสได้ แต่ไม่สามารถสร้างแก๊สได้ และสามารถรีดิวซ์ไนเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ซึ่งผลที่ได้ตรงกับผลจากโปรแกรม FBIdent Version 1.0 แสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus subtilis* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับ โปรแกรม FBI dent V.1.0

วิธีการทดสอบของเชื้อ *B. subtilis*	ผลการทดสอบ	ผลจากโปรแกรม FBI dent V.1.0
การเคลื่อนที่	+	+
Acid production from glucose	+	+
Gas production from glucose	-	-
Nitrate reduction test	+	+

4.2.4 *Lactobacillus casei*

จากการทดสอบทางชีวเคมีตามโปรแกรม FBI dent ในกรณีที่ทราบชื่อสกุลแบคทีเรีย เชื้อ *L. casei* มีการทดสอบดังนี้ การเคลื่อนที่ ความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการสร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส และความสามารถในการใช้เซลโลไบโอส ผลการทดสอบพบว่า *L. casei* สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสได้ แต่ไม่สามารถสร้างแก๊สได้ และสามารถใช้เซลโลไบโอสในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ซึ่งผลที่ได้ตรงกับผลจากโปรแกรม FBIdent Version 1.0 แสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Lactobacillus casei* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับ โปรแกรม FBI dent V.1.0

วิธีการทดสอบของเชื้อ *Lactobacillus casei*	ผลการทดสอบ	ผลจากโปรแกรม FBI dent V.1.0
การเคลื่อนที่	+	+
Acid production from glucose	+	+
Gas production from glucose	-	-
Utilization of cellobios	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.5 *Lactobacillus lactis*

จากการทดสอบทางชีวเคมีตามโปรแกรม FBI dent ในกรณีที่ทราบชื่อสกุลแบคทีเรียเชื้อ *L. lactis* มีการทดสอบดังนี้ การเคลื่อนที่ ความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการสร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส และความสามารถในการใช้เซลโลไบโอส ผลการทดสอบพบว่า *L. lactisi* สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสได้ แต่ไม่สามารถสร้างแก๊สได้ และสามารถใช้เซลโลไบโอสในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ซึ่งผลที่ได้ตรงกับผลจากโปรแกรม FBIdent Version 1.0 แสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Lactobacillus lactis* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับ โปรแกรม FBI dent V.1.0

วิธีการทดสอบของเชื้อ *Lactobacillus lactis*	ผลการทดสอบ	ผลจากโปรแกรม FBI dent V.1.0
การเคลื่อนที่	+	+
Acid production from glucose	+	+
Gas production from glucose	-	-
Utilization of cellobios	-	-

4.2.6 *Leuconostoc mesenteroides*

จากการทดสอบทางชีวเคมีตามโปรแกรม FBI dent ในกรณีที่ทราบชื่อสกุลแบคทีเรียเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* มีการทดสอบดังนี้ การเคลื่อนที่ การทดสอบการใช้อาร์จินีน การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส และการทดสอบการสร้างอินโดล ผลการทดสอบพบว่า *Leuconostoc mesenteriodes* ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สามารถใช้อาร์จินีนได้ ไม่สามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลสได้ และไม่สามารถสร้างอินโดลได้ ซึ่งผลที่ได้ตรงกับผลจากโปรแกรม FBIdent Version 1.0 แสดงดังตารางที่ 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับ โปรแกรม FBI dent V.1.0

วิธีการทดสอบของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides*	ผลการทดสอบ	ผลจากโปรแกรม FBI dent V.1.0
การเคลื่อนที่	-	-
Arginine dihydrolase test	-	-
Catalase test	-	-
Indole test	-	-

4.2.7 *Listeria monocytogenes*

จากการทดสอบทางชีวเคมีตามโปรแกรม FBI dent ในกรณีที่ทราบชื่อสกุลแบคทีเรียเชื้อ *Listeria monocytogenes* มีการทดสอบดังนี้ การเคลื่อนที่ การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส และความสามารถในการสร้างกรดจากแมนนิทอล ผลการทดสอบพบว่า *Listeria monocytogenes* สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลสได้ ไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดส และสามารถสร้างกรดจากแมนนิทอลได้ ซึ่งผลที่ได้ตรงกับผลจากโปรแกรม FBIdent Version 1.0 แสดงดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Listeria monocytogenes* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับ โปรแกรม FBI dent V.1.0

