การคัดแยกและการศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของ marine bacteria ที่แยกได้จากพื้นที่ชายทะเลฝั่งตะวันออกของไทย

SCREENING AND CHARACTERIZATION OF MARINE BACTERIA ISOLATION FROM EASTERN COAST IN THAILAND

ปิยะรักษ์ กอบโกย
มุธิตา พรมไชย

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การคัดแยกและการศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของ marine bacteria ที่แยกได้จากพื้นที่ชายทะเลฝั่งตะวันออกของไทย

SCREENING AND CHARACTERIZATION OF MARINE BACTERIA ISOLATION FROM EASTERN COAST IN THAILAND

ปิยะรักษ์ กอบโกย
มุธิตา พรมไชย

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

SCREENING AND CHARACTERIZATION OF MARINE BACTERIA ISOLATION FROM EASTERN COAST IN THAILAND

Piyaraks Kopkoi
Mutita Promchai

A COOPERATIVE EDUCATION SUBMITTED IN PARTIAL
FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อสหกิจศึกษา	การคัดแยกและการศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของ marine bacteria ที่แยกได้จากพื้นที่ชายทะเลฝั่งตะวันออกของไทย SCREENING AND CHARACTERIZATION OF MARINE BACTERIA ISOLATION FROM EASTERN COAST IN THAILAND
ชื่อนักศึกษา	นางสาวปิยะรักษ์ กอบโกย รหัสนักศึกษา 57050852 นางสาวมุธิตา พรมไชย รหัสนักศึกษา 57050877
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.นิลเนตร อัศวะศิริจินดา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.ฉัตรฤดี สุวรรณชาติ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ประธานกรรมการ	
ดร.นิลเนตร อัศวะศิริจินดา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	
ดร.ฉัตรฤดี สุวรรณชาติ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อสหกิจศึกษา	การคัดแยกและการศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของ marine bacteria ที่แยกได้จากพื้นที่ชายทะเลฝั่งตะวันออกของไทย
ชื่อนักศึกษา	นางสาวปิยะรักษ์ กอบโกย รหัสนักศึกษา 57050852
	นางสาวมุธิตา พรมไชย รหัสนักศึกษา 57050877
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.นิลเนตร อัศวะศิริจินดา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.ฉัตรฤดี สุวรรณชาติ

บทคัดย่อ

โครงงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของ gliding bacteria ที่แยกได้จากพื้นที่ชายทะเลฝั่งตะวันออกของไทย คือ หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ผลการศึกษาคุณลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา คุณลักษณะทางด้านชีวเคมี และคุณลักษณะทางด้านพันธุวิศวกรรม โดยคัดแยกแบคทีเรียในน้ำทะเลได้ 65 ไอโซเลท จากตัวอย่าง 25 ตัวอย่าง จากนั้นจึงทำการเพาะเชื้อ gliding bacteria จากหลอดเก็บเชื้อด้วยวิธี lyophilization 11 สายพันธุ์ เพื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียจากน้ำทะเล พบว่าแบคทีเรียที่เก็บตัวอย่างจากน้ำทะเลไม่พบเชื้อที่เป็น gliding bacteria และจากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของ gliding bacteria กับแบคทีเรียที่เก็บตัวอย่างจากน้ำทะเล สามารถสรุปได้ว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียในน้ำทะเลและ gliding bacteria เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างได้หลากหลาย เช่น รูปร่างท่อน (rod) กลม (cocci) และเส้นสาย (filament) โดย gliding bacteria จะไม่มีแฟลกเจลลาแต่เคลื่อนที่ด้วยการคืบคลานบนผิวหน้าอาหาร (gliding motility) มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่มีความหลากหลาย เช่น การผลิตเอนไซม์คะตาเลส เอนไซม์ออกซิเดส และสามารถศึกษาการใช้สับสเตรทของเชื้อโดยชุดทดสอบ API 20E, API 20NE และ API ZYM ส่วนการทดสอบคุณสมบัติทางพันธุวิศวกรรมพบว่าเชื้อที่คัดแยกได้มีหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudoalteromonas piscicida*, *Pseudidiomarina arabiensis*, *Ruegeria* sp., *Vibrio* sp., *Vibrio azureus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio neocaledonicus*, *Vibrio natriegens*, *Pseudidiomarina sediminum*, *Nesiotobacter exalbescens*, *Tenacibaculum mesophilum*, *Idiomarina sediminum*, *Brevibacterium sediminis*, *Brevibacterium casei*, *Rapidithrix thailandica* TISTR 1750, *Rapidithrix*

thailandica และ *Rapidithrix* sp. TISTR 1768 ซึ่งคุณสมบัติต่างๆ ของเชื้อเหล่านี้เป็นที่น่าสนใจและอาจมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการผลิตสารสีและเอนไซม์ที่มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมหรือทางด้านการแพทย์ เป็นต้น

คำสำคัญ : แบคทีเรียในน้ำทะเล gliding bacteria การทดสอบเอนไซม์คะตาเลส การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส ชุดทดสอบ API 20E ชุดทดสอบ API 20NE ชุดทดสอบ API ZYM

Title	SCREENING AND CHARACTERIZATION OF MARINE BACTERIA ISOLATION FROM EASTERN COAST IN THAILAND
Students	Miss Piyaraks Kopkoi Student ID 57050852
	Miss Mutita Promchai Student ID 57050877
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Dr.Nilnate Assavasirijinda
Co-advisor	Dr.Chatrudee Suwannachart

Abstract

This study is to isolate and characterize gliding bacteria which isolated from eastern cost in Thailand at Sai Kaew beach, Sattahip District, Chonburi Province. The 65 isolates from 25 samples were isolated. The results of characterization, morphology, physiology, genotypic characterization and biochemical characterization found that the isolated bacteria are not gliding bacteria. This study also study gliding bacteria from culture collection to compare with marine bacteria. The results of this study show that morphology of marine bacteria and gliding bacteria are Gram negative bacteria with various shapes such as rod, cocci and filament. However, gliding bacteria are lack of flagella but show gliding motility. Morover, The biochemical properties are diverse such as producing catalase oxidase enzyme, utilize various substrate by observing with the test kit API 20E, API 20NE and API ZYM. Inaddition, genotypic characterization results revealed that several strains were isolated such as *Pseudoalteromonas piscicida*, *Pseudidiomarina arabiensis*, *Vibrio azureus, Vibrio* sp. , *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio natriegens, Vibrio neocaledonicus*, *Pseudidiomarina sediminum, Ruegeria* sp., *Nesiotobacter exalbescens*, *Tenacibaculum mesophilum, Idiomarina sediminum*, *Brevibacterium sediminis*, *Brevibacterium casei*, *Rapidithrix thailandica* TISTR 1750, *Rapidithrix thailandica* and *Rapidithrix* sp. TISTR 1768. They

also have ability to produce various substances, for example, colorants and enzymes that are useful in various industries.

Keywords : marine bacteria , gliding bacteria, catalase test, oxidase test, API 20E, API 20NE, API ZYM

กิตติกรรมประกาศ

การที่ข้าพเจ้าไปฝึกปฏิบัติงานสหกิจศึกษา ณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ตั้งแต่วันที่ 8 มกราคม พ.ศ. 2561 ถึงวันที่ 30 เมษายน พ.ศ. 2561 ข้าพเจ้าได้รับคำแนะนำและความช่วยเหลือในด้านต่างๆ โดยเฉพาะอาจารย์ที่ปรึกษาคือ ดร.นิลเนตร อัศวะศิริจินดา ซึ่งได้ติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินงาน คอยให้คำแนะนำและความคิดเห็นต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำโครงงานวิจัย ขอขอบพระคุณสถานประกอบการและพนักงานทุกท่าน ที่ทำให้การปฏิบัติงานครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดีจากความร่วมมือและการสนับสนุนจากหลายฝ่ายดังนี้

1. ดร. ฉัตรฤดี สุวรรณชาติ ตำแหน่งนักวิจัย
2. นางสาวกาญจนา เรืองยศจันทนา ตำแหน่งผู้ช่วยนักวิจัย
3. นางสาวทัศนีย์ เวระสุระ ตำแหน่งผู้ช่วยนักวิจัย

ขอขอบพระคุณ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ประธานการสอบ ซึ่งได้ช่วยชี้แนะเกี่ยวกับการจัดทำรูปเล่มของโครงงานวิจัยรวมถึงส่วนของเนื้อหาให้มีความถูกต้อง สมบูรณ์มากขึ้น สุดท้ายข้าพเจ้าใคร่ขอขอบพระคุณทุกท่าน ที่มีส่วนเกี่ยวข้องและมีส่วนร่วมในการให้ข้อมูลและเป็นที่ปรึกษาในการทำโครงงานวิจัยฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ตลอดจนให้การดูแลให้ความเข้าใจเกี่ยวกับชีวิตของการทำงานจริง ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ปิยะรักษ์ กอบโกย

มุธิตา พรมไชย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูป ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 บทบาทของจุลินทรีย์ในน้ำทะเล 3

2.1.1 แบคทีเรียในน้ำทะเลช่วยในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ 3

2.1.2 แบคทีเรียในน้ำทะเลช่วยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของวัฏจักรสารต่างๆ ในทะเล 3

2.1.3 แบคทีเรียในน้ำทะเลทำให้เกิดโรคต่อสัตว์ทะเล 4

2.2 gliding bacteria 4

2.2.1 ลักษณะทั่วไปของ gliding bacteria 4

2.2.2 ประโยชน์ของ gliding bacteria 4

2.3 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ 5

2.3.1 streak plate technique 5

2.4 การย้อมแกรมแบคทีเรียและการส่องแกรมแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง 5

2.4.1 การย้อมแกรมเบื้องต้น 5

2.4.2 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา 7

2.5 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 8

2.5.1 หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 9

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6 การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส 10
2.7 การทดสอบเอนไซม์คะตาเลส 10
2.8 จัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้เครื่อง Automate Identification 11
รุ่น Vitek®2 compact
2.8.1 หลักการของเครื่อง Automate Identification 11
2.8.2 ชนิดของการ์ดทดสอบ (Identification Test Card) 12
2.9 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์โดยชุดทดสอบ API 20E, API 20NE 13
และ API ZYM (bioMérieux)
2.9.1 ชุดทดสอบ API 20E 13
2.9.2 ชุดทดสอบ API 20NE 15
2.9.3 ชุดทดสอบ API ZYM 17
2.10 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ 19
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 20
3.1 เครื่องมือและสารเคมี 20
3.1.1 วัสดุอุปกรณ์ 20
3.1.2 สารเคมี 20
3.2 การทดสอบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา 20
3.2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 20
3.2.2 การเคาะเชื้อ gliding bacteria 21
3.2.3 นำเชื้อ gliding bacteria ถ่ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ 22
3.2.4 การย้อมแกรม 22
3.2.5 การศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ 23
3.2.5.1 gliding bacteria 23
3.2.5.2 การถ่ายรูปเพลทเพื่อดูการเจริญของเชื้อ gliding bacteria 23
3.2.5.3 non gliding bacteria 23
3.2.5.4 การถ่ายรูปเพลทเพื่อดูการเจริญของเชื้อ non gliding bacteria 24
3.2.6 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในกลีเซอรอล 10% 24

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3 การทดสอบคุณลักษณะทางชีวเคมี (Biochemical characterization)..... 24
3.3.1 จัดจำแนกชนิดของเชอื้จุลินทรีย์โดยใช้เครื่อง Automate Identification.... 24
Vitek®2 compact
3.3.1.1 เครื่องมือและน้ำยาที่ใช้..... 24
3.3.1.2. วิธีการตรวจด้วยเครื่อง Automate Identification 25
3.3.1.3 วิธีการควบคุมคุณภาพการ์ดทดสอบ..... 26
3.3.2 การศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีชุดทดสอบ API 20E, API 20NE.. 27
และ API ZYM
3.3.2.1 ชุดทดสอบ API 20E..... 27
3.3.2.2 ชุดทดสอบ API 20NE..... 27
3.3.2.3 ชุดทดสอบ API ZYM..... 28
3.3.3 การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส..... 28
3.3.4 การทดสอบเอนไซม์คะตาเลส..... 29
3.4 การศึกษาคุณลักษณะทางพันธุกรรม (Genotypic characterization)..... 30
3.4.1 การเตรียม DNA Template..... 30
3.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเลส..... 30
บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 32
4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ gliding bacteria และ 33
แบคทีเรียในน้ำทะเล
4.2 ผลการศึกษาคุณลักษณะทางพันธุกรรม (Genotypic characterization)..... 98
4.2.1 ผลการหาลำดับเบสแล้วไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ..... 98
EZ TAXON
4.3 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมี..... 110
4.3.1 ผลการจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้เครื่อง Automate..... 110
Identificationรุ่น Vitek®2 compact
4.3.2 ผลความสามารถในการใช้สารตั้งต้นของเชื้อ โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E..... 125
4.3.3 ผลความสามารถในการใช้สารตั้งต้นของเชื้อ โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE... 133
4.3.4 ผลความสามารถในการใช้สารตั้งต้นของเชื้อ โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM..... 142
4.3.5 ผลการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดสและเอนไซม์คะตาเลส..... 152

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 156

5.1 สรุปผลการทดลอง 156

5.2 ข้อเสนอแนะ 157

เอกสารอ้างอิง 158

ภาคผนวก 161

ภาคผนวก ก 162

ภาคผนวก ข 165

ภาคผนวก ค 173

ภาคผนวก ง 198

ประวัติผู้วิจัย 211

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงชนิดของการ์ดทดสอบที่ใช้สำหรับจำแนกชนิดของแบคทีเรีย	12
2.2 แสดงฐานข้อมูลการแปลผลของเครื่อง Automate Identification	13
2.3 แสดงสารชีวเคมีของชุดทดสอบ API 20E และการอ่านผลการทดสอบ	14
2.4 แสดงสารชีวเคมีของชุดทดสอบ API 20NE และการอ่านผลการทดสอบ	16
2.5 แสดงสารชีวเคมีของชุดทดสอบ API ZYM และการอ่านผลการทดสอบ	17
4.1 แสดงข้อมูลค่าความคล้ายคลึงเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล EZ TAXON และ NCBI	98
4.2 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ S2.4, S17.8, S17.13, S21.1 และ S29.4 ด้วยเครื่อง Automate Identification	111
4.3 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ S32.1, S33.3, S34.1 และ S37.6 ด้วยเครื่อง Automate Identification	113
4.4 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736 และ TISTR 1741 ด้วยเครื่อง Automate Identification	116
4.5 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763 และ TISTR 1763 ด้วยเครื่อง Automate Identification	119
4.6 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1764, TISTR 1769 และ TISTR 1770 ด้วยเครื่อง Automate Identification	122
4.7 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S2.4, S17.8, S17.13, S21.1 และ S29.4 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E	126
4.8 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S32.1, S33.3, S34.1 และ S37.6 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E	127
4.9 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736 และ TISTR 1741 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E	129
4.10 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763 และ TISTR 1763 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E	130
4.11 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1764, TISTR 1769 และ TISTR 1770 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E	131
4.12 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S2.4, S17.8, S17.13, S21.1 และ S29.4 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE	134

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.13 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S32.1, S33.3, S34.1 และ S37.6 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE	135
4.14 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736 และ TISTR 1741 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE	137
4.15 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763 และ TISTR 1763 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE	140
4.16 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1764, TISTR 1769 และ TISTR 1770 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE	141
4.17 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S2.4, S17.8, S17.13, S21.1 และ S29.4 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM	143
4.18 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S32.1, S33.3, S34.1 และ S37.6 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM	144
4.19 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736 และ TISTR 1741 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM	146
4.20 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763 และ TISTR 1763 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM	149
4.21 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1764, TISTR 1769 และTISTR 1770 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM	150
4.22 แสดงผลการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดสและเอนไซม์คะตาเลสของ S2.4, S17.8, S17.13, S21.1, S29.4 และ S32.1	152
4.23 แสดงผลการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดสและเอนไซม์คะตาเลสของ S33.3, S34.1, S37.6, TISTR 1719, TISTR 1726 และ TISTR 1736	153
4.24 แสดงผลการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดสและเอนไซม์คะตาเลสของ TISTR 1741, TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763, TISTR 1763 และ TISTR 1764	154
4.25 แสดงผลการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดสและเอนไซม์คะตาเลสของ TISTR 1769 และ TISTR 1770	155
5.1 แสดงสรุปสายพันธุ์ของเชื้อแต่ละรหัสที่นำมาศึกษา	156

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 วัฏจักรกำมะถัน	3
2.2 ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ	6
2.3 การติดสีของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ	6
2.4 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	8
2.5 การจำลองดีเอ็นเอ	8
2.6 ขั้นตอนของเทคนิคพีซีอาร์	9
2.7 เครื่อง Automate Identification รุ่น Vitek®2 compact	11
2.8 หลุมทดสอบจำนวน 20 หลุม ของชุดทดสอบ API 20E	14
2.9 หลุมทดสอบจำนวน 20 หลุม ของชุดทดสอบ API 20NE	15
3.1 หลอดเก็บเชื้อแห้งโดยวิธี Lyophilization	21
3.2 การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส(oxidase test)	29
3.3 การทดสอบเอนไซม์คะตาเลส (catalase test)	29
4.1 - 4.65 แสดงลักษณะ A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X	33
4.66 แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S2.4, S17.8, S17.13, S21.1, S29.4, S32.1, S33.3, 34.1 และ S37.6 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E	125
4.67 แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736, TISTR 1741, TISTR 1750, TISTR 1760 และ TISTR 1763 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E	128
4.68 แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ เชื้อ TISTR 1764, TISTR 1769 และTISTR 1770 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E	131
4.69 แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S2.4, S17.8, S17.13, S21.1 และ S29.4 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE	133
4.70 แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S32.1, S33.3, S34.1 และ S37.6 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20N	135
4.71 แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ เชื้อ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736 และ TISTR 1741 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE	137

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.72	แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763 และ 1763, TISTR 1764, TISTR 1769 และ TISTR 1770 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE	139
4.73	แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S2.4, S17.8, S17.13, S21.1 และ S29.4 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM	142
4.74	แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S32.1, S33.3, S34.1 และ S37.6 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM	144
4.75	แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736 และ TISTR 1741 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM	146
4.76	แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763, TISTR 1763 TISTR 1764, TISTR 1769 และ TISTR 1770 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM	148

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

แบคทีเรียในน้ำทะเลมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ ได้ดี สารอินทรีย์ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ จะถูกย่อยสลายให้เป็นแร่ธาตุ ส่วนอีก 40 เปอร์เซ็นต์ จะเปลี่ยนเป็นองค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรีย สารอินทรีย์ที่ถูกย่อยสลายได้รวดเร็วได้แก่ กรดอะมิโนและคาร์โบไฮเดรตเชิงเดี่ยว ส่วนไขมันและโพลีแซคคาไรด์ที่ซับซ้อนมากๆ จะถูกย่อยสลายอย่างช้าๆ จากการค้นคว้าวิจัยหลายๆ โครงการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือสารประกอบเคมีที่น่าสนใจเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ โดยส่วนใหญ่ความสนใจจะมุ่งเน้นที่จุลินทรีย์ทั้งจากเศษวัสดุต่างๆ จากชายฝั่งและทะเลลึก วัสดุบริเวณชายฝั่งทะเลเช่น ซากพืช สัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลัง ฟิล์มชีวภาพและสาหร่ายทะเลเป็นแหล่งที่พบจุลินทรีย์หลายชนิด มีงานวิจัยที่น่าสนใจค้นพบ gliding bacteria บนฟิล์มชีวภาพและพลาสติกเนื่องจากฟิล์มชีวภาพเป็นแหล่งของจุลินทรีย์จำนวนมากที่เกิดขึ้นบนพื้นผิววัตถุที่จมอยู่ใต้น้ำ (Kadouri and O'Toole 2005)

gliding bacteria ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสภาวะแวดล้อมต่างๆ และมีลักษณะเฉพาะตัวที่สามารถเคลื่อนที่ได้บนพื้นผิวที่มีการเจริญโดยวิธีการคืบคลาน มีความสามารถในการผลิตสารต่างๆ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างได้หลากหลายทั้งเป็นท่อน (rod) หรือเป็นเส้นสาย (filament) ไม่มีแฟลกเจลลาแต่เคลื่อนที่ด้วยการคืบคลาน (gliding motility) สร้างเมือก ไวต่อสารปฏิชีวนะจำพวกแอคติโนมัยซินดี (actinomycin D) gliding bacteria แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ gliding fruiting bacteria มีลักษณะเซลล์ที่ไม่เป็นเส้นสาย เซลล์ส่วนใหญ่เป็นท่อนสั้นๆ มีลักษณะเด่นคือ เซลล์ปกติในบางระยะจะเคลื่อนที่เข้าหากันรวมกันเป็นกลุ่มที่เรียกว่า ฟรุตติ้งบอดี (fruiting bodies) ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันตามสปีชีส์โดยอาจมีรูปร่างไม่แน่นอนบางครั้งอาจพบเป็นรูปทรงกลมหรือรูปไข่ ทำให้ทนต่อความแห้งแล้ง และความร้อนได้ดี มีค่า G+C content อยู่ในช่วง 65-71 mol% ส่วน gliding non fruiting bacteria เป็นกลุ่มที่มีลักษณะเซลล์เป็นเส้นสาย มีขนาดของเซลล์ยาว บางครั้งพบเป็นเซลล์เดี่ยว รูปท่อน ไม่มีการสร้างฟรุตติ้งบอดี มีค่า G+C content อยู่ในช่วง 31-53 mol% จากการศึกษางานวิจัยพบว่า สารสกัดจาก gliding bacteria สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสารสื่อประสาท (acetylcholine) ที่ทำให้มนุษย์มีความสามารถในการจำลดลงและก่อให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ (ฉัตรฤดี และคณะ, 2007)

จากความน่าสนใจของจุลินทรีย์ทางทะเล ทั้งการศึกษาทางด้านลักษณะสัณฐานวิทยา คุณลักษณะทางชีวเคมี รวมทั้งลักษณะพิเศษของ gliding bacteria สำหรับศึกษาการนำไปใช้ประโยชน์ในทางเทคโนโลยีชีวภาพอีกทั้งเพื่อศึกษาแนวทางการใช้ประโยชน์จาก gliding bacteria

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษาวิธีการคัดแยก gliding bacteria จากพื้นที่ชายฝั่งตะวันออกของไทย

2) เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ gliding bacteria และ marine bacteria

3) เพื่อศึกษาขั้นตอนการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีและคุณลักษณะทางพันธุวิศวกรรม

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) คัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียในน้ำทะเลจากตัวอย่างที่เก็บได้จากพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันออกของไทยทั้งหมด 25 ตัวอย่าง ซึ่งแยกได้จากบริเวณที่มีการสะสมของอินทรียวัตถุ พืชทะเล สาหร่าย หญ้าทะเล ตะกอนดินและฟิล์มชีวภาพ บริเวณหิน พลาสติก เปลือกหอย หรือกระดองของสัตว์ทะเลที่จมอยู่ใต้น้ำ เป็นต้น

2) เลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนี สีเหลือง สีขาวขุ่น สีขาวใส หรือมีลักษณะเฉพาะที่อาจจะเป็น gliding bacteria เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณลักษณะทางชีวเคมีและคุณลักษณะทางพันธุวิศวกรรม

3) ศึกษาลักษณะทางชีวเคมี เฉพาะเชื้อ gliding bacteria เชื้อจากหลอดเก็บเชื้อและเชื้อที่ไม่ใช่ *Vibrio* sp.

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบวิธีการคัดแยกแบคทีเรียในน้ำทะเลและ gliding bacteria

2) ทราบถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียในน้ำทะเลและ gliding bacteria

3) ทราบถึงขั้นตอนการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีและคุณลักษณะทางพันธุวิศวกรรม

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 บทบาทของจุลินทรีย์ในน้ำทะเล

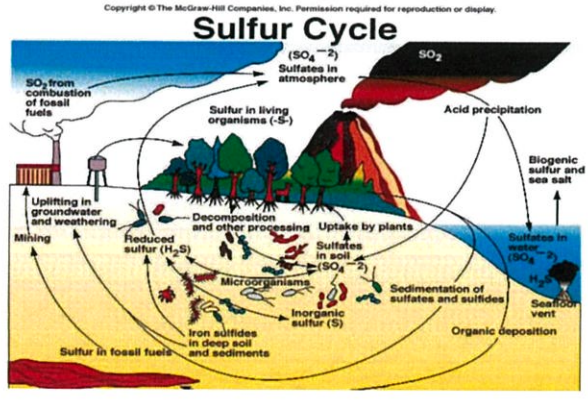
จุลินทรีย์ในน้ำทะเลมีน้อยกว่าน้ำจืด เพราะทะเลมีแร่ธาตุต่างๆ ที่เข้มข้นสูงทำให้จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ รวมทั้งเป็นบริเวณที่มีแรงดันของน้ำทะเลมากเกินไป โดยทั่วไปมหาสมุทรทั่วโลกมีความเค็ม (salinity) ประมาณ 3.5% ความหนาแน่นเฉลี่ยที่ผิวน้ำของมหาสมุทรอยู่ที่ 1.025 กรัมต่อมิลลิลิตร เพราะน้ำทะเลมีความหนักของเกลือและ electrostriction จุดเยือกแข็งของน้ำทะเลอยู่ที่อุณหภูมิ −2 องศาเซลเซียส และในน้ำทะเลยังเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของทั้งพืช สัตว์และจุลินทรีย์อีกหลากหลายชนิดทั้งแบคทีเรียและสาหร่าย **ที่มา:** https://th.wikipedia.org/wiki (20 เมษายน 2561)

2.1.1 แบคทีเรียในน้ำทะเลช่วยในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ

แบคทีเรียในน้ำทะเลช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์จากซากสิ่งมีชีวิตให้กลายเป็นสารอนินทรีย์ มีเป็นแร่ธาตุและสารอาหารที่จำเป็นต่อพืช สาหร่าย สัตว์ในทะเล และแบคทีเรีย

2.1.2 แบคทีเรียในน้ำทะเลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของวัฏจักรสารต่างๆ ในทะเล

แบคทีเรียในน้ำทะเลช่วยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของวัฏจักรสารต่างๆในทะเล เช่น วัฏจักรไนโตรเจน วัฏจักรกำมะถัน ซึ่งวัฏจักรกำมะถันใช้ในการเจริญเติบโตและกระบวนการเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตในสภาพของสารประกอบ เช่น H_2S, SO_4^{2-}



รูปที่ 2.1 วัฏจักรกำมะถัน

ที่มา: http://slideplayer.info/3663089/12/images/7/Daur+Sulfur.jpg (20 เมษายน 2561)

2.1.3 แบคทีเรียในน้ำทะเลทำให้เกิดโรคต่อสัตว์ทะเล

แบคทีเรียหลายชนิดในน้ำทะเลที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ ต่อสัตว์ทะเล เช่น *Vibrio anguillarum* ทำให้เกิดโรคกับปลา *Mycobacterium marinum* ทำให้เกิดวัณโรคในปลาและติดต่อมาสู่มนุษย์ได้ ที่มา: https://112cb64232430.wordpress.com (20 เมษายน 2561)

2.2 gliding bacteria

2.2.1 ลักษณะทั่วไปของ gliding bacteria

gliding bacteria เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะจำเพาะคือการเคลื่อนที่แบบคืบคลาน (gliding motility) บนพื้นผิวอาหารแข็งโดยไม่อาศัยแฟลกเจลลา (non flagella) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีรูปร่างลักษณะที่แตกต่างกัน เช่น ลักษณะกลม (cocci) ท่อน (rod) หรือเส้นสาย (filament) สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ได้แก่ ดิน ใบไม้ มูลสัตว์ น้ำจืด และน้ำทะเล (ฉัตรฤดี สุวรรณชาติ, 2550) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (Gaspasi *et al.*, 2005; lizauka *et al.*, 1998) คือ กลุ่มที่สร้างฟรุตติ้งบอดี (fruiting body gliding bacteria) แบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ Myxobacteria ซึ่งจัดอยู่ใน Order Myxococcales มีลักษณะโคโลนีเป็น swarm colony คล้ายแผ่นฟิล์มบางๆ กระจายอยู่บนอาหารแข็ง เมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ เซลล์จะมีการเปลี่ยนรูปร่าง โดยเซลล์จะมารวมตัวกันและยกตัวสูงขึ้นเป็นฟรุตติ้งบอดี ขนาด 50-500 ไมโครเมตร ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Reichenbach and Dworkin, 1992; Dworkin, 1996) Myxobacteria สามารถพบได้ในดิน เปลือกไม้ ซากไม้ผุพัง มูลสัตว์ สามารถเจริญได้ในความเข้มข้นของเกลือสูง (lizauka *et al.*, 1998) กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ไม่สร้างฟรุตติ้งบอดี (Non fruiting body gliding bacteria) แบคทีเรียชนิดนี้ ได้แก่ แบคทีเรียใน Sub Order และ Order ต่างๆ คือ Sub Order Chlorobiinae, Order Beggiatoales, Order Leucotrichales และ Order Cytophagales ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไกลดิ้งกลุ่มนี้จะมีลักษณะคล้ายรากไม้ และสร้างรงควัตถุสีต่างๆ เช่น สีเหลือง สีส้ม หรือสีแดงอิฐ แบคทีเรียกลุ่มนี้จะพบได้ในดินที่มีพีเอชเป็นกลาง ซากพืชเน่าเปื่อย มูลสัตว์ แหล่งน้ำจืด หรือแม้แต่ในทะเล เช่น ซากสาหร่าย ตะกอนดิน เป็นต้น

2.2.2 ประโยชน์ของ gliding bacteria

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีการนำ gliding bacteria มาสกัดเป็นสาร Antibacterial ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Serratia marcescens, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella typhimurium* และ *Vibrio cholera* พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ (Sangnoi *et al.*, 2016)

2.3 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

เชื้อบริสุทธิ์หมายถึงเชื้อจุลินทรีย์ที่ประกอบด้วยเซลล์ชนิดเดียวกันที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการ

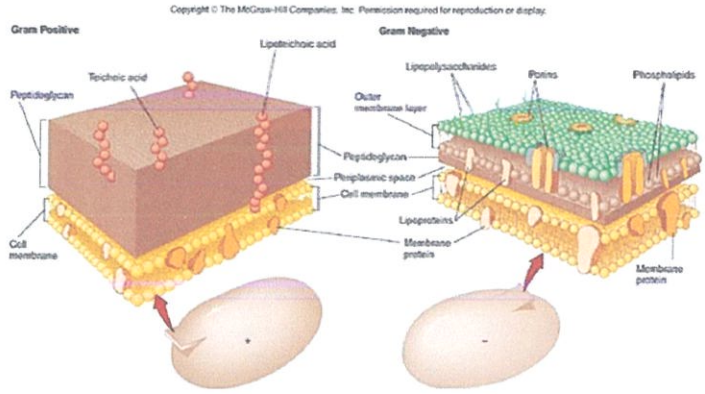
2.3.1 streak plate technique

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เป็นเทคนิคพื้นฐานทางจุลชีววิทยาที่มีความสำคัญ เนื่องจากสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น น้ำ อากาศ หรือแม้แต่ร่างกายของคนก็มีเชื้อจุลินทรีย์อยู่หลายชนิดที่อาจปนเปื้อนในหลอดเพาะเชื้อได้ หลักการของการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์คือ จะต้องแยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ (single colony) จำนวนมาก จากนั้นจึงนำเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวไปศึกษารูปร่างลักษณะ และคุณสมบัติต่างๆ เพื่อให้ทราบว่าเป็นเชื้อชนิดใด

2.4 การย้อมแกรมและการส่องแกรมแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

2.4.1 การย้อมแกรมเบื้องต้น

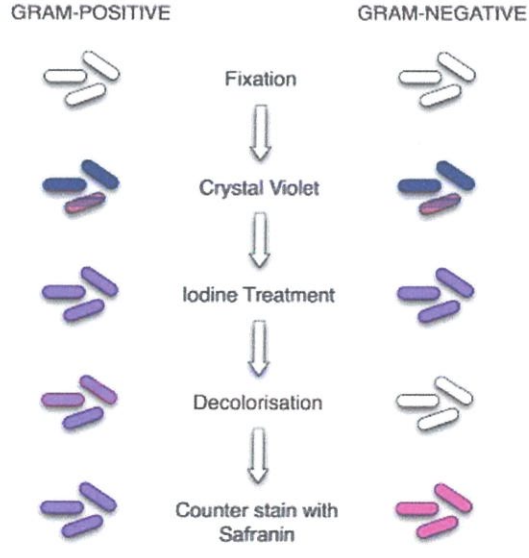
ในการจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ จัดเป็นการย้อมแบบ differential staining ซึ่งหมายถึงการใช้สีย้อมตั้งแต่ 2 ชนิด แบคทีเรียที่ย้อมติดสีแรกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนแบคทีเรียที่ย้อมติดสีที่ 2 เป็นแบคทีเรียแกรมลบระหว่างการย้อมสีแรกกับสีที่ 2 จะมีการใส่สารละลายไอโอดีนซึ่งทำหน้าที่เป็น mordant โดยสีคริสตัลไวโอเลตจับกับแบคทีเรียแกรมบวกได้แน่น ไม่หลุดเมื่อล้างออกด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ การที่แบคทีเรียจะติดสีแบบใดนั้นเนื่องจากส่วนประกอบทางเคมีและโครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรียที่ต่างกัน แบคทีเรียแกรมลบจะมีปริมาณไขมันที่ผนังเซลล์สูง ทำให้เมื่อชะล้างสีด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ ไขมันจะถูกล้างออกได้ง่ายและสารประกอบเชิงซ้อนคริสตัลไวโอเลตไอโอดีน จะหลุดออกจากเซลล์ได้ง่ายเพราะผนังเซลล์จะเกิดรูพรุนมากขึ้น ยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ของสารประกอบเชิงซ้อนคริสตัลไวโอเลตไอโอดีนหลุดออกจึงติดสี ชา ฟานิน การติดสีของแบคทีเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่งคริสตัลไวโอเลตมีผลจากปัจจัยภายนอกหลายประการ เช่น ปริมาณความร้อนที่ใช้ระหว่างการตรึงรอยเกลี่ยเชื้อ ระยะเวลาที่ใช้ในการย้อมแต่ละขั้นตอน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้สารละลายไอโอดีน และการชะล้างสีด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ อายุของแบคทีเรียปกติควรมีอายุไม่เกิน 24-48 ชั่วโมง ดังนั้นในการย้อมสีไม่ควรให้ปัจจัยภายนอกมีอิทธิพลต่อผลของการย้อมแกรม การเตรียมแบคทีเรียเพื่อย้อมแกรม แบคทีเรียต้องมีอายุน้อย อาจเลี้ยงไว้ในอาหารเหลว (broth) หรืออาหารแห้ง (agar) ในช่วงเวลา 24-48 ชั่วโมง



รูปที่ 2.2 ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ

ที่มา: http://anonmicrobiology.blogspot.com/2013/06/blog-post_28.html (20 เมษายน 2561)

แบคทีเรียแกรมบวกซึ่งมีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยและมีความซับซ้อนขององค์ประกอบที่ผนังเซลล์น้อยกว่า เมื่อล้างสีด้วยแอลกอฮอล์จะทำให้เซลล์เหี่ยวเพราะเกิดจากการสูญเสียน้ำ เยื่อหุ้มเซลล์มีขนาดเล็กลง สารประกอบโมเลกุลใหญ่ของสารสีละลายออกมาไม่ได้ ทำให้เซลล์ยังคงติดสีม่วงและเมื่อย้อมทับด้วยสีซาฟรานินเซลล์จึงไม่ติดสีแดง



รูปที่ 2.3 การติดสีของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ

ที่มา: http://anonmicrobiology.blogspot.com/2013/06/blog-post_28.html (20 เมษายน 2561)

2.4.2 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา

กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา ประกอบด้วยเลนส์ 2 ชนิดคือ เลนส์ใกล้วัตถุและเลนส์ใกล้ตา โดยใช้แสงผ่านวัตถุขึ้นมาที่เลนส์จนเห็นภาพบนวัตถุอย่างชัดเจน ส่วนประกอบของกล้องจุลทรรศน์มีดังนี้

1) ลำกล้อง (body tube) เป็นส่วนที่เชื่อมโยงอยู่ระหว่างเลนส์ใกล้ตากับเลนส์ใกล้วัตถุ มีหน้าที่ป้องกันไม่ให้แสงจากภายนอกรบกวน

2) แขน (arm) คือ ส่วนที่ทำหน้าที่ยึดระหว่างลำกล้องกับฐาน เป็นตำแหน่งที่จับเวลายกกล้อง

3) แท่นวางวัตถุ (speciment stage) เป็นแท่นใช้วางแผ่นสไลด์ที่ต้องการ

4) ที่หนีบสไลด์ (stage clip) ใช้หนีบสไลด์ให้ติดอยู่กับแท่นวางวัตถุ

5) ฐาน (base) เป็นส่วนที่ใช้ในการตั้งกล้อง ทำหน้าที่รับน้ำหนักตัวกล้องทั้งหมด

6) กระจกเงา (mirror) ทำหน้าที่สะท้อนแสงจากธรรมชาติหรือแสงจากหลอดไฟภายในห้องให้ส่องผ่านวัตถุ โดยทั่วไปกระจกเงามี 2 ด้าน ด้านหนึ่งเป็นกระจกเงาเว้า อีกด้านเป็นกระจกเงาระนาบ

7) เลนส์รวมแสง (condenser) ทำหน้าที่รวมแสงให้เข้มขึ้นเพื่อส่งไปยังวัตถุที่ต้องการศึกษา

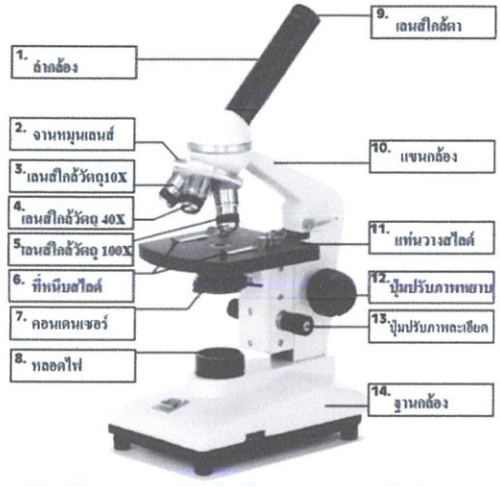
8) ไดอะแฟรม (diaphragm) อยู่ใต้เลนส์รวมแสง ทำหน้าที่ปรับปริมาณแสงให้เข้าสู่เลนส์

9) ปุ่มปรับภาพหยาบ (coarse adjustment) ทำหน้าที่ปรับภาพ โดยเปลี่ยนระยะโฟกัสของเลนส์ใกล้วัตถุ (เลื่อนลำกล้องหรือแท่นวางวัตถุขึ้นลง) เพื่อทำให้เห็นภาพชัดเจน

10) ปุ่มปรับภาพละเอียด (fine adjustment) ทำหน้าที่ปรับภาพ ทำให้ได้ภาพที่ชัดเจนมากขึ้น

11) เลนส์ใกล้วัตถุ (objective lens) จะติดอยู่กับจานหมุน (revolving nose piece) จานหมุนทำหน้าที่เปลี่ยนกำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุที่มีกำลังขยาย 3-4 ระดับ คือ 4X 10X 40X 100X ภาพที่เกิดจากเลนส์ใกล้วัตถุเป็นภาพจริงหัวกลับ

12) เลนส์ใกล้ตา (eye piece) เป็นเลนส์ที่อยู่บนสุดของลำกล้อง โดยทั่วไปมีกำลังขยาย 10X หรือ 15X ทำหน้าที่ขยายภาพที่ได้จากเลนส์ใกล้วัตถุให้มีขนาดใหญ่ขึ้น ภาพที่ได้เป็นภาพเสมือนหัวกลับ

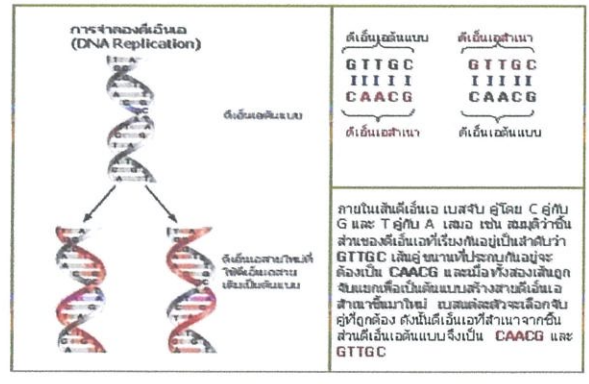


รูปที่ 2.4 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ที่มา: http://www.khu.ac.th/partda55/image/Untitled-1.gif (20 เมษายน 2561)

2.5 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หรือ Polymerase Chain Reaction เป็นเทคนิคเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมคือ ดีเอ็นเอ ให้มีปริมาณมากเป็นล้านเท่าในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA Replication) เลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่อีกหนึ่งสายจากดีเอ็นเอเดิม

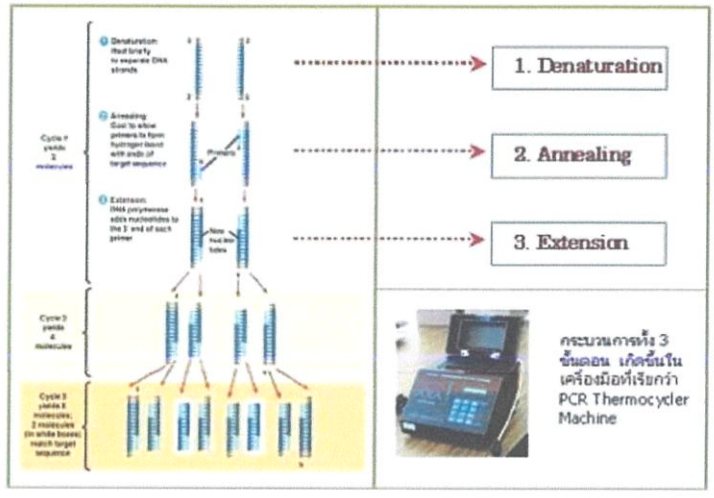


รูปที่ 2.5 การจำลองดีเอ็นเอ

ที่มา: https://sites.google.com/site/biology2012science/what-is-dna/thekhnikh-pcr-ni-kar-pheim-canwn-dna (20 เมษายน 2561)

2.5.1 หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสใช้หลักการพื้นฐานในการเพิ่มดีเอ็นเอด้วยการจำลองดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) โดยใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นหรือไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ทำให้สังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ครั้งละ 2 สายพร้อมกัน ประกอบด้วยปฏิกิริยาสำคัญ 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป



รูปที่ 2.6 ขั้นตอนของเทคนิคพีซีอาร์

ที่มา: https://sites.google.com/site/biology2012science/what-is-dna/thekhnikh-pcr-ni-kar-pheim-canwn-dna (20 เมษายน 2561)

1) ขั้นที่หนึ่ง เรียกว่า Denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิในช่วง 92-95 องศาเซลเซียส

2) ขั้นที่สอง เรียกว่า Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงอยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส และใช้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 17-24 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นเข้าคู่กับสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน

3) ขั้นที่สาม เรียกว่า Extension หรือ Synthesis of new DNA เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลายของไพรเมอร์ ดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) ให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าและเมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลายๆ รอบ จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวนมาก ปฏิกิริยาประมาณ 30-40 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอได้ไม่น้อยกว่าพันล้านเท่า ดังนั้นแม้ตัวอย่างที่นำมาศึกษามีปริมาณสารพันธุกรรมน้อยมากสามารถใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มจำนวนได้หลายเท่าทวีคูณ

ดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ดังนั้นเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอ ต้องนำตัวอย่างที่ทำพีซีอาร์แยกหาดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริสิส (agarose gel electrophoresis) ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (agarose gel) โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปได้ขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ ซึ่งเรืองแสงภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

2.6 การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส

การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดสเป็นวิธีการทดสอบว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส ซึ่งใช้แยกแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae กับ Vibrioaceae แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้จะให้ผลบวก (สีม่วงเข้ม) โดยสังเกตปฏิกิริยาภายใน 10 วินาที อย่าทดสอบปฏิกิริยานี้โดยใช้เชื้อที่เลี้ยงบนอาหารที่มีกลูโคสเพราะจะเกิดการหมักแล้วยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ออกซิเดส **ที่มา:** http:// kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2010/6919/10/261263_app.pdf (20 เมษายน 2561)

2.7 การทดสอบเอนไซม์คะตาเลส

การทดสอบเอนไซม์คะตาเลสเพื่อทดสอบแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส ได้ โดยสังเกตว่ามีฟองอากาศหรือไม่

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ดังนี้

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{คะตาเลส}} 2H_2O+2O_2$$

ถ้ามีการสร้างฟองอากาศแสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส (ผลเป็นบวก) ในการทดสอบต้องใช้เชื้อที่มีอายุไม่เกิน 24-48 ชั่วโมง เพราะเอนไซม์คะตาเลสจะมีอยู่ในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น (ดวงพร 2537) **ที่มา:** http://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2010/6919/10/261263_app.pdf (20 เมษายน 2561)

2.8 จัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้เครื่อง Automate Identification รุ่น Vitek®2 compact

รูปที่ 2.7 เครื่อง Automate Identification รุ่น Vitek®2 compact
ที่มา: http://www.biomerieux-usa.com (20 เมษายน 2561)

2.8.1 หลักการของเครื่อง Automate Identification

การทดสอบเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยอาศัยหลักการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงสีของสารชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในหลุมทดสอบแต่ละหลุมเทียบกับค่าเริ่มต้น เมื่อเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตและใช้สารอาหารภายในหลุมทดสอบจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายชีวเคมี เครื่องจะทำการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในหน่วยของค่าการส่องผ่านของแสงที่เปลี่ยนไป ค่าที่วัดได้จะถูกนำไปเทียบกับฐานข้อมูลของเครื่องเพื่อประเมินผลและวิเคราะห์ว่าเชื้อที่ทดสอบมีรูปแบบตรงกับเชื้อใดในฐานข้อมูล เครื่องจะทำการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของแสงที่ส่องผ่านแต่ละหลุมการทดสอบที่มีสารละลายเชื้อและสารชีวเคมีอยู่ทุกๆ 15 นาที โดยใช้ความยาวคลื่นที่ 430 นาโนเมตรหรือ 568 นาโนเมตร สำหรับเชื้อแกรมบวกบางตัวซึ่งลักษณะการวัดที่เกิดขึ้นแต่ละหลุมเครื่องจะทำการวัดในแต่ละช่องการทดสอบที่จำนวนจุด 16 จุดที่แตกต่างกัน และทำซ้ำ 3 รอบ แล้วหาค่าเฉลี่ยผลการวัดออกมา ซึ่งจะเป็นการวัดแบบ kinetic โดยแต่ละหลุมการทดสอบจะมีการเปลี่ยนแปลงของการส่องผ่านของแสงเป็นอิสระ จากนั้นเครื่องจะนำผลรวมของการทดสอบทั้งหมดมาเทียบกับฐานข้อมูลที่เครื่องมีอยู่ว่าเชื้อที่ทดสอบมีโอกาสเป็นเชื้อใดมากที่สุด

2.8.2 ชนิดของการ์ดทดสอบ (Identification Test Card)

การ์ดทดสอบที่ใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นการ์ดทดสอบพลาสติกประกอบด้วยหลุมทดสอบจำนวน 47 หลุม โดยแต่ละหลุมจะบรรจุสารชีวเคมีแห้งที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของการ์ดทดสอบว่าต้องการใช้เพื่อแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มใด ดัง**ตารางที่ 2.1** การ์ดทดสอบในแต่ละอันจะถูกบรรจุในห่ออลูมิเนียมพร้อมสารดูดความชื้นและมีบาร์โค้ดระบุหมายเลขที่เฉพาะเจาะจงไม่ซ้ำกัน และมีท่อสีน้ำเงิน (transfer tube) ใช้สำหรับถ่ายสารละลายเชื้อซึ่งต่ออยู่ข้างการ์ดทดสอบแต่ละอัน และบนห่ออลูมิเนียมจะระบุชนิดของการ์ดทดสอบ (card type)

ตารางที่ 2.1 แสดงชนิดของการ์ดทดสอบที่ใช้สำหรับจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

กลุ่มเชื้อ	ชนิดการ์ดทดสอบ	ชนิดของเชื้อที่แยกได้	จำนวนสารชีวเคมีในการ์ดทดสอบ	เวลาการรายงานผล (ชั่วโมง)	ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นในการละลายเชื้อ
Gram negative bacilli	GN	140	47	2-10	0.5 McFarland
Gram positive cocci	GP	115	43	2-8	0.5 McFarland
Yeast	YST	50	46	18	2.0 McFarland
Bacillus	BCL	40	46	14	2.0 McFarland
Anaerobic and Corynebacteria	ANC	63	36	6	3.0 McFarland
Neisseria Hemophilus	NH	26	30	6	3.0 McFarland

หมายเหตุ ในการทดลองใช้การ์ดทดสอบชนิด GN ใช้ทดสอบเชื้อในกลุ่ม Gram negative bacilli

การแปลผลเครื่องจะนำผลรวมของการทดสอบทั้งหมดมาเทียบกับฐานข้อมูลที่เครื่องมีอยู่ว่าเชื้อที่ทดสอบมีโอกาสเป็นเชื้อใดมากที่สุดเมื่อเทียบกับรูปแบบในฐานข้อมูล หากมีเพียงเชื้อเดียวที่เป็นไปได้ เครื่องจะรายงานผลออกมาทันทีพร้อมทั้งรายงานเปอร์เซ็นต์ความน่าเชื่อถือสำหรับผลการทดสอบ แต่หากมีรูปแบบที่ตรงกับเชื้อหลายชนิดโปรแกรมจะแสดงข้อความต่างๆ เช่น Low Discrimination, Non Identified เป็นต้น ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงฐานข้อมูลการแปลผลของเครื่อง Automate Identification

Comment	Probability
Excellent ID	96 – 99
Very good ID	93 – 95
Good ID	89 – 92
Acceptable	85 – 88
Low discrimination or slashline	มีเชื้อ 2 หรือ 3 ชนิดที่เป็นไปได้ ต้องใช้การทดสอบอื่นเพิ่มเติม
Non-identified	มีเชื้อมากกว่า 3 ชนิดที่เป็นไปได้หรือเชื้อมีลักษณะที่แตกต่างจากฐานข้อมูลของเครื่องมากจนไม่สามารถแยกชนิดได้