วิธีการทดสอบของเชื้อ *Listeria monocytogenes*	ผลการทดสอบ	ผลจากโปรแกรม FBI dent V.1.0
การเคลื่อนที่	+	+
Catalase test	+	+
Oxidase test	-	-
Acid production from mannitol	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.8 *Pediococcus halophilus*

จากการทดสอบทางชีวเคมีตามโปรแกรม FBI dent ในกรณีที่ทราบชื่อสกุลแบคทีเรียเชื้อ *Pediococcus halophilus* มีการทดสอบดังนี้ การเคลื่อนที่ การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท และการทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส ผลการทดสอบพบว่า *Pediococcus halophilus* ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลสได้ ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้ และไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดส ซึ่งผลที่ได้ตรงกับผลจากโปรแกรม FBIdent Version 1.0 แสดงดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Pediococcus halophilus* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับ โปรแกรม FBI dent V.1.0

วิธีการทดสอบของเชื้อ *Pediococcus halophilus*	ผลการทดสอบ	ผลจากโปรแกรม FBI dent V.1.0
การเคลื่อนที่	-	-
Catalase test	-	-
Nitrate reduction test	-	-
Oxidase test	-	-

4.2.9 *Staphylococcus aureus*

จากการทดสอบทางชีวเคมีตามโปรแกรม FBI dent ในกรณีที่ทราบชื่อสกุลแบคทีเรียเชื้อ *Staphylococcus aureus* มีการทดสอบดังนี้ การเคลื่อนที่ การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส และความสามารถในการสร้างกรดจากดีไซโลส ผลการทดสอบพบว่า *Staphylococcus aureus* ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลสได้ ไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดส และสามารถสร้างกรดจากดีไซโลสได้ ซึ่งผลที่ได้ตรงกับผลจากโปรแกรม FBIdent Version 1.0 แสดงดังตารางที่ 4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับ โปรแกรม FBI dent V.1.0

วิธีการทดสอบของเชื้อ *Staphylococcus aureus*	ผลการทดสอบ	ผลจากโปรแกรม FBI dent V.1.0
การเคลื่อนที่	-	-
Catalase test	+	+
Oxidase test	-	-
Acid production from D-xylose	+	+

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาโดยดูลักษณะโคโลนีเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และย้อมแกรมเพื่อดูรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียแกรมบวกที่นำมาทดสอบ 9 ชนิด พบว่าลักษณะที่ได้ตรงกับข้อมูลที่มีในโปรแกรม FBI dent version 1.0 ที่ได้สร้างไว้ จึงได้ทำการถ่ายภาพลักษณะเชื้อที่ได้จากการทดลองนำไปลงในโปรแกรมเพื่อให้โปรแกรมมีความสมบูรณ์มากขึ้น และเมื่อนำเชื้อทั้ง 9 ชนิดซึ่งทราบชื่อสกุลของเชื้อ มาทดสอบทางชีวเคมีเพื่อดูผลการทดสอบว่าตรงกับผลในโปรแกรมที่สร้างไว้หรือไม่ โดยแบคทีเรียทั้ง 9 ชนิดมีวิธีการทดสอบทางชีวเคมีที่แตกต่างกันออกไปแล้วแต่ชนิดของเชื้อ จากการทดสอบพบว่าผลการทดสอบได้ผลตรงกับโปรแกรมที่สร้างไว้ จึงเห็นได้ว่าข้อมูลที่มีในโปรแกรม FBI dent version 1.0 ที่สร้างไว้ เมื่อนำแบคทีเรียแกรมบวกที่มีในโปรแกรมมาทดสอบ (กรณีทราบชื่อสกุลของแบคทีเรีย) ผลที่ได้ตรงกับข้อมูลในโปรแกรม แสดงว่าโปรแกรม FBI dent version 1.0 มีความน่าเชื่อถือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการนำแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 9 ชนิดมาทำการศึกษาลักษณะรูปร่างโดยการย้อมแกรมและศึกษาการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งนำมาทดสอบทางชีวเคมีตามที่โปรแกรม FBI dent version 1.0 เขียนไว้ พบว่าผลการทดสอบที่ได้ตรงกับข้อมูลที่มีอยู่ในโปรแกรมทั้งหมด แสดงว่าโปรแกรม FBI dent version 1.0 มีความถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่เราทราบชื่อสกุลแบคทีเรียที่นำมาตรวจสอบ