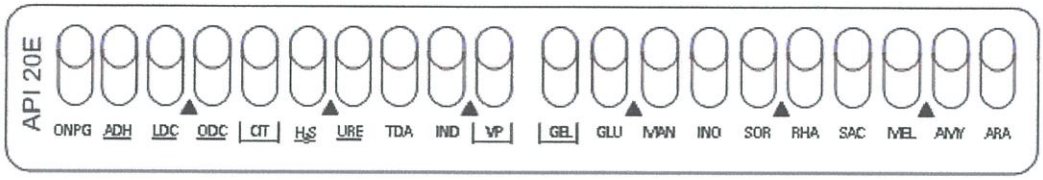
2.9 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์โดยชุดทดสอบ API 20E, API 20NE และ API ZYM (bioMérieux)

ชุดทดสอบเป็นชุดวินิจฉัยแบคทีเรียสำเร็จรูปเชิงพาณิชย์ที่นำเข้าจากต่างประเทศใช้แยกชนิดแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae และแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ แบคทีเรียจะต้องไม่เจริญช้าหรือต้องการอาหารชนิดพิเศษ ในหลุมทดสอบประกอบด้วยสารตั้งต้นหรืออาหารแห้งสำหรับตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่แบคทีเรียผลิตและความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ โดยเชื้อแบคทีเรียต้องมีการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ก่อน

2.9.1 ชุดทดสอบ API 20E

ชุดทดสอบ API 20E ใช้สำหรับจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Enterobacteriaceae และ non fastidious Gram negative rod โดยอาศัยหลักการทดสอบทางชีวเคมี 23 ชนิด ดังตารางที่ 2.3

API 20E เป็นแถบพลาสติกประกอบด้วยหลุมหรือช่องที่บรรจุสารเคมีชนิดแห้ง (dehydrated substrates) จำนวน 20 หลุมทดสอบ **ดังรูปที่ 2.3** ใช้สำหรับทดสอบคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเติมสารละลายเชื้อลงไปในช่องที่บรรจุสารเคมี เชื้อจะสามารถเจริญและใช้สารเหล่านี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น การเปลี่ยนแปลงสี ความขุ่น (Global Health Laboratories, 2013)



รูปที่ 2.8 หลุมทดสอบจำนวน 20 หลุม ของชุดทดสอบ API 20E
ที่มา: Global Health Laboratories, 2013

ตารางที่ 2.3 แสดงสารชีวเคมีของชุดทดสอบ API 20E และการอ่านผลการทดสอบ

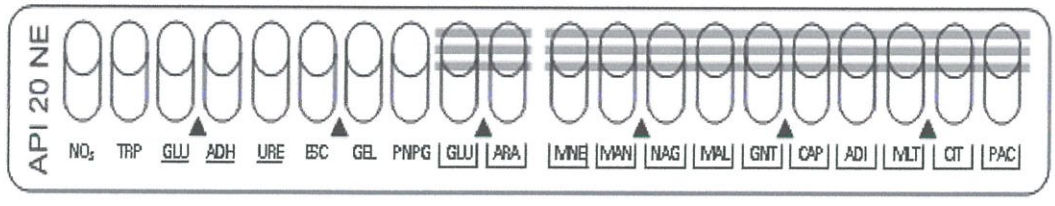
การทดสอบ	ปฏิกิริยา	ผลลบ	ผลบวก
ONPG	β-galactosidase	Colourless	Yellow (maybe pale)
ADH	Arginine dihydrolase	Yellow	Orange or red
LDC	Lysine decarboxylase	Yellow	Orange or red
ODC	Ornithine decarboxylase	Yellow	Orange or red
CIT	Citrate utilisation	Light green	Blue-green or blue
H_2S	H_2S production	Colourless	Black
URE	Urea hydrolysis	Yellow	Pink
TDA	Tryptophan deamination	Yellow	Dark brown
IND	Indole production	Colourless reagent	Pink
VP	Acetoin production	Colourless	Pink or red
GEL	Gelatin hydrolysis	Colourless	Black diffuse pigment
GLU	Glucose fermentation	Blue	Yellow
MAN	Mannitol	Blue	Yellow
INO	Inositol	Blue	Yellow

ตารางที่ 2.3 แสดงสารชีวเคมีของชุดทดสอบ API 20E และการอ่านผลการทดสอบ **(ต่อ)**

การทดสอบ	ปฏิกิริยา	ผลลบ	ผลบวก
SOR	Sorbitol	Blue	Yellow
RHA	Rhamnose	Blue	Yellow
SAC	Sucrose	Blue	Yellow
MEL	Melibiose	Blue	Yellow
AMY	Amygdalin	Blue	Yellow
ARA	Arabinose	Blue	Yellow
Oxidase	Cytochrome oxidase	Colourless	Purple

2.9.2 ชุดทดสอบ API 20NE

ชุดทดสอบ API 20NE เป็นชุดทดสอบเพื่อระบุแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน non fastidious และ non enteric เช่น *Pseudomonas, Acinetobacter, Flavobacterium, Moraxella, Vibrio* และ *Aeromonas* เป็นต้น ประกอบด้วยการทดสอบแบบเดิม 8 หลุมทดสอบและอีก 12 หลุมทดสอบจะเป็นการทดสอบการดูดซึมของเชื้อดังรูปที่ 2.9 และตารางที่ 2.4 (Global Health Laboratories, 2013



รูปที่ 2.9 หลุมทดสอบจำนวน 20 หลุม ของชุดทดสอบ API 20NE
ที่มา: Global Health Laboratories, 2013

ตารางที่ 2.4 แสดงสารชีวเคมีของชุดทดสอบ API 20NE และการอ่านผลการทดสอบ

การทดสอบ	ปฏิกิริยา	ผลลบ	ผลบวก
$NO_3 \rightarrow NO_2$ $NO_2 \rightarrow N_2$	Reduction of potassium nitrate	Colourless Red/pink	Red (NIT1+NIT2) Colourless (Zn)
TRP	Indole production from tryptophan	Yellow	Pink
GLU	Glucose fermentation	Blue/green	Yellow
ADH	Arginine hydrolysis	Yellow	Orange/pink/red
$NO_3 \rightarrow NO_2$ $NO_2 \rightarrow N_2$	Reduction of potassium nitrate	Colourless Red/pink	Red (NIT1+NIT2) Colourless (Zn)
TRP	Indole production from tryptophan	Yellow	Pink
GLU	Glucose fermentation	Blue/green	Yellow
ADH	Arginine hydrolysis	Yellow	Orange/pink/red
URE	Urea hydrolysis	Yellow	Orange/pink/red
ESC	Aesculin hydrolysis	Yellow	Grey/brown/ black
GEL	Gelatin hydrolysis	No pigment diffusion	Diffusion of black pigment
PNPG	p-nitrophenyl-βD-galactopyranoside hydrolysis	Colourless	Yellow
GLU	Glucose assimilation	Transparent	Opaque
ARA	Arabinose assimilation	Transparent	Opaque
MNE	Mannose assimilation	Transparent	Opaque
MAN	Mannitol assimilation	Transparent	Opaque
NAG	N-acetyl-glucosamine assimilation	Transparent	Opaque

ตารางที่ 2.4 แสดงสารชีวเคมีของชุดทดสอบ API 20NE และการอ่านผลการทดสอบ **(ต่อ)**

การทดสอบ	ปฏิกิริยา	ผลลบ	ผลบวก
NAG	N-acetyl-glucosamine assimilation	Transparent	Opaque
MAL	Maltose assimilation	Transparent	Opaque
GNT	Gluconate assimilation	Transparent	Opaque
Oxidase	Cytochrome oxidase	Colourless	Purple

2.9.3 ชุดทดสอบ API ZYM

ชุดทดสอบ API ZYM เป็นชุดทดสอบที่ใช้หาปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถประยุกต์ได้กับตัวอย่างหลากหลายแบบ เช่น จุลินทรีย์ เนื้อเยื่อ สารละลายของเซลล์ เป็นต้น ประกอบด้วย 20 หลุมทดสอบ โดยใช้เอนไซม์ 19 ชนิด ดัง**ตารางที่ 2.5** หากเกิดปฏิกิริยาจะเกิดการเปลี่ยนสีของสารตั้งต้นและบัฟเฟอร์ที่อยู่ในหลุม

ตารางที่ 2.5 แสดงสารชีวเคมีของชุดทดสอบ API ZYM และการอ่านผลการทดสอบ

การทดสอบ	สารตั้งต้น	pH	ผลลบ	ผลบวก
Control	-	8.5	Colorless or color of the sample if it has an interse coloration	
Alkaline phosphatase	2-naphthyl phosphate	6.5	Violet	Colorless or Very pale yellow
Esterase (C 4)	2-naphthyl butyrate	7.5	Violet	
Esterase Lipase (C 8)	2-naphthyl caprylate	"	Violet	
Lipase (C 14)	2-naphthyl myristate	"	Violet	

ตารางที่ 2.5 แสดงสารชีวเคมีของชุดทดสอบ API ZYM และการอ่านผลการทดสอบ **(ต่อ)**

การทดสอบ	สารตั้งต้น	pH	ผลลบ	ผลบวก
Leucine arylamidase	L-leucyl-2-naphthylamide	"	Orange	Colorless or Very pale yellow
Valine arylamidase	L-valyl-2-naphthylamide	"	Orange	
Cystine arylamidase	L-cystyl-2-naphthylamide	8.5	Orange	
Trypsin	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamde	7.5	Orange	
α-chymotrypsin	N-glutaryl-phenylalanine-2-naphthylamde	5.4	Orange	
Acid phosphatase	2-naphthyl phosphate	"	Violet	
Naphhthol-AS-BI-phosphohydrolase	Naphthyl-AS-BI-phosphate	"	Blue	
α-galactosidase	6-Br-2-naphthyl-αD-galactopyranoside	"	Violet	
β-galactosidase	2-naphthyl-βD-galactopyranoside	"	Violet	
β-glucuronidase	Naphthyl-AS-BI-βD-glucuroniide	"	Blue	
α-glucosidase	2-naphthyl-αd-glucopyranoside	"	Violet	
β-glucosidase	6-Br-2-naphthyl-βD-glucopyranoside	"	Violet	
N-acetyl-β-glucosaminidase	1-naphthyl-N-acetyl- βD-glucosaminide	"	Brown	
α-mannsidase	6-Br-2-naphthyl-αD-mannopyranoside	"	Violet	

ตารางที่ 2.5 แสดงสารชีวเคมีของชุดทดสอบ API ZYM และการอ่านผลการทดสอบ **(ต่อ)**

การทดสอบ	สารตั้งต้น	pH	ผลลบ	ผลบวก
α-fucosidase	2-naphthyl-αL-fucopyranoside	”	Violet	Colorless or Very pale yellow

2.10 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์มีหลายวิธี เช่น การแช่เยือกแข็งใช้อุณหภูมิระหว่าง -20 องศาเซลเซียสและ -70 องศาเซลเซียส ในตู้แช่เยือกแข็งปกติ (mechanical freezer) และ -140 องศาเซลเซียส ในสภาวะไอของไนโตรเจน (vapour phase) และ -196 องศาเซลเซียส ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาขึ้นอยู่กับเครื่องมือ (facility) โดยทั่วไปอุณหภูมิต่ำจะเก็บเชื้อได้นานและมีความคงตัวทางพันธุกรรม (genetic stability) สูง อุณหภูมิที่ดีคือ -70 องศาเซลเซียส และต่ำกว่าอุณหภูมิระหว่าง -30 องศาเซลเซียสและ -70 องศาเซลเซียส จะเหมาะกับการเก็บรักษาเชื้อได้ในระดับกลาง (medium storage) เก็บได้ประมาณ 5 ปี ควรหลีกเลี่ยงอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสหรือมากกว่าเนื่องจากจะทำให้เซลล์เสียหายได้ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่รวมถึงแบคทีเรีย ยีสต์ รา ไวรัส จะมีชีวิตได้นานในการเก็บแบบแช่เยือกแข็ง เนื่องจากจะมีการลดอัตราการใช้พลังงาน (metabolic rate) ทุกขั้นตอนจะมีการลดการทำให้เซลล์เสียหาย อัตราการทำให้เย็นควรจะเป็นไปอย่างช้าๆ และควบคุมให้ได้ประมาณ 1 องศาเซลเซียส/นาที จนลงมาถึง -40 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำให้เยือกแข็งอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิที่ต้องการ มีการใช้สารที่เป็นสารป้องกันความเย็น (cryoprotective agents) หลายชนิดในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ โดยทั่วไปใช้กลีเซอรอล (glycerol) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 ถึง 10 อย่างไรก็ตามความเสียหายของเซลล์ในระยะของการทำให้ละลาย (thawing) อาจเกิดขึ้นได้ ดังนั้นอัตราการฟื้นตัว (recovery rate) ที่ดีที่สุดคือการทำให้ละลายอย่างรวดเร็ว วิธีแช่เยือกแข็งโดยใช้ไนโตรเจนเหลวเป็นวิธีมาตรฐานที่ดีวิธีหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาจุลินทรีย์หลากหลายชนิด เนื่องจากลดอัตราการสูญเสียเซลล์ที่ตายและช่วยในการรักษาความคงที่ทางพันธุกรรมของเชื้อได้ดีและมีอายุการเก็บรักษาเชื้อได้มากกว่า 30 ปี

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

Duran bottles	Balance
Beakers	Stirring Rod
Vials	Petri dish
Loops	Pasture pipettes
Cyotubes	Cylinder glass
Autoclave	Incubator
Hot air oven	Microscope

3.1.2 สารเคมี

สารละลาย 0.85% NaCl	สารละลาย 0.45% NaCl
Glycerol 30%	สารที่ใช้ทดสอบ API KIT
ชุดย้อมแกรม	

3.2 การทดสอบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียในน้ำทะเลและ gliding bacteria ที่แยกได้จากพื้นที่ชายทะเลฝั่งตะวันออกของไทย

3.2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ SAP1

Tryptone (Difco)	0.5	กรัม
Yeast extract (Difco)	0.5	กรัม
Agar	1.5	กรัม
Fresh seawater	100	มิลลิลิตร
ปรับ pH = 7.2		

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ SAP2

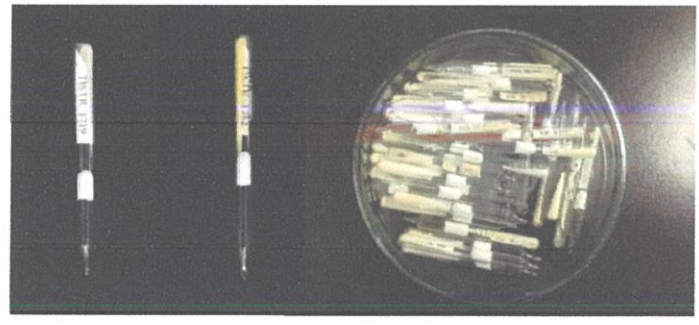
Tryptone (Difco)	0.1	กรัม
Yeast extract (Difco)	0.1	กรัม
Agar	1.5	กรัม
Fresh seawater	100	มิลลิลิตร

ปรับ pH = 7.2

วิธีการ

1. ชั่งสารตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการ ดังสูตรอาหารข้างต้น
2. จากนั้นนำไปผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer)
3. ตวงอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 350 มิลลิลิตรลงในขวด Duran ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
4. นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที
5. เทอาหารลงในจานเพาะเชื้อ

3.2.2 การเคาะเชื้อ gliding bacteria



รูปที่ 3.1 หลอดเก็บเชื้อแห้งโดยวิธี lyophilization

วัสดุอุปกรณ์

หลอดเก็บเชื้อ	แอลกอฮอล์ 70%
ตะไบ	อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (SAP2)
ผ้าสักหลาด	Loop ชนิดแก้ว
กระดาษทิชชู	Pasture pipette

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในหลอดฝาเกลียวขนาด 4 แดรม

วิธีการ

1. ฉีดแอลกอฮอล์ 70% ลงบนกระดาษทิชชูพอหมาดและนำไปเช็ดหลอดเก็บเชื้อในทิศทางเดียวกันให้ทั่วทั้งหลอด

2. วางผ้าสักหลาดแล้ววางทิชชูทับลงไปบนผ้าสักหลาดและนำหลอดเก็บเชื้อวางลงบนกระดาษทิชชู แล้วตะไบด้วยตะไบเหล็กจนเกิดรอยคอด จากนั้นทำการพับผ้าสักหลาดที่มีกระดาษทิชชูทับหลอดเก็บเชื้อโดยหันด้านที่มีรอยคอดออกจากตัว แล้วใช้นิ้วโป้งทั้งสองข้างกดที่รอยคอดแล้วออกแรงหักเบาๆ

3. เมื่อหลอดเก็บเชื้อหักแล้ว ให้ทำการดึงสำลีและหลอดด้านที่ไม่มีเชื้อออก จากนั้นดูดอาหารเหลวใส่ลงไปในหลอดส่วนที่มีเชื้อแล้วผสมให้เข้ากัน

4. นำส่วนของเชื้อที่ทำการผสมกับอาหารเหลว นำไปหยดลงเพลทอาหาร 1 หยด จำนวน 1 เพลท แล้วทำการ streak และอีกเพลทจะหยดสารละลายเชื้อ 3 หยดแล้วเอียงเพลทให้สารละลายเชื้อไหลลงมาในแนวยาว

5. นำเพลทอาหารที่ใส่เชื้อแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน แล้วนำมาตรวจผล โดยการดูการเจริญของเชื้อ

3.2.3 นำเชื้อ gliding bacteria ถ่ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่

นำเชื้อ gliding bacteria มาถ่ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่เตรียมไว้ ดัง**หัวข้อที่ 3.2.1** จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน

3.2.4 การย้อมแกรม

วิธีการ

1. ทำความสะอาดสไลด์และเช็ดให้แห้ง

2. นำเชื้อมา smear ลงบนไลด์และตรึงเซลล์ด้วยความร้อน

3. หยดสีคริสตัลไวโอเลตให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที

4. เทสีซาฟานินที่เหลือค้างบนสไลด์ลงในอ่างน้ำ แล้วชะด้วยน้ำ หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอย smear และทิ้งไว้นาน 1 นาที

5. เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 15-20 วินาที แล้วชะด้วยน้ำ

6. หยดสีซาฟานินให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที

7. เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ทิ้ง ชะด้วยน้ำแล้วซับด้วยกระดาษทิชชู วางทิ้งให้แห้ง

8. นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100X ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีน้ำเงิน ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดง

3.2.5 การศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์

3.2.5.1 gliding bacteria

วิธีการ

1. เตรียมกระจกสไลด์ที่ปราศจากเชื้อโดยการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที จากนั้นอบด้วยความร้อนแห้ง (hot air oven) เป็นเวลาข้ามคืน

2. เทอาหาร SAP2 ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อความหนาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร รอจนวุ้นแข็งตัว แล้ววางแผ่นสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงบนอาหารวุ้น จากนั้นเทอาหารลงไปให้ท่วมสไลด์

3. ตัดชิ้นวุ้นบริเวณที่มีเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เคลือบบนแผ่นสไลด์

4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยสังเกตการคืบคลานของโคโลนี

5. นำมีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาตัดวุ้นอาหารตามรอยแผ่นกระจกสไลด์ จากนั้นนำแผ่นกระจกสไลด์ที่เคลือบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อและมีการเจริญของเชื้อมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X ในหัวเฟส 3 เพื่อดูการเคลื่อนที่ของเซลล์

3.2.5.2 การถ่ายรูปเพลทเพื่อดูการเจริญของเชื้อ gliding bacteria

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อ gliding bacteria บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน

2. เลือกเพลทที่เชื้อเจริญขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ มาถ่ายรูป

3. ถ่ายรูปโดยทำการเปิดฝาเพลท

3.2.5.3 non gliding bacteria

วิธีการ

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient agar)

2. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อหรือเข็มเขี่ยเชื้อมาเผาไฟ ให้ลวดที่ปลายร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อ รอให้เย็นแตะเชื้อที่ต้องการศึกษา แล้วลากหรือขีด (streak) ไปบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง (nutrient agar) ด้วยวิธี streak plate คือ ลากเส้นให้ได้แนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้น

3. นำห่วงเขี่ยเชื้อมาเผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อ จากนั้นหมุนจานเพลท 90 องศา แล้วลากเชื้อส่วนของรอยลากในระนาบแรก ที่มีจุลินทรีย์อยู่หนาแน่นที่สุดออกมาเพียงหนึ่งครั้ง แล้วลากเป็นระนาบที่สอง ซึ่งตั้งฉากกับระนาบแรกโดยรอยขีดของเชื้อจะไม่ทับกับระนาบแรก หลังจากนั้นก็ทำเช่นเดียวกันอีก 3-4 ระนาบ

3.2.5.4 การถ่ายรูปเพื่อดูการเจริญของเชื้อ non gliding bacteria

วิธีการ

1. ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน

2. เลือกเพลทที่เชื้อเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ มาถ่ายรูป

3. ถ่ายรูปโดยทำการเปิดฝาเพลท

3.2.6 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในกลีเซอรอล 10%

วิธีการ

1. เตรียมกลีเซอรอลและอาหารเลี้ยงเชื้อ SAP2 ในอัตราส่วน 10:90 จะได้กลีเซอรอล 10% จากนั้นดูดใส่หลอด Cryotube 1.8 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วทิ้งให้เย็น

2. ใช้ loop เขี่ยเชื้อลงในกลีเซอรอล 10% ประมาณ 2-3 loop ผสมให้เข้ากัน

3. นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อปรับอุณหภูมิ จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3 การทดสอบคุณลักษณะทางชีวเคมี (Biochemical characterization)

3.3.1 จัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้เครื่อง Automate Identification รุ่น Vitek®2 compact

การทดสอบเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยเครื่อง Vitek®2 compact เป็นการทดสอบโดยอาศัยหลักการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงสีของสารชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในหลุมทดสอบแต่ละหลุมเทียบกับค่าเริ่มต้น

3.3.1.1 เครื่องมือและน้ำยาที่ใช้

เครื่องตรวจวิเคราะห์ Automate Identification	Cassettes สำหรับ Vitek 2 card
Vortex mixture	Dispenser
เครื่องวัดความขุ่นของเชื้อ (DENSICHEK)	

DENSICHEK Calibration Standard

Identification card ประกอบด้วย

- ID-GN สำหรับเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Gram negative bacilli
- ID-GP สำหรับเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive cocci
- ID-YST สำหรับเชื้อยีสต์
- ID-NH สำหรับเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Neisseria* spp., *Hemophilus* spp.

Susceptibility card ประกอบด้วย

- AST-GP สำหรับเชื้อ Gram positive cocci
- AST-GN สำหรับเชื้อ Gram negative bacilli

Micropipette ปริมาตร 145 ไมโครลิตร และ 280 ไมโครลิตร พร้อม ทิปปลอดเชื้อ

น้ำยาและสารเคมี

สารละลาย 0.45% NaCl ปลอดเชื้อ

3.3.1.2 วิธีการตรวจด้วยเครื่อง Automate Identification

1. เลือกชนิดการ์ดทดสอบที่ต้องการใช้ให้ตรงกับชนิดของเชื้อที่ต้องการทดสอบ เช่น ID-GN, ID-GP, ID-NH, ID-YST, AST-GN, AST-GP โดยก่อนใช้ควรวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 10-15 นาที

2. การเตรียมตัวอย่างเชื้อที่ใช้ทดสอบต้องมีอายุระหว่าง 18-24 ชั่วโมง (well-isolated colony) ซึ่งต้องนำไปเจือจาง ใน 0.45% NaCl เพื่อให้ได้อัตราการเจริญที่เหมาะสม เมื่อนำไปทดสอบกับการ์ดทดสอบ

3. ขั้นตอนการทดสอบ (Identification and susceptibility preparation method)

- เตรียม 0.45% NaCl ปลอดเชื้อในหลอดทดสอบพลาสติก (polystyrene) ขนาด 12 X 75 มิลลิเมตร จำนวน 2 หลอดทดสอบ หลอดละ 3.0 มิลลิลิตร (1 หลอดสำหรับ Identification, 1 หลอดสำหรับ susceptibility) นำหลอดทดสอบวางใส่ในแต่ละช่องของ cassette
- เตรียมสารละลายเชื้อโดยเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบใส่ลงใน 0.45% NaCl ปลอดเชื้อสำหรับทดสอบ Identification แล้วผสมสารละลายเชื้อให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer
- นำสารละลายเชื้อที่ได้วัดเทียบความขุ่นโดยเครื่อง DENSICHEK ให้ได้ค่าอยู่ในช่วงที่กำหนด คือ หากทดสอบด้วยการ์ด ID-GN ปรับความขุ่นให้ได้ 0.5-0.63 McFarland (หากค่าที่วัด

ได้น้อยกว่าช่วงที่กำหนดให้เขี่ยเชื้อใส่ลงไปอีกจนค่าที่วัดได้อยู่ในช่วงที่กำหนด แต่หากค่าที่วัดได้มากกว่าค่าในช่วงที่กำหนดให้เติม 0.45% NaCl ปลอดเชื้อลงไปแทน)

- เลือกการ์ดทดสอบให้ตรงกับชนิดของกลุ่มเชื้อที่ต้องการทดสอบนั่นคือแผ่นทดสอบชนิด ID-GN (สำหรับเชื้อ Gram Negative Bacilli)

- แกะห่ออะลูมิเนียมฟอยด์ออกโดยระวังไม่ให้จับโดนหลอดถ่ายสารละลายเชื้อ (transfer tube) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแล้วนำแผ่นทดสอบที่ได้วางในช่องคู่กับหลอดสารละลายเชื้อ

- นำ cassette ที่มีการ์ดทดสอบและหลอดสารละลายเชื้อใส่เข้าในช่อง filling chamber แล้วกด start Fill เพื่อให้เครื่องทำการดูดถ่ายสารละลายจากหลอดสารละลายเชื้อเข้าสู่การ์ดทดสอบ (ขั้นตอนนี้ใช้เวลาประมาณ 70 วินาที) เมื่อเครื่องทำการดูดถ่ายสารละลายเชื้อแล้วจะมีสัญญาณเสียงและสัญญาณไฟกระพริบเตือนเพื่อแจ้งให้ทำขั้นตอนต่อไป

- นำ cassette ใส่เข้าไปในช่อง loader (ขั้นตอนนี้จะต้องทำภายใน 10 นาที) เพื่อให้เครื่องทำการ scan บาร์โค้ด ตัด transfer tube และ seal card นำการ์ดเข้า carosel เพื่อทำการบ่มเชื้อที่ 35.5 องศาเซลเซียส และอ่านผลทุกๆ 15 นาที เมื่อขั้นตอนดังกล่าวเสร็จจะมีสัญญาณไฟกระพริบเตือนที่เครื่อง เพื่อให้ผู้ใช้นำ cassette ออกจากเครื่อง

- ใส่ข้อมูลของสิ่งส่งตรวจ

- เครื่องทำการวิเคราะห์ผลการทดสอบเสร็จสิ้นระบบจะทำการพิมพ์ผลการทดสอบออกมาโดยอัตโนมัติพร้อมทั้งแสดงรายละเอียดผลการทดสอบบนหน้าจอคอมพิวเตอร์

3.3.1.3 วิธีการควบคุมคุณภาพการ์ดทดสอบ

การควบคุมคุณภาพของการ์ดทดสอบ โดยทดสอบกับเชื้อมาตรฐานสำหรับทดสอบคุณภาพของการ์ดทดสอบสามารถใช้เชื้อมาตรฐาน ดังต่อไปนี้

1. สำหรับการ์ด ID-GN
   - เชื้อมาตรฐาน *Klebsiella oxytoca* ATCC 700324
2. สำหรับการ์ด ID-GP
   - เชื้อมาตรฐาน *Staphylococcus saprophyticus* ATCC BAA-750
3. สำหรับการ์ด ID-YST
   - เชื้อมาตรฐาน *Candida lusitaniae* ATCC 34449

4. สำหรับการ์ด AST-N094, AST-N136, AST-N109, AST-N27, AST-N194, AST-N288

- เชื้อมาตรฐาน *Escherichia coli* ATCC 25922
- เชื้อมาตรฐาน *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

5. สำหรับการ์ด AST-P592

- เชื้อมาตรฐาน *Staphylococcus aureus* ATCC 25922
- เชื้อมาตรฐาน *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

6. สำหรับการ์ด AST-P576

- เชื้อมาตรฐาน *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

3.3.2 การศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีชุดทดสอบ API 20E, API 20NE และ API ZYM

3.3.2.1 ชุดทดสอบ API 20E

เลี้ยงเชื้อ gliding bacteria และแบคทีเรียในน้ำทะเลในอาหารแข็ง SAP2 เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงใน 0.85% NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดสอบ ปรับความขุ่นของเชื้อตั้งต้นให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard No.0.5 นำแผ่นทดสอบประกอบด้วย 20 หลุม มาวางลงบนถาดรอง จากนั้นหยด 0.85% Nacl ที่มีเชื้ออยู่ลงในแต่ละช่องให้ถึงบริเวณส่วนโค้งด้านล่างของแต่ละหลุม โดยหลุม ADH, LDC, ODC, H2S และ URE ปิดทับด้วย mineral oil ส่วนหลุม CIT, VP และ GEL เติมเชื้อเต็มหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ดูผลการเปลี่ยนแปลงของสีเทียบกับมาตรฐาน API 20E และเมื่อครบ 48 ชั่วโมง หยดสารละลายทดสอบลงใน API 20E โดยทดสอบหลุม TDA ด้วย TDA reagent ทดสอบหลุม IND ด้วย JAMES reagent และ ทดสอบหลุม VP ด้วย VP1 และ VP2 reagent อ่านผลโดยการเปรียบเทียบสีและบันทึกผล (คู่มือแสดงวิธีการทดสอบดังแนบมาใน **ภาคผนวก ง**)

3.3.2.2 ชุดทดสอบ API 20NE

เลี้ยงเชื้อ gliding bacteria และแบคทีเรียในน้ำทะเลในอาหารแข็ง SAP2 เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงใน 0.85% NaCl ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดสอบ ปรับความขุ่นของเชื้อตั้งต้นให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard No.0.5 นำแผ่นทดสอบประกอบด้วย 20 หลุม โดยหลุมที่ 1-8 (NO_3, TRP, GLU, ADH, URE, ESC, GEL และ PNPG หยด 0.85% NaCl ที่มีเชื้ออยู่ลงในแต่ละช่องให้ถึงบริเวณส่วนโค้งด้านล่างของแต่ละหลุม GLU, ADH และ

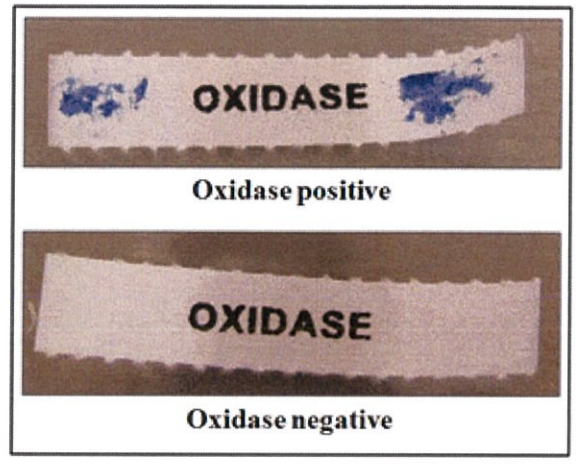
URE ปิดทับด้วย mineral oil จากนั้น ดูด 0.85% NaCl ที่มีเชื้อ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงใน API AUX Medium ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้นดูดลงเพื่อไม่ให้เกิดฟอง จากนั้นดูดใส่ลงในหลุมที่ 9-20 (GLU, ARA, MNE, MAN, NAG, MAL, GNT, CAP, ADI, MLT, CIT และ PAC) ให้เต็มหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ดูผลการเปลี่ยนแปลงเทียบกับมาตรฐาน API 20NE และเมื่อครบ 48 ชั่วโมง หยดสารละลายทดสอบ NIT1 และ NIT2 ในหลุม NO_3 ทิ้งไว้ 5 นาที หากผลเป็นลบ ให้เติม Zn แล้วทิ้งไว้ 5 นาที แล้วอ่านผล หยดสารละลายทดสอบ JAMES ลงในหลุม TRP โดยการอ่านผลทันที (คู่มือแสดงวิธีการทดสอบดังแนบมาใน**ภาคผนวก ง**)

3.3.2.3 ชุดทดสอบ API ZYM

เลี้ยงเชื้อ gliding bacteria และแบคทีเรียในทะเลในอาหารแข็ง SAP2 เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อจากจานเพาะเชื้อใส่ลงใน 0.85% NaCl ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดสอบ ปรับความขุ่นของเชื้อตั้งต้นให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland Standrad No.5-6 นำแผ่นตรวจสอบเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย 20 หลุม สำหรับทดสอบเอนไซม์ 19 ชนิด มาวางลงบนถาดรอง ดูดสารละลายปริมาตร 65 ไมโครลิตร มาหยดลงในแผ่นตรวจแต่ละหลุมจนครบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ถึง 4 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด หยดสารละลายทดสอบ 2 ชนิด คือ ZYM A และ ZYM B อย่างละ 1 หยด ตามลำดับ จากนั้นนำไปวางไว้ในที่ที่มีแสง แล้วทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที อ่านผลของปฏิกิริยาเป็นค่าบวกและลบ โดยการเทียบสี (คู่มือแสดงวิธีการทดสอบดังแนบมาใน**ภาคผนวก ง**)

3.3.3 การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส

การทดสอบเชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส โดยเขี่ยเชื้อแล้วป้ายบนกระดาษกรองขนาดเล็ก จากนั้นจึงหยด Kovac's oxidase reagent ซึ่งเป็นสารใสไม่มีสี แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้จะให้ผลบวก (สีน้ำเงินเข้ม) โดยสังเกตปฏิกิริยาภายใน 10 วินาที

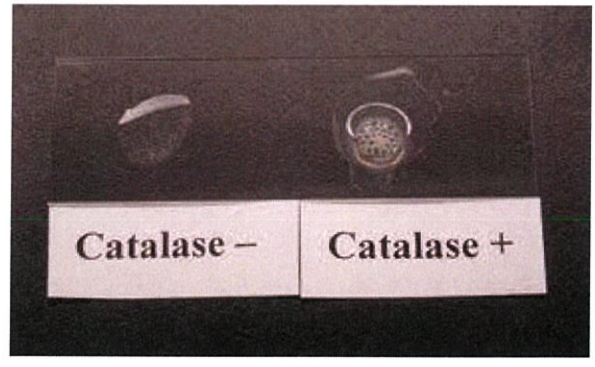


รูปที่ 3.2 การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test)

ที่มา : https://microbeonline.com/wp-content/uploads/2012/12/Oxidase-test-result.gif

3.3.4 การทดสอบเอนไซม์คะตาเลส

การทดสอบแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์ อายุ 24 ชั่วโมง มาแตะบนสไลด์ที่สะอาด จากนั้นหยด 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สังเกตว่ามีฟองเกิดขึ้นหรือไม่ ต้องสังเกตผลทันที ถ้ามีการสร้างฟองแสดงว่า แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส (ผลเป็นบวก) ในการทดสอบต้องใช้เชื้อที่มีอายุไม่เกิน 24-48 ชั่วโมง



รูปที่ 3.3 การทดสอบเอนไซม์คะตาเลส (catalase test)

ที่มา : https://microbeonline.com/wp-content/uploads/2013/10/catase-test.jpg

3.4 การศึกษาคุณลักษณะทางพันธุกรรม (Genotypic characterization)

3.4.1 การเตรียม DNA Template

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อบนอาหาร SAP2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำ loop เขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงใน TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลง 2-3 ครั้ง

2. นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm นาน 2 นาที แล้วดูดเฉพาะส่วนใสด้านบน นำไปเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเลส

3.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเลส

วิธีการ

1. เตรียมส่วนผสมของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ดังนี้

Buffer	5 ไมโครลิตร
dNTP	1 ไมโครลิตร
Primer 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)	1 ไมโครลิตร
Primer 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT)	1 ไมโครลิตร
DNA Template	4 ไมโครลิตร
Taq Polymerase	0.25 ไมโครลิตร
Deionization water	37.7 ไมโครลิตร

2. นำ master mix ที่เตรียมไว้ไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเลส ด้วยเครื่อง Thermocycler อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย 1 รอบ สำหรับการคลายเกลียวและแยกสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 35 รอบสำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 10 วินาที ในรอบสุดท้ายอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสมบูรณ์ เก็บผลผลิตพีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. นำผลผลิตที่ได้มาตรวจสอบปริมาณและขนาดในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 40 นาที ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับเบส

4. เมื่อได้ลำดับเบสแล้วนำไปเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA กับฐานข้อมูล NCBI และ EzTaxon

บทที่ 4
ผลการทดลอง

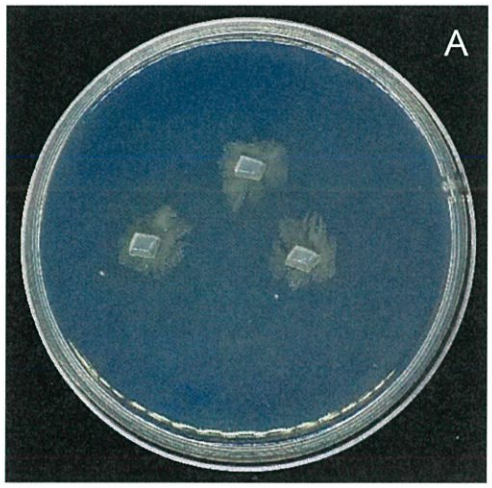
ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ gliding bacteria และแบคทีเรียในน้ำทะเล ที่แยกได้จากชายทะเลฝั่งตะวันออกของไทย โดย

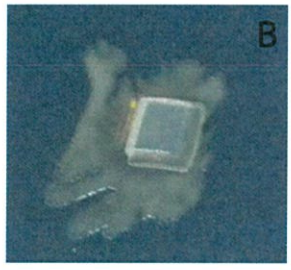
A, B แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็งของเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 24-48 ชั่วโมง

C, D แสดงรูปที่ติดสีจากการย้อมแกรมโดยส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X

E แสดงรูปร่างของเซลล์โดยส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X ดังนี้

4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ gliding bacteria และแบคทีเรียในน้ำทะเล





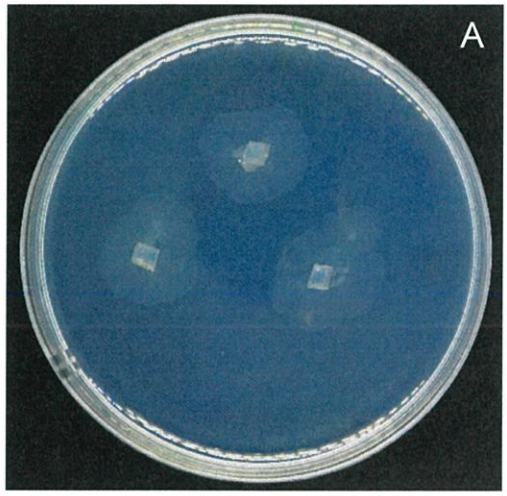
Taxonomy

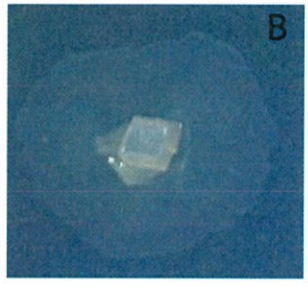
Original code	S1.1
Lot	-
Scientific name	*Vibrio azureus*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	ซากไม้ หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	ซากไม้
Location	12.740957,100.840031

Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	2-3 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะของ S1.1 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



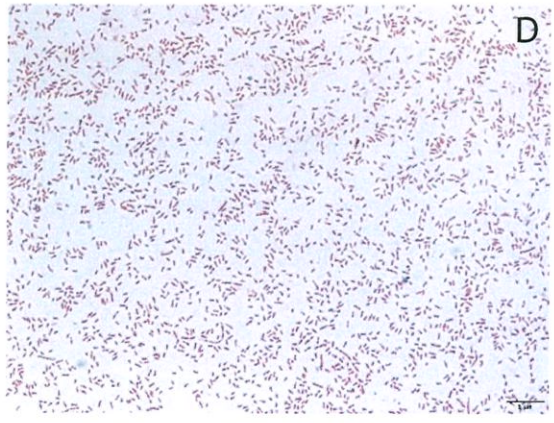


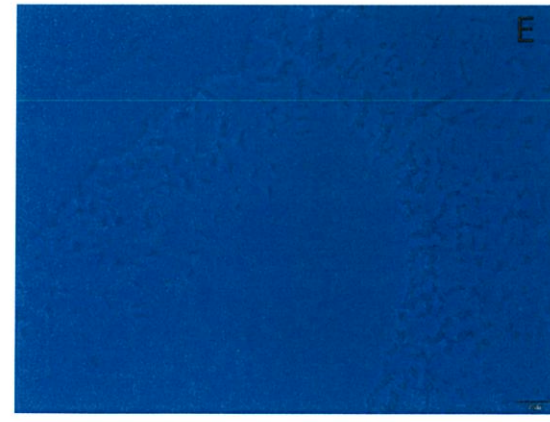
Taxonomy

Original code	S2.1
Lot	-
Scientific name	*Vibrio alginolyticus*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษไม้ หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษไม้
Location	12.740957,100.840031

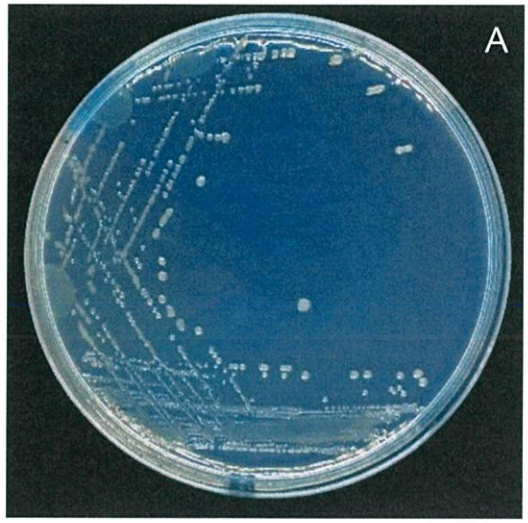
Characteristics

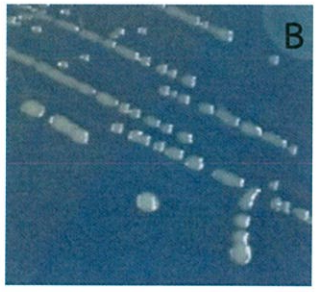
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

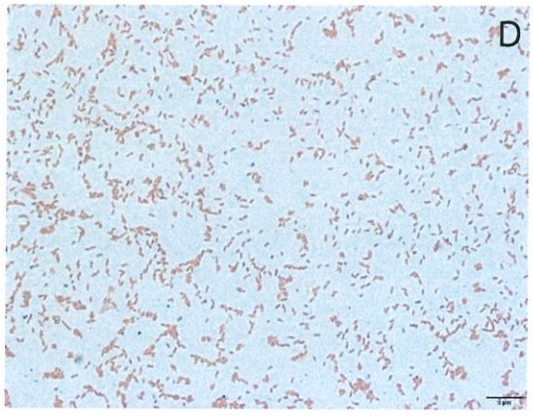


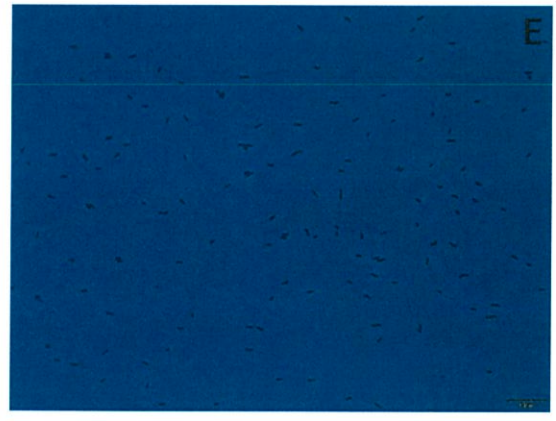


รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะของ S2.1 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



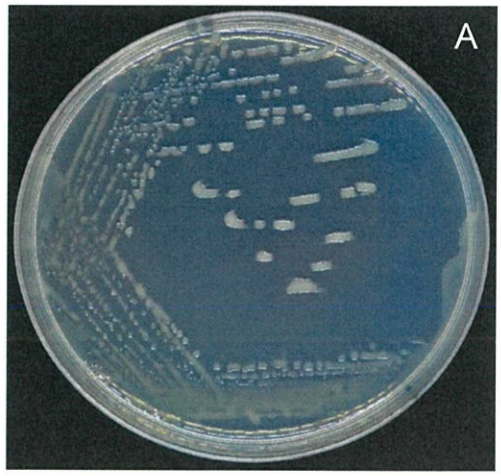


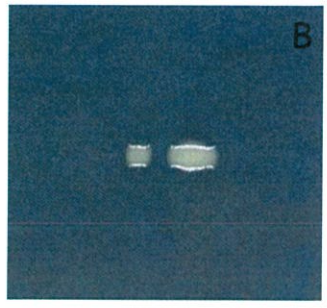




Taxonomy	
Original code	S2.2
Lot	-
Scientific name	*Vibrio alginolyticus*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษไม้ หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษไม้
Location	12.740957,100.840031
Characteristics	
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะของ S2.2 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



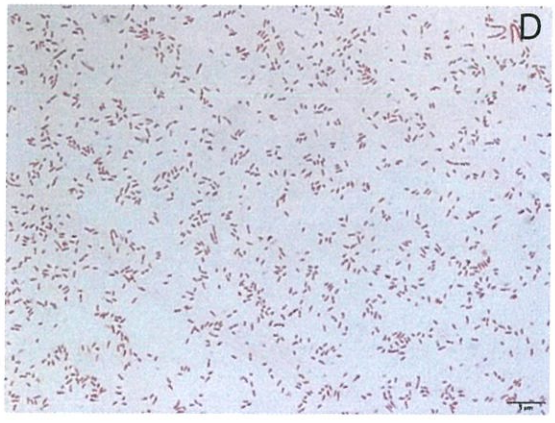


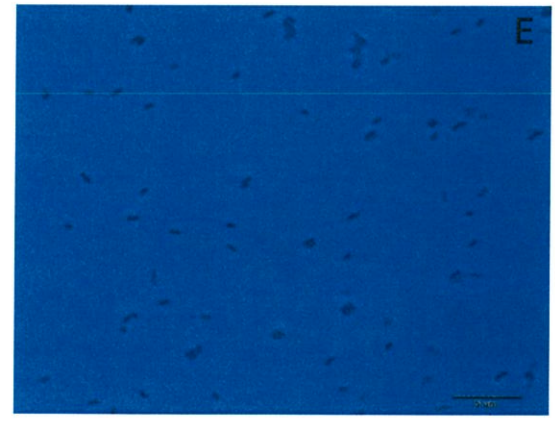
Taxonomy

Original code	S2.3
Lot	-
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษไม้ หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษไม้
Location	12.740957,100.840031

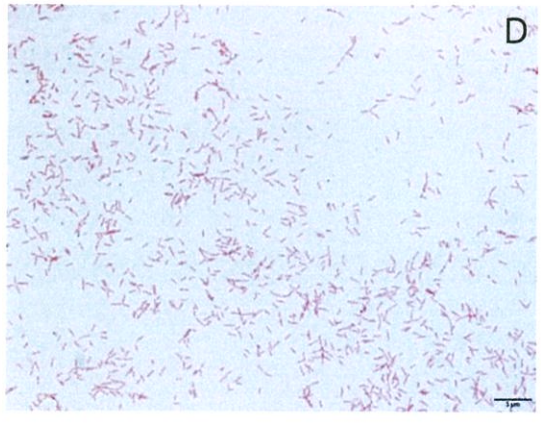
Characteristics

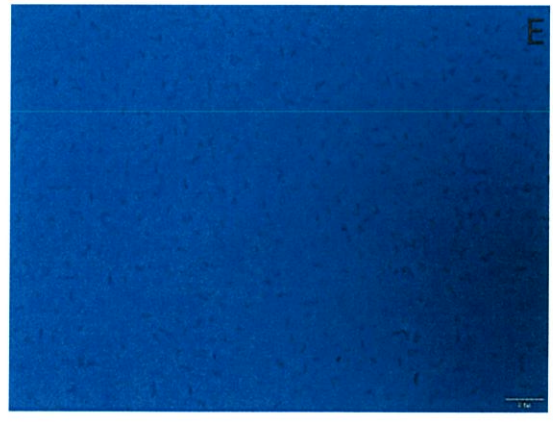
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white





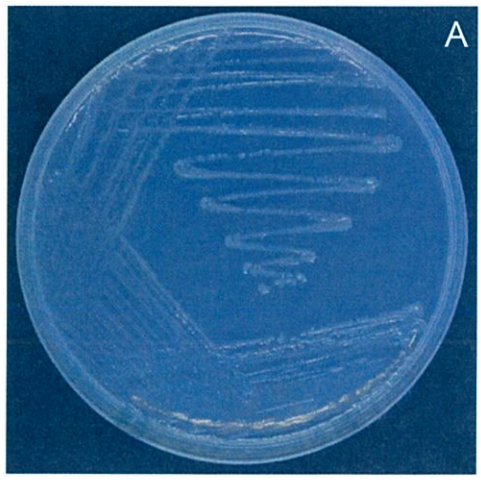
รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะของ S2.3 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X

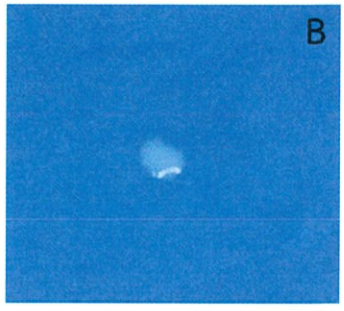


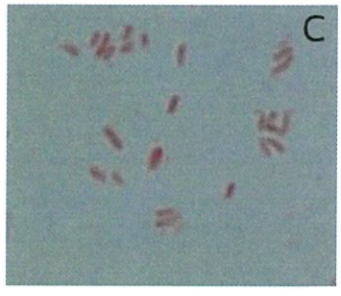


Taxonomy	
Original code	S2.4
Lot	-
Scientific name	*Nesiotobacter exalbescens*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษไม้ หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษไม้
Location	12.740957,100.840031
Characteristics	
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	2-3 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะของ S2.4 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





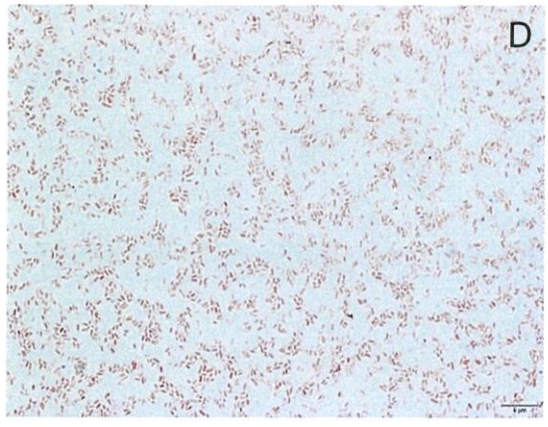


Taxonomy

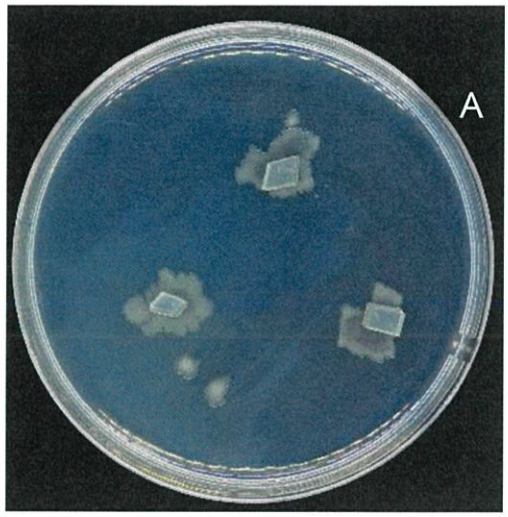
Original code	S3.1
Lot	-
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เมล็ดสะแก หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เมล็ดสะแก
Location	12.740957,100.840031

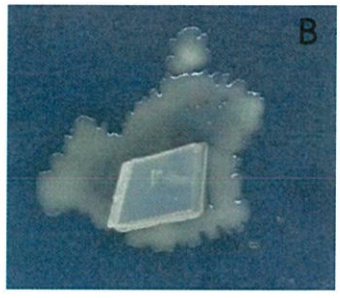
Characteristics

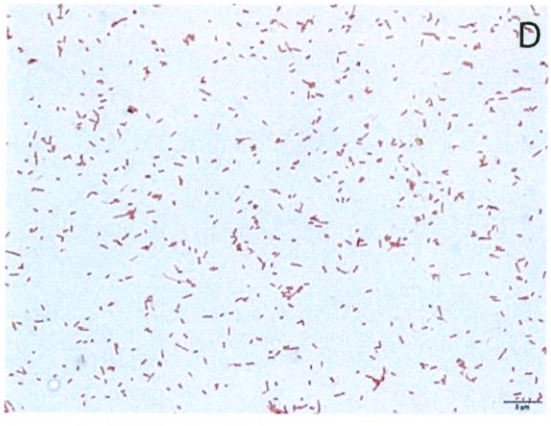
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	2-3 ไมโครเมตร
Color	white



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะของ S3.1 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X

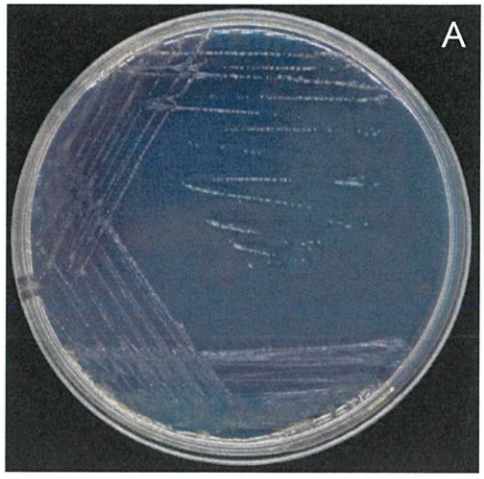


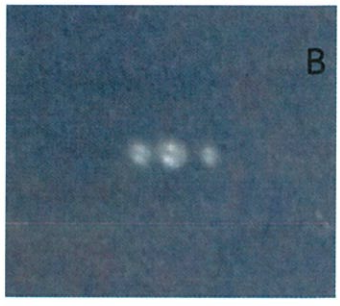


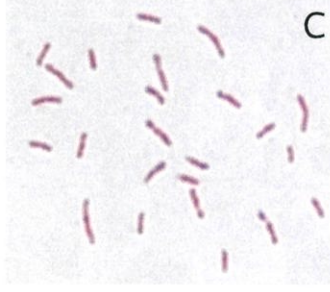


Taxonomy	
Original code	S3.2
Lot	-
Scientific name	*Vibrio natriegens*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เมล็ดสะแก หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เมล็ดสะแก
Location	12.740957,100.840031
Characteristics	
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	2-3 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะของ S3.2 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





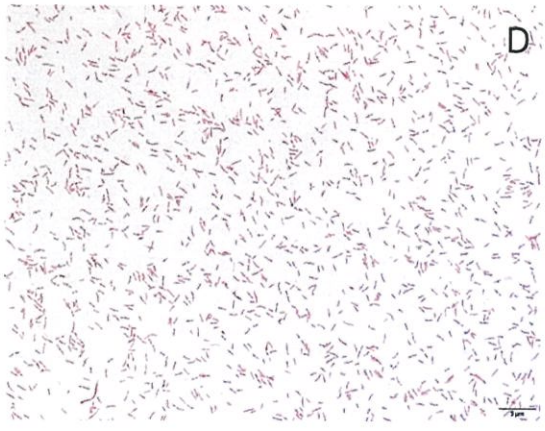


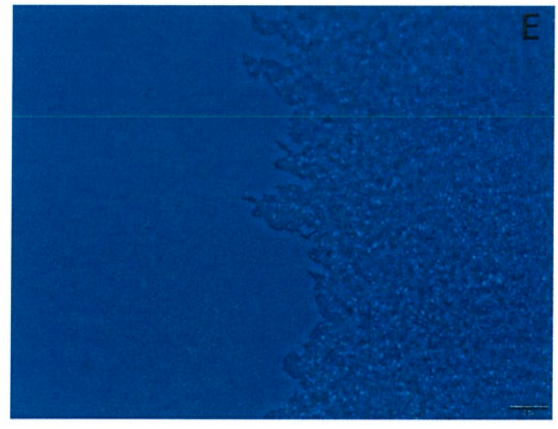
Taxonomy

Original code	S3.3
Lot	-
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เมล็ดสะแก หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เมล็ดสะแก
Location	12.740957,100.840031

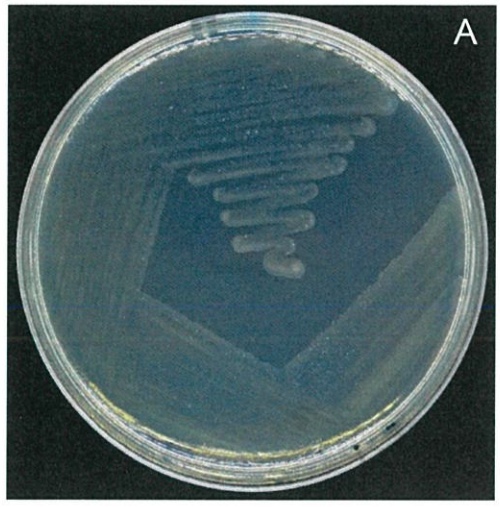
Characteristics

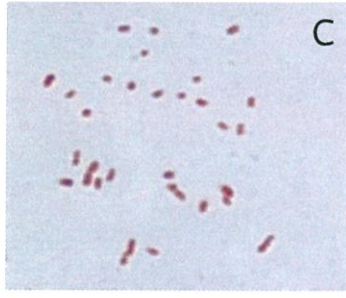
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	2-3 ไมโครเมตร
Color	white

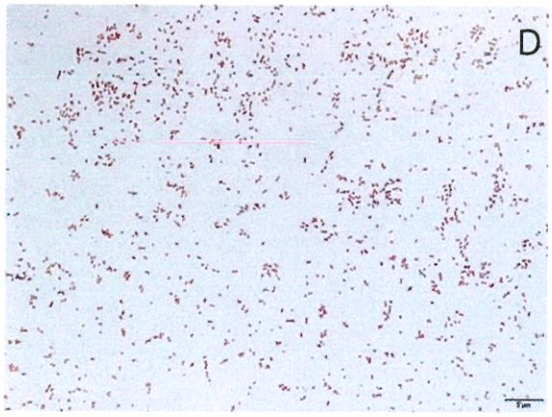


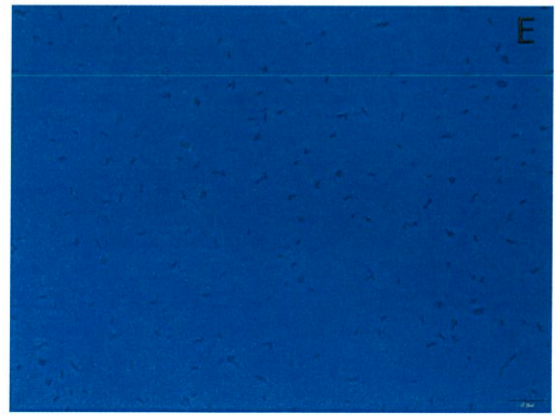


รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะของ S3.3 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



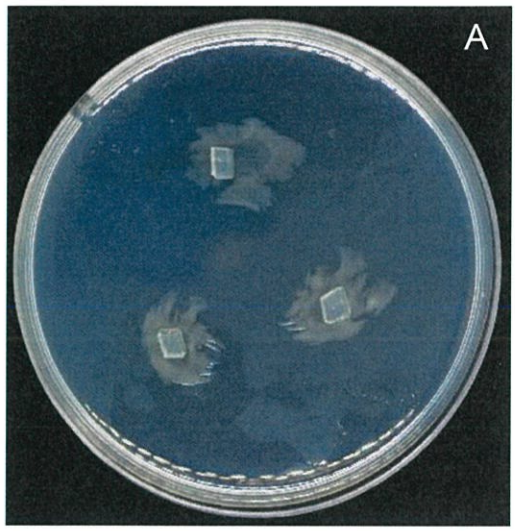


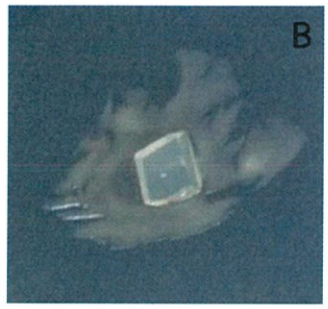


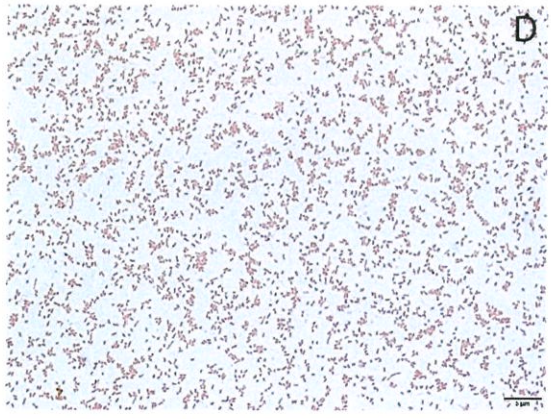


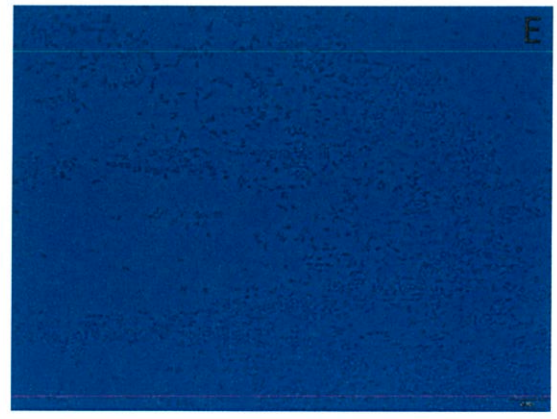
Taxonomy	
Original code	S6.1
Lot	-
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษเชือก หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษเชือก
Location	12.740957,100.840031
Characteristics	
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะของ S6.1 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



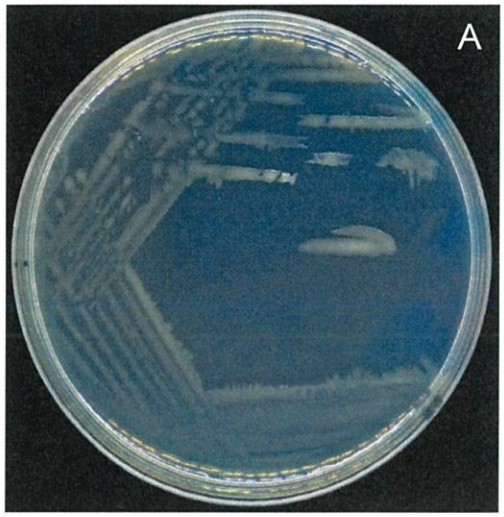


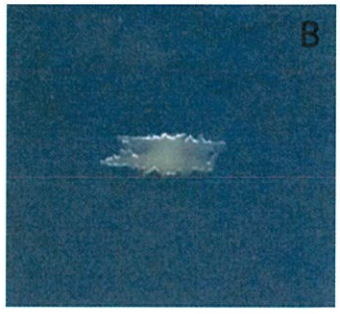


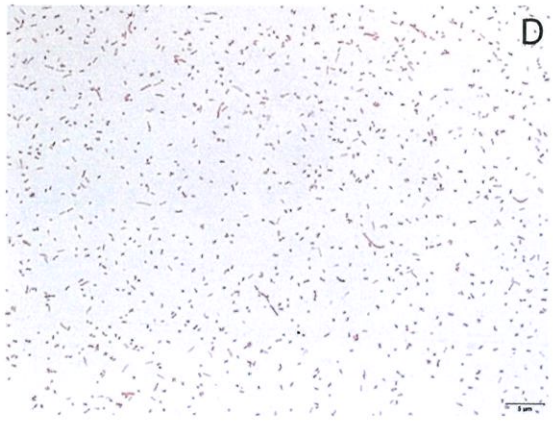


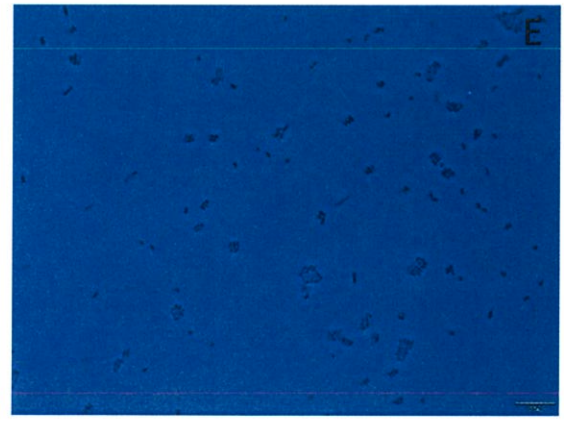
Taxonomy	
Original code	S6.2
Lot	-
Scientific name	*Vibrio natriegens*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษเชือก หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษเชือก
Location	12.740957,100.840031
Characteristics	
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะของ S6.2 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X









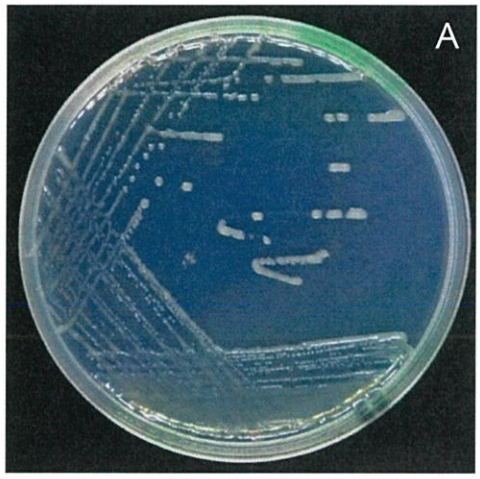
Taxonomy

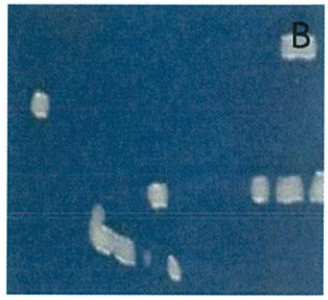
Original code	S12.1
Lot	-
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษหิน (สีเหลือง) หาดทราย แก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษหิน (สีเหลือง)
Location	12.740957,100.840031

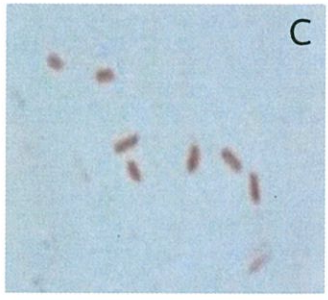
Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะของ S12.1 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





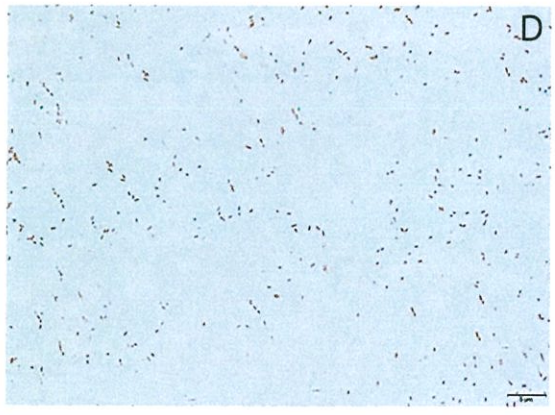


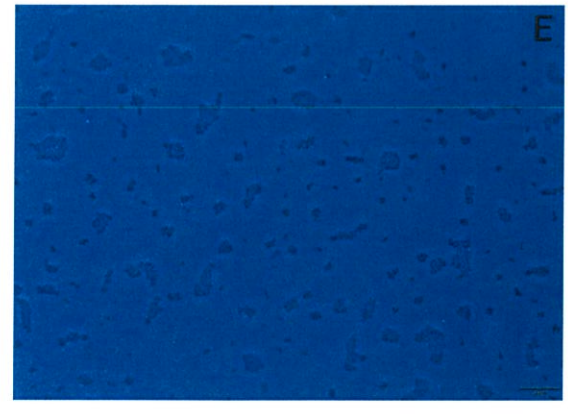
Taxonomy

Original code	S13.1
Lot	-
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษใบไม้ หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษใบไม้
Location	12.740957,100.840031

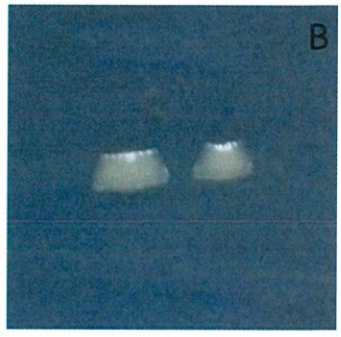
Characteristics

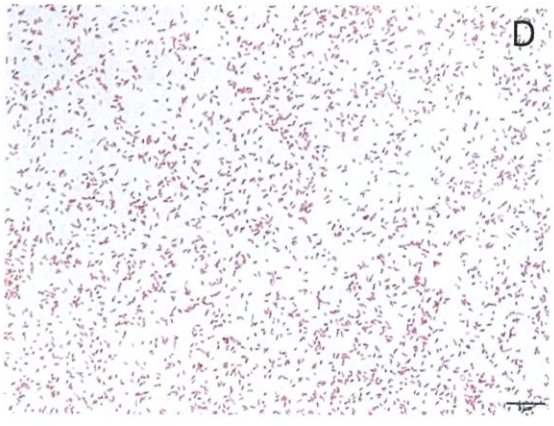
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

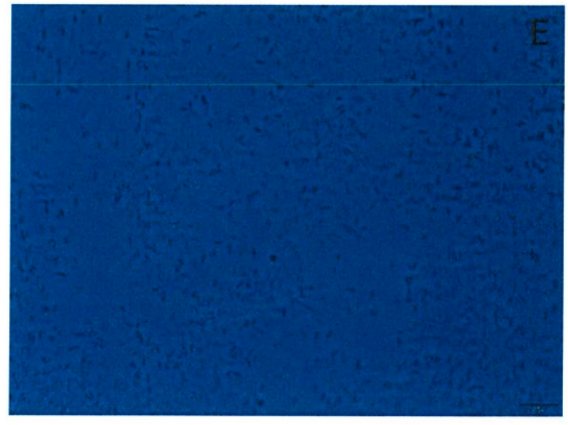




รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะของ S13.1 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X

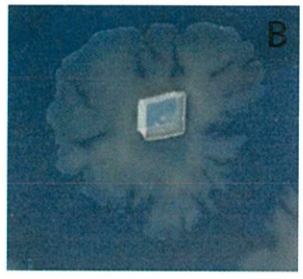


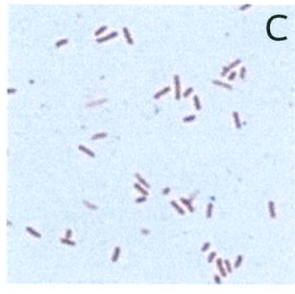


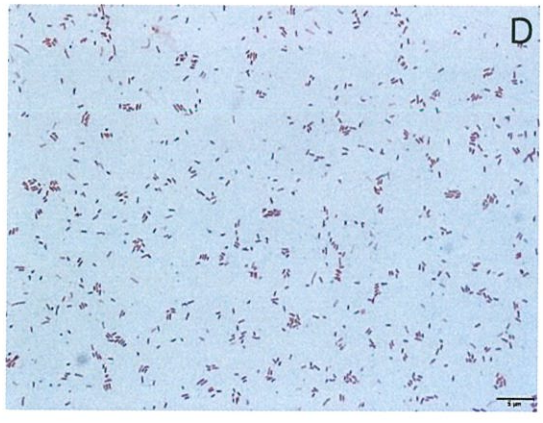


Taxonomy	
Original code	S13.3
Lot	-
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษใบไม้ หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษใบไม้
Location	12.740957,100.840031
Characteristics	
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.13 แสดงลักษณะของ S13.3 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X







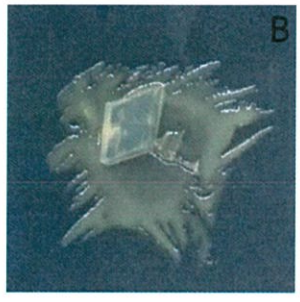
Taxonomy

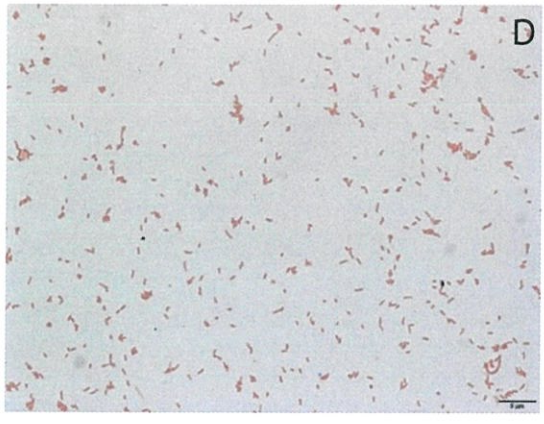
Original code	S14.1
Lot	-
Scientific name	*Vibrio alginolyticus*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	หอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	หอย
Location	12.740957,100.840031

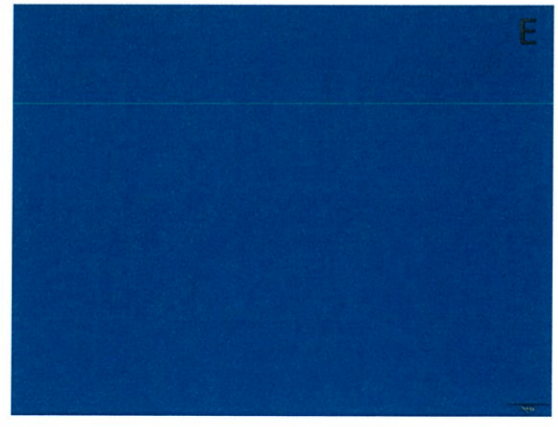
Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	3-4 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.14 แสดงลักษณะของ S14.1 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X







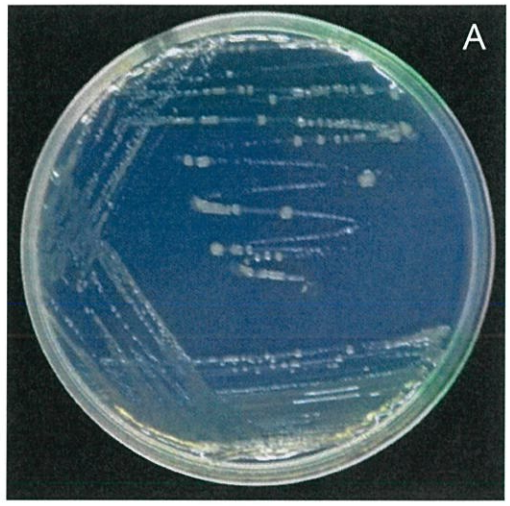
Taxonomy

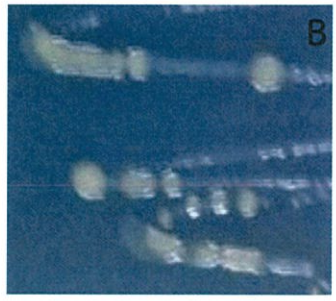
Original code	S15.1
Lot	-
Scientific name	*Vibrio parahaemolyticus*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	หอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	หอย
Location	12.740957,100.840031

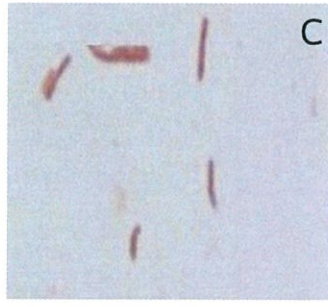
Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	3-4 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.15 แสดงลักษณะของ S15.1 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X

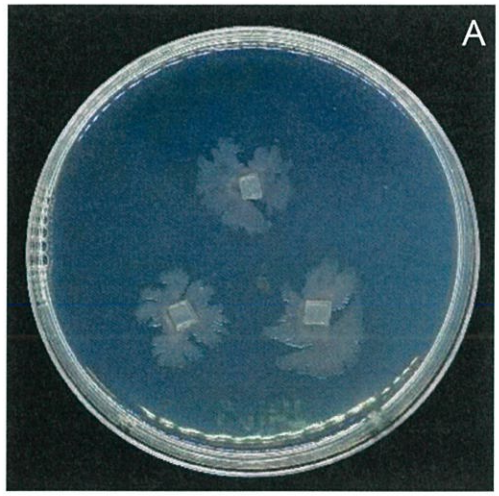


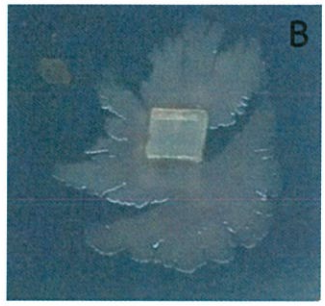


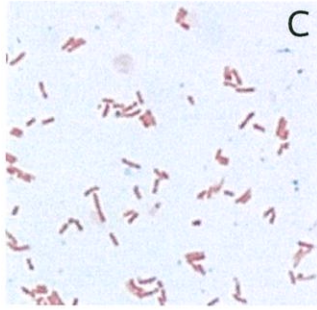


Taxonomy	
Original code	S15.4
Lot	-
Scientific name	*Vibrio alginolyticus*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	หอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	หอย
Location	12.740957,100.840031
Characteristics	
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	3-4 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.16 แสดงลักษณะของ S15.4 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





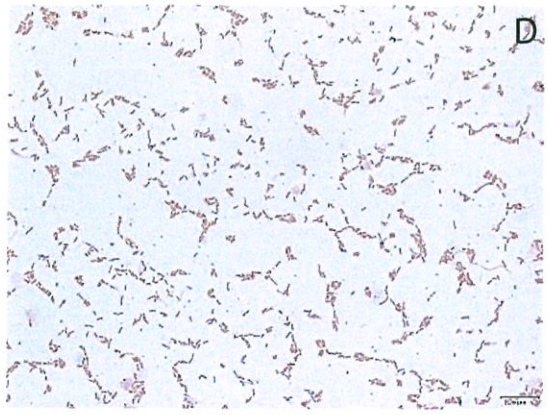


Taxonomy

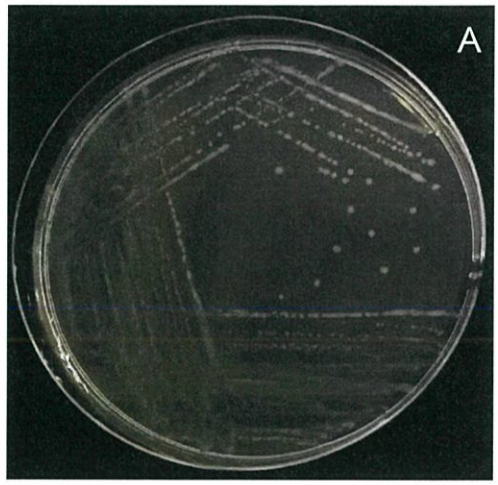
Original code	S16.2
Lot	-
Scientific name	*Vibrio alginolyticus*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษใบไม้ (สีน้ำตาล) หาด ทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษใบไม้ (สีน้ำตาล)
Location	12.740957,100.840031

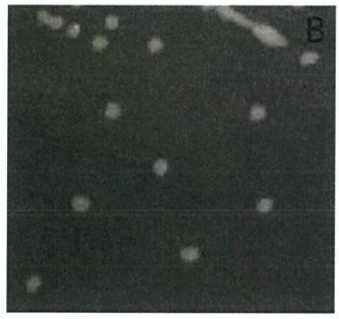
Characteristics

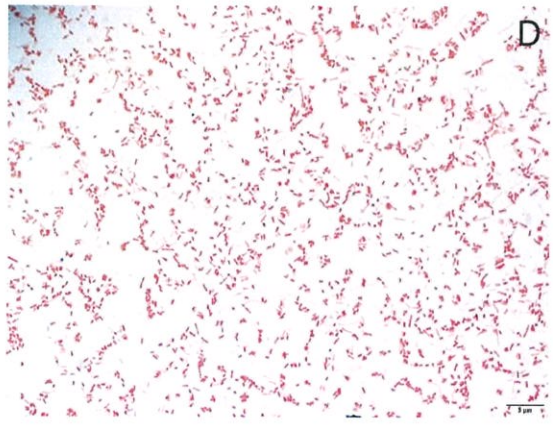
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	3-4 ไมโครเมตร
Color	white

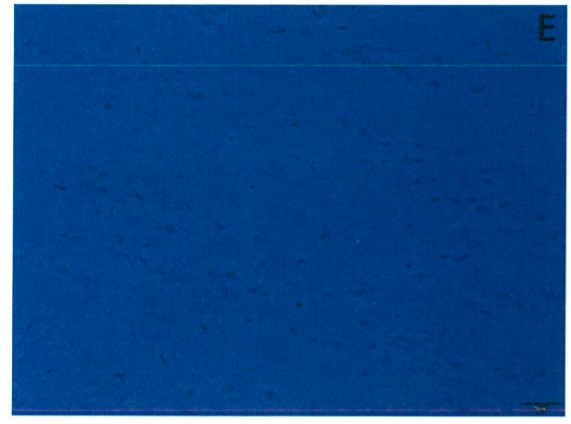


รูปที่ 4.17 แสดงลักษณะของ S16.2 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



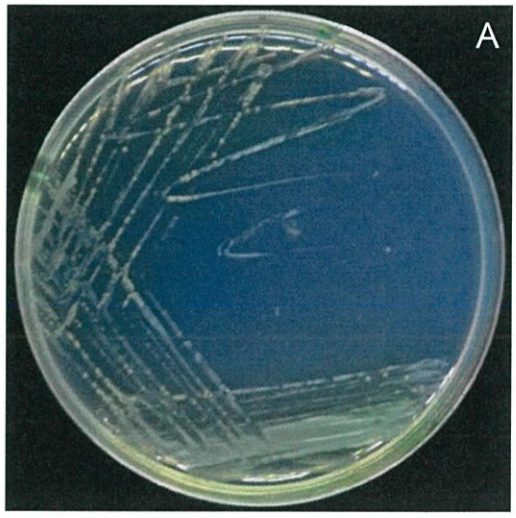


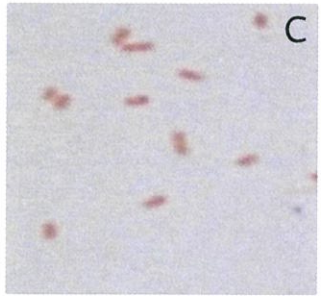


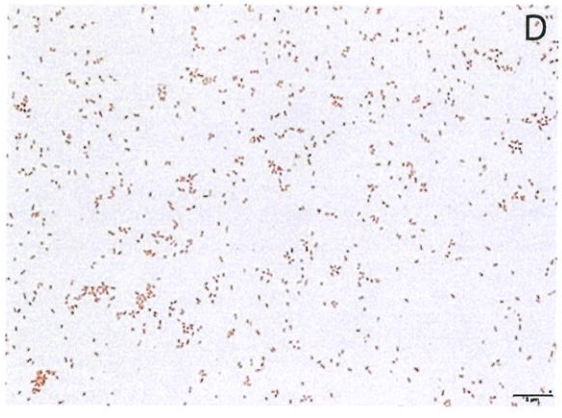


Taxonomy	
Original code	S17.2
Lot	-
Scientific name	*Vibrio alginolyticus*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031
Characteristics	
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	3-4 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.18 แสดงลักษณะของ S17.2 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X

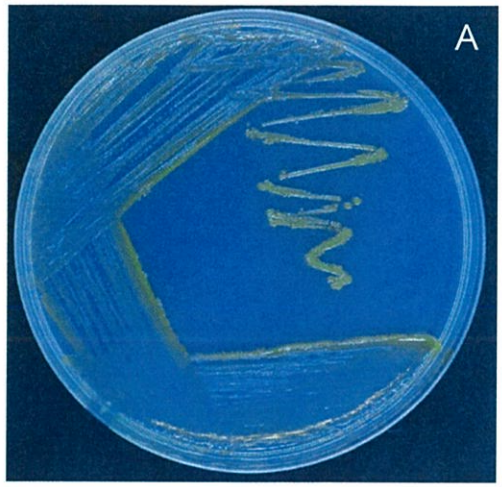


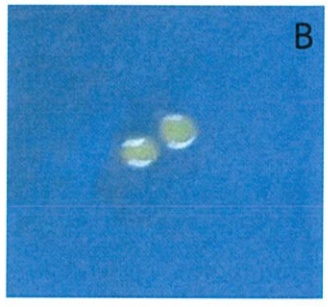


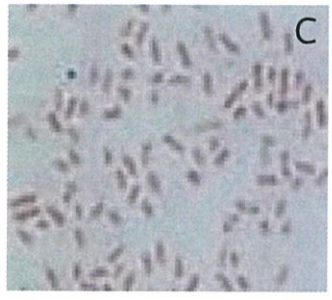


Taxonomy	
Original code	S17.3
Lot	-
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031
Characteristics	
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	3-4 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.19 แสดงลักษณะของ S17.3 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





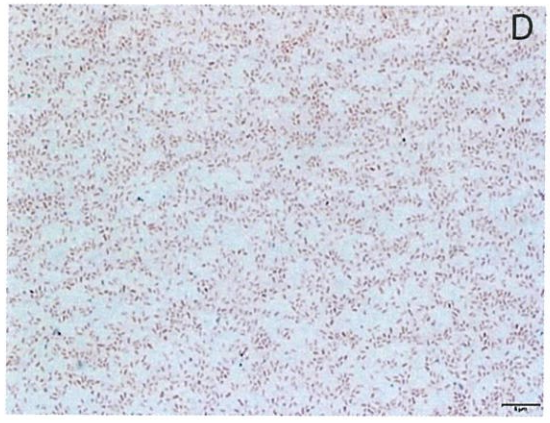


Taxonomy

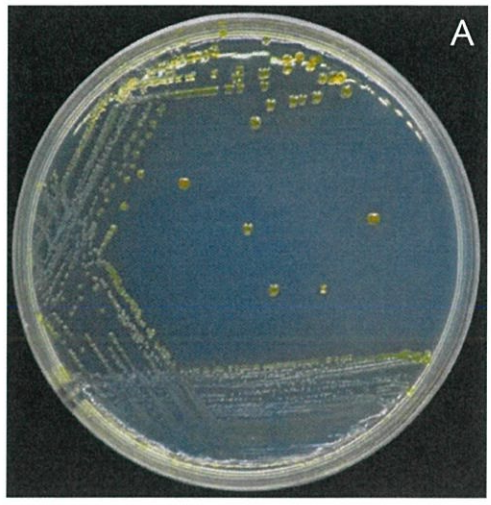
Original code	S17.7
Lot	-
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031

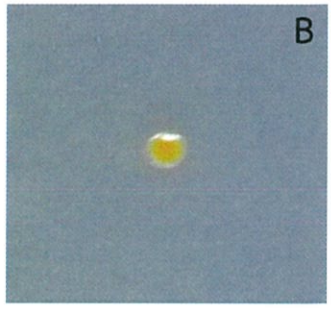
Characteristics

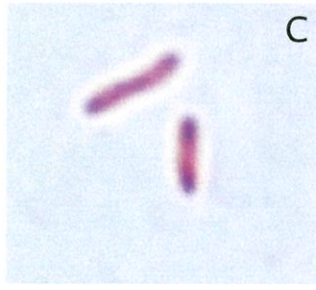
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	3-4 ไมโครเมตร
Color	Yellow



รูปที่ 4.20 แสดงลักษณะของ S17.7 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





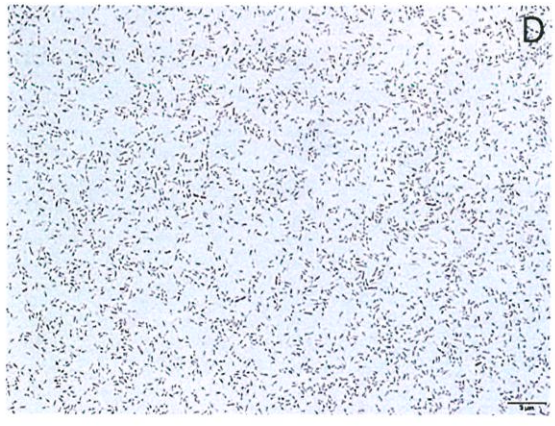


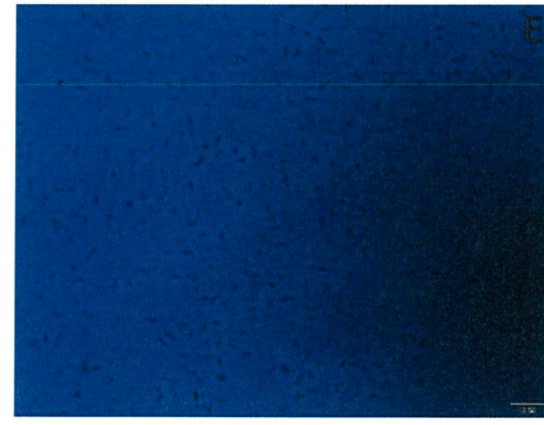
Taxonomy

Original code	S17.8
Lot	-
Scientific name	*Pseudoalteromonas piscicida*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031

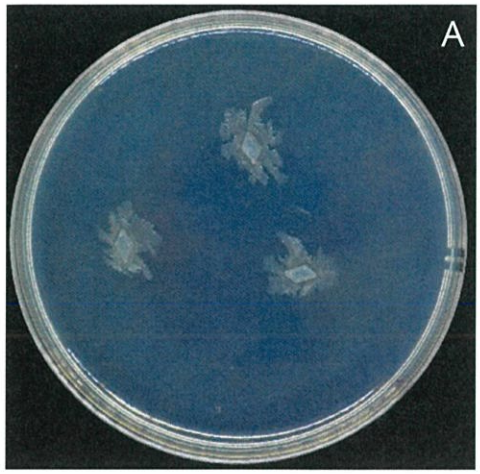
Characteristics

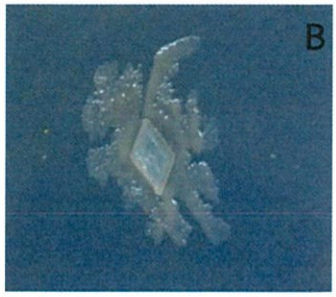
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	3-4 ไมโครเมตร
Color	Yellow





รูปที่ 21 แสดงลักษณะของ S17.8 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



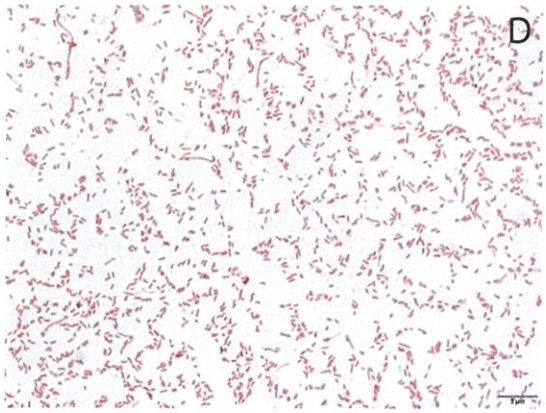


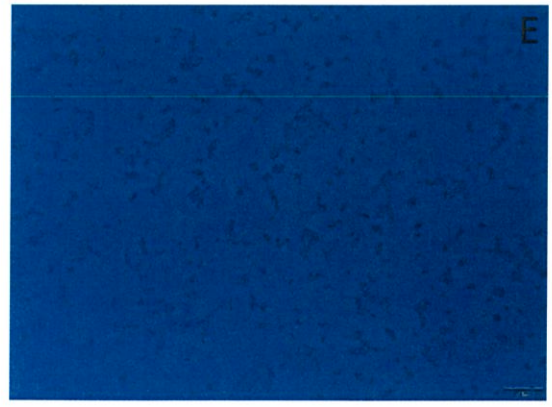
Taxonomy

Original code	S17.10
Lot	-
Scientific name	*Vibrio* sp.
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031

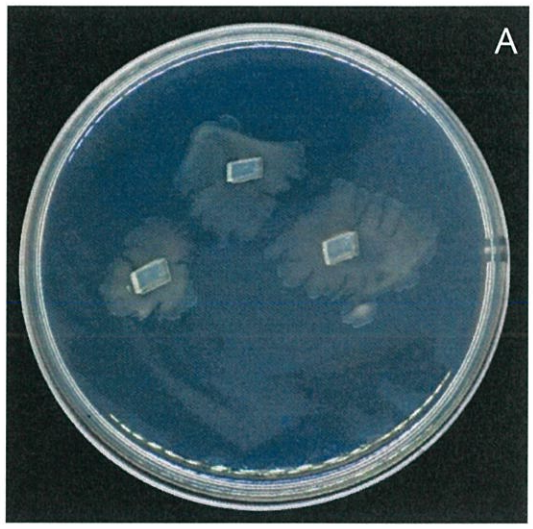
Characteristics

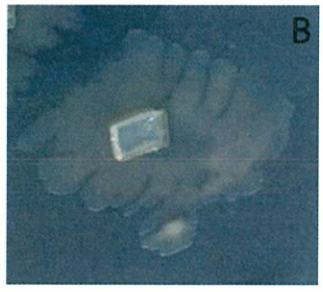
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	3-4 ไมโครเมตร
Color	white

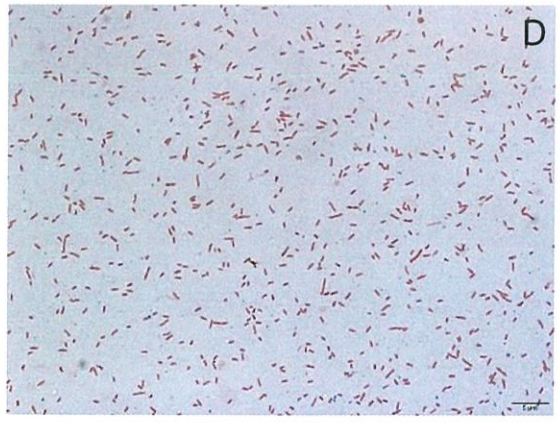




รูปที่ 22 แสดงลักษณะของ S17.10 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X







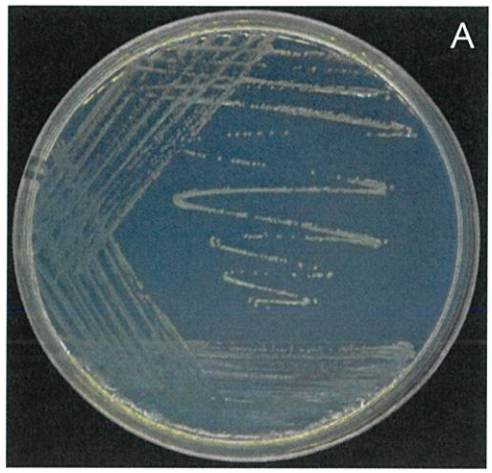
Taxonomy

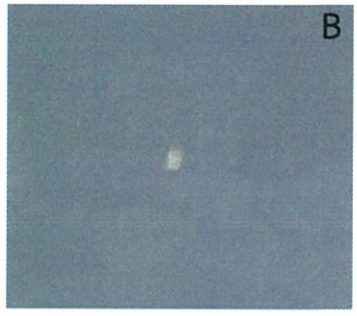
Original code	S17.11
Lot	-
Scientific name	*Vibrio alginolyticus*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031

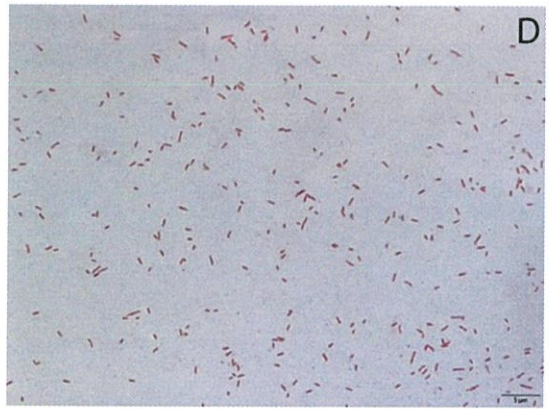
Characteristics

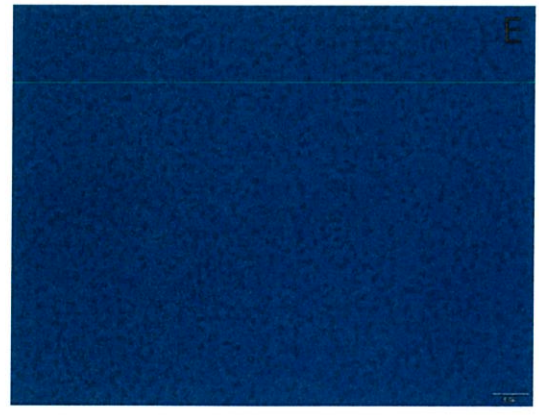
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	3-4 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.23 แสดงลักษณะของ S17.11 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



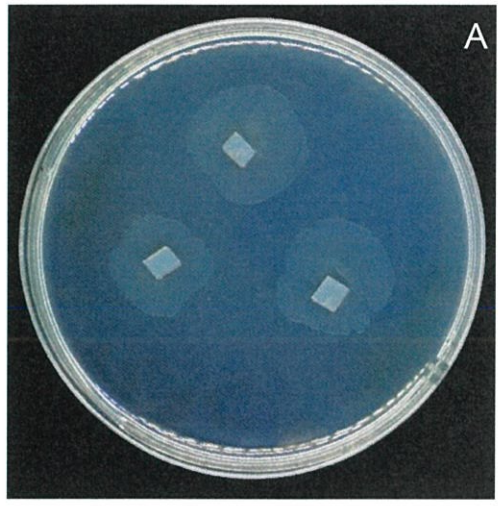


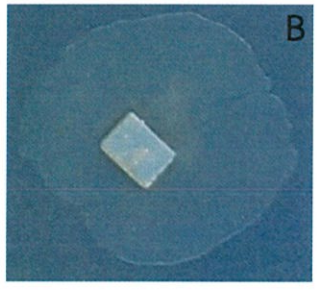


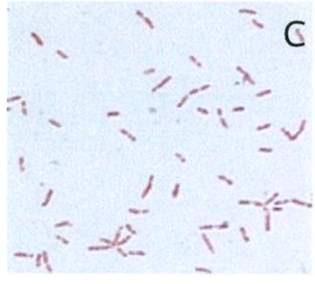


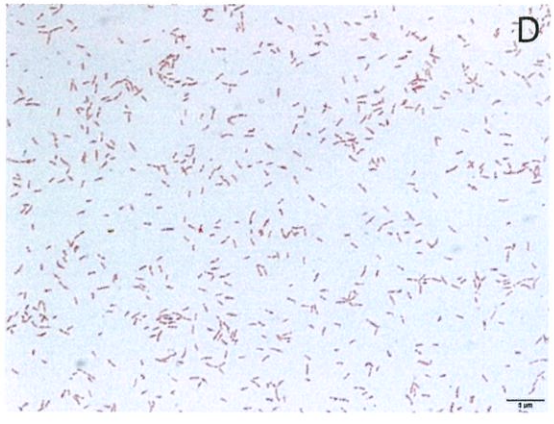
Taxonomy	
Original code	S17.13
Lot	-
Scientific name	*Pseudidiomarina sediminum*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031
Characteristics	
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	3-4 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.24 แสดงลักษณะของ S17.13 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



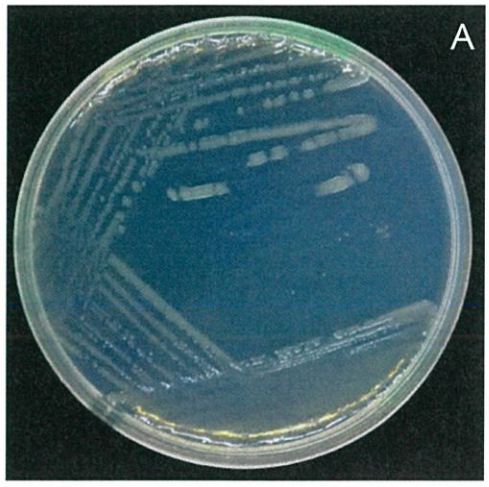


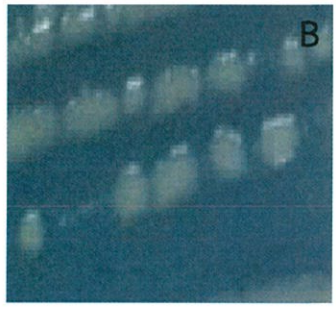


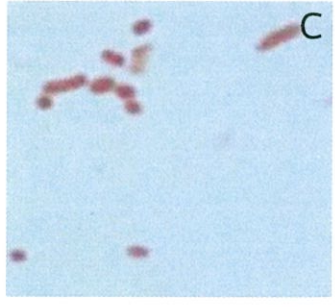


Taxonomy	
Original code	S18.1
Lot	-
Scientific name	*Vibrio alginolyticus*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษใบไม้ หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษใบไม้
Location	12.740957,100.840031
Characteristics	
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	3-4 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.25 แสดงลักษณะของ S18.1 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