จากการหาข้อมูลในหนังสือ Bergey's Manual of Determinative bacteriology ในการจัดจำแนก bacillus ในระดับสปีชีส์ต่างๆ จะต้องมีการทดสอบทางชีวเคมีมากกว่าที่มีในโปรแกรม FBI dent version 1.0 เช่น ในการที่จะจัดจำแนก *B. subtilis* ออกจาก *B. pumitus* และ *B. licheniformis* จะต้องศึกษาและใช้การทดสอบต่างๆ ได้แก่ ขนาดของเซลล์ ความสามารถในการย่อยแป้ง ความสามารถในการย่อยฮิบปูเรต (hippurate) ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเทรตเป็นไนไทรต์ ความสามารถในการเจริญในสภาวะไร้อากาศ รวมทั้งอุณหภูมิสูงสุดและต่ำสุดในการเจริญ ลักษณะเหล่านี้สามารถใช้ในการจำแนกสปีชีส์ทั้งสามออกจากกันได้ หรือในการจัดจำแนก *B.cereus* ออกจาก *B.anthracis* , *B. thuringiensis* และ *B. megaterium* โดยศึกษาขนาดเซลล์ การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ การสร้างกรดจากน้ำตาลอะราบิโนส ไซโลส และแมนนิทอล ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเทรตเป็นไนไทรต์ ปฏิกิริยา egg yalk ความสามารถในการเจริญในสภาวะไร้อากาศ ความสามารถในการสร้างด่างบนอาหารที่มีเกลือหรือซิเตรท รวมทั้งอุณหภูมิสูงสุดและต่ำสุดในการเจริญ นอกจากนี้ยังสามารถจำแนก *B. coagulans* ออกจาก *B. stearothermophilus* และ *B. alvei* โดยศึกษาขนาดเซลล์ การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ การสร้างเอนไซม์แคตาเลส การสร้างกรดจากน้ำตาลอะราบิโนส ไซโลส และแมนนิทอล ความสามารถในการเจริญในสภาวะไร้อากาศ ความสามารถในการสร้างอินโดลและไดไฮดรอกซีอะซิโตน (dihydroxyacetone) รวมทั้งอุณหภูมิสูงสุดและต่ำสุดในการเจริญ ซึ่งในโปรแกรม FBI dent version 1.0 มีข้อมูลในการทดสอบทางชีวเคมี 4 อย่าง ได้แก่ ความสามารถในการเคลื่อนที่ ความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการสร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส และความสามารถในการีดิสซ์ไนเตรท ซึ่งข้อมูลที่นำมาใช้ในการศึกษานี้สามารถจำแนกได้แค่ระดับจีนัสเท่านั้น นั่นคือ *bacillus* ถ้าต้องการจำแนกถึงระดับสปีชีส์ก็ต้องมีการทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติมดังข้อมูลใน Bergey's Manual of Determinative bacteriology จึงจะสามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *bacillus* ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษนี้ทำเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของโปรแกรม FBI dent version 1.0 ในกรณีที่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรีย แต่ในกรณีที่ไม่ทราบชื่อสกุลของแบคทีเรีย จะใช้โปรแกรมนี้ช่วยในการประมวลผลจากฐานข้อมูลแบคทีเรีย โดยต้องนำแบคทีเรียที่ไม่ทราบชื่อสกุลมาศึกษาสัณฐานวิทยา และนำข้อมูลที่ได้ป้อนลงในโปรแกรม FBI dent version 1.0 จากนั้นทดสอบทางชีวเคมีตามที่โปรแกรมเขียนไว้ นำผลการทดสอบแต่ละการทดสอบไปลงในโปรแกรม ในที่สุดโปรแกรมจะประมวลผลมาให้ว่าแบคทีเรียชนิดนี้อยู่ในจีนัสและสปีชีส์ใด แต่เนื่องจากต้องนำข้อมูลจากการทดสอบแต่ละขั้นตอนมาลงในโปรแกรม ทำให้ไม่สะดวกในการใช้งาน ถ้าโปรแกรมสามารถบอกวิธีการตรวจสอบแบคทีเรียได้ทั้งหมดทีเดียว ก็จะง่ายต่อการนำแบคทีเรียมาตรวจสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กมลทิพย์ บูรณะสุคนธ์ . 2547 . การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้ง .วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

คมรัชกร ราชสมบัติ. 2548. การพัฒนาข้อมูลแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหาร. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร-ลาดกระบัง.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Bodhipadma, K., Vatanyoopaisarn ,S., Sansukthaweesub, S., and Susakule, H. 1996. Application of CDS/ISIS in food bacterial identification. *Journal of King Mongkut 's institute of Technology North Bangkok* 6(5) : 4 – 8.

Busse, H-J., Denner, E.B.M., and Lubitz, W. 1996 . Classification and identification of bacteria : current appoarches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology* 47 : 3-38.

Buyer, J.S. 2002 . Identification of bacteria from single colonies by fatty acid analysis. *Journal of Microbiological Methods* 48 : 259-265.

De Paoli, P. 2005. Biobanking in microbiology : from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiology Reviews*. In Press.

Frandberg, E. and J. Schnurer. 1994. Chitinoloytic properties of *Bacillus pubuli* K.I. *Journal of Applied Bacteriology* 76 : 361 - 367.

Holt, J.G., Krieg , N.R., Sneath , P.H.A., Staley, J.T., and Williams , S.T. 1994. Bergy 's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed. Williams & Wilkins , Baltimore.

Krieg , N.R., and Holt , J.G ., Eds. 1984 . Bergy's Manual of Systemtic Bacteriology , vol.1 Williams and Wilkins , Baltimore.

[Online]. Available http://www.textbookofbacteriology.net

[Online]. Available http://www.gogi-foods.com/index.php?lay=show&ac=arti...

[Online]. Available http://www.genome.jgi-psf.org/.../leume/leume.home.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1. Motility Test Medium

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

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH 7.4 ± 0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5-8 องศาเซลเซียส การนำมาใช้ ให้หลอมละลายในน้ำเดือด และปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จึงเติม Triphenyl Tetrazolium chloride ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เทใส่หลอดทดสอบหลอดละ 8 มิลลิลิตร

2. Nutrient agar

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

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3. Nutrient broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. 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 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

5. Tryptophane broth

Tryptone หรือ trypticase	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH 6.9 ± 0.2 ใช้หลอดทดสอบละ 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

6. Fermentation carbohydrate medium

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

ต้มส่วนผสมทั้งหมดจนละลาย แล้วเติม Bromthymol blue 1.6 เปอร์เซ็นต์ 4 มิลลิลิตร เตรียมอาหารใส่หลอดทดสอบ หลอดละประมาณ 6 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที ยกออกมาแช่ในน้ำเย็น ทั้งนี้เพื่อป้องกันน้ำตาลแตกตัว เพราะจะเสียคุณสมบัติของน้ำตาลแต่ละชนิดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. 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 เปอร์เซ็นต์ 4 มิลลิลิตร เตรียมอาหารใส่หลอดทดสอบ หลอดละประมาณ 6 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที ยกออกมาแช่ในน้ำเย็น ทั้งนี้เพื่อป้องกันน้ำตาลแตกตัว เพราะจะเสียคุณสมบัติของน้ำตาลแต่ละชนิดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารที่ใช้ทดสอบ

1. Methyl red solution

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

ละลาย Methyl red ใน Ethanol 95% แล้วจึงเติมน้ำกลั่น

2. α-Napthylamine solution

α-napthylamine	0.5	กรัม
Acetic acid 5 N	100.0	มิลลิลิตร

เตรียม Acetic acid 5 นอร์มัล โดยเท acetic acid 17.4 นอร์มัล ลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นละลาย α-napthylamine 0.5 กรัม ใน Acetic acid 5 นอร์มัล 100 มิลลิลิตร

3. Salfanilic acid solution

Salfanilic acid	0.8	กรัม
Acetic acid 5 N	100.0	มิลลิลิตร

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

4. H_2O_2 reagent

H_2O_2	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

5. Kovac's reagent

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลาย P-dimethylaminobenzaldehyde ใน alcohol โดยทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส จนกระทั่งละลายหมด ปล่อยให้เย็น เติม HCL conc. ช้าๆ เก็บในขวดหยดสีน้ำตาล และเอาไว้ในตู้เย็น สารทดสอบควรมีสีเหลืองอ่อน