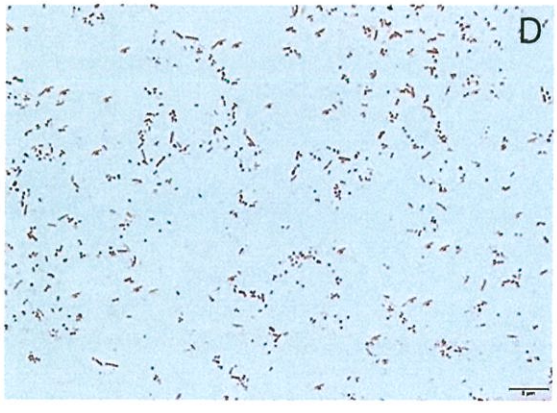


Taxonomy

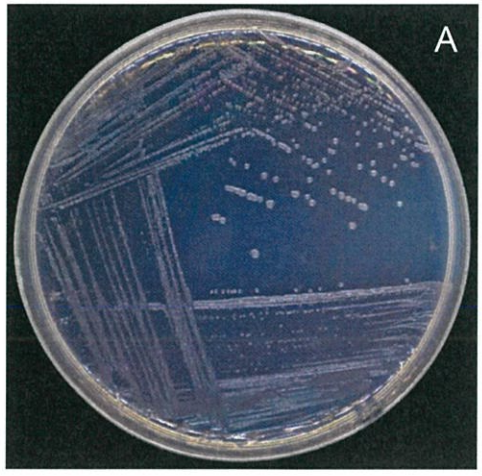
Original code	S18.2
Lot	-
Scientific name	*Vibrio alginolyticus*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษใบไม้ หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษใบไม้
Location	12.740957,100.840031

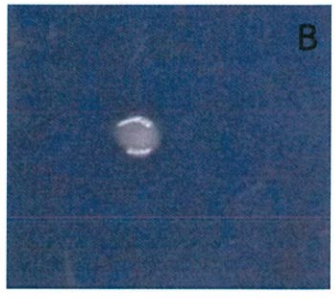
Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white



รูปที่ 4.26 แสดงลักษณะของ S18.2 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



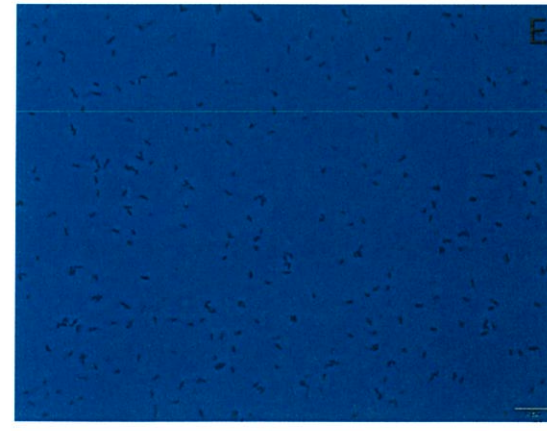


Taxonomy

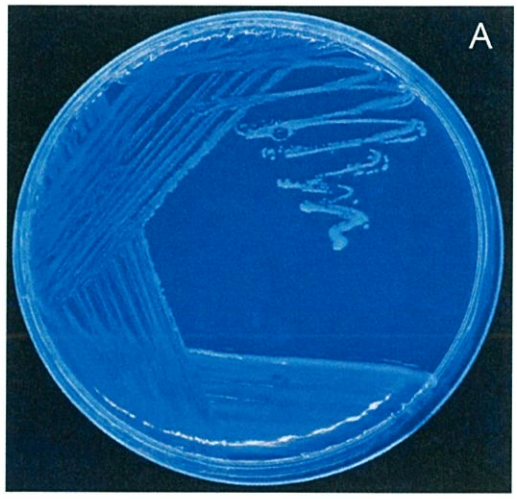
Original code	S18.4
Lot	-
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษใบไม้ หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษใบไม้
Location	12.740957,100.840031

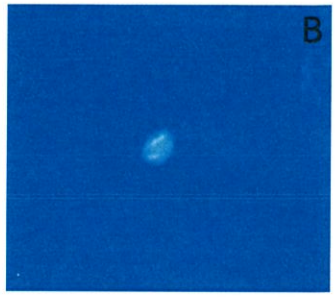
Characteristics

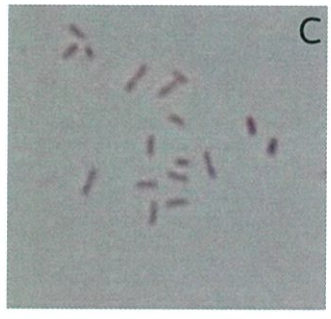
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	2-3 ไมโครเมตร
Color	white



รูปที่ 4.26 แสดงลักษณะของ S18.2 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





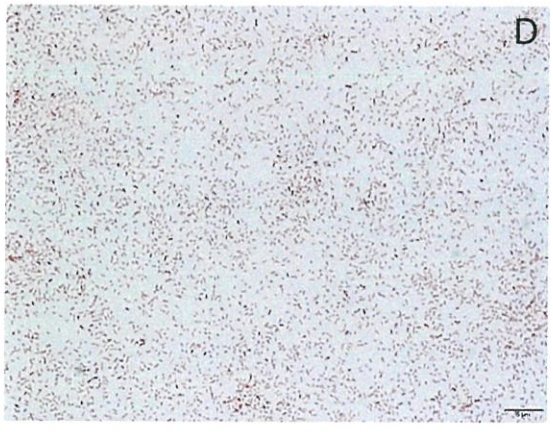


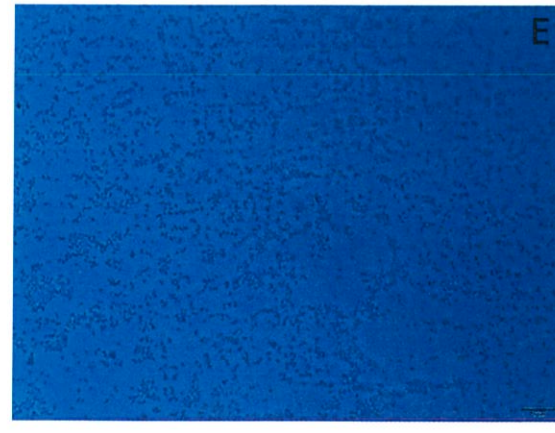
Taxonomy

Original code	S20.1
Lot	-
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษไม้ หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษไม้
Location	12.740957,100.840031

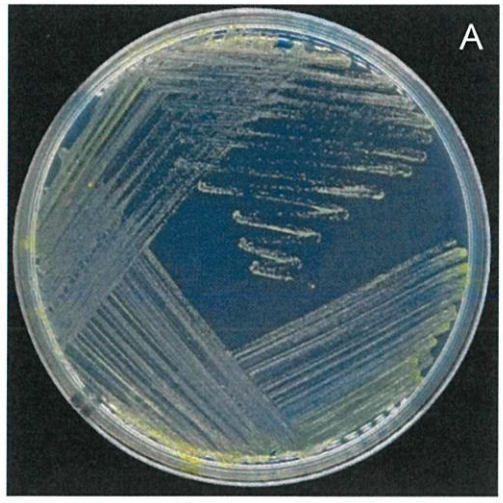
Characteristics

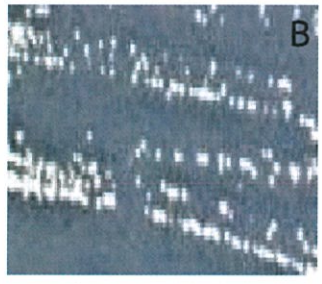
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	2-3 ไมโครเมตร
Color	white

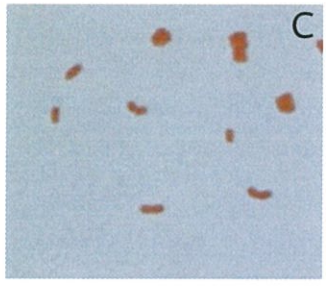




รูปที่ 4.26 แสดงลักษณะของ S20.1 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





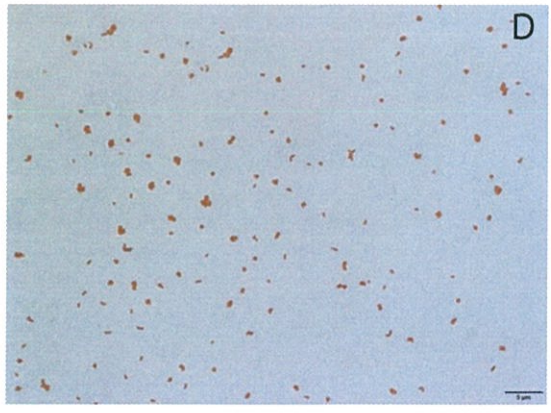


Taxonomy

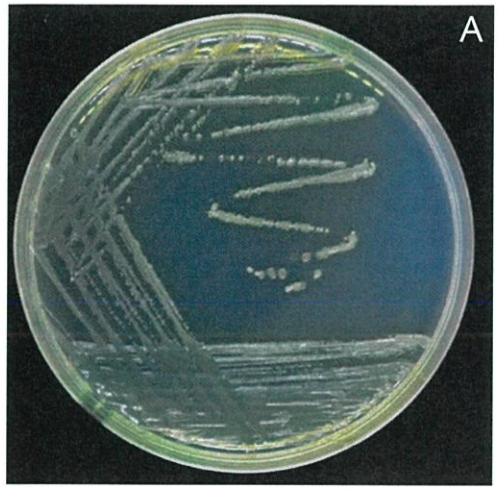
Original code	S21.1
Lot	-
Scientific name	*Brevibacterium sediminis*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031

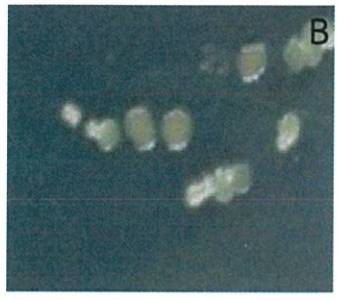
Characteristics

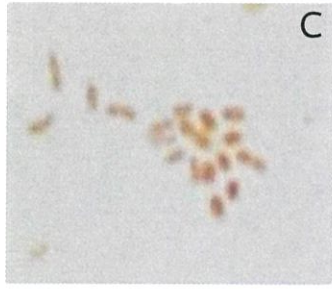
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	Yellow

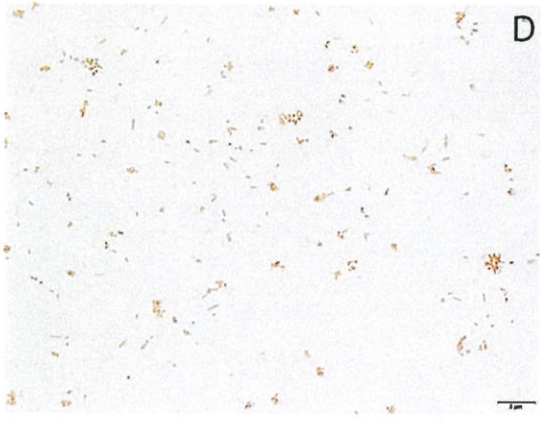


รูปที่ 4.29 แสดงลักษณะของ S21.1 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X









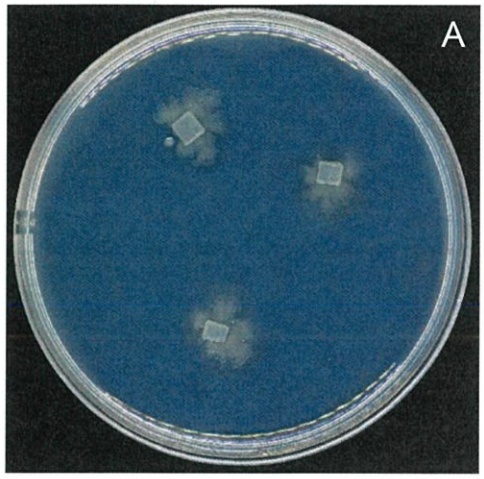
Taxonomy

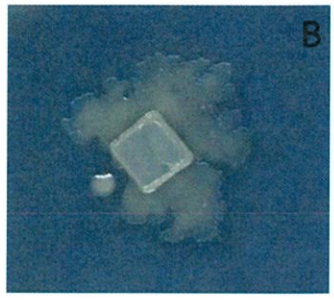
Original code	S22.1
Lot	-
Scientific name	*Ruegeria* sp.
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษใบไม้ หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษใบไม้
Location	12.740957,100.840031

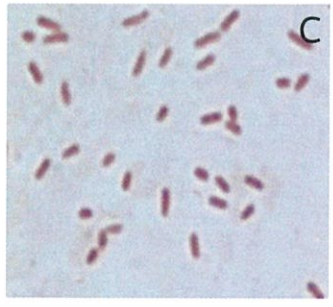
Characteristics

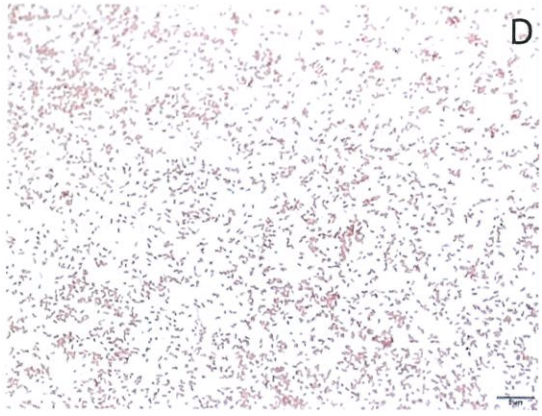
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

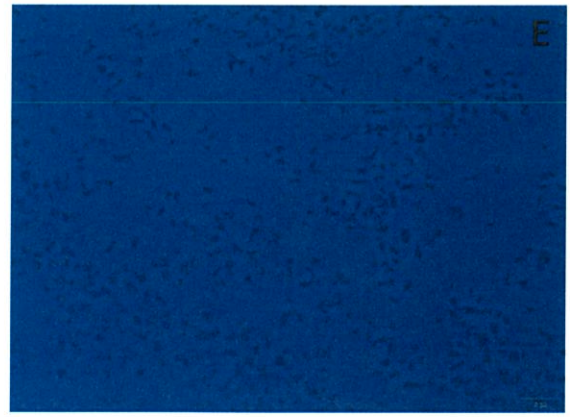
รูปที่ 4.30 แสดงลักษณะของ S22.1 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X











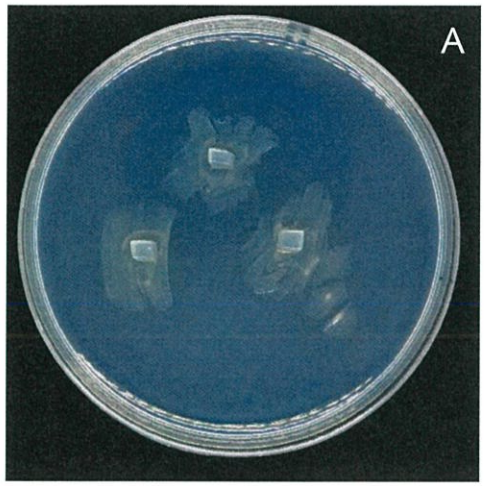
Taxonomy

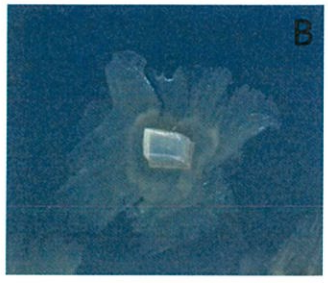
Original code	S24.1
Lot	-
Scientific name	*Vibrio* sp.
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษเชือก หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษเชือก
Location	12.740957,100.840031

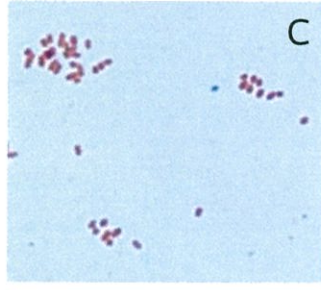
Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	2-3 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.32 แสดงลักษณะของ S24.3 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





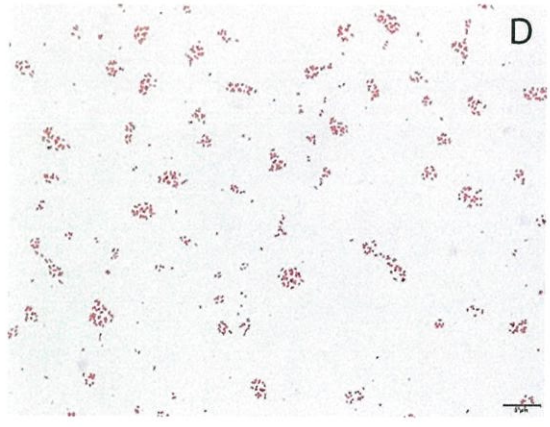


Taxonomy

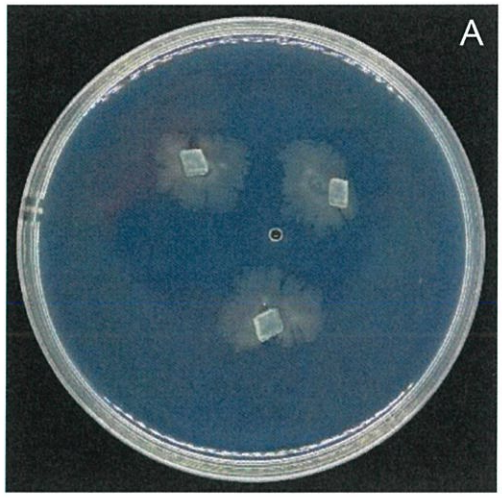
Original code	S24.3
Lot	-
Scientific name	*Vibrio alginolyticus*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษเชือก หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษเชือก
Location	12.740957,100.840031

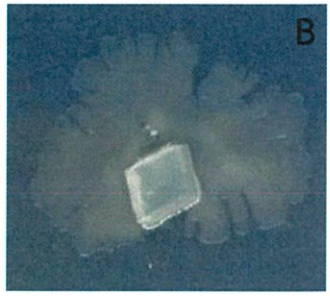
Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white



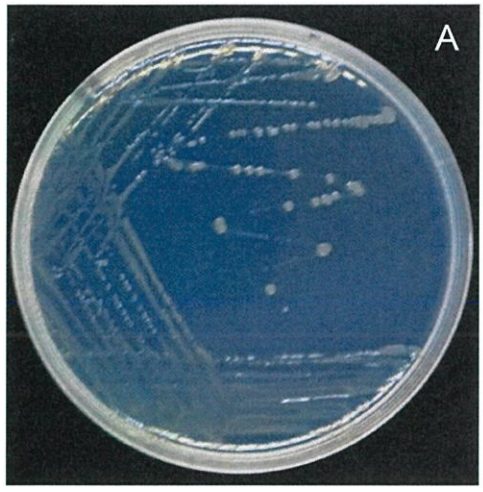
รูปที่ 4.32 แสดงลักษณะของ S24.3 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



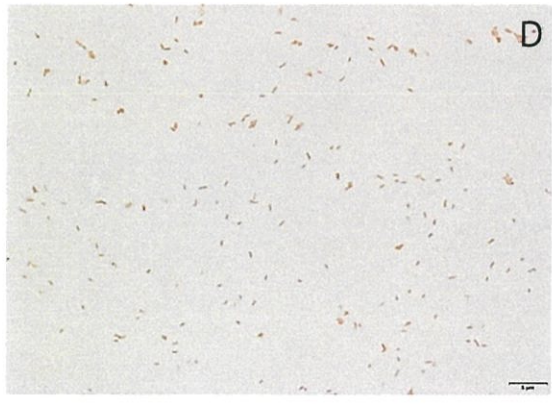


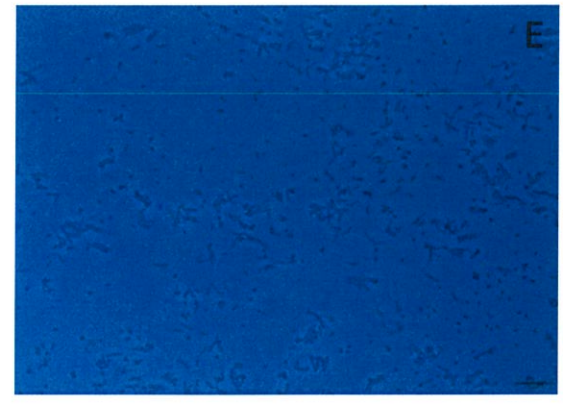
Taxonomy	
Original code	S24.4
Lot	-
Scientific name	*Vibrio alginolyticus*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษเชือก หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษเชือก
Location	12.740957,100.840031
Characteristics	
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.33 แสดงลักษณะของ S24.4 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X

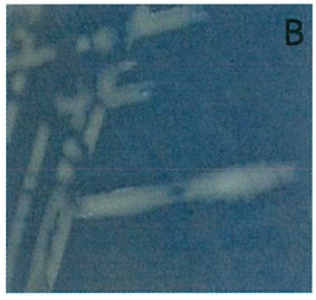


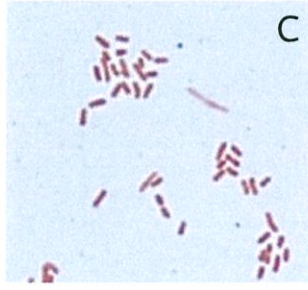
Taxonomy	
Original code	S25.3
Lot	-
Scientific name	*Pseudoalteromonas* sp.
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031
Characteristics	
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

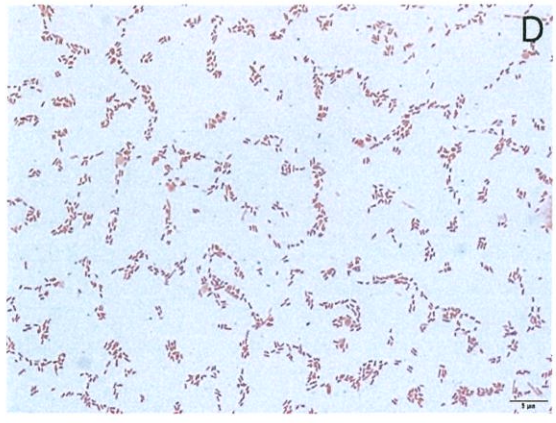


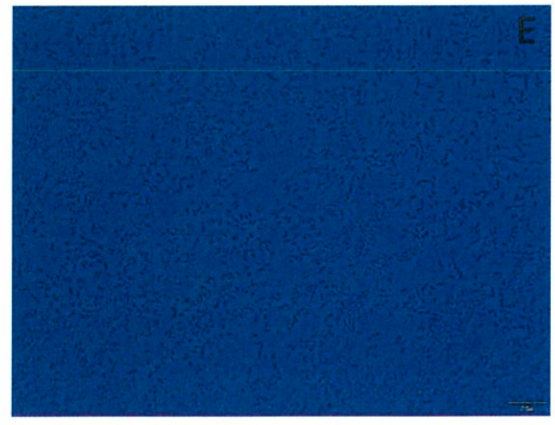


รูปที่ 4.34 แสดงลักษณะของ S25.3 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X









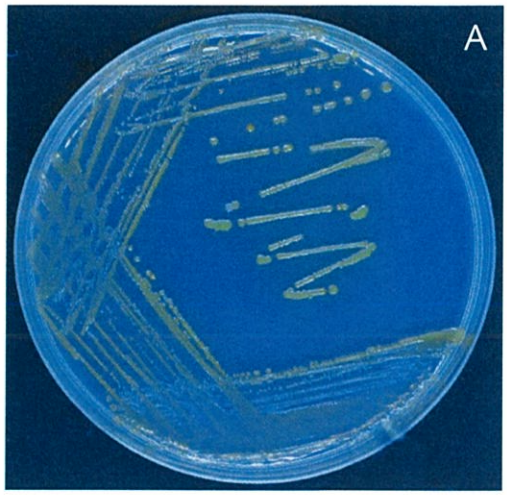
Taxonomy

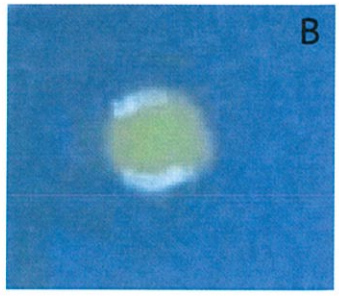
Original code	S25.4
Lot	-
Scientific name	*Vibrio alginolyticus*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031

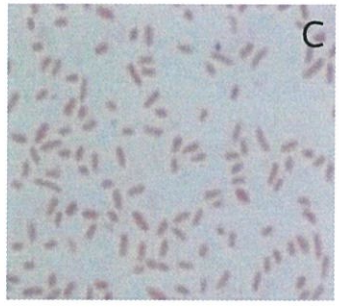
Characteristics

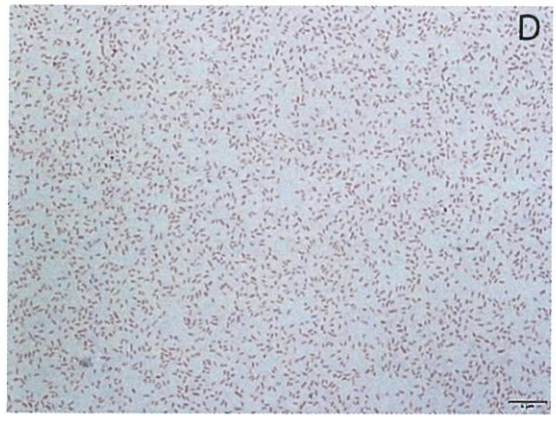
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

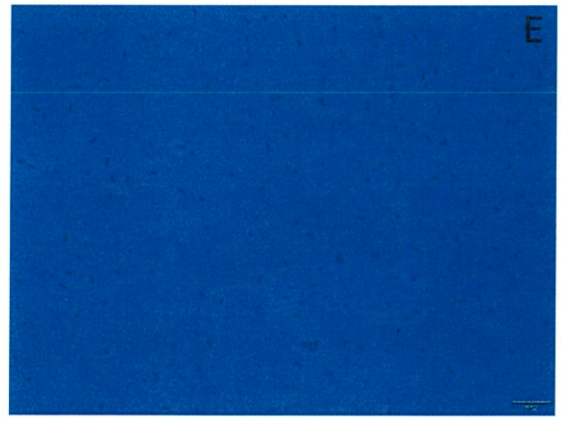
รูปที่ 4.35 แสดงลักษณะของ S25.4 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X











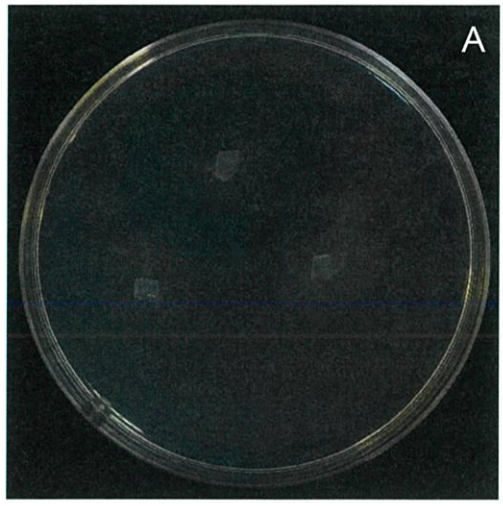
Taxonomy

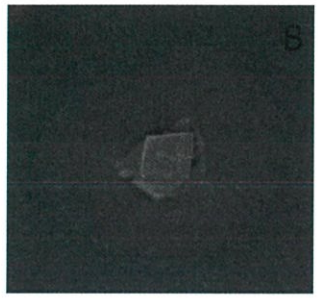
Original code	S25.5
Lot	-
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031

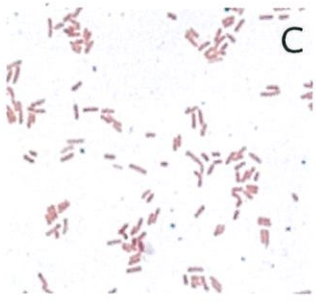
Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	Yellow

รูปที่ 4.36 แสดงลักษณะของ S25.4 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





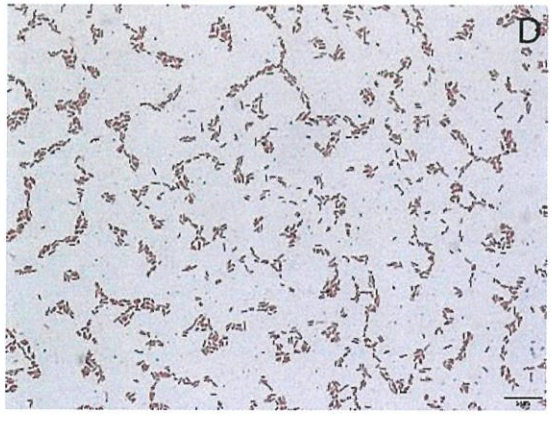


Taxonomy

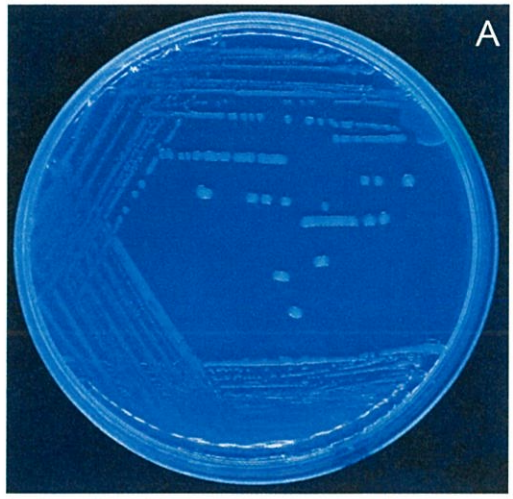
Original code	S26.2
Lot	-
Scientific name	*Vibrio natriegens*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	ก้อนหิน หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	ก้อนหิน
Location	12.740957,100.840031

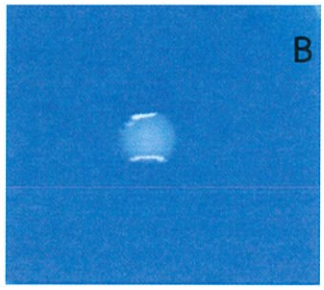
Characteristics

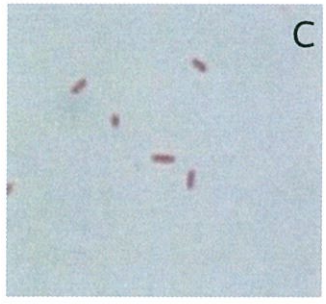
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	2-3 ไมโครเมตร
Color	white



รูปที่ 4.37 แสดงลักษณะของ S26.2 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





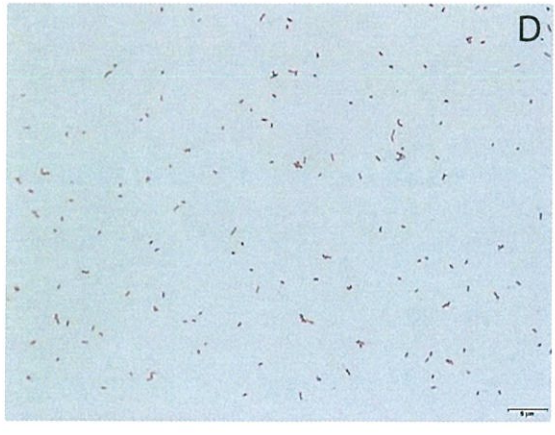


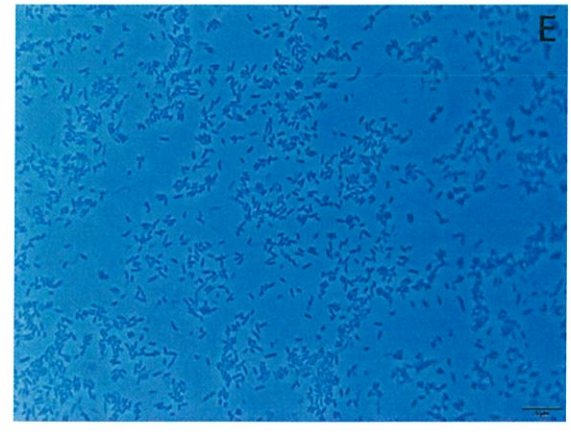
Taxonomy

Original code	S28.1
Lot	-
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	ก้อนหิน หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	ก้อนหิน
Location	12.740957,100.840031

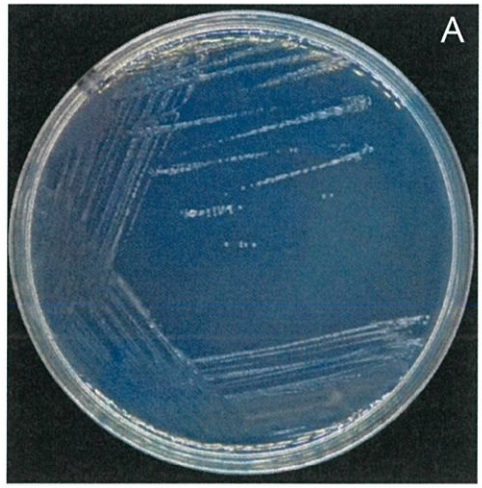
Characteristics

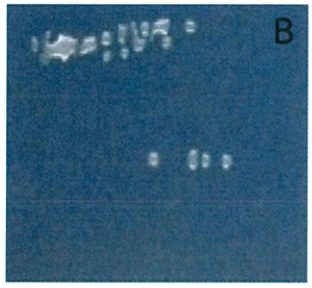
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white





รูปที่ 4.37 แสดงลักษณะของ S28.1 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



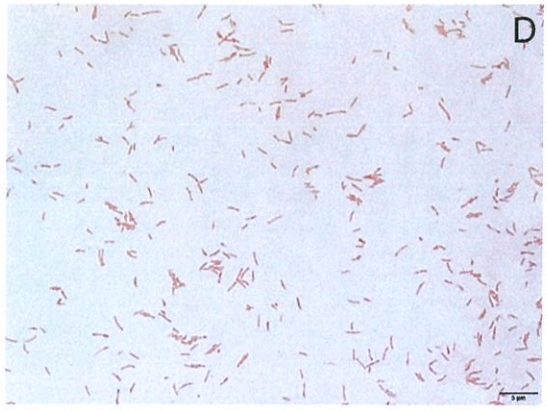


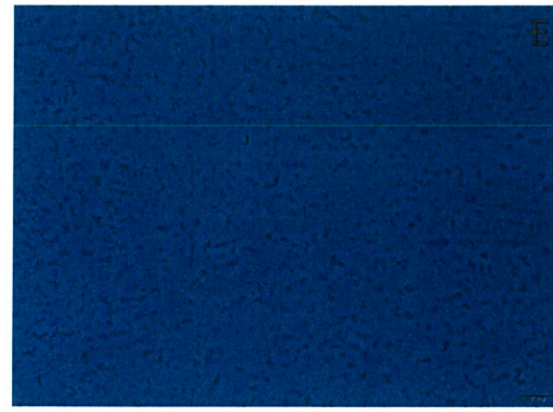
Taxonomy

Original code	S28.3
Lot	-
Scientific name	*Idiomarina sediminum*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	ก้อนหิน หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	ก้อนหิน
Location	12.740957,100.840031

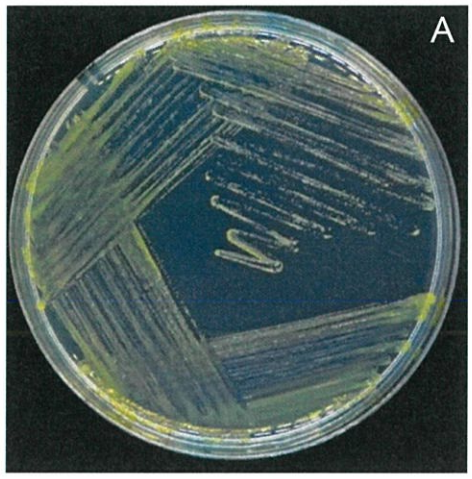
Characteristics

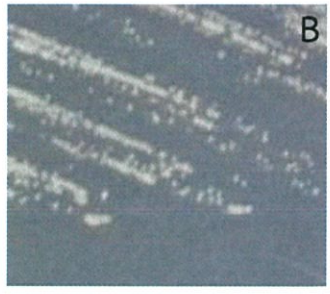
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

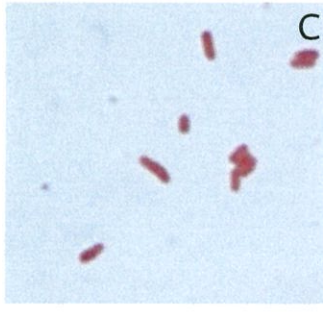




รูปที่ 4.39 แสดงลักษณะของ S28.3 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





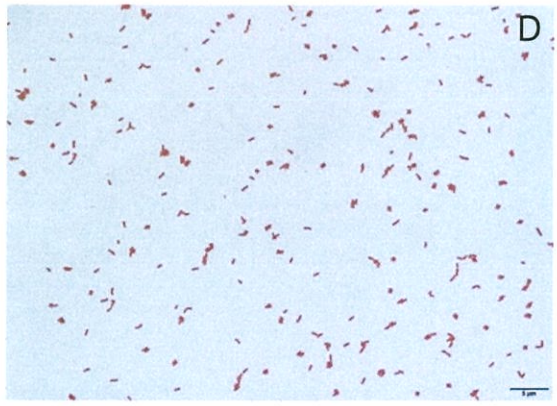


Taxonomy

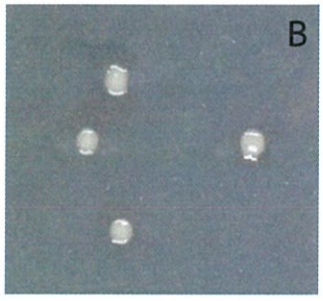
Original code	S29.4
Lot	-
Scientific name	*Brevibacterium epidermidis*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษปะการัง หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษปะการัง
Location	12.740957,100.840031

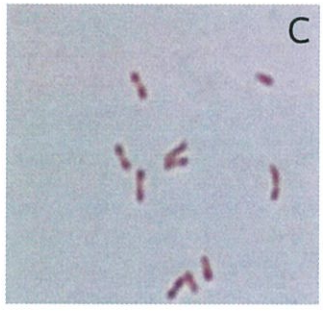
Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	yellow



รูปที่ 4.40 แสดงลักษณะของ S29.4 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



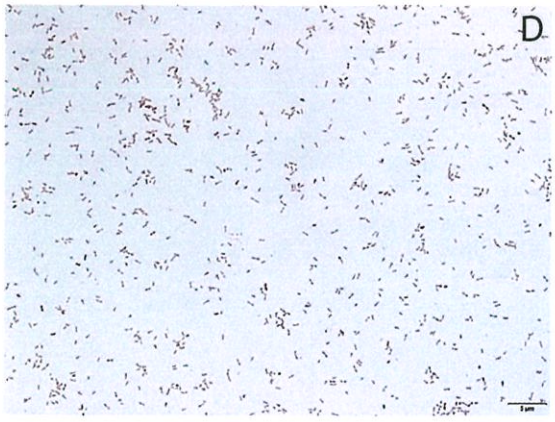


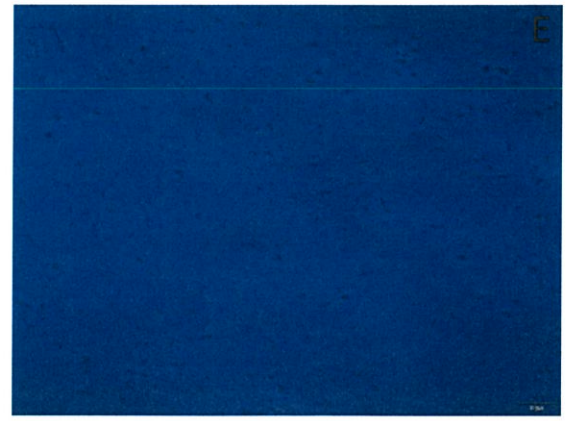
Taxonomy

Original code	S31.1
Lot	-
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031

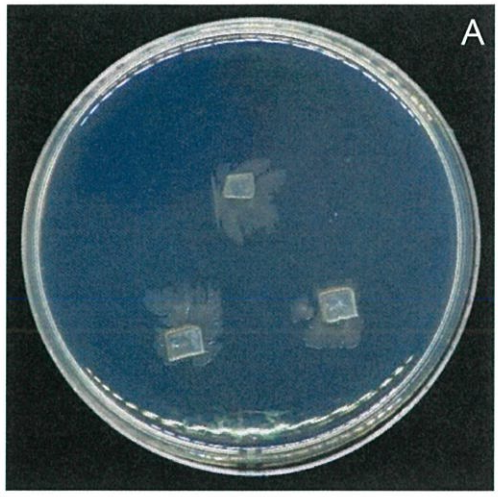
Characteristics

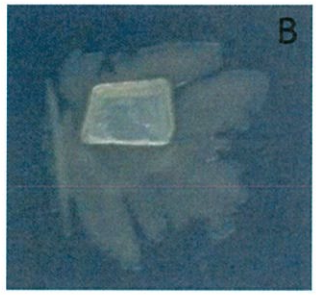
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	yellow





รูปที่ 4.40 แสดงลักษณะของ S29.4 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



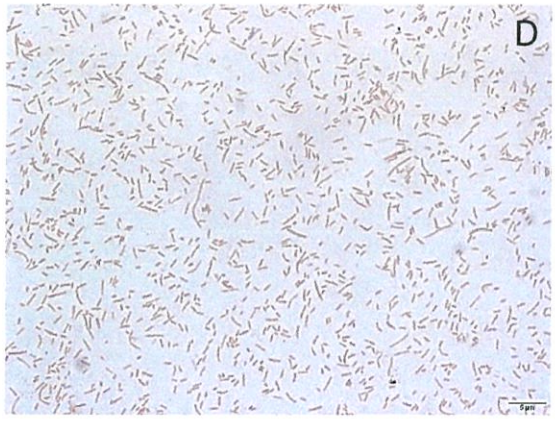


Taxonomy

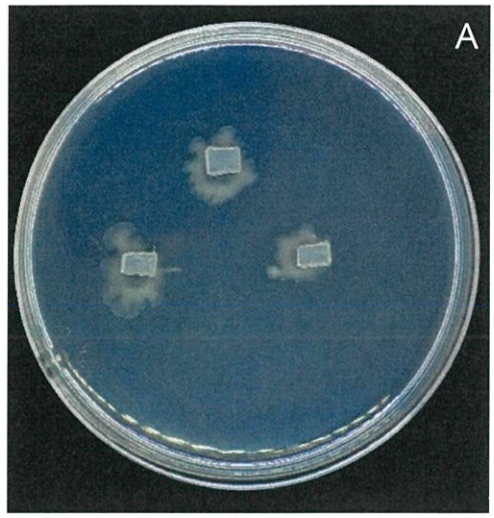
Original code	S31.2
Lot	-
Scientific name	*Vibrio alginolyticus*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031

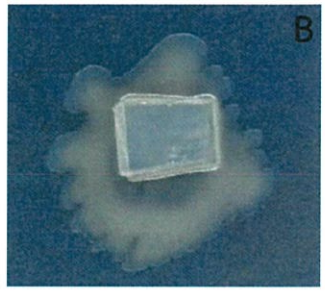
Characteristics

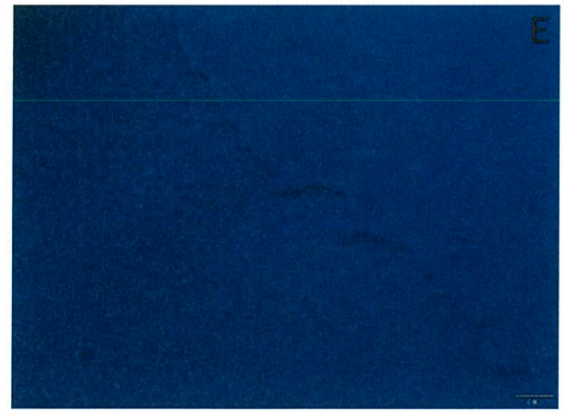
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white



รูปที่ 4.40 แสดงลักษณะของ S29.4 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X







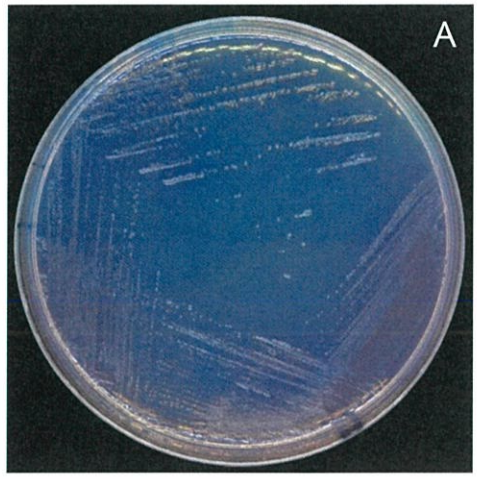
Taxonomy

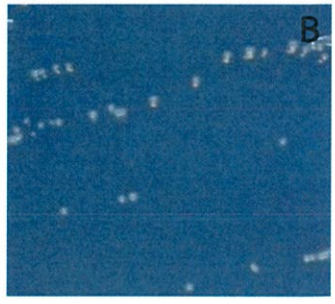
Original code	S31.6
Lot	-
Scientific name	*Vibrio alginolyticus*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031

Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.43 แสดงลักษณะของ S31.6 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



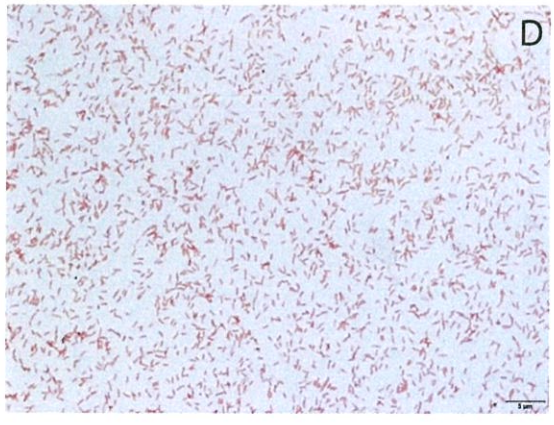


Taxonomy

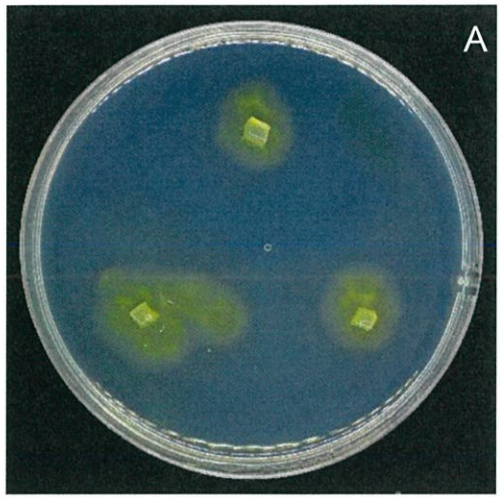
Original code	S32.1
Lot	-
Scientific name	*Nesiotobacter exalbescens*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031

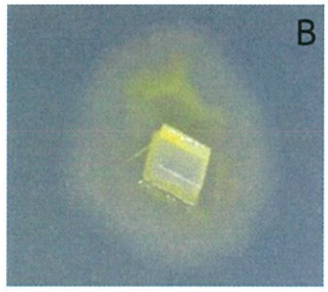
Characteristics

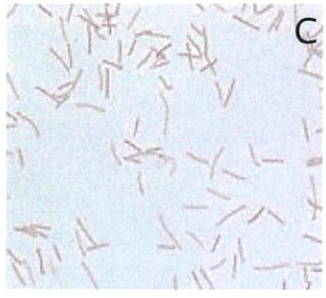
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

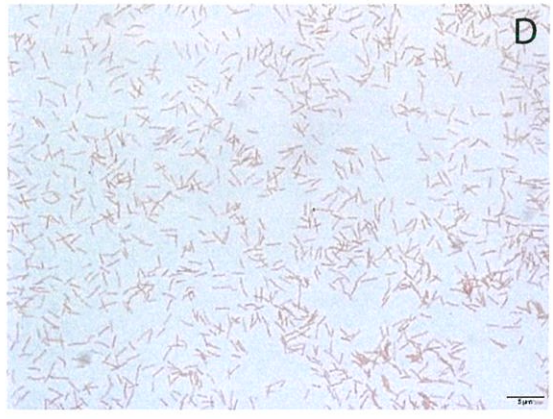


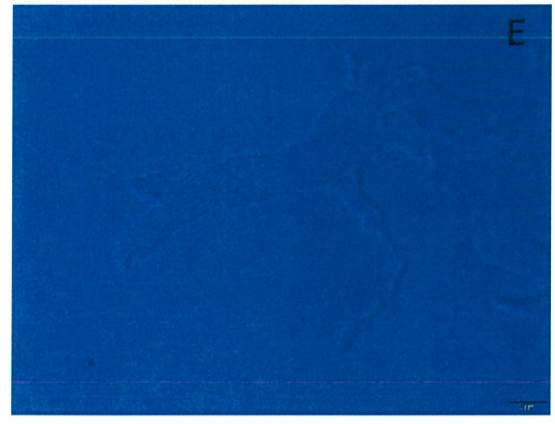
รูปที่ 4.44 แสดงลักษณะของ S32.1 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X











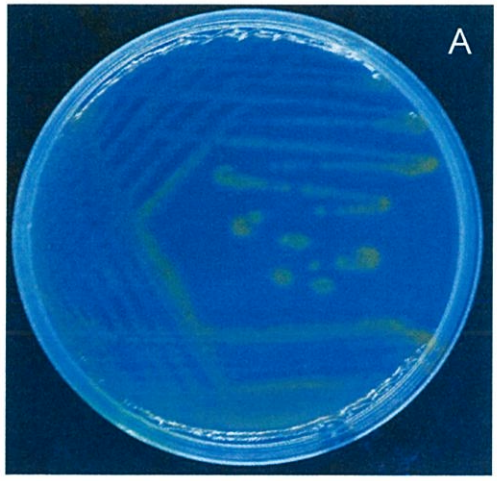
Taxonomy

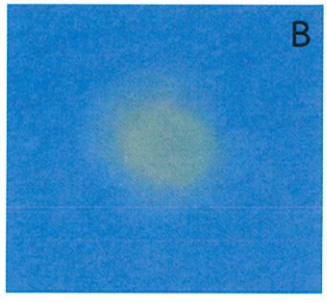
Original code	S33.3
Lot	-
Scientific name	*Tenacibaculum mesophilum*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษเปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษเปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031