6. Bromthymol blue 1.6 %

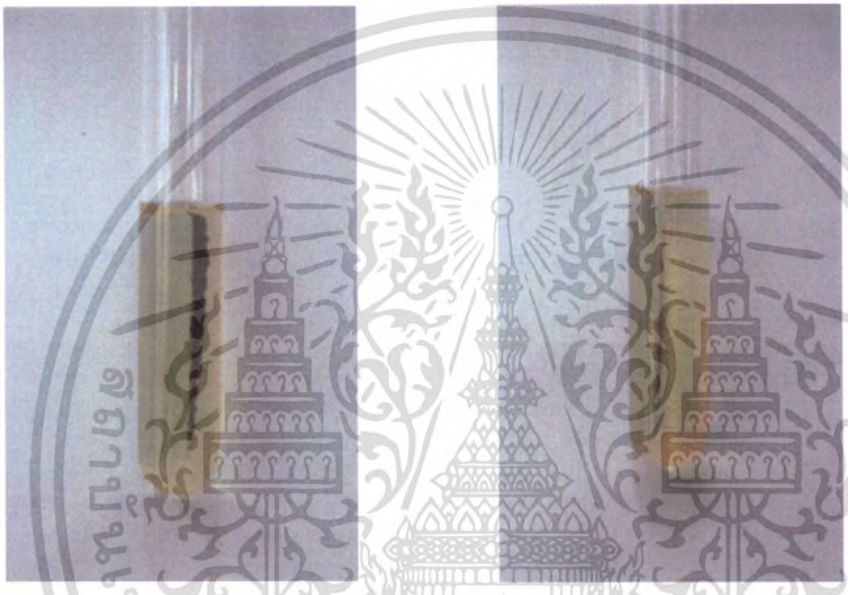
Bromthymol blue	1.6	กรัม
Ethyl alcohol	100.0	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

รูปที่ได้จากการทดสอบทางชีวเคมี

1. การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test)

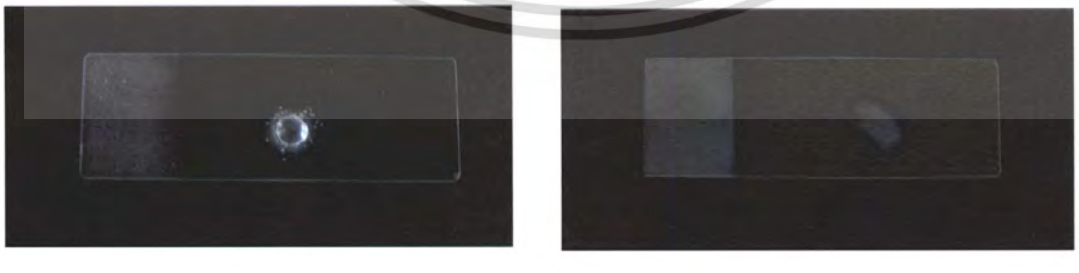


ผลบวก ผลลบ

ผลบวก เชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้ โดยมีรอยการเจริญออกจากรอยที่แทงไว้

ผลลบ เชื้อไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่มีรอยการเจริญออกจากรอยที่แทงไว้

2. การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส (Catalase test)



ผลบวก ผลลบ

ผลบวก เกิดฟองแก๊ส แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลสได้

ผลลบ ไม่เกิดฟองแก๊ส แสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส (Oxidase test)

ผลบวก ผลลบ

ผลบวก เกิดสีม่วงภายใน 10 วินาที แสดงว่าแบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์ไซโตโครม ซี

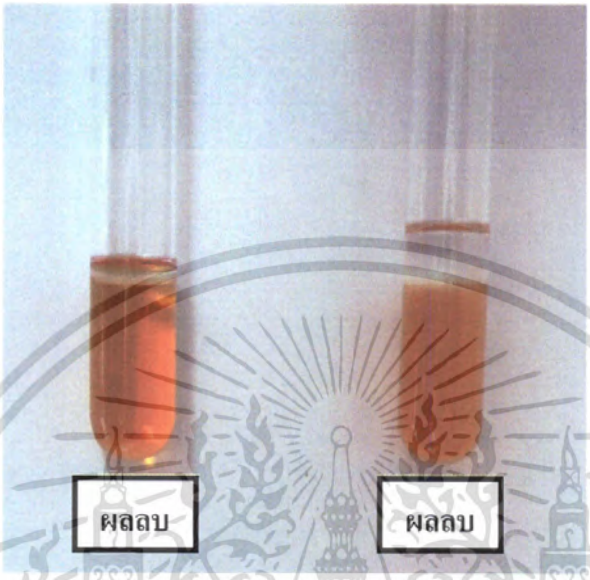
ผลลบ ไม่เกิดสีม่วง แสดงว่าแบคทีเรียไม่มีการสร้างเอนไซม์ไซโตโครม ซี