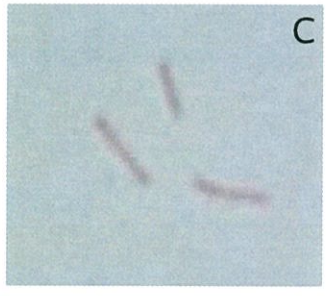
Characteristics

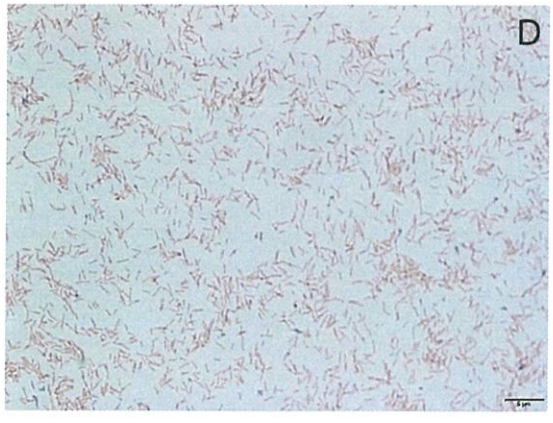
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	3-4 ไมโครเมตร
Color	yellow

รูปที่ 4.45 แสดงลักษณะของ S33.3 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X









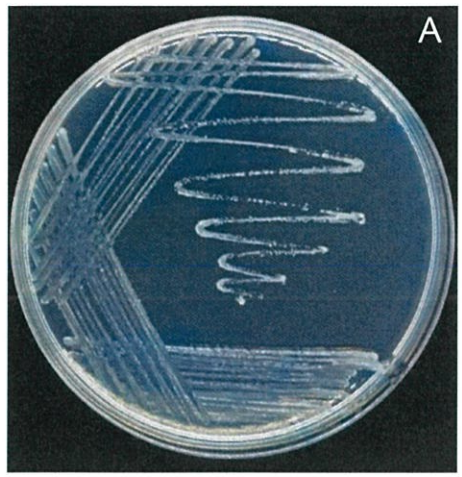
Taxonomy

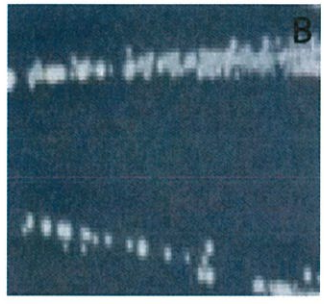
Original code	S33.4
Lot	-
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษเปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษเปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031

Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	3-4 ไมโครเมตร
Color	yellow

รูปที่ 4.46 แสดงลักษณะของ S33.4 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



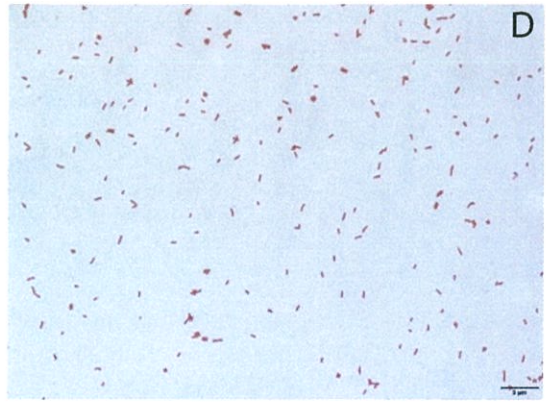


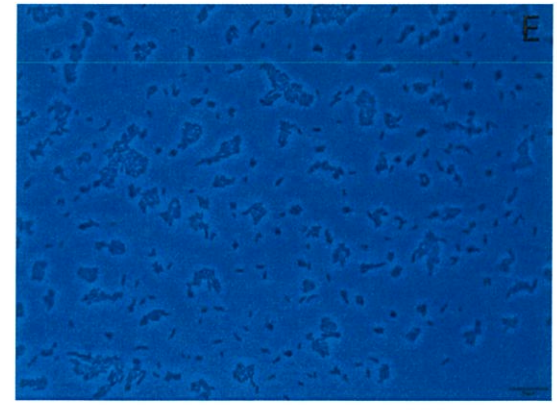
Taxonomy

Original code	S34.1
Lot	-
Scientific name	*Brevibacterium casei*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษเปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษเปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031

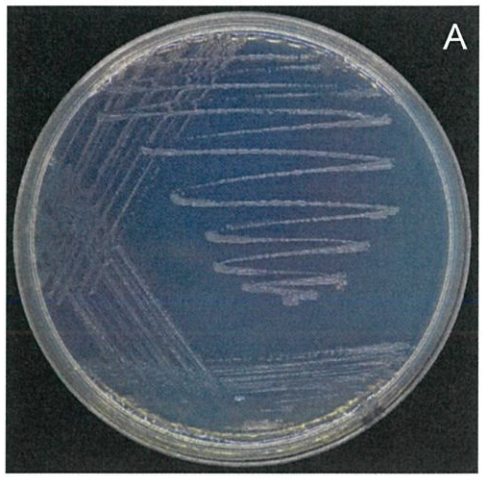
Characteristics

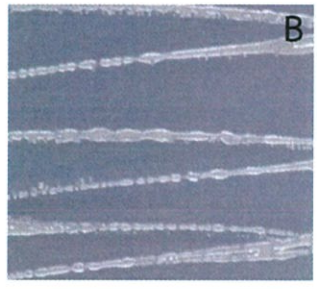
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	3-4 ไมโครเมตร
Color	yellow





รูปที่ 4.47 แสดงลักษณะของ S34.1 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



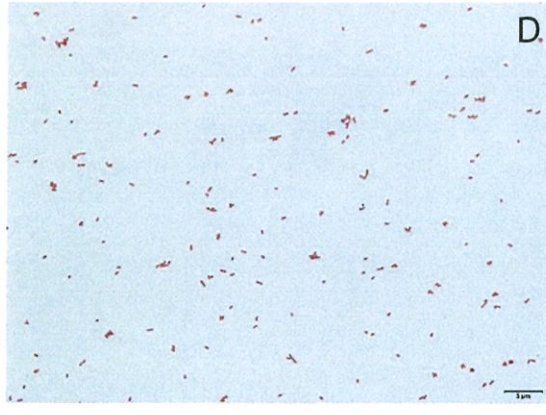


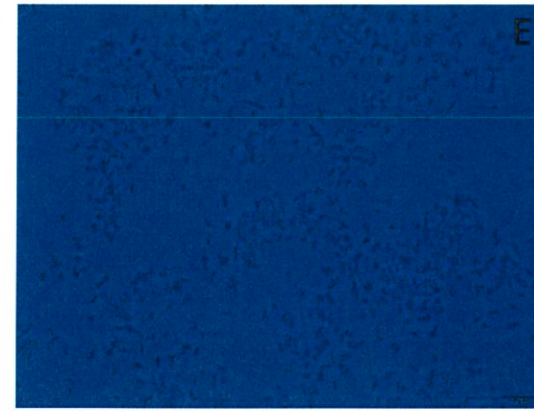
Taxonomy

Original code	S37.6
Lot	-
Scientific name	*Nesiotobacter exalbescens*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษเปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษเปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031

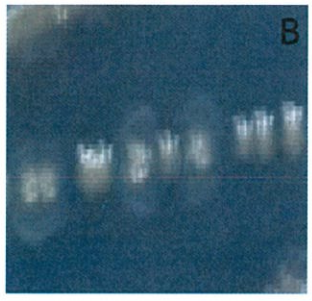
Characteristics

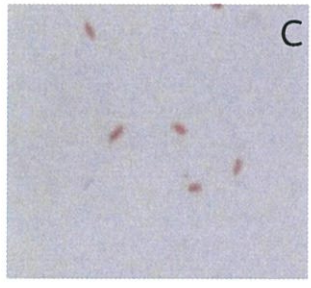
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	3-4 ไมโครเมตร
Color	white





รูปที่ 4.48 แสดงลักษณะของ S37.6 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



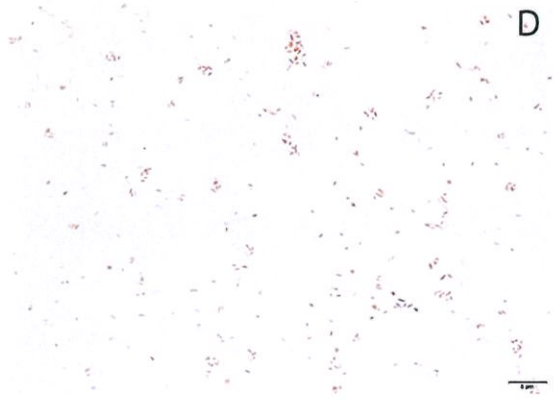


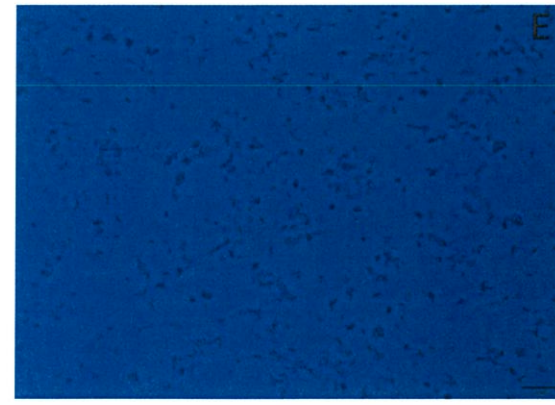
Taxonomy

Original code	S37.9
Lot	-
Scientific name	*Pseudoalteromonas* sp.
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษเปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษเปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031

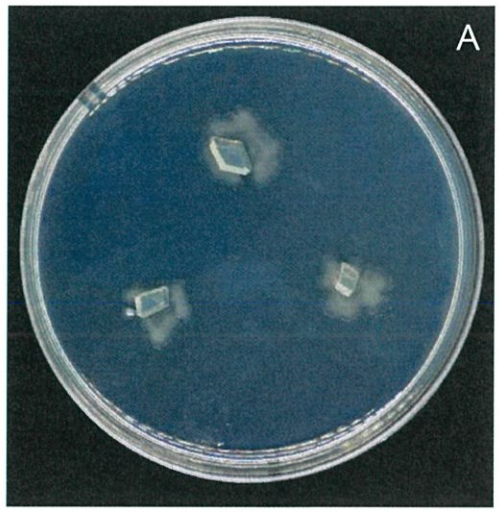
Characteristics

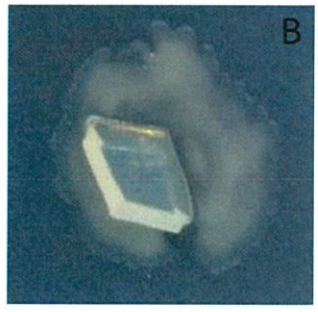
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

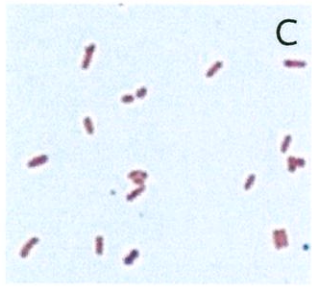




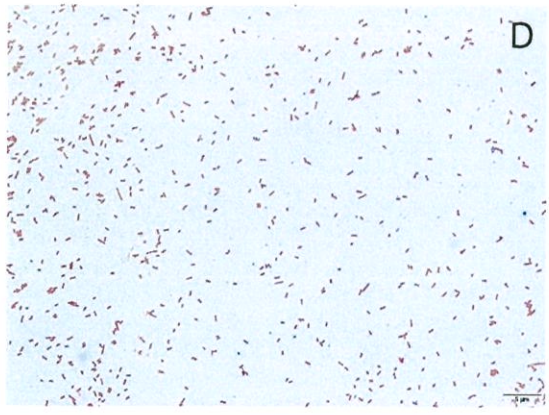
รูปที่ 4.49 แสดงลักษณะของ S37.9 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X

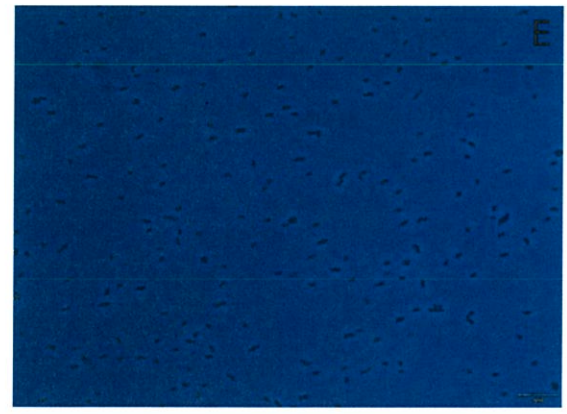




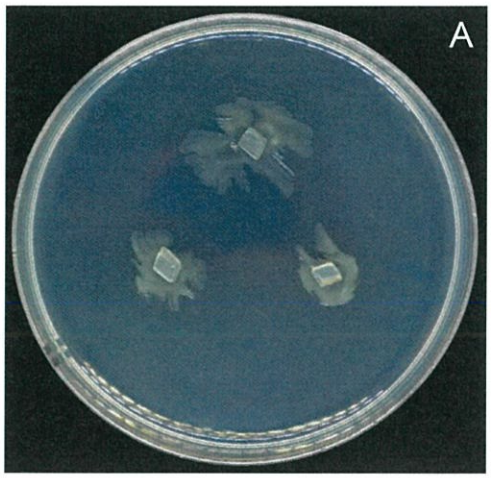


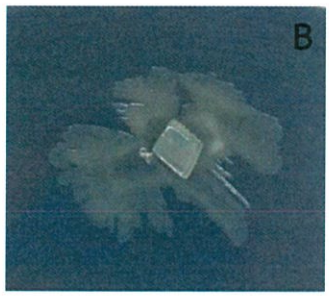
Taxonomy	
Original code	S37.10
Lot	-
Scientific name	*Vibrio alginolyticus*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เศษเปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เศษเปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031
Characteristics	
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

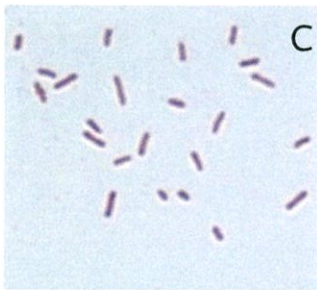


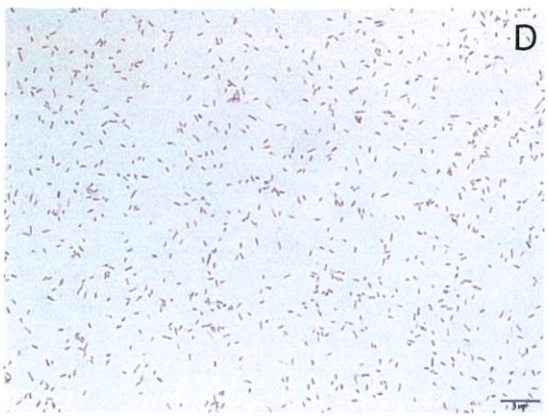


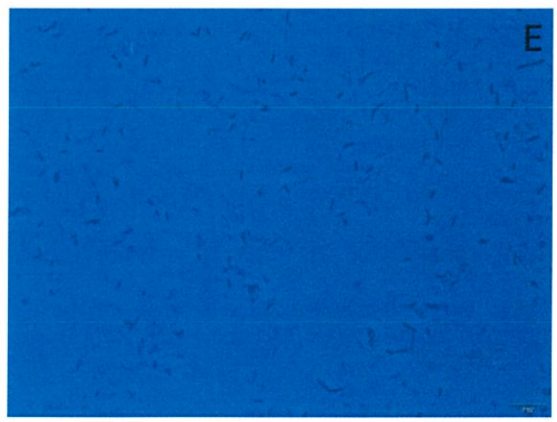
รูปที่ 4.50 แสดงลักษณะของ S37.10 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X











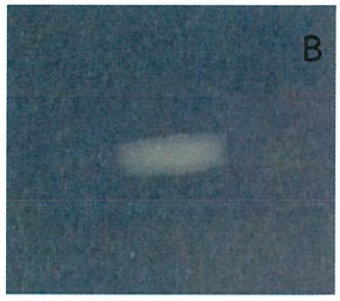
Taxonomy

Original code	S38.1
Lot	-
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	ก้อนหิน หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	ก้อนหิน
Location	12.740957,100.840031

Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.51 แสดงลักษณะของ S38.1 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X

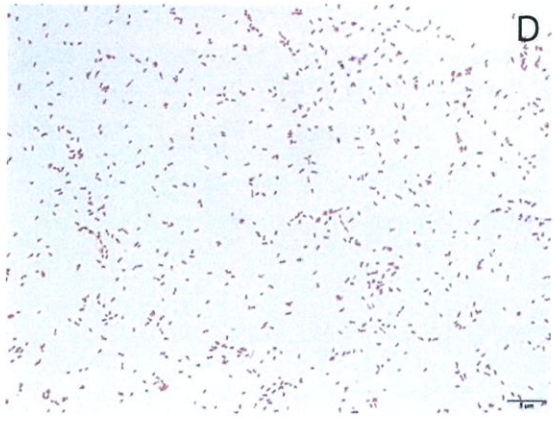


Taxonomy

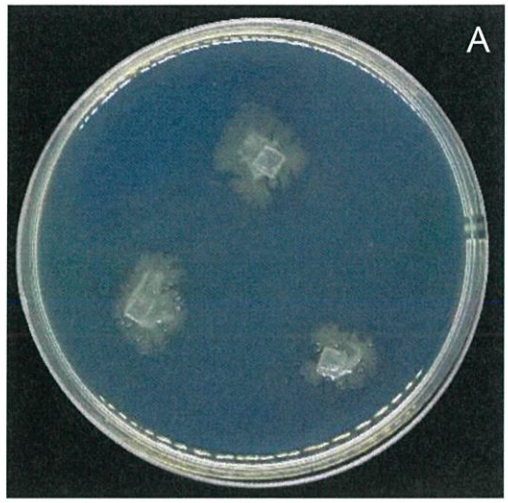
Original code	S38.3
Lot	-
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	ก้อนหิน หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	ก้อนหิน
Location	12.740957,100.840031

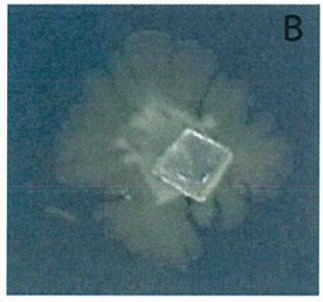
Characteristics

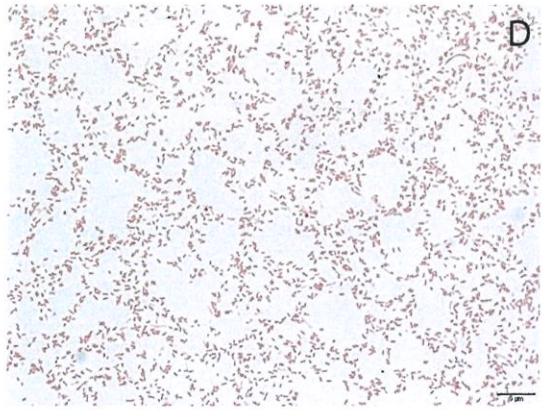
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

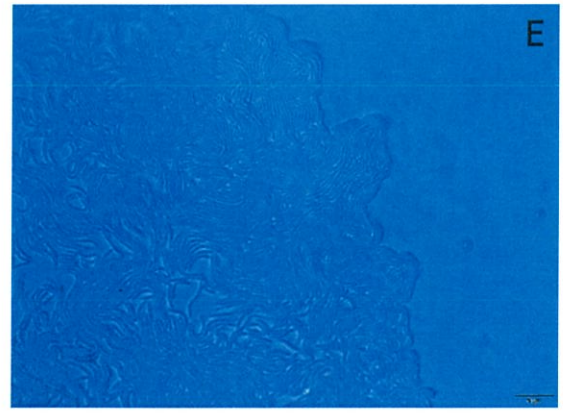


รูปที่ 4.52 แสดงลักษณะของ S38.3 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X









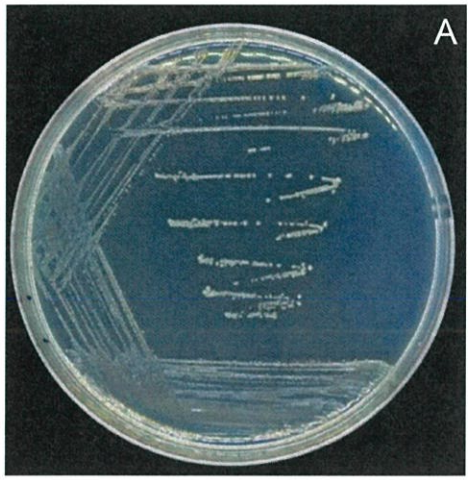
Taxonomy

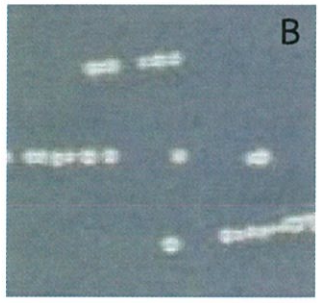
Original code	S40.1
Lot	-
Scientific name	*Vibrio azureus*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031

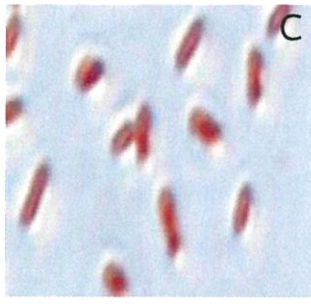
Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.53 แสดงลักษณะของ S40.1 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





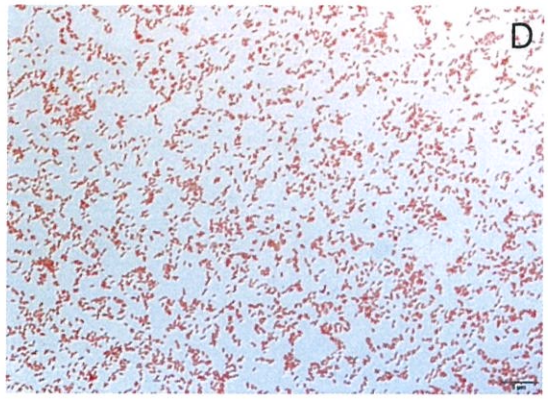


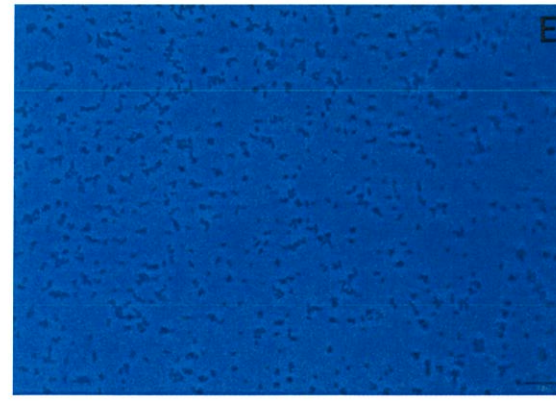
Taxonomy

Original code	S40.3
Lot	-
Scientific name	*Ruegeria* sp.
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	เปลือกหอย หาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
Source	เปลือกหอย
Location	12.740957,100.840031

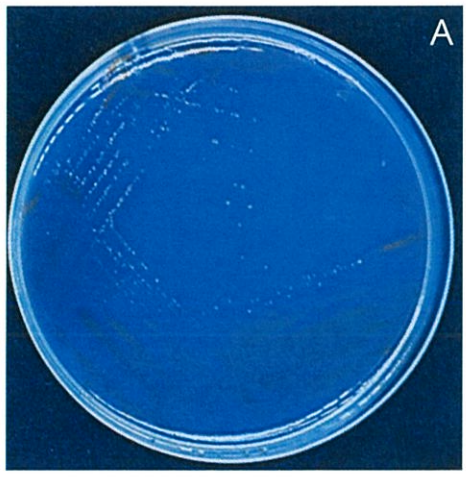
Characteristics

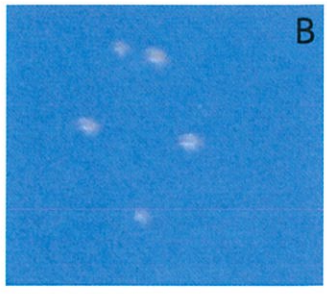
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	1-2 ไมโครเมตร
Color	yellow

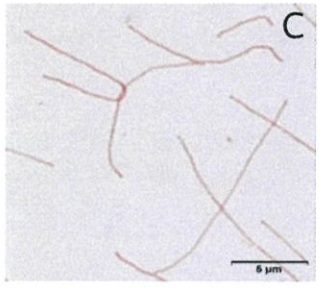




รูปที่ 4.54 แสดงลักษณะของ S40.3 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X







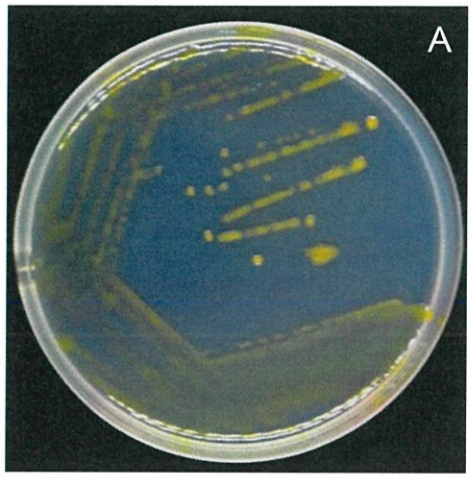
Taxonomy

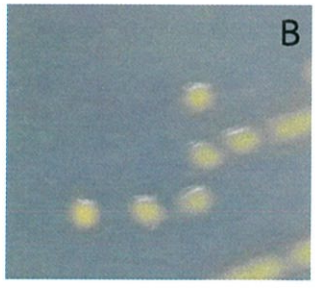
Original code	TISTR 1719 9 JAN 2009
Lot	9 JAN 2009
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	หลอดเก็บเชื้อ
Source	หลอดเก็บเชื้อ
Location	-

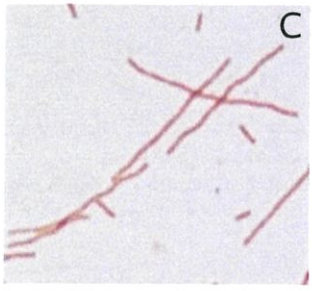
Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	20 ไมโครเมตร
Color	Yellow

รูปที่ 4.55 แสดงลักษณะของ TISTR 1719 9 JAN 2009 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





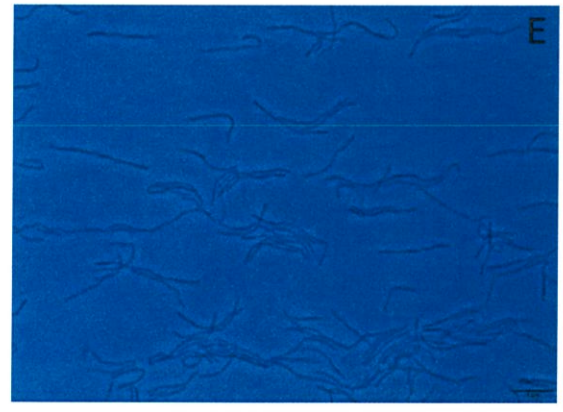


Taxonomy

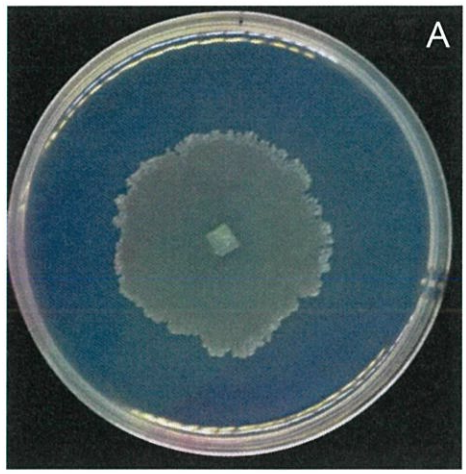
Original code	TISTR 1726 5 SEP 2006
Lot	5 SEP 2006
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	หลอดเก็บเชื้อ
Source	หลอดเก็บเชื้อ
Location	-

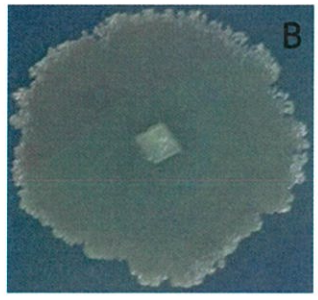
Characteristics

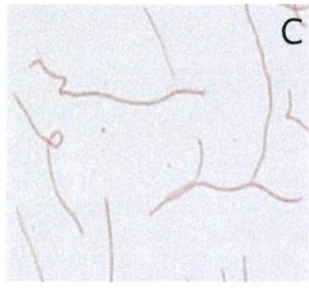
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	entire
Size	15 ไมโครเมตร
Color	Yellow



รูปที่ 4.56 แสดงลักษณะของ TISTR 1726 5 SEP 2006 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X







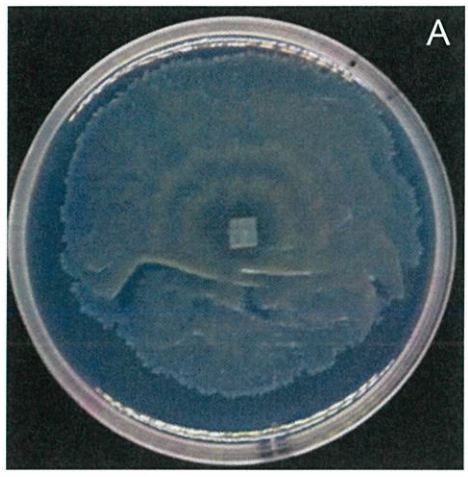
Taxonomy

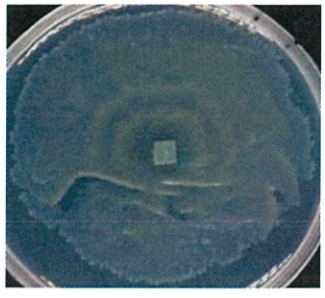
Original code	TISTR 1736 26 SEP 2006
Lot	26 SEP 2006
Scientific name	*Rapidithrix thilandica*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	หลอดเก็บเชื้อ
Source	หลอดเก็บเชื้อ
Location	-

Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	15 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.57 แสดงลักษณะของ TISTR 1736 26 SEP 2006 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





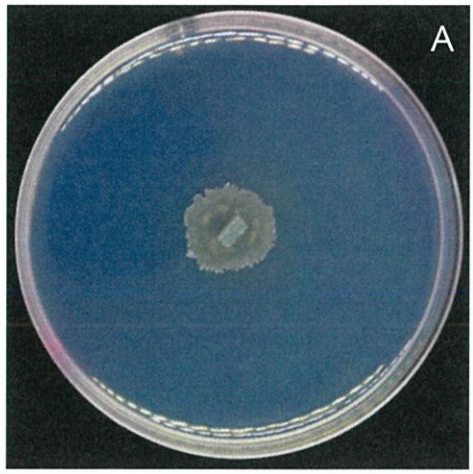
Taxonomy

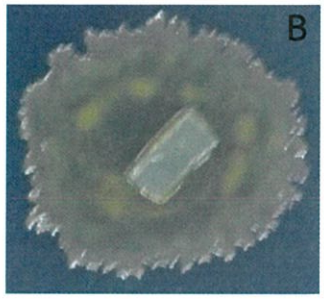
Original code	TISTR 1741 26 SEP 2006
Lot	26 SEP 2006
Scientific name	*Rapidithrix thilandica*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	หลอดเก็บเชื้อ
Source	หลอดเก็บเชื้อ
Location	-

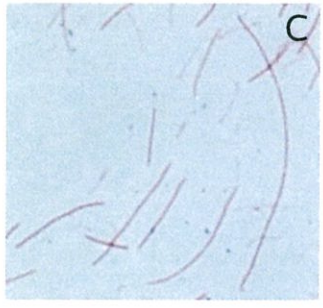
Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	15 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.58 แสดงลักษณะของ TISTR 1741 26 SEP 2006 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





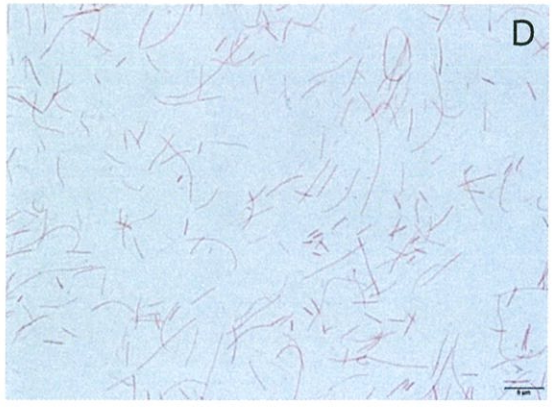


Taxonomy

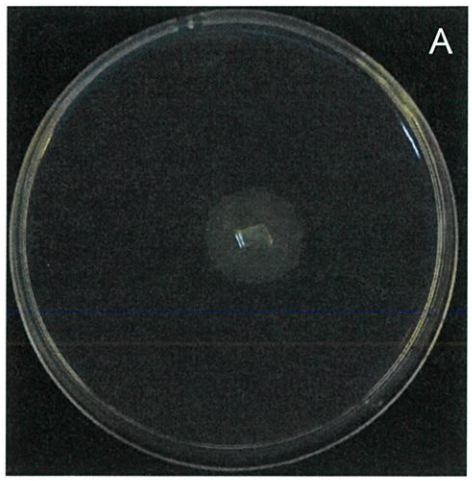
Original code	TISTR 1750 26 SEP 2006
Lot	26 SEP 2006
Scientific name	*Rapidithrix thilandica*
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	หลอดเก็บเชื้อ
Source	หลอดเก็บเชื้อ
Location	-

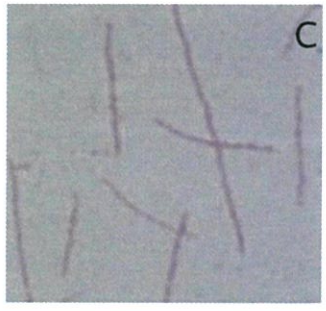
Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	15 ไมโครเมตร
Color	white



รูปที่ 4.59 แสดงลักษณะของ TISTR 1750 26 SEP 2006 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X



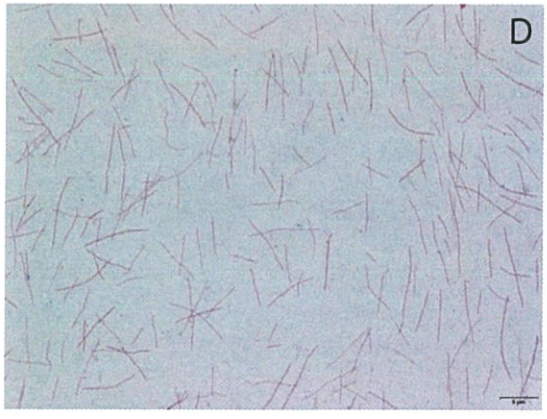


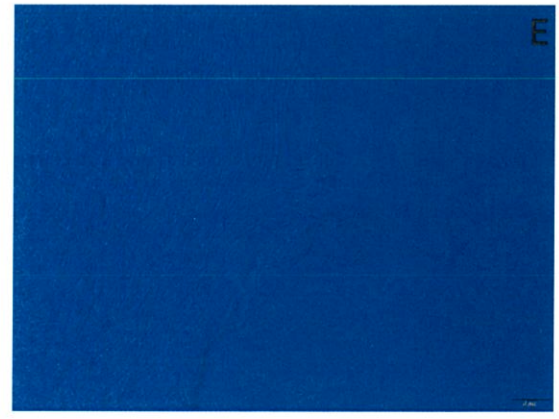
Taxonomy

Original code	TISTR 1760 10 JUN 2007
Lot	10 JUN 2007
Scientific name	*Rapidithrix* sp. TISTR 1768
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	หลอดเก็บเชื้อ
Source	หลอดเก็บเชื้อ
Location	-

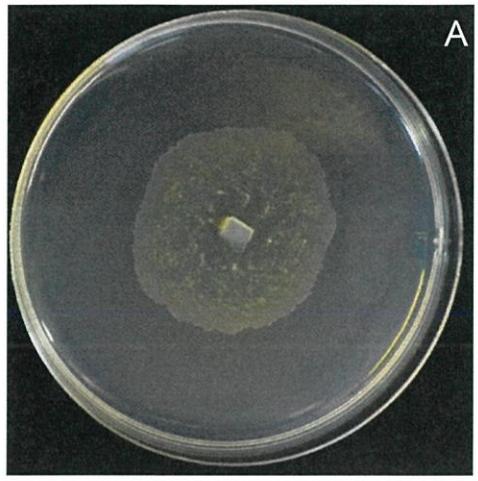
Characteristics

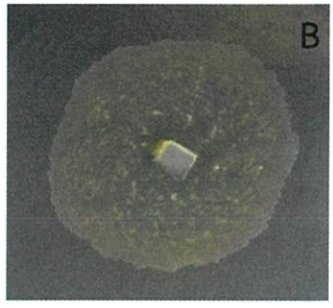
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	12 ไมโครเมตร
Color	white





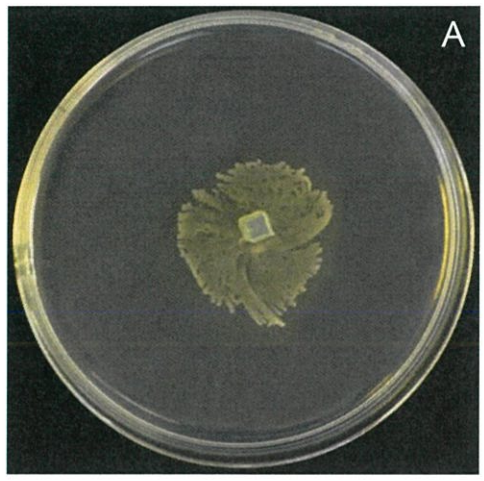
รูปที่ 4.60 แสดงลักษณะของ TISTR 1760 10 JUN 2007 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X

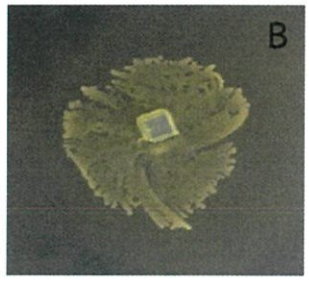




Taxonomy	
Original code	TISTR 1763 12 JUN 2007
Lot	12 JUN 2007
Scientific name	*Rapidithrix* sp. TISTR 1768
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	หลอดเก็บเชื้อ
Source	หลอดเก็บเชื้อ
Location	-
Characteristics	
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	15 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.61 แสดงลักษณะของ TISTR 1763 12 JUN 2007 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





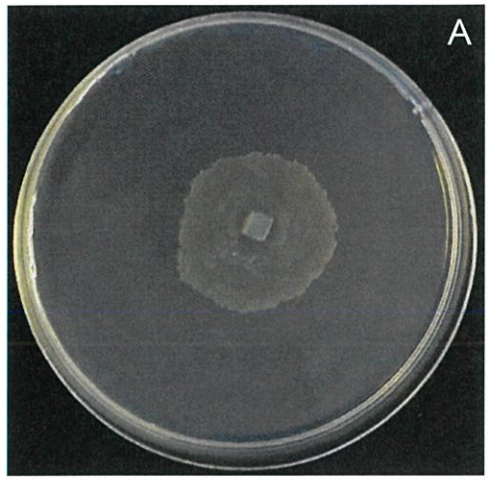
Taxonomy

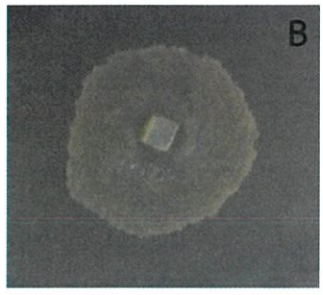
Original code	TISTR 1763 28 NOV 2007
Lot	28 NOV 2007
Scientific name	*Rapidithrix* sp. TISTR 1768
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	หลอดเก็บเชื้อ
Source	หลอดเก็บเชื้อ
Location	-

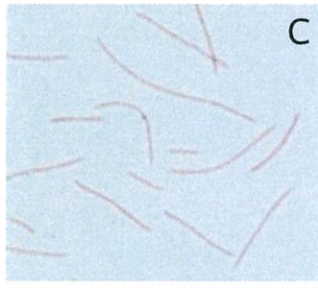
Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	15 ไมโครเมตร
Color	yellow

รูปที่ 4.62 แสดงลักษณะของ TISTR 1763 28 NOV 2007 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





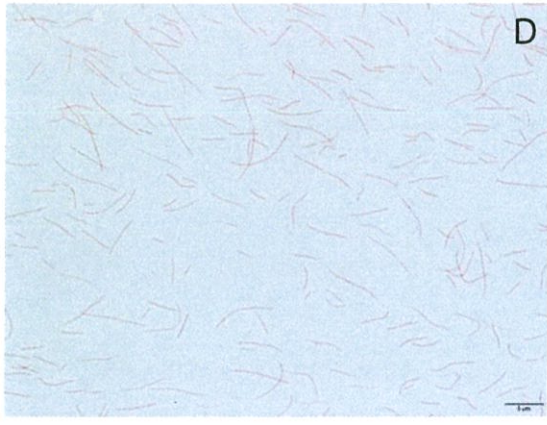


Taxonomy

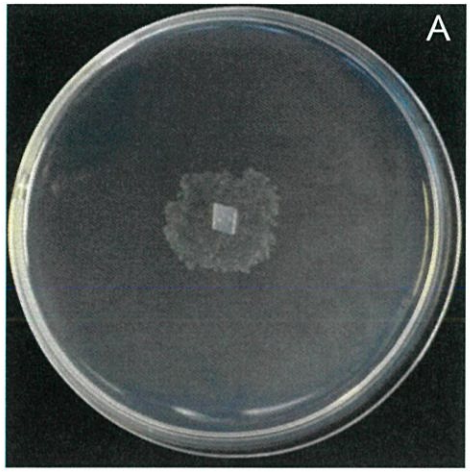
Original code	TISTR 1764 28 NOV 2007
Lot	28 NOV 2007
Scientific name	*Rapidithrix* sp. TISTR 1768
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	หลอดเก็บเชื้อ
Source	หลอดเก็บเชื้อ
Location	-

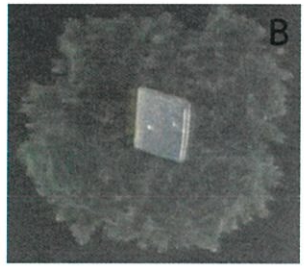
Characteristics

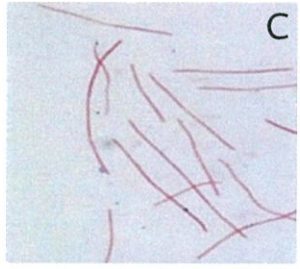
Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	12 ไมโครเมตร
Color	white



รูปที่ 4.63 แสดงลักษณะของ TISTR 1764 28 NOV 2007 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X







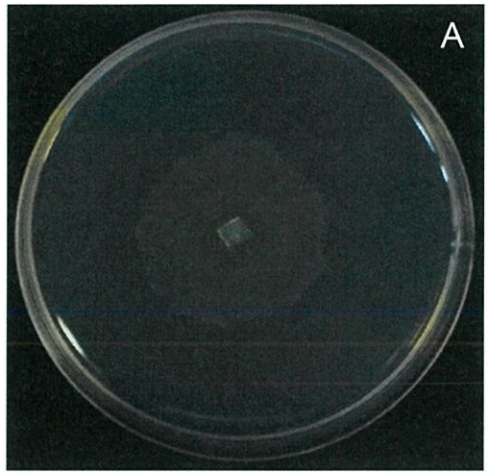
Taxonomy

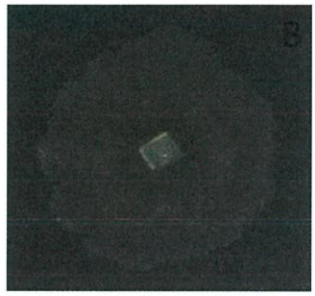
Original code	TISTR 1769 13 JUN 2007
Lot	13 JUN 2007
Scientific name	*Rapidithrix* sp. TISTR 1768
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	หลอดเก็บเชื้อ
Source	หลอดเก็บเชื้อ
Location	-

Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	15 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.64 แสดงลักษณะของ TISTR 1769 13 JUN 2007 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X





Taxonomy

Original code	TISTR 1770 3 APR 2007
Lot	3 APR 2007
Scientific name	re-sequence
Depositor	Chatrudee Suwannachart
Type	Bacteria
Growth Temp	30 °C
Medium	SAP2
Receive as	MIRCEN isolated strain
Note	หลอดเก็บเชื้อ
Source	หลอดเก็บเชื้อ
Location	-

Characteristics

Gram strain	Negative
Form	rod
Margin	lobate
Size	7 ไมโครเมตร
Color	white

รูปที่ 4.65 แสดงลักษณะของ TISTR 1770 3 APR 2007 A, B : ลักษณะบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง C, D : การติดสีแดง แกรมลบ รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้การส่องเฟสที่กำลังขยาย 100X

4.2 ผลการศึกษาคุณลักษณะทางพันธุกรรม (Genotypic characterization)

หลังจากทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเลสแล้วจะนำไปหาลำดับเบสและบางส่วนนำไปเชื่อมต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะเพื่อถ่ายเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียและสกัดพลาสมิดแล้วส่งหาลาดับเบส เมื่อได้ผลการหาลำดับเบสนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ EZ TAXON

4.2.1 ผลการหาลำดับเบสแล้วไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ EZ TAXON

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลค่าความคล้ายคลึงเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล EZ TAXON และ NCBI

ลำดับ	รหัส	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ EZ TAXON	ค่าความคล้ายคลึง (%)	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ NCBI	ค่าความคล้ายคลึง (%)	ความยาวเบส (bp)
1	S1.1	*Vibrio azureus*	99.86	*Vibrio azureus*	99	1393
2	S2.1	*Vibrio alginolyticus*	99.49	*Vibrio alginolyticus*	99	1388
3	S2.2	*Vibrio neocaledonicus*	99.64	*Vibrio alginolyticus*	99	1395
4	S2.3	re-sequence		re-sequence		
5	S2.4	*Nesiotobacter exalbescens*	99.92	*Nesiotobacter exalbescens*	99	1303

หมายเหตุ : re-sequence คือ การได้ลำดับเบสมาไม่ดี เมื่อนำลำดับเบสไปวิเคราะห์ข้อมูลทำให้ได้เปอร์เซนต์ออกมาต่ำซึ่งอาจเกิดจากชนิดของเชื้อหรือเกิดการปนเปื้อน ต้องนำไปศึกษาใหม่อีกครั้ง

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลค่าความคล้ายคลึงเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ EZ TAXON **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ EZ TAXON	ค่าความคล้ายคลึง (%)	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ NCBI	ค่าความคล้ายคลึง (%)	ความยาวเบส (bp)
6	S3.1	re-sequence		re-sequence		
7	S3.2	*Vibrio natriegens*	92.78	*Vibrio natriegens*	99	1403
8	S3.3	re-sequence		re-sequence		
9	S6.1	re-sequence		re-sequence		
10	S6.2	*Vibrio alginolyticus*	99.64	*Vibrio natriegens* *Vibrio alginolyticus*		1384
11	S12.1	re-sequence		re-sequence		
12	S13.1	re-sequence		re-sequence		
13	S13.3	re-sequence		re-sequence		
14	S14.1	*Vibrio neocaledonicus*	99.50	*Vibrio alginolyticus*	99	1389

หมายเหตุ : re-sequence คือ การได้ลำดับเบสมาไม่ดี เมื่อนำลำดับเบสไปวิเคราะห์ข้อมูลทำให้ได้เปอร์เซนต์ออกมาต่ำซึ่งอาจเกิดจากชนิดของเชื้อหรือเกิดการปนเปื้อน ต้องนำไปศึกษาใหม่อีกครั้ง

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลค่าความคล้ายคลึงเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ EZ TAXON **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ EZ TAXON	ค่าความคล้ายคลึง (%)	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ NCBI	ค่าความคล้ายคลึง (%)	ความยาวเบส (bp)
15	S15.1	*Vibrio neocaledonicus*	99.93	*Vibrio parahaemolyticus*	100	1395
16	S15.4	*Vibrio alginolyticus* *Vibrio antiquaries* *Vibrio neocaledonicus*	98.68	*Vibrio alginolyticus*	99	1366
17	S16.2	*Vibrio neocaledonicus*	99.64	*Vibrio alginolyticus*	99	1386
18	S17.2	*Vibrio neocaledonicus*	99.71	*Vibrio alginolyticus*	99	1399
19	S17.3	re-sequence		re-sequence		
20	S17.7	re-sequence		re-sequence		

หมายเหตุ : re-sequence คือ การได้ลำดับเบสมาไม่ดี เมื่อนำลำดับเบสไปวิเคราะห์ข้อมูลทำให้ได้เปอร์เซนต์ออกมาต่ำซึ่งอาจเกิดจากชนิดของเชื้อหรือเกิดการปนเปื้อน ต้องนำไปศึกษาใหม่อีกครั้ง

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลค่าความคล้ายคลึงเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ EZ TAXON **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ EZ TAXON	ค่าความคล้ายคลึง (%)	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ NCBI	ค่าความคล้ายคลึง (%)	ความยาวเบส (bp)
21	S17.8	*Idiomarina sediminum*	99.49	*Pseudoalteromonas piscicida*	99	1373
22	S17.10	*Vibrio neocaledonicus*	99.57	*Vibrio* sp.	99	1409
23	S17.11	*Vibrio neocaledonicus*	99.64	*Vibrio alginolyticus*	99	1399
24	S17.13	*Idiomarina sediminum*	99.49	*Pseudidiomarina sediminum (Idiomarina sediminum* คะแนนน้อยกว่า)	99	1370
25	S18.1	*Vibrio neocaledonicus*	99.93	*Vibrio alginolyticus*	100	1347

หมายเหตุ : re-sequence คือ การได้ลำดับเบสมาไม่ดี เมื่อนำลำดับเบสไปวิเคราะห์ข้อมูลทำให้ได้เปอร์เซนต์ออกมาต่ำซึ่งอาจเกิดจากชนิดของเชื้อหรือเกิดการปนเปื้อน ต้องนำไปศึกษาใหม่อีกครั้ง

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลค่าความคล้ายคลึงเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ EZ TAXON **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ EZ TAXON	ค่าความคล้ายคลึง (%)	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ NCBI	ค่าความคล้ายคลึง (%)	ความยาวเบส (bp)
26	S18.2	*Vibrio neocaledonicus*	99.71	*Vibrio alginolyticus*	99	1393
27	S18.4	re-sequence		re-sequence		
28	S20.1	re-sequence		re-sequence		
29	S21.1	*Brevibacterium sediminis*	99.56	*Brevibacterium* sp. *Brevibacterium sediminis*	99	1368
30	S22.1	*Ruegeria mobilis*	99.62	*Ruegeria* sp.	99	1306
31	S24.1	*Vibrio* sp.	<80	*Vibrio* sp.	<80	ลำดับเบสalignกันไม่ดี

หมายเหตุ : re-sequence คือ การได้ลำดับเบสมาไม่ดี เมื่อนำลำดับเบสไปวิเคราะห์ข้อมูลทำให้ได้เปอร์เซนต์ออกมาต่ำซึ่งอาจเกิดจากชนิดของเชื้อหรือเกิดการปนเปื้อน ต้องนำไปศึกษาใหม่อีกครั้ง