4. การทดสอบการรีดิวซ์ไนเทรต (Nitrate reduction test)

ผลบวก เกิดสีแดงปนตะกอน ถ้าไม่เปลี่ยนสี ไม่ถือเป็นผลลบ ให้ทดสอบโดยเติมผงสังกะสี หลังจากเติมผงสังกะสีแล้ว หากไม่เปลี่ยนสีให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าเปลี่ยนเป็นสีแดง ให้ผลเป็นลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

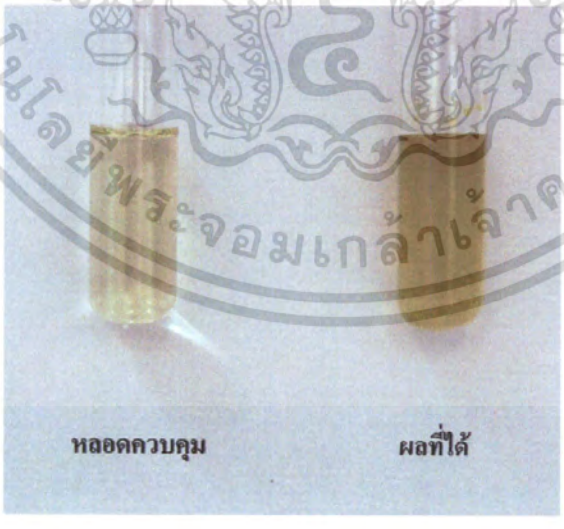
5. การทดสอบการใช้อาร์จินีน (Arginine dihydrolase test)



ผลบวก เกิดสีม่วงหรือสีม่วงแดง

ผลลบ เกิดสีเหลือง (ไม่เปลี่ยนสี)

6. การทดสอบการสร้างอินโดล (Indole test)



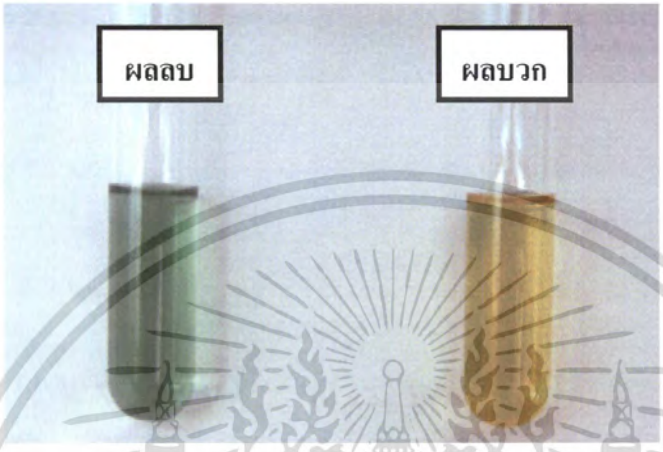
ผลบวก เกิดสีแดงที่ผิวชั้นบน

ผลลบ ไม่เกิดสีแดงที่ผิวชั้นบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส

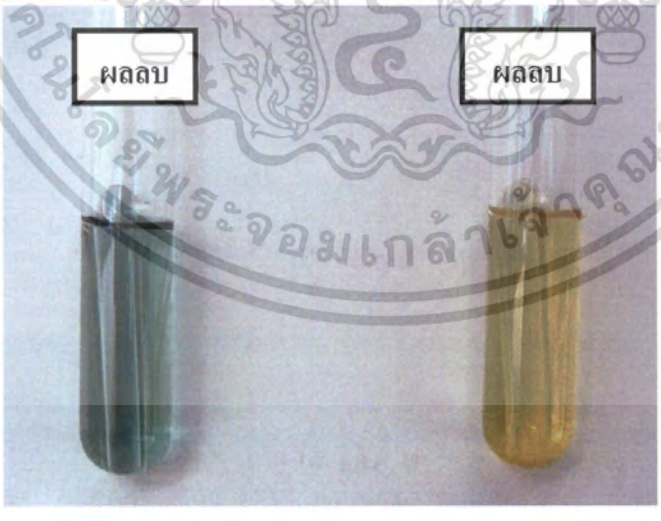
(Acid production from glucose)



ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง เนื่องจากเชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ จึงสร้างกรดขึ้น

ผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

8. การทดสอบการสร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส (Gas production from glucose)

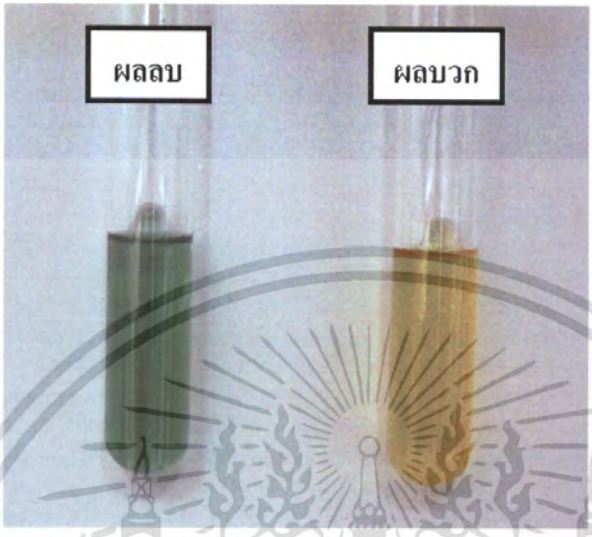


ผลบวก เกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส

ผลลบ ไม่เกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

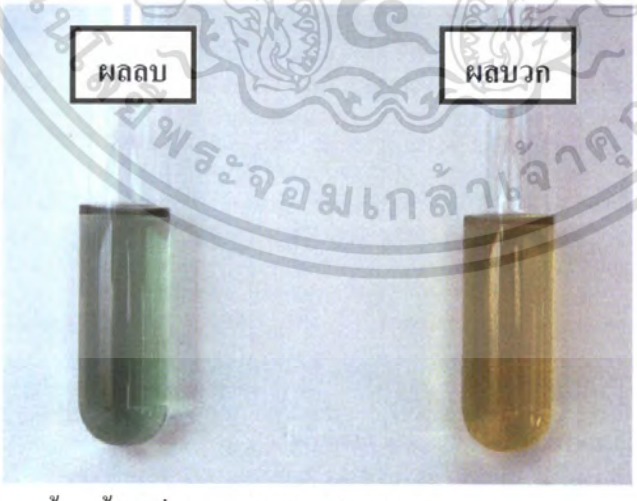
9. การทดสอบความสามารถในการใช้เซลโลไบโอส (Utilization of cellobiose)



ผลบวก อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง และมีแก๊สเกิดขึ้น หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างใดอย่างหนึ่ง

ผลลบ อาหารไม่เปลี่ยนสี และไม่เกิดแก๊ส

10. การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาลดีไซโลส (Acid production from D-xylose)



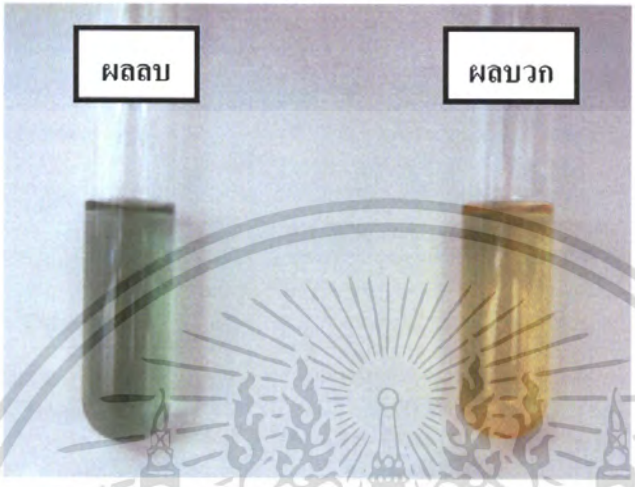
ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง

ผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากแมนนิทอล

(Acid production from mannitol)



ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง

ผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้