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลค่าความคล้ายคลึงเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ EZ TAXON **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ EZ TAXON	ค่าความคล้ายคลึง (%)	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ NCBI	ค่าความคล้ายคลึง (%)	ความยาวเบส (bp)
32	S24.3	*Vibrio neocaledonicus*	99.86	*Vibrio alginolyticus*	99	1395
33	S24.4	*Vibrio alginolyticus*	99.57	*Vibrio alginolyticus*	99	1384
34	S25.3	*Pseudoalteromonas arabiensis*	100	*Pseudoalteromonas* sp.	100	1385
35	S25.4	*Vibrio alginolyticus*	99.71	*Vibrio alginolyticus*	99	1364
36	S25.5	re-sequence		re-sequence		
37	S26.2	*Vibrio neocaledonicus*	99.85	*Vibrio natriegens* *Vibrio alginolyticus* *Vibrio neocaledonicus*	99	1303

หมายเหตุ : re-sequence คือ การได้ลำดับเบสมาไม่ดี เมื่อนำลำดับเบสไปวิเคราะห์ข้อมูลทำให้ได้เปอร์เซนต์ออกมาต่ำซึ่งอาจเกิดจากชนิดของเชื้อหรือเกิดการปนเปื้อน ต้องนำไปศึกษาใหม่อีกครั้ง

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลค่าความคล้ายคลึงเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ EZ TAXON **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ EZ TAXON	ค่าความคล้ายคลึง (%)	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ NCBI	ค่าความคล้ายคลึง (%)	ความยาวเบส (bp)
38	S28.1	re-sequence		re-sequence		
39	S28.3	*Idiomarina sediminum*	99.57	*Idiomarina sediminum*	100	1391
40	S29.4	*Brevibacterium sediminis* *Brevibacterium epidermidis*	99.56 99.27	*Brevibacterium epidermidis*	99	1378
41	S31.1	re-sequence		re-sequence		

หมายเหตุ : re-sequence คือ การได้ลำดับเบสมาไม่ดี เมื่อนำลำดับเบสไปวิเคราะห์ข้อมูลทำให้ได้เปอร์เซนต์ออกมาต่ำซึ่งอาจเกิดจากชนิดของเชื้อหรือเกิดการปนเปื้อน ต้องนำไปศึกษาใหม่อีกครั้ง

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลค่าความคล้ายคลึงเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ EZ TAXON **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ EZ TAXON	ค่าความคล้ายคลึง (%)	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ NCBI	ค่าความคล้ายคลึง (%)	ความยาวเบส (bp)
42	S31.2	*Vibrio neocaledonicus*	99.93	*Vibrio alginolyticus*	100	1350
43	S31.6	*Vibrio alginolyticus*	99.78	*Vibrio alginolyticus*	99	1382
44	S32.1	*Nesiotobacter exalbescens*	99.92	*Nesiotobacter exalbescens*	99	1319
45	S33.3	*Tenacibaculum mesophilum*	88.08	*Tenacibaculum mesophilum*	96	ลำดับเบสalignกันไม่ดี
46	S33.4	re-sequence		re-sequence		
47	S34.1	*Brevibacterium casei*	99.15	*Brevibacterium* sp. *Brevibacterium casei*	99	1302

หมายเหตุ : re-sequence คือ การได้ลำดับเบสมาไม่ดี เมื่อนำลำดับเบสไปวิเคราะห์ข้อมูลทำให้ได้เปอร์เซนต์ออกมาต่ำซึ่งอาจเกิดจากชนิดของเชื้อหรือเกิดการปนเปื้อน ต้องนำไปศึกษาใหม่อีกครั้ง

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลค่าความคล้ายคลึงเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ EZ TAXON **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ EZ TAXON	ค่าความคล้ายคลึง (%)	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ NCBI	ค่าความคล้ายคลึง (%)	ความยาวเบส (bp)
48	S37.6	*Nesiotobacter exalbescens*	99.92	*Nesiotobacter* sp. *Nesiotobacter exalbescens*	100 99	1312
49	S37.9	*Pseudoaltero monas arabiensis*	99.28	*Pseudoaltero monas* sp.	99	1382
50	S37.10	*Vibrio neocaledonicus*	99.86	*Vibrio alginolyticus*	100	1396
51	S38.1	re-sequence		re-sequence		
52	S38.3	re-sequence		re-sequence		
53	S40.1	*Vibrio azureus*	99.71	*Vibrio azureus*	99	1371
54	S40.3	*Ruegeria mobilis*	99.92	*Ruegeria* sp.	99	1304

หมายเหตุ : re-sequence คือ การได้ลำดับเบสมาไม่ดี เมื่อนำลำดับเบสไปวิเคราะห์ข้อมูลทำให้ได้เปอร์เซนต์ออกมาต่ำซึ่งอาจเกิดจากชนิดของเชื้อหรือเกิดการปนเปื้อน ต้องนำไปศึกษาใหม่อีกครั้ง

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลค่าความคล้ายคลึงเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ EZ TAXON **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ EZ TAXON	ค่าความคล้ายคลึง (%)	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ NCBI	ค่าความคล้ายคลึง (%)	ความยาวเบส (bp)
55	TISTR 1719 9 JAN 2009	re-sequence		re-sequence		
56	TISTR 1726 5 SEP 2006	re-sequence		re-sequence		
57	TISTR 1736 26 SEP 2006	*Rapidithrix thailandica* TISTR 1750	99.56	*Rapidithrix* sp. strain s68 *Rapidithrix thailandica* *Rapidithrix thailandica* *Rapidithrix* sp. TISTR 1768	99	1380

หมายเหตุ : re-sequence คือ การได้ลำดับเบสมาไม่ดี เมื่อนำลำดับเบสไปวิเคราะห์ข้อมูลทำให้ได้เปอร์เซนต์ออกมาต่ำซึ่งอาจเกิดจากชนิดของเชื้อหรือเกิดการปนเปื้อน ต้องนำไปศึกษาใหม่อีกครั้ง

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลค่าความคล้ายคลึงเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ EZ TAXON **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ EZ TAXON	ค่าความคล้ายคลึง (%)	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ NCBI	ค่าความคล้ายคลึง (%)	ความยาวเบส (bp)
58	TISTR 1741 26 SEP 2006	*Rapidithrix thailandica* TISTR 1750	99.49	*Rapidithrix* sp. strain s68 *Rapidithrix thailandica* *Rapidithrix thailandica* *Rapidithrix* sp. TISTR 1768	99	1380
59	TISTR 1750 26 SEP 2006	*Rapidithrix thailandica* TISTR 1750	99.46	*Rapidithrix* sp. strain s68 *Rapidithrix thailandica* *Rapidithrix thailandica* *Rapidithrix* sp. TISTR 1768	99	1307

หมายเหตุ : re-sequence คือ การได้ลำดับเบสมาไม่ดี เมื่อนำลำดับเบสไปวิเคราะห์ข้อมูลทำให้ได้เปอร์เซนต์ออกมาต่ำซึ่งอาจเกิดจากชนิดของเชื้อหรือเกิดการปนเปื้อน ต้องนำไปศึกษาใหม่อีกครั้ง

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลค่าความคล้ายคลึงเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ EZ TAXON **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ EZ TAXON	ค่าความคล้ายคลึง (%)	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ NCBI	ค่าความคล้ายคลึง (%)	ความยาวเบส (bp)
60	TISTR 1760 10 JAN 2007	*Rapidithrix Thailandica* TISTR 1750	99.63	*Rapidithrix thailandica* *Rapidithrix* sp. TISTR 1768	99	1367
61	TISTR 1763 12 JUN 2007	*Rapidithrix thailandica* TISTR 1750	99.14	*Rapidithrix thailandica* *Rapidithrix* sp. TISTR 1768	99	1399
62	TISTR 1763 28 NOV 2007	*Rapidithrix thailandica* TISTR 1750	99.64	*Rapidithrix thailandica* *Rapidithrix* sp. TISTR 1768	99	1385
63	TISTR 1764 28 NOV 2007	*Rapidithrix thailandica* TISTR 1750	97.47	*Rapidithrix* sp. TISTR 1768	97	1409
64	TISTR 1769 13 JUN 2007	*Rapidithrix thailandica* TISTR 1750	99.71	*Rapidithrix thailandica* *Rapidithrix* sp. TISTR 1768	99	1382

หมายเหตุ : re-sequence คือ การได้ลำดับเบสมาไม่ดี เมื่อนำลำดับเบสไปวิเคราะห์ข้อมูลทำให้ได้เปอร์เซนต์ออกมาต่ำซึ่งอาจเกิดจากชนิดของเชื้อหรือเกิดการปนเปื้อน ต้องนำไปศึกษาใหม่อีกครั้ง

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลค่าความคล้ายคลึงเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ EZ TAXON **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ EZ TAXON	ค่าความคล้ายคลึง (%)	เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ NCBI	ค่าความคล้ายคลึง (%)	ความยาวเบส (bp)
65	TISTR 1770 3 APR 2007	re-sequence		re-sequence		

หมายเหตุ : re-sequence คือ การได้ลำดับเบสมาไม่ดี เมื่อนำลำดับเบสไปวิเคราะห์ข้อมูลทำให้ได้เปอร์เซนต์ออกมาต่ำซึ่งอาจเกิดจากชนิดของเชื้อหรือเกิดการปนเปื้อน ต้องนำไปศึกษาใหม่อีกครั้ง

จากผลการหาลำดับเบสแล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Ez Taxon ซึ่งเป็นฐานข้อมูลของประเทศเกาหลีใต้และฐานข้อมูล NCBI ที่เป็นฐานข้อมูลสากล พบว่าค่าความคล้ายคลึงอยู่ที่ 99-100% ซึ่งเป็นค่าที่มีความน่าเชื่อถือว่าเป็นเชื้อชนิดนั้น แต่ถ้ามีค่าความคล้ายคลึงน้อยกว่า 96% เชื้อที่ได้อาจจะเป็น new species ซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไป **ที่มา:** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ (20 เมษายน 2561) และ https://www.ezbiocloud.net/ (20 เมษายน 2561)

4.3 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมี

4.3.1 ผลการจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้เครื่อง Automate Identification

การทดสอบเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยเครื่อง Automate Identification ทำการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงสีของสารชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในหลุมทดสอบแต่ละหลุมเทียบกับค่าเริ่มต้นเมื่อเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตและใช้สารอาหารภายในหลุมทดสอบ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายชีวเคมี เครื่องจะทำการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในหน่วยของค่าการส่องผ่านของแสงที่เปลี่ยนไป ทำการทดสอบเพื่อดูการใช้สารอาหารของเชื้อแต่ละตัว ดัง**ตารางที่ 4.2, ตารางที่ 4.3, ตารางที่ 4.4, ตารางที่ 4.5** และ**ตารางที่ 4.6**

ตารางที่ 4.2 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ S2.4, S17.8, S17.13, S21.1 และ S29.4 ด้วยเครื่อง Automate Identification

Well	Test	รหัส				
		S2.4	S17.8	S17.13	S21.1	S29.4
1	Control					
2	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-	+	+	+	+
3	ADONITOL	-	-	-	-	-
4	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	(+)	-	+	-
5	L-ARABITOL	-	-	-	-	-
7	D-CELLOBIOSE	-	-	-	-	-
9	BETA-GALACTOSIDASE	-	-	+	-	-
10	H_2S PRODUCTION	-	-	-	-	-
11	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	+	+	-	+	-
12	Glutamyl Arylamidase pNA	-	-	+	-	-
13	D-GLUCOSE	+	-	-	+	-
14	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	-	-	-	-	-
15	FERMENTATION/ GLUCOSE	-	-	-	+	-
17	BETA-GLUCOSIDASE	-	-	-	-	-
18	D-MOLTOSE	-	-	-	+	-
19	D-MANNITOL	-	-	-	-	-
20	D-MANNOSE	-	-	-	-	-
21	BETA-XYLOSIDASE	-	-	-	-	-
22	BETA-Alanine arylamidase pNA	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.2 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ S2.4, S17.8, S17.13, S21.1 และ S29.4 ด้วยเครื่อง Automate Identification **(ต่อ)**

Well	Test	รหัส				
		S2.4	S17.8	S17.13	S21.1	S29.4
23	L-Proline ARYLAMIDASE	+	-	+	+	-
26	LIPASE	-	+	+	-	+
27	PALATINOSE	-	-	-	-	-
29	Tyrosine ARYLAMIDASE	+	+	+	+	-
31	UREASE	+	-	-	+	+
32	D-SORBITOL	-	-	-	-	-
33	SACCHAROSE/SUCROSE	-	-	-	+	-
34	D-TAGATOSE	-	-	-	-	-
35	D-TREHALOSE	-	-	-	+	-
36	CITRATE (SODIUM)	-	-	-	-	-
37	MALONATE	-	-	-	-	-
39	5-KETO-D-GLUCONATE	-	-	-	-	-
40	L-LACTATE alkalinization	-	-	-	-	+
41	ALPHA-GLUCOSIDASE	+	-	-	-	-
42	SUCCINATE alkalinization	-	-	-	-	-
43	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-	-	-	-	-
44	ALPHA-GALACTOSIDASE	-	-	-	-	-
45	PHOSPHATASE	-	+	+	+	-
46	Glycine ARYLAMIDASE	-	-	-	-	+
47	ORNITHINE DECARBOXYLASE	-	-	-	+	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.2 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ S2.4, S17.8, S17.13, S21.1 และ S29.4 ด้วยเครื่อง Automate Identification **(ต่อ)**

Well	Test	รหัส				
		S2.4	S17.8	S17.13	S21.1	S29.4
48	LYSINE DECARBOXYLASE	-	-	-	-	-
53	L-HISTIDINE	-	-	-	-	-
56	COURMARATE	-	-	-	+	-
57	BETA-GLUCURONIDASE	-	-	-	-	-
58	O/129 RESISTANCE	-	-	-	-	-
59	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	-	-	+	+	-
61	L-MALATE assimilation	-	-	-	-	+
62	ELLMAN	+	-	-	-	+
64	L-LACTATE assimilation	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.3 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ S32.1, S33.3, S34.1 และ S37.6 ด้วยเครื่อง Automate Identification

Well	Test	รหัส			
		S32.1	S33.3	S34.1	S37.6
1	Control				
2	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-	+	+	-
3	ADONITOL	-	-	-	-
4	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	-	-	-
5	L-ARABITOL	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.3 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ S32.1, S33.3, S34.1 และ S37.6 ด้วยเครื่อง Automate Identification **(ต่อ)**

Well	Test	รหัส			
		S32.1	S33.3	S34.1	S37.6
7	D-CELLOBIOSE	-	-	-	-
9	BETA-GALACTOSIDASE	-	-	-	-
10	H_2S PRODUCTION	-	-	-	-
11	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-	-	-	(+)
12	Glutamyl Arylamidase pNA	-	-	-	-
13	D-GLUCOSE	-	-	-	+
14	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	-	-	-	-
15	FERMENTATION/ GLUCOSE	-	-	-	-
17	BETA-GLUCOSIDASE	-	-	-	-
18	D-MOLTOSE	-	-	-	-
19	D-MANNITOL	-	-	-	-
20	D-MANNOSE	-	-	-	-
21	BETA-XYLOSIDASE	-	-	-	-
22	BETA-Alanine arylamidase pNA	-	-	-	-
23	L-Proline ARYLAMIDASE	+	-	+	+
26	LIPASE	-	+	-	-
27	PALATINOSE	-	-	-	-
29	Tyrosine ARYLAMIDASE	-	+	+	+
31	UREASE	-	-	-	-
32	D-SORBITOL	-	-	-	-
33	SACCHAROSE/SUCROSE	-	-	-	-
34	D-TAGATOSE	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.3 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ S32.1, S33.3, S34.1 และ S37.6 ด้วยเครื่อง Automate Identification **(ต่อ)**

Well	Test	รหัส			
		S32.1	S33.3	S34.1	S37.6
35	D-TREHALOSE	-	-	-	-
36	CITRATE (SODIUM)	-	-	-	-
37	MALONATE	-	-	-	-
39	5-KETO-D-GLUCONATE	-	-	-	-
40	L-LACTATE alkalinization	-	-	+	-
41	ALPHA-GLUCOSIDASE	(-)	-	+	+
42	SUCCINATE alkalinization	-	-	-	-
43	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-	-	-	-
44	ALPHA-GALACTOSIDASE	-	-	-	-
45	PHOSPHATASE	-	+	-	-
46	Glycine ARYLAMIDASE	-	-	-	-
47	ORNITHINE DECARBOXYLASE	-	-	-	-
48	LYSINE DECARBOXYLASE	-	-	-	-
53	L-HISTIDINE	-	-	-	-
56	COURMARATE	-	-	-	+
57	BETA-GLUCURONIDASE	-	-	-	-
58	O/129 RESISTANCE	-	-	-	-
59	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	-	-	-	-
61	L-MALATE assimilation	-	-	-	-
62	ELLMAN	+	-	-	+
64	L-LACTATE assimilation	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.4 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736 และ TISTR 1741 ด้วยเครื่อง Automate Identification

Well	Test	TISTR No.			
		1719 9 JAN 2009	1726 5 SEP 2006	1736 26 SEP 2006	1741 26 SEP 2006
1	Control				
2	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	+	+	+	+
3	ADONITOL	-	-	-	-
4	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	-	-	-
5	L-ARABITOL	-	-	-	-
7	D-CELLOBIOSE	-	-	-	-
9	BETA-GALACTOSIDASE	-	-	+	+
10	H_2S PRODUCTION	-	-	-	-
11	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-	-	+	+
12	Glutamyl Arylamidase pNA	+	+	+	+
13	D-GLUCOSE	-	-	-	-
14	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	-	-	-	-
15	FERMENTATION/ GLUCOSE	-	-	-	-
17	BETA-GLUCOSIDASE	-	-	+	+
18	D-MOLTOSE	-	-	-	-
19	D-MANNITOL	-	-	-	-
20	D-MANNOSE	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.4 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736 และ TISTR 1741 ด้วยเครื่อง Automate Identification **(ต่อ)**

Well	Test	TISTR No.			
		1719 9 JAN 2009	1726 5 SEP 2006	1736 26 SEP 2006	1741 26 SEP 2006
21	BETA-XYLOSIDASE	-	-	+	-
22	BETA-Alanine arylamidase pNA	-	-	-	-
23	L-Proline ARYLAMIDASE	-	+	+	+
26	LIPASE	-	-	-	-
27	PALATINOSE	-	-	-	-
29	Tyrosine ARYLAMIDASE	+	+	+	+
31	UREASE	-	-	-	-
32	D-SORBITOL	-	-	-	-
33	SACCHAROSE/SUCROSE	-	-	-	-
34	D-TAGATOSE	-	-	-	-
35	D-TREHALOSE	-	-	-	-
36	CITRATE (SODIUM)	-	-	-	-
37	MALONATE	-	-	-	-
39	5-KETO-D-GLUCONATE	-	-	-	-
40	L-LACTATE alkalinization	-	-	-	-
41	ALPHA-GLUCOSIDASE	-	-	+	+
42	SUCCINATE alkalinization	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.4 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736 และ TISTR 1741 ด้วยเครื่อง Automate Identification **(ต่อ)**

Well	Test	TISTR No.			
		1719 9 JAN 2009	1726 5 SEP 2006	1736 26 SEP 2006	1741 26 SEP 2006
43	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-	-	+	+
44	ALPHA-GALACTOSIDASE	-	-	+	+
45	PHOSPHATASE	-	+	+	+
46	Glycine ARYLAMIDASE	+	-	+	+
47	ORNITHINE DECARBOXYLASE	-	-	-	-
48	LYSINE DECARBOXYLASE	-	-	-	-
53	L-HISTIDINE	-	-	-	-
56	COURMARATE	-	-	-	-
57	BETA-GLUCURONIDASE	-	-	-	-
58	O/129 RESISTANCE	-	-	-	-
59	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	-	+	-	+
61	L-MALATE assimilation	-	-	-	-
62	ELLMAN	-	-	-	-
64	L-LACTATE assimilation	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.5 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763 และ TISTR 1763 ด้วยเครื่อง Automate Identification

Well	Test	TISTR No.			
		1750 26 SEP 2006	1760 10 JAN 2007	1763 12 JUN 2007	1763 28 NOV 2007
1	Control				
2	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	+	+	+	+
3	ADONITOL	-	-	-	-
4	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	-	-	-
5	L-ARABITOL	-	-	-	-
7	D-CELLOBIOSE	-	-	-	-
9	BETA-GALACTOSIDASE	-	+	+	+
10	H_2S PRODUCTION	-	-	-	-
11	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	+	+	+	+
12	Glutamyl Arylamidase pNA	+	+	+	+
13	D-GLUCOSE	-	-	-	-
14	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	-	-	-	-
15	FERMENTATION/ GLUCOSE	-	-	-	-
17	BETA-GLUCOSIDASE	-	+	+	+

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.5 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763 และ TISTR 1763 ด้วยเครื่อง Automate Identification **(ต่อ)**

Well	Test	TISTR No.			
		1750 26 SEP 2006	1760 10 JAN 2007	1763 12 JUN 2007	1763 28 NOV 2007
18	D-MOLTOSE	-	-	-	-
19	D-MANNITOL	-	-	-	-
20	D-MANNOSE	-	-	-	-
21	BETA-XYLOSIDASE	-	-	-	-
22	BETA-Alanine arylamidase pNA	-	-	-	-
23	L-Proline ARYLAMIDASE	-	+	+	+
26	LIPASE	+	-	-	-
27	PALATINOSE	-	-	-	-
29	Tyrosine ARYLAMIDASE	+	+	+	+
31	UREASE	-	-	-	-
32	D-SORBITOL	-	-	-	-
33	SACCHAROSE/SUCROSE	-	-	-	-
34	D-TAGATOSE	-	-	-	-
35	D-TREHALOSE	-	-	-	-
36	CITRATE (SODIUM)	-	-	-	-
37	MALONATE	-	-	-	-
39	5-KETO-D-GLUCONATE	-	-	-	-
40	L-LACTATE alkalinization	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.5 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763 และ TISTR 1763 ด้วยเครื่อง Automate Identification **(ต่อ)**

Well	Test	TISTR No.			
		1750 26 SEP 2006	1760 10 JAN 2007	1763 12 JUN 2007	1763 28 NOV 2007
41	ALPHA-GLUCOSIDASE	-	+	+	(-)
42	SUCCINATE alkalinization	-	-	-	-
43	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	+	+	+	+
44	ALPHA-GALACTOSIDASE	-	(+)	+	+
45	PHOSPHATASE	+	-	+	(-)
46	Glycine ARYLAMIDASE	+	+	+	+
47	ORNITHINE DECARBOXYLASE	-	-	-	-
48	LYSINE DECARBOXYLASE	-	-	-	-
53	L-HISTIDINE	-	-	-	-
56	COURMARATE	-	-	-	-
57	BETA-GLUCURONIDASE	-	-	-	-
58	O/129 RESISTANCE	-	-	-	-
59	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	+	+	+	-
61	L-MALATE assimilation	-	-	-	-
62	ELLMAN	-	-	-	-
64	L-LACTATE assimilation	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.6 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1764, TISTR 1769 และ TISTR 1770 ด้วยเครื่อง Automate Identification

Well	Test	TISTR No.		
		1764 28 NOV 2007	1769 13 JUN 2007	1770 3 APR 2007
1	Control			
2	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	+	+	+
3	ADONITOL	-	-	-
4	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	-	-
5	L-ARABITOL	-	-	-
7	D-CELLOBIOSE	-	-	-
9	BETA-GALACTOSIDASE	-	-	-
10	H_2S PRODUCTION	-	-	-
11	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	+	+	+
12	Glutamyl Arylamidase pNA	+	+	+
13	D-GLUCOSE	-	-	-
14	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	-	-	-
15	FERMENTATION/ GLUCOSE	-	-	-
17	BETA-GLUCOSIDASE	-	-	-
18	D-MOLTOSE	-	+	-
19	D-MANNITOL	-	-	-
20	D-MANNOSE	-	-	-
21	BETA-XYLOSIDASE	-	-	-
22	BETA-Alanine arylamidase pNA	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.6 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1764, TISTR 1769 และ TISTR 1770 ด้วยเครื่อง Automate Identification **(ต่อ)**

Well	Test	TISTR No.		
		1764 28 NOV 2007	1769 13 JUN 2007	1770 3 APR 2007
23	L-Proline ARYLAMIDASE	-	-	+
26	LIPASE	-	-	-
27	PALATINOSE	-	-	-
29	Tyrosine ARYLAMIDASE	+	+	+
31	UREASE	-	-	-
32	D-SORBITOL	-	-	-
33	SACCHAROSE/SUCROSE	-	-	-
34	D-TAGATOSE	-	-	-
35	D-TREHALOSE	-	-	-
36	CITRATE (SODIUM)	-	-	-
37	MALONATE	-	-	-
39	5-KETO-D-GLUCONATE	-	-	-
40	L-LACTATE alkalinization	-	-	-
41	ALPHA-GLUCOSIDASE	-	-	-
42	SUCCINATE alkalinization	-	-	-
43	BETA-N-ACETYL- GLUCOSAMINIDASE	+	+	+
44	ALPHA-GALACTOSIDASE	-	-	-
45	PHOSPHATASE	+	(+)	(-)
46	Glycine ARYLAMIDASE	+	+	+
47	ORNITHINE DECARBOXYLASE	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.6 ผลการจัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1764, TISTR 1769, TISTR 1770 และ TISTR 1776 ด้วยเครื่อง Automate Identification **(ต่อ)**

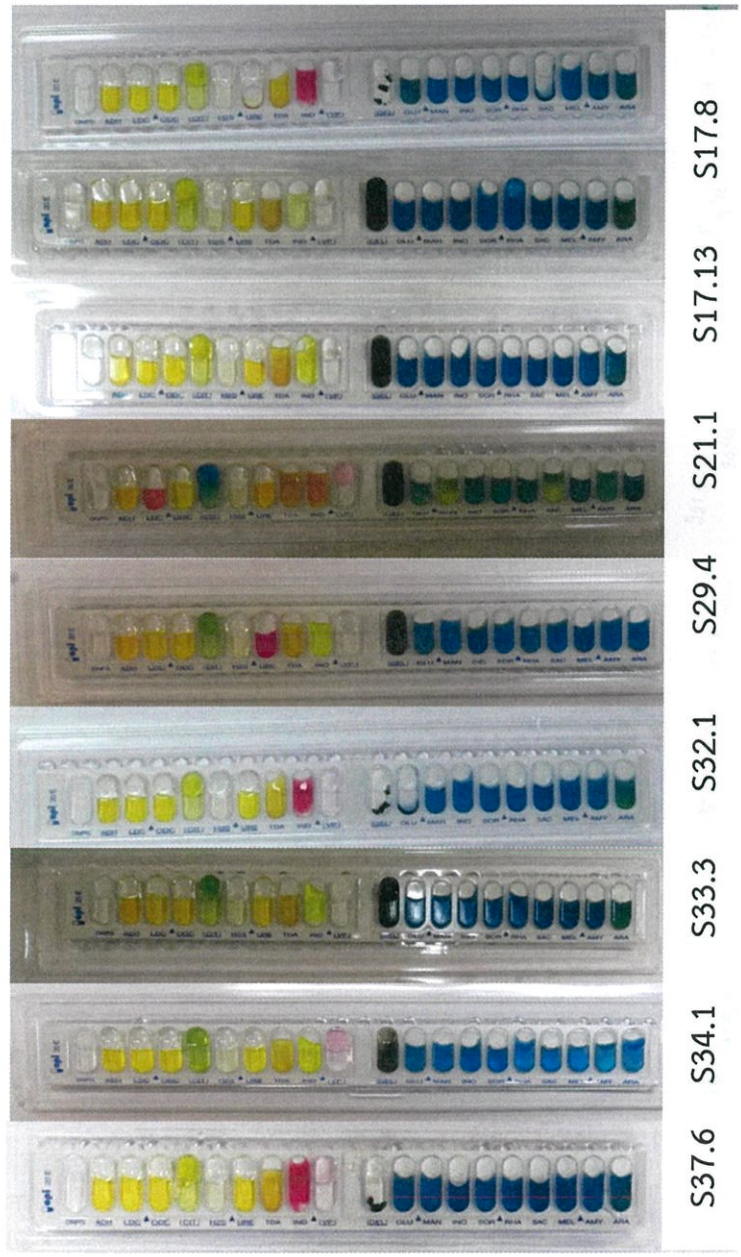
Well	Test	TISTR No.		
		1764 28 NOV 2007	1769 13 JUN 2007	1770 3 APR 2007
48	LYSINE DECARBOXYLASE	-	-	-
53	L-HISTIDINE	-	-	-
56	COURMARATE	-	-	-
57	BETA-GLUCURONIDASE	-	-	-
58	O/129 RESISTANCE	-	-	-
59	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	+	(-)	+
61	L-MALATE assimilation	-	-	-
62	ELLMAN	-	-	-
64	L-LACTATE assimilation	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

เชื้อแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารชีวเคมีที่แตกต่างกัน เช่น S17.8, S17.13, S21.1 S29.4, S33.3, S34.1, TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736, TISTR 1741, TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763, TISTR 1764, TISTR 1769 และ TISTR 1770 สามารถใช้ Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE ได้ซึ่งสารตัวนี้มีความสำคัญคือ APPA (Ala-Phe-Pro-Arylamidase) เป็นเอนไซม์ที่มีผลต่อการควบคุมโดยธาตุเหล็ก และ ARYLAMIDASE เป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ที่สามารถย่อยสลายอะมิโนแอซิด (Riley and Behal, 1971) ส่วน S17.13, TISTR 1736, TISTR 1741, TISTR 1760 และ TISTR 1763 สามารถใช้ β-galactosidase ในอุตสาหกรรมเพื่อย่อยแลคโตสจากนมและหางนมสำหรับการใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ น้ำแข็ง (Rubens Cruz,1999) และ S2.4, S17.8, S21.1, S37.6, TISTR 1736, TISTR 1741 TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763, TISTR 1764, TISTR 1769 และ TISTR 1770 สามารถใช้ BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE ซึ่งเป็นเอนไซม์ exoglycosidase เกี่ยวข้องกับ N-linkedglycans มีความจำเพาะต่อ N-acetyl glucosamine (GlcNAc) และ N-acetyl

galactosamine (GalNAc) และมีประโยชน์ในการกำหนด linkage และ anomeric ของหน่วยคาร์โบไฮเดรตในการแยก glycans, glycolipids และ glycoproteins ร่วมกับสารอื่น ๆ (Li, S.C., and Li, Y.T.,1970)

4.3.2 ผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อโดยใช้ชุดทดสอบ API 20E



รูปที่ 4.66 แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S2.4, S17.8, S17.13, S21.1, S29.4, S32.1, S33.3, 34.1 และ S37.6 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E

ตารางที่ 4.7 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S2.4, S17.8, S17.13, S21.1 และ S29.4 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E

Test	รหัส				
	S2.4	S17.8	S17.13	S21.1	S29.4
ONPG	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	+	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-
Citrate utilization	-	-	-	+	+
H_2S Production	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-
Tryptophane Deaminase	-	-	-	Δ	Δ
Indole production	+	-	-	-	-
Voges Proskauer	Δ	-	-	Δ	-
Gelatinase	-	+	+	+	+
Fermatation/Oxidation(GLU)	Δ	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(MAN)	-	-	-	+	-
Fermatation/Oxidation(INO)	-	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(SOR)	-	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(RHA)	-	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(SAC)	-	-	-	+	-
Fermatation/Oxidation(MEL)	-	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(AMY)	-	-	-	Δ	-
Fermatation/Oxidation(ARA)	Δ	Δ	Δ	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.8 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S32.1, S33.3, S34.1 และ S37.6 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E

Test	รหัส			
	S32.1	S33.3	S34.1	S37.6
ONPG	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-
Citrate utilization	-	+	+	-
H_2S Production	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-
Tryptophane Deaminase	-	-	Δ	-
Indole production	+	-	-	+
Voges Proskauer	Δ	-	+	Δ
Gelatinase	-	+	+	-
Fermatation/Oxidation(GLU)	-	-	-	+
Fermatation/Oxidation (MAN)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(INO)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(SOR)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(RHA)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(SAC)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(MEL)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation (AMY)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(ARA)	Δ	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

รูปที่ 4.67 แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736, TISTR 1741, TISTR 1750, TISTR 1760 และ TISTR 1763 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E

ตารางที่ 4.9 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736 และ TISTR 1741 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E

Test	TISTR No.			
	1719 9 JUN 2009	1726 5 SEP 2006	1736 26 SEP 2006	1741 26 SEP 2006
ONPG	-	-	+	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-
Citrate utilization	-	-	-	-
H_2S Production	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-
Tryptophane Deaminase	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-
Voges Proskauer	-	-	-	-
Gelatinase	+	-	-	-
Fermatation/Oxidation(GLU)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(MAN)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(INO)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(SOR)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(RHA)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(SAC)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(MEL)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(AMY)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(ARA)	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.10 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763 และ TISTR 1763 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E

Test	TISTR No.			
	1750 26 SEP 2006	1760 10 JUN 2007	1763 12 JAN 2007	1763 28 NOV 2007
ONPG	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-
Citrate utilization	-	-	-	+
H_2S Production	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-
Tryptophane Deaminase	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-
Voges Proskauer	-	-	-	-
Gelatinase	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(GLU)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(MAN)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(INO)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(SOR)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(RHA)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(SAC)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(MEL)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(AMY)	-	-	-	-
Fermatation/Oxidation(ARA)	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

รูปที่ 4.68 แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ เชื้อ TISTR 1764, TISTR 1769 และ TISTR 1770 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E

ตารางที่ 4.11 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1764, TISTR 1769 และ TISTR 1770 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E

Test	TISTR No.		
	1764 28 NOV 2006	1769 28 NOV 2006	1770 3 APR 2007
ONPG	+	+	-
Arginine dihydrolase	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

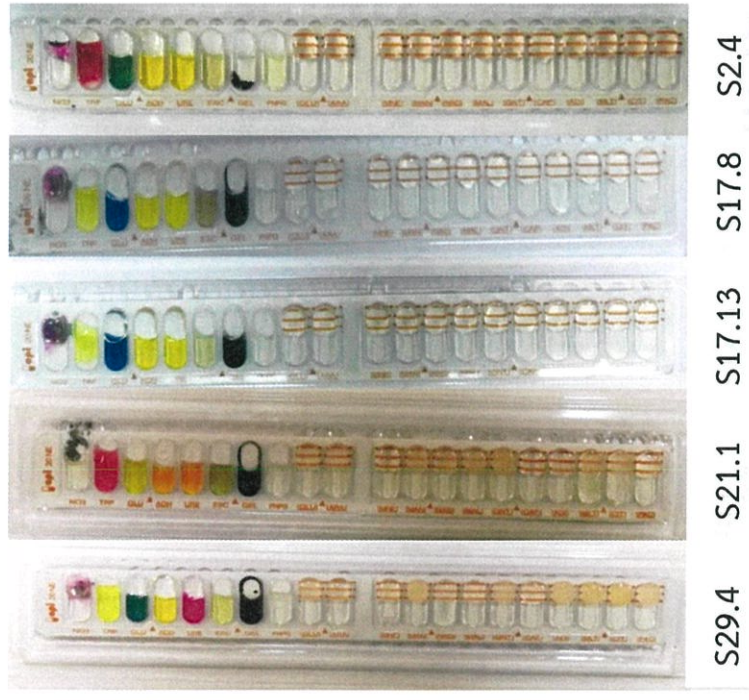
ตารางที่ 4.11 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1764, TISTR 1769 และ TISTR 1770 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20E **(ต่อ)**

Test	TISTR No.		
	1764 28 NOV 2006	1769 28 NOV 2006	1770 3 APR 2007
Citrate utilization	-	-	-
H_2S Production	-	-	-
Urease	-	-	-
Tryptophane Deaminase	-	-	-
Indole production	-	-	-
Voges Proskauer	-	-	-
Gelatinase	-	-	-
Fermatation/Oxidation(GLU)	-	-	-
Fermatation/Oxidation(MAN)	-	-	-
Fermatation/Oxidation(INO)	-	-	-
Fermatation/Oxidation(SOR)	-	-	-
Fermatation/Oxidation(RHA)	-	-	-
Fermatation/Oxidation(SAC)	-	-	-
Fermatation/Oxidation(MEL)	-	-	-
Fermatation/Oxidation(AMY)	-	-	-
Fermatation/Oxidation(ARA)	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ผลการทดสอบ API 20E พบว่า S21.2, S29.4, S33.3, S34.1 และ TISTR 1763 สามารถใช้ citrate utilization ได้ ใช้ทดสอบการแยกเชื้อ *E. coli* จากโคลิฟอร์มสายพันธุ์อื่น (Koser SA, 1924) ส่วน S17.8, S17.13, S21.1, S29.4, S33.3, 34.1, TISTR 1719 และ TISTR 1763 สามารถสร้างเจลาติเนส เกี่ยวกับการย่อยสลายเจลาติน กระบวนการนี้เกิดขึ้นสองปฏิกิริยา โดยปฏิกิริยาแรกเจลาติเนสจะย่อยสลายเจลาตินเป็นพอลิเปปไทด์ จากนั้นพอลิเปปไทด์จะถูกแปลงเป็นกรดอะมิโน แบคทีเรียจะนำกรดอะมิโนไปใช้ในกระบวนการเผาผลาญอาหารได้ **ที่มา:** https://microbeonline.com/gelatin-hydrolysis-test-principle-procedure-expected-results/ (27 พฤษภาคม 2561) และ TISTR 1736, TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763 และ TISTR 1763, TISTR 1764 และ TISTR 1769 สามารถใช้ o-nitrophenol-β-D-galactoside (ONPG) ซึ่งสามารถย่อยสลายแลคโตสและยับยั้งเชื้อในกระแสเลือด (M.Ladero, 2001)

4.3.3 ผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อโดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE



รูปที่ 4.69 แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S2.4, S17.8, S17.13, S21.1 และ S29.4 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE

ตารางที่ 4.12 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S2.4, S17.8, S17.13, S21.1 และ S29.4 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE

Test	รหัส				
	S2.4	S17.8	S17.13	S21.1	S29.4
Nitrate reduction (NO_3 -> NO_2-)	-	-	-	+	-
Reduction of nitrates to nitrogen	+	+	+	+	-
Indole production	+	-	-	+	-
Glucose Acidification	-	-	-	+	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	+	-
Urease	-	-	-	+	-
β-Glucosidase (esculin hydrolysis)	Δ	+	-	+	-
Protease (gelatin hydrolysis)	-	+	+	+	+
β-Galactosidase (PNPG)	-	-	-	-	-
D-Glucose	-	-	-	+	+
L-Arbinose	-	-	-	+	+
D-Mannose	-	-	-	-	+
D-Mannitol	-	-	-	+	+
N-Acetyl-D-glucosamine	-	-	-	+	+
D-Maltose	-	-	-	+	+
Gluconate	-	-	-	+	+
Caprate	-	-	-	-	-
Adipate	-	-	-	-	+
Malate	-	-	-	+	+
Citrate	-	-	-	+	+
Phenyl-acetate	-	-	-	+	+

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

รูปที่ 4.70 แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S32.1, S33.3, S34.1 และ S37.6 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20N

ตารางที่ 4.13 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S32.1, S33.3, S34.1 และ S37.6 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE

Test	รหัส			
	S32.1	S33.3	S34.1	S37.6
Nitrate reduction (NO_3 -> NO_2-)	-	-	+	-
Reduction of nitrates to nitrogen	+	-	-	+
Indole production	+	-	-	+
Glucose Acidification	-	-	-	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-
β-Glucosidase (esculin hydrolysis)	-	+	-	Δ
Protease (gelatin hydrolysis)	-	-	+	-
β-Galactosidase (PNPG)	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.13 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S32.1, S33.3, S34.1 และ S37.6 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE **(ต่อ)**

Test	รหัส			
	S32.1	S33.3	S34.1	S37.6
D-Glucose	-	+	+	-
L-Arbinose	-	+	+	-
D-Mannose	-	+	-	-
D-Mannitol	-	+	-	-
N-Acetyl-D-glucosamine	-	-	+	-
D-Maltose	-	+	+	-
Gluconate	-	+	+	-
Caprate	-	+	-	-
Adipate	-	+	-	-
Malate	-	+	+	-
Citrate	-	+	+	-
Phenyl-acetate	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

รูปที่ 4.71 แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ เชื้อ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736 และ TISTR 1741 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE

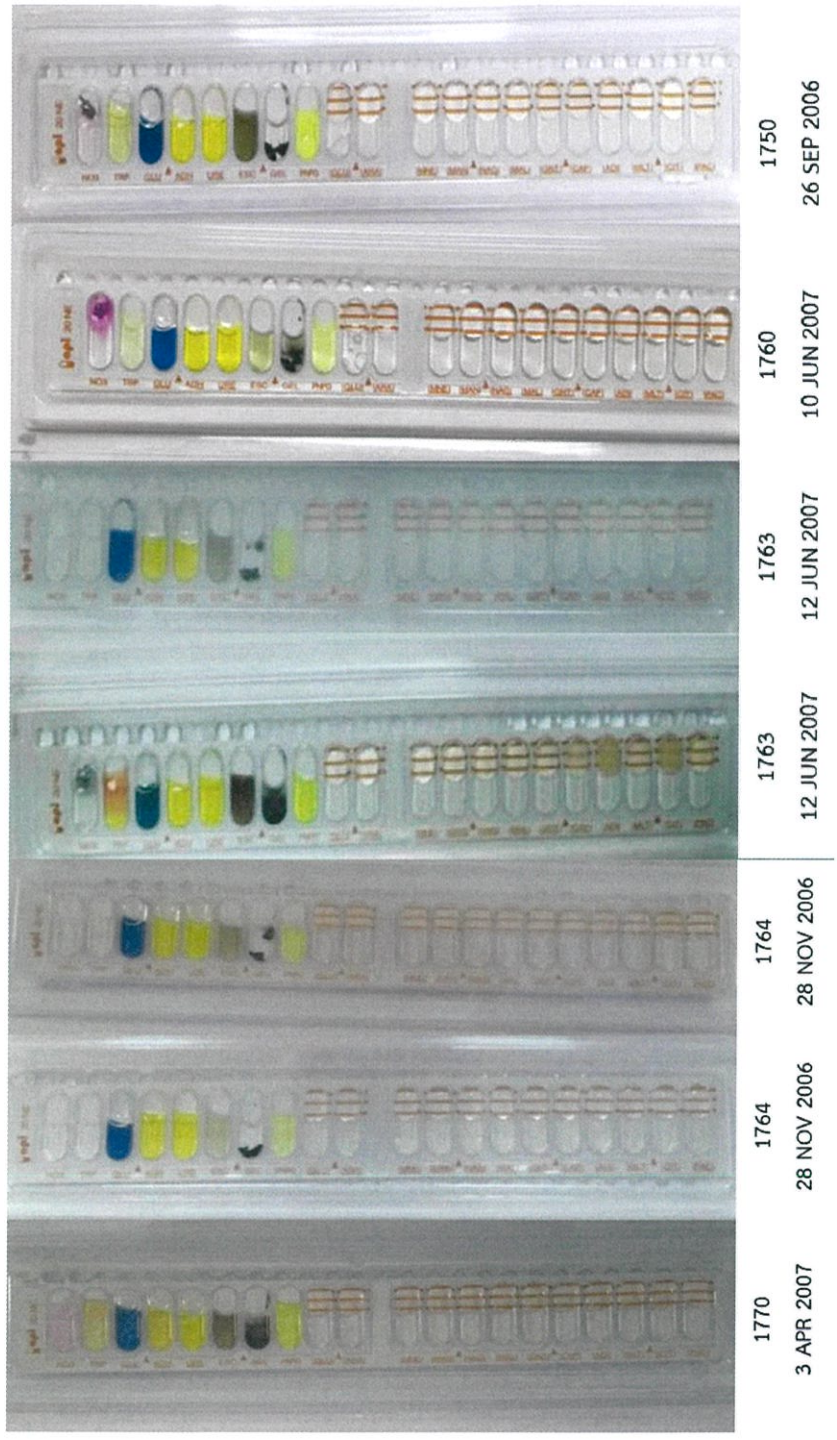
ตารางที่ 4.14 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736 และ 1741 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE

Test	TISTR No.			
	1719 9 JUN 2009	1726 5 SEP 2006	1736 26 SEP 2006	1741 26 SEP 2006
Nitrate reduction (NO_3^-> NO_2^-)	-	-	-	-
Reduction of nitrates to nitrogen	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-
Glucose Acidification	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-
β-Glucosidase (esculin hydrolysis)	+	-	+	Δ

ตารางที่ 4.14 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736 และ TISTR 1741 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE **(ต่อ)**

Test	TISTR No.			
	1719 9 JUN 2009	1726 5 SEP 2006	1736 26 SEP 2006	1741 26 SEP 2006
Protease (ɡ+elatin hydrolysis)	-	Δ	-	-
β-Galactosidase (PNPG)	-	-	+	+
D-Glucose	-	-	-	-
L-Arbinose	-	-	-	-
D-Mannose	-	-	-	-
D-Mannitol	-	-	-	-
N-Acetyl-D-ɡlucosamine	-	-	-	-
D-Maltose	-	-	-	-
Gluconate	-	-	-	-
Caprate	-	-	-	-
Adipate	-	-	-	-
Malate	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-
Phenyl-acetate	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย



รูปที่ 4.72 แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763 และ 1763, TISTR 1764, TISTR 1769 และ TISTR 1770 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE

ตารางที่ 4.15 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763 และ TISTR 1763 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE

Test	TISTR No.			
	1750 26 SEP 2006	1760 10 JUN 2007	1763 12 JAN 2007	1763 28 NOV 2007
Nitrate reduction (NO_3^-> NO_2^-)	-	-	+	-
Reduction of nitrates to nitrogen	-	-	-	+
Indole production	-	-	-	-
Glucose Acidification	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-
Urease	+	-	-	-
β-Glucosidase (esculin hydrolysis)	-	+	+	+
Protease (gelatin hydrolysis)	+	-	-	Δ
β-Galactosidase (PNPG)	-	+	+	+
D-Glucose	-	-	-	-
L-Arbinose	-	-	-	-
D-Mannose	-	-	-	-
D-Mannitol	-	-	-	-
N-Acetyl-D-glucosamine	-	-	-	-
D-Maltose	-	-	-	-
Gluconate	-	-	-	-
Caprate	-	-	-	Δ
Adipate	-	-	-	+
Malate	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	+
Phenyl-acetate	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

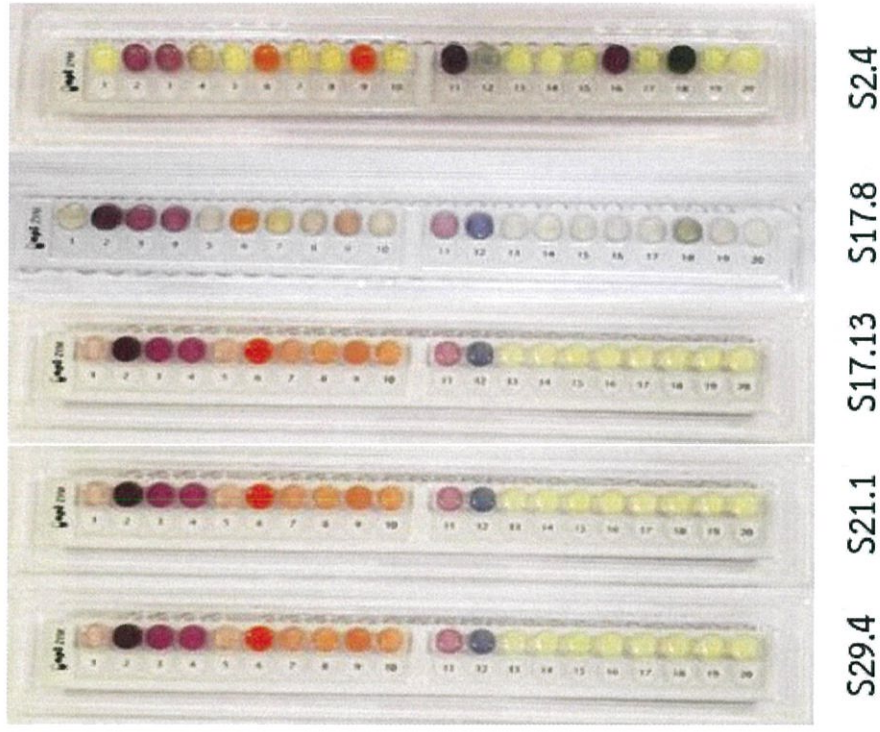
ตารางที่ 4.16 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1764, TISTR 1769 และ TISTR 1770 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE

Test	TISTR No.		
	1764 28 NOV 2007	1769 13 JUN 2007	1770 3 APR 2007
Nitrate reduction (NO_3^-> NO_2^-)	+	-	+
Reduction of nitrates to nitrogen	-	-	-
Indole production	-	-	-
Glucose Acidification	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-
Urease	-	-	-
β-Glucosidase (esculin hydrolysis)	+	-	+
Protease (gelatin hydrolysis)	-	-	+
β-Galactosidase (PNPG)	+	+	+
D-Glucose	-	-	Δ
L-Arbinose	-	-	-
D-Mannose	-	-	-
D-Mannitol	-	-	-
N-Acetyl-D-glucosamine	-	-	-
D-Maltose	-	-	-
Gluconate	-	-	-
Caprate	-	-	-
Adipate	-	-	-
Malate	-	-	-
Citrate	-	-	-
Phenyl-acetate	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

จากการทดสอบการใช้สารชีวเคมีในชุดทดสอบ API 20NE พบว่า S2.4, S17.8, S17.13, S21.1, S32.1, S37.6, TISTR 1763 เกิดการรีดักชันไนเตรทให้อยู่ในรูปของก๊าซไนโตรเจน (N_2) เกิดปฏิกิริยา dinitrifying bacteria ภายใต้ภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จะปลดปล่อยไนโตรเจนสู่แหล่งน้ำ และระเหยออกไปสู่บรรยากาศ ซึ่งไนเตรทเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่พืชใช้สังเคราะห์ ส่วน S17.8, S17.13, S21.1, S29.4, S34.1, TISTR 1750 และ TISTR 1770 สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์โปรตีน (protein) ซึ่งเป็นพอลิเพปไทด์ของกรดอะมิโน (amino acid) ได้เป็นเพปไทด์สายสั้น ผลิตได้จากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และรา สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เช่นการผลิตเบียร์ (beer) จะใช้เอนไซม์โปรตีเอสเพื่อย่อยสลายโปรตีนให้มีขนาดเล็ก ช่วยทำให้เบียร์ใสขึ้น **ที่มา :** http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/protease (27 พฤษภาคม 2561)

4.3.4 ผลความสามารถในการใช้สารตั้งต้นของเชื้อโดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM



รูปที่ 4.73 แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S2.4, S17.8, S17.13, S21.1 และ S29.4 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM

ตารางที่ 4.17 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S2.4, S17.8, S17.13, S21.1 และ S29.4 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM

Test	รหัส				
	S2.4	S17.8	S17.13	S21.1	S29.4
control	control	control	control	control	control
Alkaline phosphatase	+	+	+	Δ	+
Esterase (C4)	+	+	+	Δ	+
Esterase Lipase (C8)	-	+	+	Δ	+
Lipase (C14)	-	-	-	+	-
Leucine arylamidase	+	+	+	Δ	+
Valine arylamidase	-	-	+	Δ	-
Crystine arylamidase	-	-	+	Δ	-
Trypsin	+	+	+	+	-
α - chymotrypsin	-	-	+	Δ	-
Acid phospatase	+	Δ	Δ	+	Δ
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	Δ	+	+	+	-
α - galactosidase	-	-	-	-	+
β - galactosidase	-	-	-	-	-
β - glucuronidase	-	-	-	-	-
α - glucosidase	+	-	-	-	-
β - glucosidase	-	-	-	-	-
N –acetyl -β-glucosaminidase	+	Δ	-	-	-
α - mannosidase	-	-	-	-	-
α - fucosidase	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

รูปที่ 4.74 แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S32.1, S33.3, S34.1 และ S37.6 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM

ตารางที่ 4.18 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S32.1, S33.3, S34.1 และ S37.6 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM

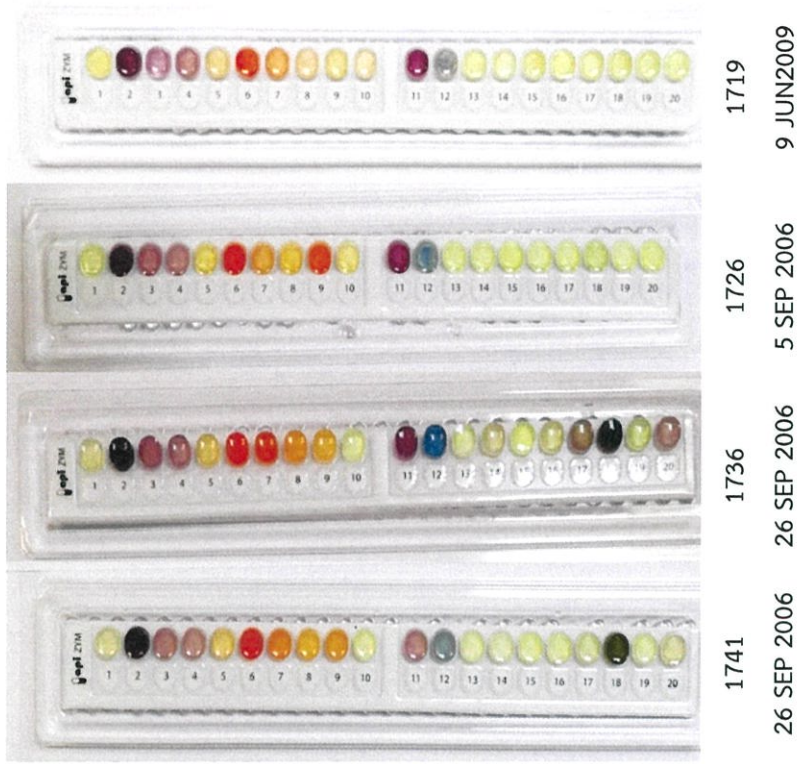
Test	รหัส			
	S32.1	S33.3	S34.1	S37.6
control	control	Control	control	control
Alkaline phosphatase	+	+	+	+
Esterase (C4)	+	+	+	+
Esterase Lipase (C8)	-	+	+	Δ
Lipase (C14)	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+
Valine arylamidase	-	+	+	Δ

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.18 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ S32.1, S33.3, S34.1 และ S37.6 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM **(ต่อ)**

Test	รหัส			
	S32.1	S33.3	S34.1	S37.6
Crystine arylamidase	-	Δ	-	-
Trypsin	+	Δ	+	+
α - chymotrypsin	-	Δ	-	-
Acid phospatase	+	Δ	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	Δ	Δ	+	Δ
α - galactosidase	-	-	-	-
β - galactosidase	-	-	-	-
β - glucuronidase	-	-	-	-
α - glucosidase	+	-	+	+
β - glucosidase	-	-	-	-
N –acetyl -β- glucosaminidase	+	-	-	+
α - mannosidase	-	-	-	-
α - fucosidase	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย



รูปที่ 4.75 แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736 และ TISTR 1741 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM

ตารางที่ 4.19 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736 และ TISTR 1741 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM

Test	TISTR No.			
	1719 9 JUN 2009	1726 5 SEP 2006	1736 26 SEP 2006	1741 26 SEP 2006
control	control	control	control	control
Alkaline phosphatase	+	+	+	+
Esterase (C4)	+	+	+	+

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.19 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736 และ TISTR 1741 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM **(ต่อ)**

Test	TISTR No.			
	1719 9 JUN 2009	1726 5 SEP 2006	1736 26 SEP 2006	1741 26 SEP 2006
Esterase Lipase (C8)	Δ	+	+	+
Lipase (C14)	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+
Valine arylamidase	+	+	+	+
Crystine arylamidase	+	+	+	+
Trypsin	Δ	+	+	+
α - chymotrypsin	Δ	-	-	-
Acid phospatase	+	+	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	+
α - galactosidase	-	-	-	-
β - galactosidase	-	-	-	-
β - glucuronidase	-	-	-	-
α - glucosidase	-	-	-	-
β - glucosidase	-	-	Δ	-
N –acetyl -β-glucosaminidase	-	-	+	+
α - mannosidase	-	-	-	-
α - fucosidase	-	-	Δ	-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

รูปที่ 4.76 แสดงผลความแตกต่างของสีในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763, TISTR 1763 TISTR 1764, TISTR 1769 และ TISTR 1770 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM

ตารางที่ 4.20 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763 และ TISTR 1763 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM

Test	TISTR No.			
	1750 26 SEP 2006	1760 10 JUN 2007	1763 12 JUN 2007	1763 28 NOV 2007
control	control	control	control	control
Alkaline phosphatase	+	+	+	+
Esterase (C4)	+	+	+	+
Esterase Lipase (C8)	+	+	+	+
Lipase (C14)	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+
Valine arylamidase	+	+	+	+
Crystine arylamidase	+	+	+	+
Trypsin	+	+	+	+
α - chymotrypsin	-	-	-	-
Acid phospatase	+	+	Δ	-
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	Δ
α - galactosidase	-	-	-	-
β - galactosidase	-	-	-	-
β - glucuronidase	-	-	-	-
α - glucosidase	-	-	+	-
β - glucosidase	-	-	-	-
N –acetyl -β- glucosaminidase	+	+	+	+
α - mannosidase	-	-	-	-
α - fucosidase	Δ	Δ	+	Δ

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.21 แสดงผลความสามารถในการใช้สารชีวเคมีของเชื้อ TISTR 1764, TISTR 1769 และ TISTR 1770 โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM

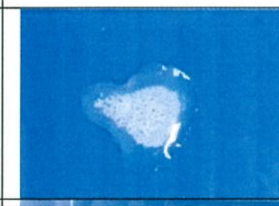
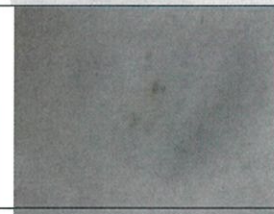
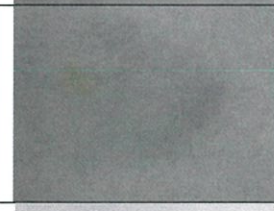
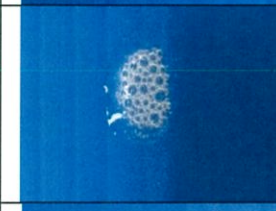
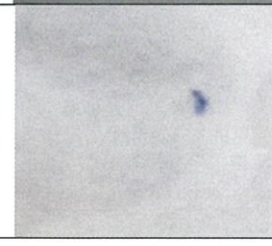
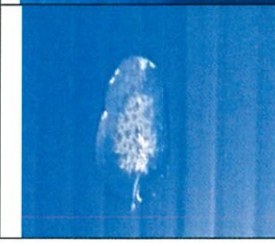
Test	TISTR No.		
	1764 28 NOV 2006	1769 13 JUN 2007	1770 3 APR 2007
control	control	control	control
Alkaline phosphatase	+	+	+
Esterase (C4)	+	+	+
Esterase Lipase (C8)	+	+	+
Lipase (C14)	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+
Valine arylamidase	+	+	+
Crystine arylamidase	+	+	+
Trypsin	+	+	+
α - chymotrypsin	-	-	-
Acid phospatase	+	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+
α - galactosidase	-	-	-
β - galactosidase	-	-	-
β - glucuronidase	-	-	-
α - glucosidase	-	-	-
β - glucosidase	-	-	-
N –acetyl -β- glucosaminidase	+	+	+
α - mannosidase	-	-	-
α - fucosidase	Δ	Δ	Δ

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, () คือ ผลบวกเล็กน้อย

จากการทดสอบการใช้สารชีวเคมีในชุดทดสอบ API ZYM พบว่า S2.4, S17.8, S17.13, S21.1, S29.4, S32.1, S33.3, S34.1, S37.6, TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736, TISTR 1741, TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763, TISTR 1763 TISTR 1764, TISTR 1769 และ TISTR 1770 สามารถใช้ alkaline phosphatase, esterase (C4) และ leucine arylamidase ได้เหมือนกัน โดย alkaline phosphatase เป็นเอนไซม์ไฮโดรเลสที่ทำหน้าที่ย้ายหมู่ฟอสเฟตจากโมเลกุลหลายชนิด เช่น นิวคลีโอไทด์ โปรตีน และอัลคาลอยด์ ทำหน้าที่ดึงหมู่ฟอสเฟตออกเรียกว่า ดีฟอสโฟริเลชัน (dephosphorylation) ซึ่งทำงานได้ดีในสภาพแวดล้อมที่เป็นเป็นเบส **ที่มา :** http://www.randox.com/leucine-arylamidase/ (27 พฤษภาคม 2561) สำหรับ esterase (C4), lipase esterase (C8), lipase (C14), valine arylamidase และ cystine arylamidase เซลล์มีความทนทานต่อ ampicillin, cefalotin, erythromycin และ vancomycin แต่มีความไวต่อ cefotaxime, choromycetin, spectinomycin และ clarithromycin (Yan-Qing Duan, 2015) นอกจากนี้ leucine arylamidase ยังเป็นเอนไซม์ proteolytic ทำปฏิกิริยากับสาร leucine ได้รวดเร็วที่สุด เอนไซม์นี้มีหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตกค้างของกรดอะมิโนจากปลายอะมิโนของโซ่ polypeptide **ที่มา :** https://www.randox.com/leucine-arylamidase/ (27 พฤษภาคม 2561)

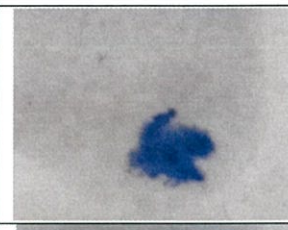
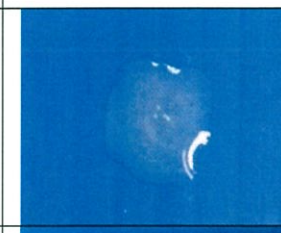
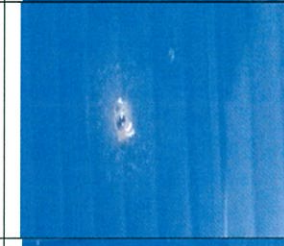
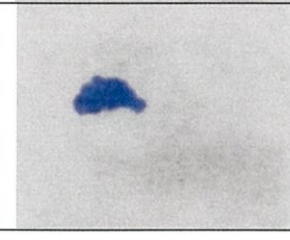
4.3.5 ผลการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดสและเอนไซม์คะตาเลส

ตารางที่ 4.22 แสดงผลการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดสและเอนไซม์คะตาเลสของ S2.4, S17.8, S17.13, S21.1, S29.4 และ S32.1

ลำดับ	รหัส	Oxidase	ผล	Catalase	ผล
1	S2.4		+		+
2	S17.8		+		-
3	S17.13		+		+
4	S21.1		-		+
5	S29.4		-		+
6	S32.1		(+)		+

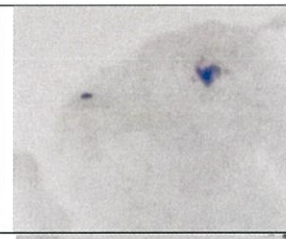
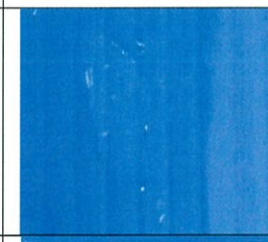
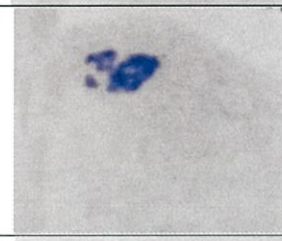
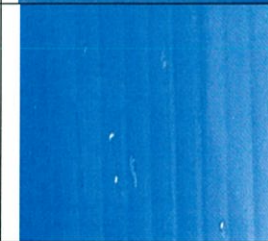
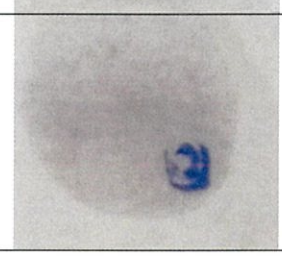
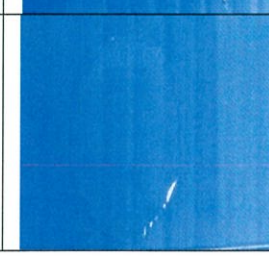
หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, (+) คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.23 แสดงผลการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดสและเอนไซม์คะตาเลสของ S33.3, S34.1, S37.6, TISTR 1719, TISTR 1726 และ TISTR 1736

ลำดับ	รหัส	Oxidase	ผล	Catalase	ผล
7	S33.3		+		-
8	S34.1		-		+
9	S37.6		(+)		+
10	TISTR 1719 9 JAN 2009		-		-
11	TISTR 1726 5 SEP 2006		(+)		-
12	TISTR 1736 26 SEP 2006		+		-

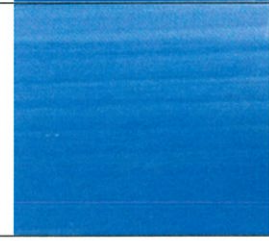
หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, (+) คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.24 แสดงผลการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดสและเอนไซม์คะตาเลสของ TISTR 1741, TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763, TISTR 1763 และ TISTR 1764

ลำดับ	รหัส	Oxidase	ผล	Catalase	ผล
13	TISTR 1741 26 SEP 2006		+		-
14	TISTR 1750 26 SEP 2006		+		-
15	TISTR 1760 10 JAN 2007		-		-
16	TISTR 1763 12 JUN 2007		+		-
17	TISTR 1763 28 NOV 2007		-		-
18	TISTR 1764 28 NOV 2007		+		-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, (+) คือ ผลบวกเล็กน้อย

ตารางที่ 4.25 แสดงผลการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดสและเอนไซม์คะตาเลสของ TISTR 1769 และ TISTR 1770

ลำดับ	รหัส	Oxidase	ผล	Catalase	ผล
19	TISTR 1769 13 JUN 2007		+		-
20	TISTR 1770 3 APR 2007		-		-

หมายเหตุ : - คือ ผลลบ, + คือ ผลบวก, (+) คือ ผลบวกเล็กน้อย

ปฏิกิริยาออกซิเดสขึ้นอยู่กับความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ ใช้สำหรับการศึกษาลักษณะแบคทีเรียแกรมลบ (Kovacs, 1956) ซึ่ง S2.4, S17.8, S17.13, S33.3, TISTR 1736, TISTR 1741, TISTR 1750, TISTR 1764 และ TISTR 1769 สามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดสได้ เนื่องจากสามารถออกซิไดส์สารรีเอเจนต์เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

การทดสอบเอนไซม์คะตาเลส พบได้ทั่วไปในเซลล์พืช เซลล์สัตว์และจุลินทรีย์ต่างๆ ที่ต้องการอากาศในการเจริญ ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากการถูกออกซิไดซ์โดยเอนไซม์คะตาเลสจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ได้ผลผลิตเป็นน้ำและออกซิเจน จุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ คะตะเลสบวกและคะตาเลสลบ โดยปริมาณคะตะเลสจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นจึงสามารถใช้ผลของคะตะเลสในการประมาณจำนวนจุลินทรีย์ได้ (Fung and Petrishko, 1973, Saldarasamut et al., 1999, ประเวทย์และฆรณี 2536) จากการทดลองพบว่า gliding bacteria คือ TISTR 1719, TISTR 1726, TISTR 1736, TISTR 1741, TISTR 1750, TISTR 1760, TISTR 1763, TISTR 1763 TISTR 1764, TISTR 1769 และ TISTR 1770 ไม่สามารถผลิตเอนไซม์คะตาเลสได้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษา gliding bacteria และแบคทีเรียในน้ำทะเล ด้านคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า gliding bacteria มีลักษณะเฉพาะคือสามารถเคลื่อนที่ได้บนพื้นผิว มีการเจริญโดยวิธีการคืบคลาน (gliding motility) มีความสามารถในการผลิตสารต่างๆ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างได้หลากหลายทั้งเป็นท่อน (rod) หรือเป็นเส้นสาย (filament) ไม่มีแฟลกเจลลา ส่วนแบคทีเรียในน้ำทะเลมีการเคลื่อนที่เหมือนแบคทีเรียทั่วๆ ไป เช่น การเคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา พิไล ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ เมื่อนำมาทดสอบทางชีวเคมีพบว่าเชื้อที่เป็น gliding bacteria และเชื้อที่ไม่ใช่ gliding bacteria มีการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส เอนไซม์คะตะเลส ที่มีความสามารถในการใช้สารชีวเคมีในชุดทดสอบ API ที่แตกต่างกัน แม้ว่าจะเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันก็ตาม ซึ่งคุณสมบัติที่แตกต่างกันเหล่านี้อาจทำให้เกิดการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือการผลิตเอนไซม์ที่หลากหลายขึ้นและอาจเป็นประโยชน์ในทางด้านการแพทย์ ทางด้านอุตสาหกรรมหรือผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ทั้งนี้ยังต้องมีการทดลองในลำดับต่อไปถึงความสามารถในการผลิตสารต่างๆ ของเชื้อแต่ละชนิดและจากการวิเคราะห์ลำดับเบสสามารถสรุปสายพันธุ์ได้ดังนี้

ตารางที่ 5.1 แสดงสรุปสายพันธุ์ของเชื้อแต่ละรหัสที่นำมาศึกษา

เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ NCBI	**รหัส**
Vibrio azureus	S1.1, S40.1
Vibrio alginolyticus	S2.1, S2.2, S6.2, S14.1, S15.4, S16.2, S17.2, S17.11, S18.1, S18.2, S24.3, S24.4, S25.4, S31.2, S31.6, S37.10
Nesiotobacter exalbescens	S2.4, S32.1, S37.6
Vibrio natriegens	S3.2
Vibrio parahaemolyticus	S15.1
Pseudoalteromonas piscicida	S17.8

ตารางที่ 5.1 แสดงผลสรุปสายพันธุ์ของเชื้อแต่ละรหัสที่นำมาศึกษา **(ต่อ)**

เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ NCBI	รหัส
Vibrio neocaledonicus	S17.10, S26.2
Pseudidiomarina sediminum	S17.13
Brevibacterium sediminis	S21.1, S29.4
*Ruegeria*sp.	S21.1, S40.3
Vibrio sp.	S24.1
Pseudidiomarina arabiensis	S25.3, S37.9
Idiomarina sediminum	S28.3
Tenacibaculum mesophilum	S33.3
Brevibacterium casei	S34.1
Rapidithrix thailandica TISTR 1750 *Rapidithrix thailandica* *Rapidithrix* sp. TISTR 1768	TISTR 1736 26 SEP 2006, TISTR 1741 26 SEP 2006, TISTR 1750 26 SEP 2006, TISTR 1760 10 JAN 2007, TISTR 1763 12 JUN 2007, TISTR 1763 28 NOV 2007, TISTR 1764 28 NOV 2007, TISTR 1769 13 JUN 2007

5.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการคัดแยก gliding bacteria ที่อาจจะเป็น new species โดยคัดแยกจากบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของไทย อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี จากการทดลองเชื้อที่พบเป็นแบคทีเรียในน้ำทะเลไม่ใช่ gliding bacteria อาจเกิดจากขั้นตอนการเก็บตัวอย่างที่ไม่ครอบคลุมหรือไม่ใช่พื้นที่ที่มี gliding bacteria เจริญอยู่ เนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือสภาพอากาศในช่วงเวลานั้นๆ ไม่เหมาะสมกับการเจริญของ gliding bacteria จากการศึกษาลักษณะต่างๆ ของ gliding bacteria และแบคทีเรียในน้ำทะเลอาจเป็นประโยชน์ในการใช้ลักษณะพื้นฐานของเชื้อไปประยุกต์ใช้หรือต่อยอดในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตสารสี การผลิตเอนไซม์ หรือในด้านทางการแพทย์

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลนครพิงค์. 2013. การใช้เครื่อง Automate Identification รุ่น Vitek® 2 compact [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก Vitek® 2 compact Online Software User Manual. (วันที่สืบค้น: 20 เมษายน 2561)

กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง. 2018. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://sittes.google.com/site/biolotical1995/ khwam- ru- thang- withyasastr/ klxngculculthrrsn- baeb- chi- saeng. (วันที่สืบค้น: 20 เมษายน 2561)

ความแก่ของผิวหนัง กลไกการเกิดระดับโมเลกุลการป้องกัน การรักษาและสารธรรมชาติที่ใช้ ในการต่อต้านความแก่ของผิวหนัง. 2018. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://ccpe.phamacycouncil.org/ showfile.php?file=195 (วันที่สืบค้น: 28 พฤษภาคม 2561)

ฉัตรฤดี สุวรรณชาติ, วัลลภา อรุณไพโรจน์และอัครวิทย์ กาญจนโอภาษ. 2007. การแยกและการศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของ gliding bacteria ที่แยกได้จากพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย

ทิพวรรณ ประพันธ์. 2012. การย้อมสีแกรม. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://journal.up.ac.th/files/journal_issue_list/1162_91.pdf. (วันที่สืบค้น: 20 เมษายน 2561)

นันทนา. 2537. การทดสอบออกซิเดสและคะตะเลส [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2010/6919/10/261263_app.pdf. (วันที่สืบค้น: 20 เมษายน 2561)

เนียรวรรณ มีเจริญ. 2017. การแยกเชื้อบริสุทธิ์ [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://www.scimath.org/lesson-biology/item/7448-2017-08-11. (วันที่สืบค้น:20เมษายน 2561)

ผศ.ดร.พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. 2018. Protease / โปรติเอส [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1176/protease-โปรติเอส (วันที่สืบค้น: 28 พฤษภาคม 2561)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. 2018. เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก https://sites.google.com/site/biology2012science/what-is-dna/thekhnikh-pcr-ni-kar-pheim-canwn-dna. (วันที่สืบค้น: 20 เมษายน 2561)

อนนต์ บิกบอส. 2013. การย้อมสีแกรม [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://anonmicrobiology.blogspot.com/2013/06/blog-post_28.html. (วันที่สืบค้น: 20 เมษายน 2561)

B. HOLMES, W.R.WILLCOX, S.P. LAPAGE . 1978. Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E system. Journal of Clinical Pathology. 31, 22-30.

Eunice E. Kim, Harold W. Wyckoff. 1991. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures: Two-metal ion catalysis. Journal of Molecular Biology. 2, 449-464.

Gelatin Hydrolysis Test: Principle, Procedure and expected results [ออนไลน์]. เข้าได้จาก https://microbeonline.com/gelatin-hydrolysis-test-principle-procedure-expected-results/. (วันที่สืบค้น: 28 พฤษภาคม 2561)

George L. Ellman, K. Diane C, Valentino Andres jr, Robert M.Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology. 1, 91-95.

Julie O Osayande, Ferripyoverdine receptors and General Metabolism in Pseudomonas aeruginosa, Preliminary Results [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://webmedcentral.com /article_view/4302. (วันที่สืบค้น: 28 พฤษภาคม 2561)

K. J. STEEL. 1961. The Oxidase Reaction as a Taxonomic Tool. Journal of general microbiology. 25, 297-306.

Koi Mio. 2018. การสะสมของไนไตรท์ [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก https://koi-mio.blogspot.com/ 2010/03/blog-post_20.html. (วันที่สืบค้น: 28 พฤษภาคม 2561)

Leucine Arylamidase. 2018. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก https://www.randox.com/leucine-arylamidase/. (วันที่สืบค้น: 28 พฤษภาคม 2561)

M. Ladero, A. Santos, J. LGarcía. 2001. Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered β-galactosidase from Escherichia coli in solution and immobilized: kinetic modeling. Enzyme and Microbial Technology. 2–3, 181-193.

M. W. HUMBLE, ANNA KING, IAN PHILLIPS. 1977. API ZYM: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. Journal of clinical phathology. 30, 275–277.

Takashi Iizuka, Yasuko Jojima, Atsushi Hayakawa, Takayoshi Fujii, Shigeru Yamanaka, Ryosuke Fudou. 2013. Pseudenhygromyxa salsuginis gen. nov., sp. nov., a myxobacterium isolated from an estuarine marsh. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 63, 1360–1369.

Takashi Iizuka, Yasuko Jojima, Ryosuke Fudou. 1998. Isolation of myxobacteria from the marine environment. FEMS Microbiology Lett. 2, 317-322.

Yan. Qing Duan, Xing. Kui Zhou, Li Di. Yan, Qing. Qing Li , Li. Zhi Dang, Yong. Guang Zhang Li. Hong Qiu. Salam Nimaichand, Wen. Jun Li. 2015. Enterobacter tabaci sp.nov., a novel member of the genus Enterobacter isolated from a tobacco stem. Antonie van Leeuwenhoek. 108, 1161-1169.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

ตาราง ก แสดงรายละเอียดการฝึก/เรียนรู้งานนิสิตสหกิจศึกษา ฝ่ายศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

ลำดับ	ว/ด/ป	หัวข้อฝึกงาน
1	8 ม.ค. 61	ต้อนรับนิสิตฝึกงาน
	9-10 ม.ค. 61	เตรียมอุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อ ดูการสกัดสารเบต้ากลูแคน ดูการทำ API
2	11-17 ม.ค. 61	คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่นำมาจากน้ำทะเล เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในกลีเซอรอล 10% ที่ -20 องศาเซลเซียส ย้อมแกรม ศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์และถ่ายรูปเชื้อ
3	18-26 ม.ค.61	คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่นำมาจากน้ำทะเล เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ย้อมแกรม ศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์และถ่ายรูปเชื้อ อบรมการใช้ถังหมักขนาด 5 ลิตร
4	29 ม.ค.-2 ก.พ. 61	คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่นำมาจากน้ำทะเล เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียมกลีเซอรอล 10% เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในกลีเซอรอล 10% ที่ -20 องศาเซลเซียส
5	5-9 ก.พ. 61	คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่นำมาจากน้ำทะเล เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในกลีเซอรอล 10% ที่ -20 องศาเซลเซียส ทดสอบเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเลส ย้อมแกรม ศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์และถ่ายรูปเชื้อ

ตารางที่ ก แสดงรายละเอียดการฝึก/เรียนรู้งานนิสิตสหกิจศึกษา ฝ่ายศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย **(ต่อ)**

ลำดับ	ว/ด/ป	หัวข้อฝึกงาน
6	12-16 ก.พ. 61	คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่นำมาจากน้ำทะเล เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในกลีเซอรอล 10% ที่ -20 องศาเซลเซียส ลงเชื้อยีสต์ในถังหมักขนาด 300 ลิตร (กึ่งอุตสาหกรรม) เก็บเกี่ยวเซลล์ยีสต์โดยการใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ย้อมแกรม ศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์และถ่ายรูปเชื้อ
7	19-23 ก.พ. 61	เคาะเชื้อ gliding bacteria ทดสอบคุณลักษณะทางชีวเคมี อบรมการใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ย้อมแกรม ศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์และถ่ายรูปเชื้อ
8	26 ก.พ.–2 มี.ค.61	เคาะเชื้อ gliding bacteria เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำแห้งเซลล์ยีสต์โดยใช้เครื่องอบแห้งเยือกแข็ง เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในกลีเซอรอล 10% ที่ -20 องศาเซลเซียส
9	5-9 มี.ค. 61	เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ช่วยเตรียมตัวอย่างแอสต้าแซนธินสำหรับการฉีดที่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในกลีเซอรอล 10% ที่ -20 องศาเซลเซียส ย้อมแกรม ศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์และถ่ายรูปเชื้อ
10	12-16 มี.ค. 61	ทดสอบคุณลักษณะทางชีวเคมี เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ย้อมแกรม ศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์และถ่ายรูปเชื้อ เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในกลีเซอรอล 10% ที่ -20 องศาเซลเซียส

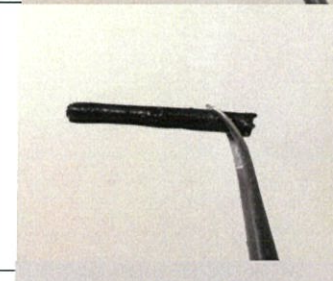
ตารางที่ ก แสดงรายละเอียดการฝึก/เรียนรู้งานนิสิตสหกิจศึกษา ฝ่ายศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย **(ต่อ)**

ลำดับ	ว/ด/ป	หัวข้อฝึกงาน
11	19-21 มี.ค.61	ทดสอบคุณลักษณะทางชีวเคมี ทดสอบเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เลส
	22 มี.ค.61	นำเสนองานวิจัยต่างประเทศ
	23 มี.ค.61	ทดสอบคุณลักษณะทางชีวเคมี ทดสอบเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เลส
12	26-30 มี.ค.61	เคาะเชื้อ gliding bacteria เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บ stock เชื้อ gliding bacteria ที่ -20 องศาเซลเซียส ย้อมแกรม ศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์และถ่ายรูปเชื้อ
13	2-5 เม.ย. 61	ทดสอบคุณลักษณะทางชีวเคมี เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ย้อมแกรม ศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์และถ่ายรูปเชื้อ
14	9-11 เม.ย. 61	ทดสอบคุณลักษณะทางชีวเคมี เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บ stock เชื้อ gliding bacteria ที่ -20 องศาเซลเซียส
15	17-20 เม.ย.61	ทดสอบคุณลักษณะทางชีวเคมี ทำรายงานสหกิจศึกษา
16	23-26 เม.ย.61	ทดสอบคุณลักษณะทางชีวเคมี ทำรายงานสหกิจศึกษา
	27 เม.ย.61	นำเสนอสหกิจศึกษา

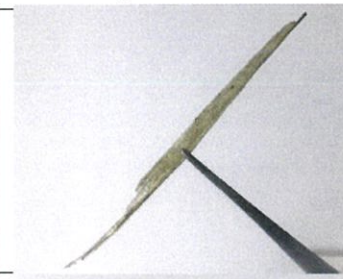
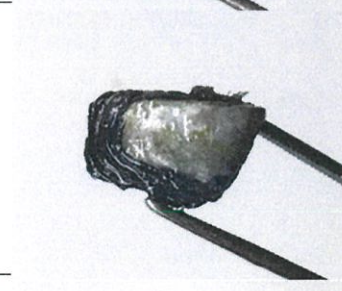
ภาคผนวก ข

ภาพตัวอย่างที่เก็บได้จากหาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี และเชื้อจากหลอดเก็บเชื้อ

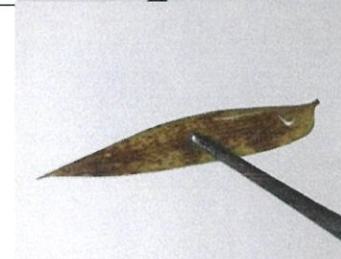
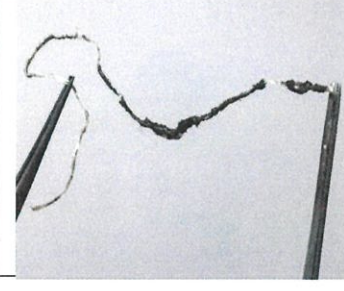
ตาราง ข แสดงภาพตัวอย่างที่เก็บได้จากหาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

ลำดับ	รหัส	ชื่อตัวอย่าง	รูปตัวอย่าง	พิกัด
1	S1.1	ซากไม้		12.740957, 100.840031
2	S2.1, S2.2, S2.3, S2.4	เศษไม้		12.740957, 100.840031
3	S3.1, S3.2, S3.3	เมล็ดสะแก		12.740957, 100.840031
4	S6.1, S6.2	เศษเชือก		12.740957, 100.840031

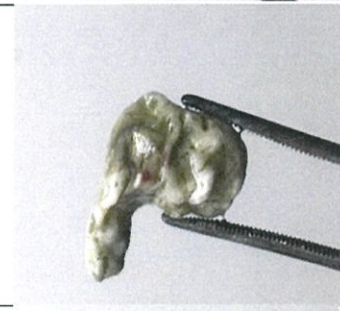
ตาราง ข แสดงภาพตัวอย่างที่เก็บได้จากหาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	ชื่อตัวอย่าง	รูปตัวอย่าง	พิกัด
5	S12.1, S13.3	เศษใบไม้ (สีเหลือง)		12.740957, 100.840031
6	S13.1	เศษหิน (สีเหลือง)		12.740957, 100.840031
7	S14.1	หอย		12.740957, 100.840031
8	S15.1, S15.4	หอย		12.740957, 100.840031
9	S16.2	เศษใบไม้ (สีน้ำตาล)		12.740957, 100.840031

ตาราง ข แสดงภาพตัวอย่างที่เก็บได้จากหาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	ชื่อตัวอย่าง	รูปตัวอย่าง	พิกัด
10	S17.2, S17.3 , S17.7, S17.8 , S17.10, S17.11, S17.13, S21.1	เปลือกหอย		12.740957, 100.840031
11	S18.2, S18.4	เศษใบไม้		12.740957, 100.840031
12	S20.1	เศษรากไม้		12.740957, 100.840031
13	S22.1	เศษใบไม้		12.740957, 100.840031
14	S24.1, S24.3, S24.4	เศษเชือก		12.740957, 100.840031

ตาราง ข แสดงภาพตัวอย่างที่เก็บได้จากหาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	ชื่อตัวอย่าง	รูปตัวอย่าง	พิกัด
15	S25.3, S25.4, S25.5	เปลือกหอย		12.740957, 100.840031
16	S26.2	ก้อนหิน		12.740957, 100.840031
17	S28.1, S28.3	เศษหิน		12.740957, 100.840031
18	S29.4	เศษปะการัง		12.740957, 100.840031
19	S31.1, S31.2, S31.6	เปลือกหอย		12.740957, 100.840031

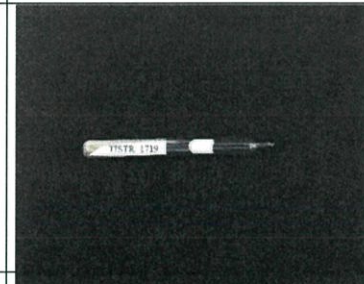
ตาราง ข แสดงภาพตัวอย่างที่เก็บได้จากหาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	ชื่อตัวอย่าง	รูปตัวอย่าง	พิกัด
20	S32.1	เปลือกหอย		12.740957, 100.840031
21	S33.3, S33.4	เศษเปลือกหอย		12.740957, 100.840031
22	S34.1	เปลือกหอย		12.740957, 100.840031
23	S37.6, S37.9, S37.10	เศษเปลือกหอย		12.740957, 100.840031
24	S38.1, S38.3	ก้อนหิน		12.740957, 100.840031

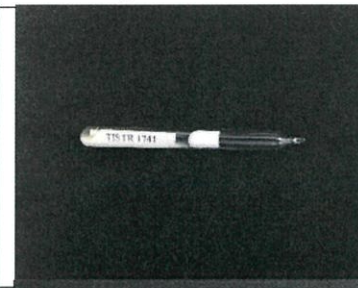
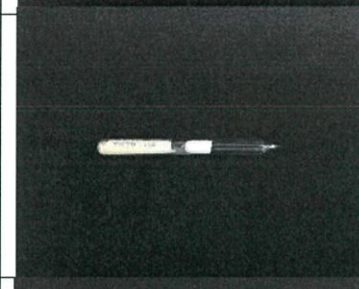
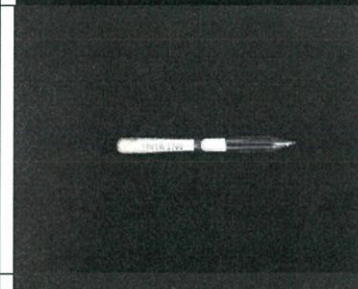
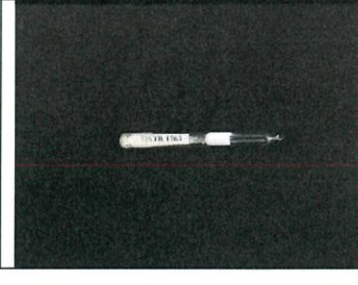
ตาราง ข แสดงภาพตัวอย่างที่เก็บได้จากหาดทรายแก้ว อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	ชื่อตัวอย่าง	รูปตัวอย่าง	พิกัด
25	S40.1, S40.3	เปลือกหอย		12.740957, 100.840031

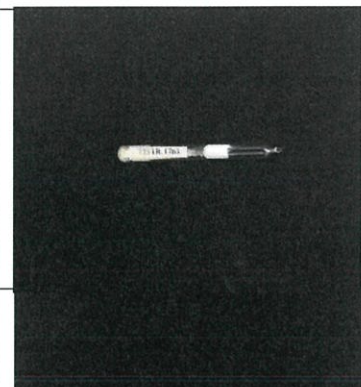
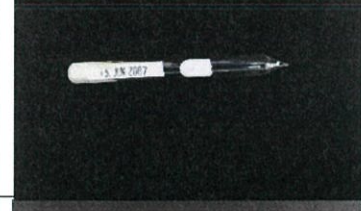
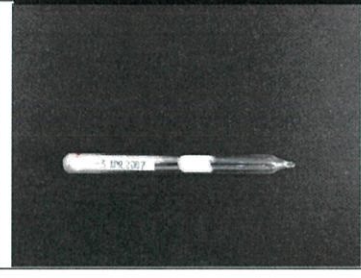
ตาราง ข แสดงภาพตัวอย่างที่เก็บในหลอดเก็บเชื้อ

ลำดับ	รหัส	ชื่อตัวอย่าง	รูปตัวอย่าง	พิกัด
1	TISTR 1719	หลอดเก็บเชื้อ 9 JAN 2009		-
2	TISTR 1726	หลอดเก็บเชื้อ 5 SEP 2006		-
3	TISTR 1736	หลอดเก็บเชื้อ 26 SEP 2006		-

ตาราง ข แสดงภาพตัวอย่างที่เก็บในหลอดเก็บเชื้อ **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	ชื่อตัวอย่าง	รูปตัวอย่าง	พิกัด
4	TISTR 1741	หลอดเก็บเชื้อ 26 SEP 2006		-
5	TISTR 1750	หลอดเก็บเชื้อ 26 SEP 2006		-
6	TISTR 1760	หลอดเก็บเชื้อ 10 JAN 2007		-
7	TISTR 1763	หลอดเก็บเชื้อ 12 JUN 2007		-
8	TISTR 1763	หลอดเก็บเชื้อ 28 NOV 2007		-

ตาราง ข แสดงภาพตัวอย่างที่เก็บในหลอดเก็บเชื้อ **(ต่อ)**

ลำดับ	รหัส	ชื่อตัวอย่าง	รูปตัวอย่าง	พิกัด
9	TISTR 1764	หลอดเก็บเชื้อ 28 NOV 2007		-
10	TISTR 1769	หลอดเก็บเชื้อ 13 JUN 2007		-
11	TISTR 1770	หลอดเก็บเชื้อ 3 APR 2007		-

ภาคผนวก ค

เอกสารผลการจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้เครื่อง Automate Identification รุ่น Vitek® 2 compact

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Apr 4, 2018 21:43 ICT
174 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: s2.4-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 0021001300200001
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card: GN	Lot Number: 2410259203	Expires: Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed: Apr 4, 2018 22:01 ICT	Status: Final	Analysis Time: 7.00 hours
Selected Organism	93% Probability	**Brucella melitensis**	
	Bionumber: 0021001300200001		**Confidence:** Very good identification
SRF Organism			

Analysis Organisms and Tests to Separate:

Analysis Messages:

Important ! Presumptive Identification
Highly pathogenic organism
See product information for additional information.

Contraindicating Typical Biopattern(s)

Brucella melitensis BNAG(1),dGLU(22),

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	+	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	+	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	+	64	lLATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Apr 5, 2018 00:45 ICT
175 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: S17.8-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 5020002100040000
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card:	GN	Lot Number:	2410259203	Expires:	Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed:	Apr 5, 2018 01:06 ICT	Status:	Final	Analysis Time:	10.25 hours

Selected Organism	Low Discrimination		
	Bionumber: 5020002100040000	Confidence:	Low discrimination

SRF Organism

Analysis Organisms and Tests to Separate:

Low Discrimination Organism	
Sphingomonas paucimobilis	SACCHAROSE(99),dMALTOSE(99),MOB(99),dMANNITOL(1),
Aeromonas salmonicida	MOB(1),dMANNITOL(99),
Brevundimonas diminuta / vesicularis	
Brevundimonas diminuta	SACCHAROSE(1),dMALTOSE(1),MOB(99),dMANNITOL(1),
Brevundimonas vesicularis	SACCHAROSE(1),dMALTOSE(99),MOB(99),dMANNITOL(1),

Analysis Messages:

Contraindicating Typical Biopattern(s)

Sphingomonas paucimobilis	LIP(5),dMAL(76),dGLU(76),dCEL(76),
Aeromonas salmonicida	BNAG(1),PHOS(1),
Brevundimonas diminuta / vesicularis	GGAA(90),BNAG(4),AGLTp(90),ProA(99),

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Apr 5, 2018 00:45 ICT
176 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: S17.8-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 5020002100040000
Organism Quantity:

Biochemical Details

2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	(+)	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	+	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Apr 4, 2018 21:43 ICT
177Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: s17.13-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 1040003100040020
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card: GN	Lot Number: 2410259203	Expires: Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed: Apr 4, 2018 22:01 ICT	Status: Final	Analysis Time: 7.00 hours
Selected Organism	99% Probability	**Brevundimonas diminuta / vesicularis**	
	Bionumber: 1040003100040020	**Confidence:**	Excellent identification
SRF Organism			

Analysis Organisms and Tests to Separate:

Brevundimonas diminuta / vesicularis	
Brevundimonas diminuta	dMALTOSE(1),ESCULIN(1),
Brevundimonas vesicularis	dMALTOSE(99),ESCULIN(99),

Analysis Messages:

Contraindicating Typical Biopattern(s)

Biochemical Details

2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	+	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	+	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	+	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Apr 25, 2018 14:49 ICT
178 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: S21.1-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 5025601350041220
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	**Card:**	GN	**Lot Number:**	2410391203	**Expires:**	Dec 22, 2018 12:00 ICT
	Completed:	Apr 25, 2018 15:04 ICT	**Status:**	Final	**Analysis Time:**	6.00 hours
Selected Organism	95% Probability		**Vibrio alginolyticus**			
	Bionumber:	5025601350041220			**Confidence:**	Very good identification
SRF Organism						
Analysis Organisms and Tests to Separate:						
Analysis Messages:						
Contraindicating Typical Biopattern(s)						
Vibrio alginolyticus	URE(1),					

Biochemical Details

2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	+	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	+	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	+
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	+	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Apr 24, 2018 23:14 ICT
179 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: S29.4-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 1000001300101041
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	**Card:**	GN	**Lot Number:**	2410259203	**Expires:**	Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed:	Apr 24, 2018 23:33 ICT	**Status:**	Final	**Analysis Time:**	7.50 hours
Selected Organism	96% Probability		**Roseomonas gilardii**			
	Bionumber:	1000001300101041			**Confidence:**	Excellent identification
SRF Organism						
Analysis Organisms and Tests to Separate:						
Analysis Messages:						
Contraindicating Typical Biopattern(s)						
Roseomonas gilardii	APPA(17),PyrA(92),					

Biochemical Details

2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	+	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	+	62	ELLM	+	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Apr 5, 2018 00:45 ICT
180 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: S32.1-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 0000001000000001
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	**Card:**	GN	**Lot Number:**	2410259203	**Expires:**	Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed:	Apr 5, 2018 01:06 ICT	**Status:**	Final	**Analysis Time:**	10.25 hours
Selected Organism	**Low Discrimination**					
	Bionumber:	0000001000000001			**Confidence:**	Low discrimination
SRF Organism						

Analysis Organisms and Tests to Separate:

Low Discrimination Organism	
Aeromonas salmonicida	UREASE(1),DNAse(99),dMANNITOL(99),
Neisseria animaloris/zoodegmatis	
Neisseria animaloris	dGLUf(99),dMANNITOL(1),
Neisseria zoodegmatis	dGLUf(1),dMANNITOL(1),
Oligella ureolytica	UREASE(99),DNAse(1),

Analysis Messages:

Contraindicating Typical Biopattern(s)

Aeromonas salmonicida	ELLM(17),
Neisseria animaloris/zoodegmatis	TyrA(99),
Oligella ureolytica	GGT(93),URE(85),

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Apr 5, 2018 00:45 ICT
181 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: S32.1-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 0000001000000001
Organism Quantity:

Biochemical Details																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	(-)	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

Bioscience department, TISTR

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Apr 18, 2018 20:27 ICT
182 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: S33.3-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 1000002100040000
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information							
	Card:	GN	**Lot Number:**	2410259203	**Expires:**	Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed:	Apr 18, 2018 20:44 ICT	**Status:**	Final	**Analysis Time:**	7.00 hours
Selected Organism	97% Probability		**Brevundimonas diminuta / vesicularis**			
	Bionumber:	1000002100040000			**Confidence:**	Excellent identification

SRF Organism

Analysis Organisms and Tests to Separate:

Brevundimonas diminuta / vesicularis	
Brevundimonas diminuta	dMALTOSE(1),ESCULIN(1),
Brevundimonas vesicularis	dMALTOSE(99),ESCULIN(99),

Analysis Messages:

Contraindicating Typical Biopattern(s)

Brevundimonas diminuta / vesicularis	GGAA(90),

Biochemical Details

2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	+	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Apr 24, 2018 21:45 ICT
183 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: S34.1-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 1000001100300000
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	**Card:**	GN	**Lot Number:**	2410259203	**Expires:**	Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed:	Apr 24, 2018 22:03 ICT	**Status:**	Final	**Analysis Time:**	6.00 hours
Selected Organism	97% Probability		**Sphingomonas paucimobilis**			
	Bionumber:	1000001100300000			**Confidence:**	Excellent identification
SRF Organism						
Analysis Organisms and Tests to Separate:						
Analysis Messages:						
Contraindicating Typical Biopattern(s)						

Biochemical Details

2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	+	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Apr 5, 2018 01:09 ICT
184 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: S37.6-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 0021001100200201
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	**Card:**	GN	**Lot Number:**	2410259203	**Expires:**	Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed:	Apr 5, 2018 01:25 ICT	**Status:**	Final	**Analysis Time:**	10.25 hours
Selected Organism	**Low Discrimination**					
	Bionumber:	0021001100200201			**Confidence:**	Low discrimination
SRF Organism						

Analysis Organisms and Tests to Separate:

Low Discrimination Organism	
Sphingomonas paucimobilis	SACCHAROSE(99),dMALTOSE(99),MOB(99),
Neisseria animaloris/zoodegmatis	
Neisseria animaloris	SACCHAROSE(1),dMALTOSE(1),MOB(1),dGLUf(99),
Neisseria zoodegmatis	SACCHAROSE(1),dMALTOSE(1),MOB(1),dGLUf(1),

Analysis Messages:

Contraindicating Typical Biopattern(s)

Sphingomonas paucimobilis	APPA(97),dMAL(76),dCEL(76),
Neisseria animaloris/zoodegmatis	CMT(1),AGLU(1),

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Apr 5, 2018 01:09 ICT
185 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: S37.6-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 0021001100200201
Organism Quantity:

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	(+)	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	+	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Mar 15, 2018 20:41 ICT
186
Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: 1719 9JAN2009-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 1040000100001000
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	**Card:**	GN	**Lot Number:**	2410259203	**Expires:**	Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed:	Mar 15, 2018 21:03 ICT	**Status:**	Final	**Analysis Time:**	10.25 hours
Selected Organism	95% Probability		**Moraxella group**			
	Bionumber:	1040000100001000			**Confidence:**	Very good identification
SRF Organism						

Analysis Organisms and Tests to Separate:

Moraxella group	
Moraxella lacunata	NAT(1),GELATIN(99),
Moraxella nonliquefaciens	NAT(1),GELATIN(1),
Moraxella osloensis	NAT(99),GELATIN(1),

Analysis Messages:

Contraindicating Typical Biopattern(s)

Moraxella group	APPA(1),

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Mar 15, 2018 20:41 ICT
187 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: 1719 9JAN2009-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 1040000100001000
Organism Quantity:

Biochemical Details

2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	+	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Mar 15, 2018 17:54 ICT
188
Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: 1726_5sep2006-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 1040001100040020
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information					
	Card:	GN	**Lot Number:** 2410259203	**Expires:**	Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed:	Mar 15, 2018 18:12 ICT	**Status:** Final	**Analysis Time:**	7.25 hours
Selected Organism	99% Probability		**Brevundimonas diminuta / vesicularis**		
	Bionumber:	1040001100040020		**Confidence:**	Excellent identification

SRF Organism

Analysis Organisms and Tests to Separate:

Brevundimonas diminuta / vesicularis	
Brevundimonas diminuta	dMALTOSE(1),ESCULIN(1),
Brevundimonas vesicularis	dMALTOSE(99),ESCULIN(99),

Analysis Messages:

Contraindicating Typical Biopattern(s)

Biochemical Details

2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	+	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	+	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Mar 15, 2018 16:51 ICT
189 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: 1736_26SEP2006-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 1460121100271000
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card: GN	Lot Number: 2410259203	Expires: Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed: Mar 15, 2018 17:07 ICT	Status: Final	Analysis Time: 7.00 hours
Selected Organism	90% Probability	Sphingomonas paucimobilis	
	Bionumber: 1460121100271000		Confidence: Good identification
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s)			
Sphingomonas paucimobilis NAGA(1),dGLU(76),dCEL(76),			

Biochemical Details

2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	+	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	+	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	+	42	SUCT	-	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Mar 15, 2018 15:17 ICT
190 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: 1741 26SEP2006-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 1460101100271020
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	**Card:**	GN	**Lot Number:**	2410259203	**Expires:**	Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed:	Mar 15, 2018 15:31 ICT	**Status:**	Final	**Analysis Time:**	5.00 hours
Selected Organism	99% Probability		**Elizabethkingia meningoseptica**			
	Bionumber:	1460101100271020			**Confidence:**	Excellent identification
SRF Organism						
Analysis Organisms and Tests to Separate:						
Analysis Messages:						
Contraindicating Typical Biopattern(s)						

Biochemical Details

2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	+	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	+	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	+	42	SUCT	-	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	+	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

Bioscience department, TISTR

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Mar 19, 2018 16:04 ICT
191 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: 1750 26 SEP2006-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 1060002100051020
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	**Card:**	GN	**Lot Number:**	2410259203	**Expires:**	Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed:	Mar 19, 2018 16:21 ICT	**Status:**	Final	**Analysis Time:**	5.50 hours
Selected Organism	95% Probability		**Chryseobacterium indologenes**			
	Bionumber:	1060002100051020			**Confidence:**	Very good identification
SRF Organism						
Analysis Organisms and Tests to Separate:						
Analysis Messages:						
Contraindicating Typical Biopattern(s)						
Chryseobacterium indologenes	AGLU(99),					

Biochemical Details

2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	+	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	+	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	+	44	AGAL	-	45	PHOS	+
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	+	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Mar 29, 2018 15:24 ICT
192 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: 1760 10JAN2007-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 1460101100231020
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card: GN	Lot Number: 2410259203	Expires: Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed: Mar 29, 2018 15:38 ICT	Status: Final	Analysis Time: 5.00 hours
Selected Organism	95% Probability	**Elizabethkingia meningoseptica**	
	Bionumber: 1460101100231020		**Confidence:** Very good identification
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s)			
Elizabethkingia meningoseptica	PHOS(99),		

Biochemical Details

2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	+	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	+	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	+	42	SUCT	-	43	NAGA	+	44	AGAL	(+)	45	PHOS	-
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	+	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Mar 19, 2018 14:41 ICT
193 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: 1763 12JUN2007-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 1460101100271020
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	**Card:**	GN	**Lot Number:** 2410259203	**Expires:**	Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed:	Mar 19, 2018 14:56 ICT	**Status:** Final	**Analysis Time:**	5.00 hours
Selected Organism	99% Probability		**Elizabethkingia meningoseptica**		
	Bionumber:	1460101100271020		**Confidence:**	Excellent identification
SRF Organism					
Analysis Organisms and Tests to Separate:					
Analysis Messages:					
Contraindicating Typical Biopattern(s)					

Biochemical Details

2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	+	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	+	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	+	42	SUCT	-	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	+	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Mar 19, 2018 14:59 ICT
194 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: 1763 28 NOV2007-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 1460101100031000
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	**Card:**	GN	**Lot Number:**	2410259203	**Expires:**	Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed:	Mar 19, 2018 15:14 ICT	**Status:**	Final	**Analysis Time:**	5.00 hours
Selected Organism	99% Probability		**Elizabethkingia meningoseptica**			
	Bionumber:	1460101100031000			**Confidence:**	Excellent identification
SRF Organism						
Analysis Organisms and Tests to Separate:						
Analysis Messages:						
Contraindicating Typical Biopattern(s)						

Biochemical Details

2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	+	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	+	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	(-)	42	SUCT	-	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	(-)
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Mar 19, 2018 16:22 ICT
195 Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: 1764 28NOV2007-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 1060000100051020
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	**Card:**	GN	**Lot Number:**	2410259203	**Expires:**	Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed:	Mar 19, 2018 16:38 ICT	**Status:**	Final	**Analysis Time:**	7.00 hours
Selected Organism	94% Probability		**Shewanella putrefaciens**			
	Bionumber:	1060000100051020			**Confidence:**	Very good identification

SRF Organism	
Analysis Organisms and Tests to Separate:	
Analysis Messages:	
Contraindicating Typical Biopattern(s)	
Shewanella putrefaciens	ELLM(82),GlyA(18),

Biochemical Details

2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	+	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	+	44	AGAL	-	45	PHOS	+
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	+	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Mar 19, 2018 17:46 ICT
196
Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: 1769 13 JUN2007-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 1060201100051000
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card: GN	Lot Number: 2410259203	Expires: Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed: Mar 19, 2018 18:05 ICT	Status: Final	Analysis Time: 7.25 hours
Selected Organism	93% Probability	**Shewanella putrefaciens**	
	Bionumber: 1060201100051000		Confidence: Very good identification
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s)			
Shewanella putrefaciens	ELLM(82),GlyA(18),dMAL(18),		

Biochemical Details

2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	+	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	+	44	AGAL	-	45	PHOS	(+)
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	(-)	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Mar 19, 2018 17:12 ICT
197
Autoprint
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: 1770 3 APR2007-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000148FF45F (8831)

Bionumber: 1060001100011020
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	**Card:**	GN	**Lot Number:** 2410259203	**Expires:**	Aug 12, 2018 12:00 ICT
	Completed:	Mar 19, 2018 17:30 ICT	**Status:** Final	**Analysis Time:**	7.00 hours
Selected Organism	94% Probability		**Shewanella putrefaciens**		
	Bionumber:	1060001100011020		**Confidence:**	Very good identification
SRF Organism					
Analysis Organisms and Tests to Separate:					
Analysis Messages:					
Contraindicating Typical Biopattern(s)					
Shewanella putrefaciens	ELLM(82),GlyA(18),				

Biochemical Details

2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	+	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	+	44	AGAL	-	45	PHOS	(-)
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	+	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

ภาคผนวก ง

คู่มือการใช้ชุดทดสอบ API 20E API 20NE และ API ZYM

REF 20 100 / 20 160

07584D - GB - 2002/10

api® 20 E

IVD

199

Identification system for *Enterobacteriaceae* and other non-fastidious Gram-negative rods

SUMMARY AND EXPLANATION

API 20 E is a standardized identification system for *Enterobacteriaceae* and other non-fastidious, Gram-negative rods which uses 21 miniaturized biochemical tests and a database. The complete list of those organisms that it is possible to identify with this system is given in the Identification Table at the end of this package insert.

PRINCIPLE

The API 20 E strip consists of 20 microtubes containing dehydrated substrates. These tests are inoculated with a bacterial suspension that reconstitutes the media. During incubation, metabolism produces color changes that are either spontaneous or revealed by the addition of reagents.
The reactions are read according to the Reading Table and the identification is obtained by referring to the Analytical Profile Index or using the identification software.

CONTENT OF THE KIT

Kit for 25 tests (ref. 20 100)

- 25 API 20 E strips
- 25 incubation boxes
- 25 result sheets
- 1 clip seal
- 1 package insert

Kit for 100 tests (ref. 20 160)

- 100 API 20 E strips (4x25 strips)
- 100 incubation boxes
- 100 result sheets
- 1 clip seal
- 1 package insert

COMPOSITION OF THE STRIP

The composition of the API 20 E strip is given in the Reading Table of this package insert.

REAGENTS AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Reagents :

- API NaCl 0.85 % Medium, 5 ml (Ref. 20 230) or API Suspension Medium, 5 ml (Ref. 20 150)
- API 20 E reagent kit (Ref. 20 120) or individual reagents : TDA (Ref. 70 402)
  JAMES (Ref. 70 542)
  VP 1 + VP 2 (Ref. 70 422)
  NIT 1 + NIT 2 (Ref. 70 442)
- Zn reagent (Ref. 70 380)
- Oxidase (Ref. 55 635*)
  * reference not sold in certain countries : use an equivalent reagent.
- Mineral oil (Ref. 70 100)
- API 20 E Analytical Profile Index (Ref. 20 190) or identification software (consult bioMérieux)

Material :

- Pipettes or PSIpettes
- Ampule protector
- Ampule rack
- General microbiology laboratory equipment

POSSIBLE ADDITIONAL REAGENTS :

- API OF Medium (Ref. 50 110) :
  Test for the determination of fermentative or oxidative metabolism.
- API M Medium (Ref. 50 120) :
  Test for motility of facultative anaerobic bacteria.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- **For *in vitro* diagnostic use and microbiological control.**
- **For professional use only.**
- This kit contains products of animal origin. Certified knowledge of the origin and/or sanitary state of the animals does not totally guarantee the absence of transmissible pathogenic agents. It is therefore recommended that these products be treated as potentially infectious, and handled observing the usual safety precautions (do not ingest or inhale).
- All specimens, microbial cultures and inoculated products should be considered infectious and handled appropriately. Aseptic technique and usual precautions for handling the bacterial group studied should be observed throughout this procedure. Refer to "NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline* - December 1997". For additional handling precautions, refer to "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication No. (CDC) 93-8395, 3rd Edition (May 1993)", or to the regulations currently in use in each country.
- Do not use reagents past the expiration date.
- Before use, check that the packaging of the various components is intact.
- Do not use strips which have been damaged : cupules deformed, desiccant sachet open, ...
- The performance data presented were obtained using the procedure indicated in this package insert. Any change or modification in the procedure may affect the results.
- Interpretation of the test results should be made taking into consideration the patient history, the source of the specimen, colonial and microscopic morphology of the strain and, if necessary, the results of any other tests performed, particularly the antimicrobial susceptibility patterns.

STORAGE CONDITIONS

The strips are supplied in an aluminum pouch with desiccant sachets.
Once opened (*), the pouch should be re-sealed using the clip seal (included in the kit) to preserve the remaining strips with the desiccant sachets : place the open end of the pouch along the seal and carefully clamp between the two parts. The strips may then be kept for up to **10 months after the pouch has been opened**, at 2-8°C (or until the expiration date indicated on the packaging, if this comes before).
(*) *Recommended method for opening the pouches* : cut open the pouch just below the seal while holding the pouch upright, in order to avoid damaging the desiccant sachets.

SPECIMENS (COLLECTION AND PREPARATION)

API 20 E is not for use directly with clinical or other specimens.
The microorganisms to be identified must first be isolated on a culture medium adapted to the culture of *Enterobacteriaceae* and/or non-fastidious Gram-negative rods, according to standard microbiological techniques.

INSTRUCTIONS FOR USE

Oxidase test

The oxidase test must be performed according to the manufacturer's instructions for use. The result should be recorded on the result sheet as it is an integral part of the final profile (21st identification test).

Preparation of the strip

- Prepare an incubation box (tray and lid) and distribute about 5 ml of distilled water or demineralized water [or any water without additives or chemicals which may release gases (e.g., Cl_2, CO_2, etc.)] into the honeycombed wells of the tray to create a humid atmosphere.
- Record the strain reference on the elongated flap of the tray. (Do not record the reference on the lid as it may be misplaced during the procedure.)
- Remove the strip from its packaging.
- Place the strip in the incubation box.

NOTE : API 20 E should only be used with *Enterobacteriaceae* and/or non-fastidious Gram-negative rods. Fastidious organisms having demanding nutritional requirements and requiring appropriate handling precautions (i.e., *Brucella* and *Francisella*) are not included in the API 20 E database. Alternative procedures must be used to exclude or confirm their presence.

Preparation of the inoculum

- Open an ampule of API NaCl 0.85 % Medium (5 ml) or an ampule of API Suspension Medium (5 ml) as indicated in the paragraph "Warnings and Precautions" of the package insert for these products, or use any tube containing 5 ml of sterile saline or sterile distilled water, without additives.
- Using a pipette or PSIpette, remove a single well-isolated colony from an isolation plate. It is recommended to use young cultures (18-24 hours old).
- Carefully emulsify to achieve a homogeneous bacterial suspension.
  This suspension must be used immediately after preparation.

NOTE : most *Vibrio* species are halophilous. If a *Vibrio* is suspected, suspend the bacteria in API NaCl 0.85 % Medium.

Inoculation of the strip

- Using the same pipette, fill both tube and cupule of the tests CIT, VP and GEL with the bacterial suspension.
- Fill only the tube (and not the cupule) of the other tests.
- Create anaerobiosis in the tests ADH, LDC, ODC, H_2S and URE by overlaying with mineral oil.
- Close the incubation box.
- Incubate at 36°C ± 2°C for 18-24 hours.

READING AND INTERPRETATION

Reading the strip

- After the incubation period, read the strip by referring to the Reading Table.
- If 3 or more tests (GLU test + or –) are positive, record all the spontaneous reactions on the result sheet and then reveal the tests which require the addition of reagents :
  - TDA Test : add 1 drop of TDA reagent. A **reddish brown** color indicates a **positive** reaction to be recorded on the result sheet.
  - IND Test : add 1 drop of JAMES reagent. A **pink** color developed in the whole cupule indicates a **positive** reaction to be recorded on the result sheet.
  - VP Test : add 1 drop each of VP 1 and VP 2 reagents. Wait at least 10 minutes. A **pink** or **red** color indicates a **positive** reaction to be recorded on the result sheet. If a **slightly pink** color appears after 10 minutes, the reaction should be considered **negative**.

  NOTE : The indole production test must be performed last since this reaction releases gaseous products which interfere with the interpretation of other tests on the strip. The plastic incubation lid should not be replaced after the addition of the reagent.
- If the number of positive tests (including the GLU test) before adding the reagents is less than 3 :
  - Reincubate the strip for a further 24 hours (± 2 hours) without adding any reagents.
  - Reveal the tests requiring the addition of reagents (see previous paragraph).
  - To complete the identification, it may be necessary to perform supplementary tests (refer to Identification paragraph).

Interpretation

Identification is obtained with the **numerical profile**.

- Determination of the numerical profile :
  On the result sheet, the tests are separated into groups of 3 and a value 1, 2 or 4 is indicated for each. By adding together the values corresponding to positive reactions within each group, a 7-digit profile number is obtained for the 20 tests of the API 20 E strip. The oxidase reaction constitutes the 21st test and has a value of 4 if it is positive.
- Identification :
  This is performed using the database (V4.0)
  * with the Analytical Profile Index :
    - Look up the numerical profile in the list of profiles.
  * with the identification software :
    - Enter the 7-digit numerical profile manually via the keyboard.

In some cases, the 7-digit profile is not discriminatory enough and the following supplementary tests need to be carried out :

- Reduction of nitrates to nitrites (NO_2) and N_2 gas (N_2) : add 1 drop each of NIT 1 and NIT 2 reagents to the GLU tube. Wait 2 to 5 minutes. A **red** color indicates a **positive** reaction (NO_2). A negative reaction (yellow) may be due to the reduction to nitrogen (as sometimes evidenced by gas bubbles) : add 2 to 3 mg of Zn reagent to the GLU tube. After 5 minutes, if the tube remains **yellow** this indicates a **positive** reaction (N_2) to be recorded on the result sheet. If the test turns **orange-red**, this is a **negative** reaction : the nitrates still present in the tube have been reduced by the Zinc. This reaction is useful when testing Gram-negative, oxidase positive rods.

NOTE : For the same reason as the indole test (see the note in the paragraph "Reading the strip"), the nitrate reduction test must be performed last.

- Motility (MOB) : Inoculate an ampule of API M Medium (see package insert).
- Growth on MacConkey agar medium (McC) : Streak a MacConkey agar plate (see package insert).
- Oxidation of glucose (OF-O) : Inoculate an ampule of API OF Medium (see package insert).
- Fermentation of glucose (OF-F) : Inoculate an ampule of API OF Medium (see package insert).

These supplementary tests, indicated in the introduction section (Profile coding) of the Analytical Profile Index, may be used to form a 9-digit profile. Identification is then obtained using the identification software.

5 315 173 (57) ***Enterobacter gergoviae***

Further tests may be proposed in case of low discrimination. Refer to the identification software or Analytical Profile Index.

QUALITY CONTROL

The media, strips, and reagents are systematically quality controlled at various stages of their manufacture. For those users who wish to perform their own quality control tests with the strip, it is preferable to use the strain **1. *Escherichia coli* ATCC 25922** or else one of the following strains :

2. *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 51331
3. *Enterobacter cloacae* ATCC 13047
4. *Proteus mirabilis* ATCC 35659
5. *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* ATCC 35657

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H_2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO_2	N_2*
1.	+	–	+	+	–	–	–	–	+	–	–	+	+	–	+	+	–	+	–	+	+	–
2.	+	–	V	–	V	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3.	+	+	–	+	+	–	–	–	–	+	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	–
4.	–	–	–	+	V	+	+	+	–	–	V	+	–	–	–	–	V	–	–	–	+	–
5.	+	–	+	–	+	–	V	–	–	V	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–

* The N_2 (+) state may be observed for the strain ATCC 13047 and the strain ATCC 25922.

- Profile obtained after 24-48 hours of incubation for the strain ATCC 51331, using colonies grown on Trypticase Soy agar + blood.
- Profiles obtained after 18-24 hours of incubation for the other strains, using colonies grown on Trypticase Soy agar + blood.
- Bacterial suspensions prepared in API NaCl 0.85 % Medium.

It is the responsibility of the user to perform Quality Control in accordance with any local applicable regulations.

LIMITATIONS OF THE METHOD

- The API 20 E system is intended uniquely for the identification of *Enterobacteriaceae* and those non-fastidious, Gram-negative rods included in the database (see Identification Table at the end of this package insert). It cannot be used to identify any other microorganisms or to exclude their presence.
- Discrepancies with respect to conventional methods may be observed. They are due to the different principles of the reactions used in the API technique. In addition, substrate variations exist that also account for percentage differences.
- On rare occasions, the glucose reactions for organisms such as *Klebsiella* or *Proteus* may revert from positive to negative, in which instance a bluish-green color is seen. This reaction will be recorded as a negative reaction. Such occurrences are reflected in the percentages indicated in the Identification Table.
- If *Salmonella* or *Shigella* are identified, serological identification must be performed to confirm the bacterial identification.
- Only pure cultures of a single organism should be used.

RANGE OF EXPECTED RESULTS

Consult the Identification Table at the end of this package insert for the range of expected results for the various biochemical reactions.

PERFORMANCE

- *Enterobacteriaceae* :
  5514 collection strains and strains of various origins belonging to species included in the database were tested:
  - 92.80 % of the strains were correctly identified (with or without supplementary tests).
  - 4.61 % of the strains were not identified.
  - 2.59 % of the strains were misidentified.
- Other non-fastidious Gram-negative rods :
  2386 collection strains and strains of various origins belonging to species included in the database were tested :
  - 90.32 % of the strains were correctly identified (with or without supplementary tests).
  - 6.16 % of the strains were not identified.
  - 3.52 % of the strains were misidentified.

WASTE DISPOSAL

It is the responsibility of each laboratory to handle waste and effluents produced according to their type and degree of hazardousness and to treat and dispose of them (or have them treated and disposed of) in accordance with any applicable regulations.

WARRANTY

bioMérieux disclaims all warranties, express or implied, including any implied warranties of MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR USE. bioMérieux shall not be liable for any incidental or consequential damages. IN NO EVENT SHALL BIOMERIEUX'S LIABLITY TO CUSTOMER UNDER ANY CLAIM EXCEED A REFUND OF THE AMOUNT PAID TO BIOMERIEUX FOR THE PRODUCT OR SERVICE WHICH IS THE SUBJECT OF THE CLAIM.

202

READING TABLE

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
ONPG	2-nitrophenyl-ßD-galactopyranoside	0.223	ß-galactosidase (Ortho NitroPhenyl-ßD-Galactopyranosidase)	colorless	yellow (1)
ADH	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	yellow	red / orange (2)
LDC	L-lysine	1.9	Lysine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
ODC	L-ornithine	1.9	Ornithine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
CIT	trisodium citrate	0.756	CITrate utilization	pale green / yellow	blue-green / blue (3)
H_2S	sodium thiosulfate	0.075	H_2S production	colorless / greyish	black deposit / thin line
URE	urea	0.76	UREase	yellow	red / orange (2)
TDA	L-tryptophane	0.38	Tryptophane DeAminase	TDA / immediate	
				yellow	reddish brown
IND	L-tryptophane	0.19	INDole production	JAMES / immediate	
				colorless pale green / yellow	pink
VP	sodium pyruvate	1.9	acetoin production (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min	
				colorless	pink / red (5)
GEL	Gelatin (bovine origin)	0.6	GELatinase	no diffusion	diffusion of black pigment
GLU	D-glucose	1.9	fermentation / oxidation (GLUcose) (4)	blue / blue-green	yellow / greyish yellow
MAN	D-mannitol	1.9	fermentation / oxidation (MANnitol) (4)	blue / blue-green	yellow
INO	inositol	1.9	fermentation / oxidation (INOsitol) (4)	blue / blue-green	yellow
SOR	D-sorbitol	1.9	fermentation / oxidation (SORbitol) (4)	blue / blue-green	yellow
RHA	L-rhamnose	1.9	fermentation / oxidation (RHAmnose) (4)	blue / blue-green	yellow
SAC	D-sucrose	1.9	fermentation / oxidation (SACcharose) (4)	blue / blue-green	yellow
MEL	D-melibiose	1.9	fermentation / oxidation (MELibiose) (4)	blue / blue-green	yellow
AMY	amygdalin	0.57	fermentation / oxidation (AMYgdalin) (4)	blue / blue-green	yellow
ARA	L-arabinose	1.9	fermentation / oxidation (ARAbinose) (4)	blue / blue-green	yellow
OX	(see oxidase test package insert)		cytochrome-OXidase	(see oxidase test package insert)	

(1) A very pale yellow should also be considered positive.
(2) An orange color after 36-48 hours incubation must be considered negative.
(3) Reading made in the cupule (aerobic).
(4) Fermentation begins in the lower portion of the tubes, oxidation begins in the cupule.
(5) A slightly pink color after 10 minutes should be considered negative.

- The quantities indicated may be adjusted depending on the titer of the raw materials used.
- Certain cupules contain products of animal origin, notably peptones.

SUPPLEMENTARY TESTS

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
Nitrate reduction GLU tube	potassium nitrate	0.076	NO_2 production	NIT 1 + NIT 2 / 2-5 min yellow	red
			reduction to N_2 gas	Zn / 5 min orange-red	yellow
MOB	API M Medium or microscope		motility	non-motile	motile
McC	MacConkey medium		growth	absence	presence
OF-F	glucose (API OF Medium)		fermentation : under mineral oil	green	yellow
OF-O			oxidation : exposed to the air	green	yellow

PROCEDURE p. I
IDENTIFICATION TABLE p. II
LITERATURE REFERENCES p. IV
INDEX OF SYMBOLS p. V

BIOMÉRIEUX

bioMérieux® sa
au capital de 11 879 045 €
673 620 399 RCS LYON
69280 Marcy-l'Etoile / France
Tel. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
http://www.biomerieux.com

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tel. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11

CE

Printed in France

The logo is a registered and protected trademark of bioMérieux sa or one of its subsidiaries.

REF 20 050

07615H - GB - 2003/10

api® 20 NE

IVD

204

Identification system for non-fastidious, non-enteric Gram-negative rods

SUMMARY AND EXPLANATION

API 20 NE is a standardized system for the identification of non-fastidious, non-enteric Gram-negative rods (e.g. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.), combining 8 conventional tests, 12 assimilation tests and a database. The complete list of those organisms that it is possible to identify with this system is given in the Identification Table at the end of this package insert.

PRINCIPLE

The API 20 NE strip consists of 20 microtubes containing dehydrated substrates.
The conventional tests are inoculated with a saline bacterial suspension which reconstitutes the media. During incubation, metabolism produces color changes that are either spontaneous or revealed by the addition of reagents.
The assimilation tests are inoculated with a minimal medium and the bacteria grow if they are capable of utilizing the corresponding substrate.
The reactions are read according to the Reading Table and the identification is obtained by referring to the Analytical Profile Index or using the identification software.

CONTENT OF THE KIT (Kit for 25 tests)

- 25 API 20 NE strips
- 25 incubation boxes
- 25 ampules of API AUX Medium
- 25 result sheets
- 1 package insert

COMPOSITION

Strip

The composition of the API 20 NE strip is given in the Reading Table of this package insert.

Medium

API AUX Medium 7 ml	Ammonium sulphate	2 g
	Agar	1.5 g
	Vitamin solution	10.5 ml
	Trace elements	10 ml
	Monosodium phosphate	6.24 g
	Potassium chloride	1.5 g
	Demineralized water to make	1000 ml
	Final pH : 7.0-7.2	

REAGENTS AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Reagents :

- API NaCl 0.85 % Medium, 2 ml (Ref. 20 070)
- Reagents : JAMES (Ref. 70 542)
  NIT 1 + NIT 2 (Ref. 70 442)
  Zn (Ref. 70 380)
- Oxidase (Ref. 55 635*)
  * reference not sold in certain countries : use an equivalent reagent.
- Mineral oil (Ref. 70 100)
- McFarland Standard (Ref. 70 900) No. 0.5
- API 20 NE Analytical Profile Index (Ref. 20 090) or identification software (consult bioMérieux)

Material :

- Pipettes or PSIpettes
- Ampule protector
- Ampule rack
- General microbiology laboratory equipment

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- **For *in vitro* diagnostic use and microbiological control.**
- **For professional use only.**
- This kit contains products of animal origin. Certified knowledge of the origin and/or sanitary state of the animals does not totally guarantee the absence of transmissible pathogenic agents. It is therefore recommended that these products be treated as potentially infectious, and handled observing the usual safety precautions (do not ingest or inhale).
- All specimens, microbial cultures and inoculated products should be considered infectious and handled appropriately. Aseptic technique and usual precautions for handling the bacterial group studied should be observed throughout this procedure. Refer to "NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline* - December 1997". For additional handling precautions, refer to "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication No. (CDC) 93-8395, 3rd Edition (May 1993)", or to the regulations currently in use in each country.
- Do not use reagents past the expiration date.
- Before use, check that the packaging and components are intact.
- Do not use strips which have been damaged : cupules deformed, etc.
- Open ampules carefully as follows :

  - Place the ampule in the ampule protector.
  - Hold the protected ampule in one hand in a vertical position (white plastic cap uppermost).
  - Press the cap down as far as possible.
  - Cover the flattened part of the cap with the upper part of the thumb.
  - Apply thumb pressure in an outward motion to the base of the flattened part of the cap to snap off the top of the ampule inside the cap.
  - Take the ampule out of the ampule protector and put the protector aside for subsequent use.
  - Carefully remove the cap.
- The performance data presented were obtained using the procedure indicated in this package insert. Any change or modification in the procedure may affect the results.
- Interpretation of the test results should be made taking into consideration the patient history, the source of the specimen, colonial and microscopic morphology of the strain and, if necessary, the results of any other tests performed, particularly the antimicrobial susceptibility patterns.

STORAGE CONDITIONS

The strips and media should be stored at 2-8°C until the expiration date indicated on the packaging.

SPECIMENS (COLLECTION AND PREPARATION)

API 20 NE is not for use directly with clinical or other specimens.
The microorganisms to be identified must first be isolated on a suitable culture medium (e.g., Trypticase Soy agar) according to standard microbiological techniques.

INSTRUCTIONS FOR USE

Oxidase test

The oxidase test must be performed according to the manufacturer's instructions for use. The result should be recorded on the result sheet as it is an integral part of the final profile (21st identification test).

Selection of colonies

API 20 NE should only be used with non-fastidious Gram-negative rods which do not belong to the *Enterobacteriaceae*.

NOTE 1 : Some non-enteric Gram-negative rods are oxidase negative (*S. maltophilia*, *Acinetobacter*...). These microorganisms may also be identified with API 20 NE but their selection must be based on other bacteriological or clinical criteria.

NOTE 2 : Fastidious organisms having demanding nutritional requirements and requiring appropriate handling precautions (i.e. *Brucella* and *Francisella*) are not included in the API 20 NE database. Alternative procedures must be used to exclude or confirm their presence.

Preparation of the strip

- Prepare an incubation box, tray and lid, and distribute about 5 ml of distilled water or demineralized water [or any water without additives or chemicals which may release gases (e.g. Cl_2, CO_2, etc.)] into the bottom of the tray to create a humid atmosphere.
- Record the specimen number on the elongated flap of the tray. (Do not record the number on the lid as it may be misplaced during the procedure.)
- Remove the strip from its individual packaging.
- Place the strip in the incubation box.

Preparation of the inoculum

- Open an ampule of API NaCl 0.85 % Medium (2 ml) as indicated in the paragraph "Warnings and Precautions" of the package insert for this product, or use any tube containing 2 ml of 0.85 % physiological saline without additives.
- Using a pipette or PSIpette, pick up 1-4 colonies of identical morphology from the agar plate, either by suction or by successive touches. It is recommended to use young cultures (18-24 hours old).
- Prepare a suspension with a turbidity equivalent to 0.5 McFarland. This suspension must be used immediately after preparation.

NOTE : It is very important that the density of the inoculum be adjusted to 0.5 McFarland ; the API 20 NE strip tests may otherwise not function correctly. In particular, a weaker inoculum may lead to false negative results. Do not touch the cupules while working with the strip and do not leave the strip exposed to air for a long period of time after inoculation.

Inoculation of the strip

- Inoculate tests NO_3 to PNPG by distributing the saline suspension into the tubes (and not the cupules) using the same pipette. To avoid the formation of bubbles at the base of the tubes, tilt the strip slightly forwards and place the tip of the pipette or PSIpette against the side of the cupule.
- Open an ampule of API AUX Medium as indicated in the paragraph "Warnings and Precautions" and add approximately 200 µl of the remaining saline suspension to the ampule. Homogenize well with the pipette, avoiding the formation of bubbles.
- Fill the tubes and cupules of tests GLU to PAC with the suspension. Take care to leave a flat or slightly convex, but not concave, meniscus. Cupules under or overfilled may give incorrect results.
- Add mineral oil to the cupules of the 3 underlined tests (GLU, ADH and URE) until a convex meniscus is formed.
- Close the incubation box and incubate at 29°C ± 2°C for 24 hours (± 2 hours).

READING AND INTERPRETATION

Reading the strip

- After the incubation period, read the strip by referring to the Reading Table.
- Record all spontaneous reactions (GLU, ADH, URE, ESC, GEL and PNPG) on the result sheet.
- The reading of the two tests NO_3 and TRP should be performed whilst protecting the assimilation tests from airborne contamination. To do this, cover the assimilation tests with the incubation box lid during the reading of the NO_3 and TRP tests.
- **NO_3 test :**
  - Add 1 drop of NIT 1 and 1 drop of NIT 2 reagents to the NO_3 cupule.
  - After 5 minutes, a **red** color indicates a **positive** reaction to be recorded on the result sheet.
  - A negative reaction may be due to the production of nitrogen (indicated by the presence of tiny bubbles) : add 2-3 mg of Zn reagent to the NO_3 cupule.
  - After 5 minutes, a cupule remaining **colorless** indicates a **positive** reaction to be recorded on the result sheet. If the cupule turns **pink-red**, the reaction is **negative** as nitrates were present in the tube and were reduced to nitrite by the zinc.

  The reaction used for the identification of the bacterium is the reduction of nitrates. It is positive when either of the above reactions (production of NO_2 or N_2) is positive.

  The production of N_2 may, however, be useful alone as a supplementary test (refer to the Analytical Profile Index).
- **TRP test :**
  Add 1 drop of JAMES reagent. The reaction takes place immediately : a **pink** color which develops in the whole cupule indicates a **positive** reaction to be recorded on the result sheet.

• **Assimilation tests :**
Observe the bacterial growth. An **opaque** cupule indicates a **positive** reaction.
Occasionally, a cupule may show weak growth. In this case, the results should be recorded as ∓ or ± by comparing the intensity to that of the other tests on the strip.
Once these readings have been made, identification should be possible as indicated in the paragraph "Interpretation". However, in the following cases, the strip must be reincubated :
- if the profile cannot be found in the API 20 NE Analytical Profile Index
- if the following note is indicated for the profile obtained :

IDENTIFICATION NOT VALID
BEFORE 48-HR INCUBATION

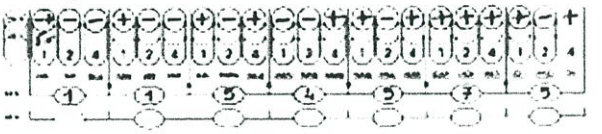
Using a pipette or PSIpette, remove the NIT 1, NIT 2 and JAMES reagents by suction and immediately cover tests NO_3 and TRP with mineral oil so that a convex meniscus is formed. Reincubate the strip at 29°C ± 2°C for a further 24 hours and read the all the tests again, except the first 3 (NO_3, TRP and GLU) which should only be read once at 24 hours.

Interpretation

Identification is obtained with the **numerical profile.** 206

• Determination of the numerical profile :
On the result sheet, the tests are separated into groups of 3 and a number 1, 2 or 4 is indicated for each. By adding the values corresponding to positive reactions within each group, a 7-digit number is obtained ; the oxidase reaction constitutes the 21st test and has a value of 4 if it is positive.

• Identification :
This is performed using the database (V6.0)
* with the Analytical Profile Index :
- Look up the numerical profile in the list of profiles.
* with the identification software :
- Enter the 7-digit numerical profile manually via the keyboard.



1 154 575 *Pseudomonas aeruginosa*

QUALITY CONTROL

The media, strips, and reagents are systematically quality controlled at various stages of their manufacture. For those who wish to perform their own quality control tests with the strip, it is preferable to use the strain **1. *Sphingobacterium multivorum* ATCC 35656** or else one of the following strains :

2. *Aeromonas hydrophila* ATCC 35654
3. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
4. *Alcaligenes faecalis* ATCC 35655

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA

	NO_3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX
1.	–	–	–	–	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	–	–	–	–	–	–	+
2.	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–*	–	+
3.	+	–	–	V	V	–	+	–	+	–	–	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+
4.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+	+	+	+

* Weak reactions may occur.

Profiles for tests ADH to PAC obtained after 48 hours of incubation after culture of the colonies on Trypticase Soy agar.

It is the responsibility of the user to perform Quality Control in accordance with any local applicable regulations.

LIMITATIONS OF THE METHOD

- The API 20 NE system is intended uniquely for the identification of those non-fastidious, non-enteric Gram-negative rods included in the database (see Identification Table at the end of this package insert). It cannot be used to identify any other microorganisms or to exclude their presence.
- Only pure cultures of a single organism should be used.

RANGE OF EXPECTED RESULTS

Consult the Identification Table at the end of this package insert for the range of expected results for the various biochemical reactions.

PERFORMANCE

5728 collection strains and strains of various origins belonging to species included in the database were tested :
- 92.53 % of the strains were correctly identified (with or without supplementary tests).
- 3.13 % of the strains were not identified.
- 4.34 % of the strains were misidentified.

WASTE DISPOSAL

Unused ampules of API AUX Medium may be considered as non hazardous waste and disposed of accordingly.
Dispose of all used or unused reagents (other than the ampules of API AUX Medium) as well as any other contaminated disposable materials following procedures for infectious or potentially infectious products.
It is the responsibility of each laboratory to handle waste and effluents produced according to their type and degree of hazardousness and to treat and dispose of them (or have them treated and disposed of) in accordance with any applicable regulations.

WARRANTY

bioMérieux disclaims all warranties, express or implied, including any implied warranties of MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR USE. bioMérieux shall not be liable for any incidental or consequential damages. IN NO EVENT SHALL BIOMERIEUX'S LIABLITY TO CUSTOMER UNDER ANY CLAIM EXCEED A REFUND OF THE AMOUNT PAID TO BIOMERIEUX FOR THE PRODUCT OR SERVICE WHICH IS THE SUBJECT OF THE CLAIM.

READING TABLE

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
NO_3	potassium nitrate	0.136	reduction of nitrates to nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min colorless	pink-red
			reduction of nitrates to nitrogen	Zn / 5 min pink	colorless
TRP	L-tryptophane	0.2	indole production (TRyptoPhane)	JAMES / immediate colorless pale green / yellow	pink
GLU	D-glucose	1.92	fermentation (GLUcose)	blue to green	yellow
ADH	L-arginine	1.92	Arginine DiHydrolase	yellow	orange / pink / red
URE	urea	0.76	UREase	yellow	orange / pink / red
ESC	esculin ferric citrate	0.56 0.072	hydrolysis (β-glucosidase) (ESCulin)	yellow	grey / brown / black
GEL	gelatin (bovine origin)	0.6	hydrolysis (protease) (GELatin)	no pigment diffusion	diffusion of black pigment
PNPG	4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	0.22	β-galactosidase (Para-NitroPhenyl-βD-Galactopyranosidase)	colorless	yellow
GLU	D-glucose	1.56	assimilation (GLUcose)	transparent	opaque
ARA	L-arabinose	1.4	assimilation (ARAbinose)	transparent	opaque
MNE	D-mannose	1.4	assimilation (MaNnosE)	transparent	opaque
MAN	D-mannitol	1.36	assimilation (MANnitol)	transparent	opaque
NAG	N-acetyl-glucosamine	1.28	assimilation (N-Acetyl-Glucosamine)	transparent	opaque
MAL	D-maltose	1.4	assimilation (MALtose)	transparent	opaque
GNT	potassium gluconate	1.84	assimilation (potassium GluconaTe)	transparent	opaque
CAP	capric acid	0.78	assimilation (CAPric acid)	transparent	opaque
ADI	adipic acid	1.12	assimilation (ADIpic acid)	transparent	opaque
MLT	malic acid	1.56	assimilation (MaLaTe)	transparent	opaque
CIT	trisodium citrate	2.28	assimilation (trisodium CITrate)	transparent	opaque
PAC	phenylacetic acid	0.8	assimilation (PhenylACetic acid)	transparent	opaque
OX	(see oxidase test package insert)	-	cytochrome oxidase	(see oxidase test package insert)	

- The quantities indicated may be adjusted depending on the titer of the raw materials used.
- Certain cupules contain products of animal origin, notably peptones.

PROCEDURE p. I
IDENTIFICATION TABLE p. II
LITERATURE REFERENCES p. III
INDEX OF SYMBOLS p. IV

BIOMÉRIEUX

bioMérieux® sa
au capital de 11 879 045 €
673 620 399 RCS LYON
69280 Marcy-l'Etoile / France
Tel. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
http://www.biomerieux.com

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tel. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11

CE

Printed in France

The logo is a registered and protected trademark of bioMérieux sa or one of its subsidiaries.

api® ZYM

208

System for the research of enzymatic activity

SUMMARY AND EXPLANATION

API ZYM is a semi-quantitative micromethod designed for the research of enzymatic activities. The technique is applicable to all specimens (microorganisms, cell suspensions, tissues, biological fluids, etc.). It allows the systematic and rapid study of 19 enzymatic reactions using very small sample quantities. The system consists of a strip with 20 microwells (cupules), the base of which contains the enzymatic substrate and its buffer. This base allows contact between the enzyme and the generally insoluble substrate.
API ZYM has not been developed in view of achieving the precision of spectrophotometric or electrophoretic procedures but has mainly been developed to permit the detection of enzymatic activities in a complex sample which has not been purified. It can be used to screen specimens, thus providing a spectrum of enzymatic determinations which can be further tested by spectrophotometric and/or electrophoretic procedures.

PRINCIPLE

The API ZYM strip is composed of 20 cupules, specially designed for the study of enzymatic reactions. The base of the strip, containing synthetic substrates, is made of non-woven fibers. This base allows enzymatic reactions to take place, even if the substrates are insoluble.
The enzymatic tests are inoculated with a dense suspension of organisms, which is used to rehydrate the enzymatic substrates. The metabolic end products produced during the incubation period are detected through colored reactions revealed by the addition of reagents.
The reactions are read according to the Reading Table.

CONTENT OF THE KIT (Kit for 25 tests) :

- 25 API ZYM strips
- 25 incubation boxes
- 25 result sheets
- 1 package insert

COMPOSITION OF THE STRIP

The composition of the API ZYM strip is given in the Reading Table of this package insert.

REAGENTS AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Reagents :

- API Suspension Medium, 2 ml (Ref. 70 700) or API NaCl 0.85 % Medium, 2 ml (Ref. 20 070)
- ZYM A Reagent (Ref. 70 494) and ZYM B Reagent (Ref. 70 493)
- McFarland Standard (ref. 70 900) or DENSIMAT (ref. 99 234)

Material :

- Pipettes or PSIpettes
- Ampule rack
- Ampule protector
- General microbiology laboratory equipment

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- **This system is designed for the research of enzymatic activity only. Not for use in diagnostic procedures.**
- **For professional use only.**
- All specimens, microbial cultures and inoculated products should be considered infectious and handled appropriately. Aseptic technique and usual precautions for handling the bacterial group studied should be observed throughout this procedure. Refer to "CLSI M29-A, *Protection of Laboratory Workers from; Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline* – Current revision". For additional handling precautions, refer to "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – CDC/NIH – Latest edition", or to the regulations currently in use in each country.
- Do not use reagents past the expiry date.
- Before use, check that the packaging of the various components is intact.
- Do not use strips which have been damaged : cupules deformed, etc.
- It is recommended to perform a quality control test when a new ampule of ZYM B reagent is opened.

STORAGE CONDITIONS

The strips should be stored at 2-8°C until the expiry date indicated on the packaging.

SPECIMEN PREPARATION

Dilute the specimen in a minimum volume of 2 ml of distilled water or in another diluter such as normal saline **without any buffer**.

- **For microorganisms :**
  Prepare a suspension with a turbidity of 5-6 McFarland in API Suspension Medium (2 ml) (open the ampule as indicated in the paragraph "Warnings and Precautions" of the package insert for this medium), distilled water or an isotonic medium. Pure growth from an agar slant or sediment from a centrifuged broth culture can be used to prepare the suspension. In order to obtain reproducible results, it is important that the micro-organisms to be compared be initially grown on the same isolation medium, the diluter be the same and the suspension be of the same optical density. This technique assays for constitutive enzymes. Inductive enzymes can be detected by adding the corresponding inducer(s) to the culture medium.
- **For other specimens (cell suspensions, tissues, biological fluids, ...) :**
  Refer to literature or develop a specific procedure.

Based on the applications, the user must determine what test conditions are appropriate and how to interpret the results of API ZYM.

INSTRUCTIONS FOR USE

Preparation of the strip

- Prepare an incubation box (tray and lid) and distribute about 5 ml of distilled water or demineralized water [or any water without additives or chemicals which may release gases (e.g. Cl_2, CO_2, etc.)] into the honeycombed wells of the tray to create a humid atmosphere.
- Record the sample reference on the elongated flap of the tray. (Do not record the reference on the lid as it may be misplaced during the procedure).
- Remove the strip from its individual packaging.
- Place the strip in the incubation box.

Inoculation of the strip

209

- Using a pipette or PSIpette, dispense 65 µl of specimen into each cupule.
- After inoculation, place the plastic lid on the tray and incubate generally for 4 - 4 ½ hours at 37°C (optimum temperature). The time of incubation and temperature may vary depending on the sample to be tested. However, when samples are being compared, all test conditions (time, temperature, growth media, density of suspension) must be the same. The inoculated strip should not be placed in bright light.

READING AND INTERPRETATION

Reading the strip

After incubation :

- Add 1 drop of ZYM A reagent and 1 drop of ZYM B reagent (*) to each cupule.
  By placing a surface-active agent (ZYM A reagent) in the cupule, solubilization of the ZYM B reagent in the medium is facilitated.
  (*) **It is recommended to control** each ampule of ZYM B before using for the first time.
  To do this, it is recommended to use **the enzyme ß-glucosidase Sigma G0395** or **the strain ATCC® 27853** indicated in the Quality Control paragraph in order to eliminate any defective reagents.
- Let the color develop for at least 5 minutes.
- If possible, put the strip under a powerful light source (1000 W bulb) for about 10 seconds with the bulb placed about 10 cm (4") above the cupules. The procedure will eliminate any yellow color which may appear in the cupules due to any excess of Fast Blue BB which has not reacted. After light exposure, negative reactions become colorless. Placing the strip in daylight for a few minutes will produce comparable results.

Recording the reactions

Read the reactions and record the results on the result sheet. A value ranging from 0-5 can be assigned, corresponding to the colors developed : 0 corresponds to a negative reaction, 5 to a reaction of maximum intensity and values 1, 2, 3 or 4 are intermediate reactions depending on the level of intensity (3, 4 or 5 being considered as positive reactions).
The colors remain stable for several hours after the strip has been inoculated with the reagents. After 24 hours, colors may deteriorate, interferring with test interpretation.

QUALITY CONTROL

For all applications, we strongly recommend that quality control be performed, prior to using API ZYM, which is adapted to the specimen analyzed and the procedure adopted.
The suspension media, strips and reagents are systematically quality controlled at various stages of their manufacture. The API ZYM quality control is performed using bacterial strains or purified enzymes, such as those indicated in the table below :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1.	–	+	+	+	+	+	–	–	–	–	V	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	+	+	+	–
3.	–	–	+	V	–	–	–	–	V	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC* 27853 (Profile obtained after 18-24 hr. culture on trypcase soy agar. Inoculum adjusted to between 5 and 6 McF using DENSIMAT).
2. ß-glucosidase Sigma G0395 (Profile obtained using a concentration of 0.2 g/l).
3. α-chymotrypsin Sigma C4129 (Profile obtained using a concentration of 1 g/l).

- Reading and interpretation 7-10 minutes after addition of the reagents.

* ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

LIMITATIONS OF THE METHOD

- API ZYM should not be considered as an identification product.
- API ZYM is a research product and is not designed to produce biological analysis results for patients.
- All applications, other than those which have been quality controlled by bioMérieux, are under the responsibilty of the user. We recommend that you follow your institution's internal policies and procedures to verify and validate the methodology and accuracy of API ZYM.
- bioMérieux refuses to accept any responsibility concerning the use of results obtained with API ZYM.

WASTE DISPOSAL

210

Unused reagents may be considered as non hazardous waste and disposed of accordingly.
Dispose of used reagents as well as any other contaminated disposable materials following procedures for infectious or potentially infectious products.
It is the responsibility of each laboratory to handle waste and effluents produced according to their type and degree of hazardousness and to treat and dispose of them (or have them treated and disposed of) in accordance with any applicable regulations.

WARRANTY

bioMérieux disclaims all warranties, express or implied, including any implied warranties of MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR USE. bioMérieux shall not be liable for any incidental or consequential damages. IN NO EVENT SHALL BIOMERIEUX'S LIABLITY TO CUSTOMER UNDER ANY CLAIM EXCEED A REFUND OF THE AMOUNT PAID TO BIOMERIEUX FOR THE PRODUCT OR SERVICE WHICH IS THE SUBJECT OF THE CLAIM.

READING TABLE

No.	ENZYME ASSAYED FOR	SUBSTRATE	pH	RESULT	
				POSITIVE	NEGATIVE
1	Control			Colorless or color of the sample if it has an intense coloration	
2	Alkaline phosphatase	2-naphthyl phosphate	8.5	Violet	Colorless or Very pale yellow *
3	Esterase (C 4)	2-naphthyl butyrate	6.5	Violet	
4	Esterase Lipase (C 8)	2-naphthyl caprylate	7.5	Violet	
5	Lipase (C 14)	2-naphthyl myristate	"	Violet	
6	Leucine arylamidase	L-leucyl-2-naphthylamide	"	Orange	
7	Valine arylamidase	L-valyl-2-naphthylamide	"	Orange	
8	Cystine arylamidase	L-cystyl-2-naphthylamide	"	Orange	
9	Trypsin	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide	8.5	Orange	
10	α-chymotrypsin	N-glutaryl-phenylalanine-2-naphthylamide	7.5	Orange	
11	Acid phosphatase	2-naphthyl phosphate	5.4	Violet	
12	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	Naphthol-AS-BI-phosphate	"	Blue	
13	α-galactosidase	6-Br-2-naphthyl-αD-galactopyranoside	"	Violet	
14	ß-galactosidase	2-naphthyl-ßD-galactopyranoside	"	Violet	
15	ß-glucuronidase	Naphthol-AS-BI-ßD-glucuronide	"	Blue	
16	α-glucosidase	2-naphthyl-αD-glucopyranoside	"	Violet	
17	ß-glucosidase	6-Br-2-naphthyl-ßD-glucopyranoside	"	Violet	
18	N-acetyl-ß-glucosaminidase	1-naphthyl-N-acetyl-ßD-glucosaminide	"	Brown	
19	α-mannosidase	6-Br-2-naphthyl-αD-mannopyranoside	"	Violet	
20	α-fucosidase	2-naphthyl-αL-fucopyranoside	"	Violet	

* Colorless or color of the control if the strip has been exposed to an intense light source after addition of the reagents ; if the strip has not been exposed to intense light, a very pale yellow color is obtained.

BIBLIOGRAPHY p. I
INDEX OF SYMBOLS p. II

bioMérieux, the blue logo and API are used, pending and/or registered trademarks belonging to bioMérieux SA or one of its subsidiaries.
ATCC is a trademark belonging to American Type Culture Collection.
Any other name or trademark is the property of its respective owner.

BIOMÉRIEUX

bioMérieux SA
au capital de 12 029 370 €
RCS LYON 673 620 399
69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
http://www.biomerieux.com

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tél. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11

Printed in France

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล นางสาวปิยะรักษ์ กอบโกย

E-mail 57050852@kmitl.ac.th

ประวัติการศึกษา

2557 มัธยมศึกษา ห้องเรียนพิเศษวิทยาศาตร์และคณิตศาสตร์ (SMT)
โรงเรียนตะกั่วป่า “เสนานุกูล” อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา

2560 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร

ชื่อ-นามสกุล นางสาวมุธิตา พรมไชย

E-mail 57050877@kmitl.ac.th

ประวัติการศึกษา

2557 มัธยมศึกษา (วิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์)
โรงเรียนสวนศรีวิทยา อำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร

2560 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มสหกิจศึกษา

วันที่ 15 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2561

ข้าพเจ้า นางสาวปิยะรักษ์ กอบโกย รหัสประจำตัว 57050852

นางสาวมุธิตา พรมไชย รหัสประจำตัว 57050877

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา

ขอรับรองว่าสหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การคัดแยกและการศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของ marine bacteria ที่แยกได้จากพื้นที่ชายทะเลฝั่งตะวันออกของไทย

ชื่อภาษาอังกฤษ SCREENING AND CHARACTERIZATION OF MARINE BACTERIA ISOLATION FROM EASTERN COAST IN THAILAND

ปีการศึกษา 2560

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มสหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.55 %

ลงชื่อ.....ปิยะรักษ์ กอบโกย.....

(นางสาวนางสาวปิยะรักษ์ กอบโกย)

นักศึกษา

ลงชื่อ.....มุธิตา พรมไชย.....

(นางสาวมุธิตา พรมไชย)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ดร.นิลเนตร อัศวะศิริจินดา อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษา ได้ตรวจสอบสหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....สุทธิจิต ศรีวัชรกุล.....

(ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล)

ประธานกรรมการ

ลงชื่อ.....

(ดร.นิลเนตร อัศวะศิริจินดา)

อาจารย์ที่ปรึกษา