บรรณานุกรม

เอกสารอ้างอิง

1.Strauss, J.M., M.Gl Groves, M.Mariappan and D.W. Ellison, "Melioidosis in Malaysia II. Distribution of Pseudomonas Pseudomallei in Soil and Surface Water," Am. J. Trop. Med, Hyg., 18, 698-702, 1969.

2.Heckman, M.G., J.B. Babcock, and H.D. Rose, "Pyocine typing of Pseudomonas aeruginosa : Clinical and epidemiological aspects," Am. J. Clin. Pathol., 57, 135, 1972.

3.Tagg, J.R., and R. Mushin, "Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa infection in hospitals, 1, Pyocine typing of Ps. aeruginosa," Med. J. Aust., 1, 847, 1971.

4.Deighton, M.A., J.R. Tagg, and R. Mushin, "Epidemiology' of Ps. aeruginosa strains in a study of cross-infection in a children's hospitol," Med. J. Aust., 1, 892, 1971.

5.Bobo, R.A., E.J. Newton, L.F. Jones, L.H. Farmer, and J.J. Farmer III, "Nursery outbreak of Pseudomonas aeruginosa : epidemiological conclusion from five different typing methods," Appl. Microgiol., 25, 414-420, 1973.

6.Ashdown, L.R, "Nosocomial infection due to Pseudomonas

pseudomallei. Two Case and an epidemiological study," Rev. Infect. Dis., 1, 891-894, 1979.

7.Greene, W.H., M. Moody, S. Schimpff, V.M. Young, and P.H. Wiernik, "Pseudomonas aeruginosa resistant to Carbenicillin and gentamicin : epidemiology and clinical aspects in a Cancer center," Am. Intern. Med., 79, 684-689, 1973.

8.Eickhoff, T.C., J.V. Bennett, P.S. Hays, and S.Fecley, "Pseudomonas pseudomallei : susceptibility to chemotherapeutic agents," J. Infect. Dist., 121, 95-102, 1970.

9.Howe, C., A.Sampath, and M. Spotinitz, "The Pseudomallei group : a review," J. Infect. Dist., 124, 598-606, 1971.

10.Miller, W.R., L. Panwell, L. Carvitz, W.A. Tanner, and T. Rosebury, "Studies on certain biological characteristics of Malleomyces mallei and Malleomyces pseudomallei II Virulence and infectivity for animal," J. Bacteriol., 55, 127, 1948.

11.Thomas, A.D., J.C. Forbes-faulker and M. Parker, "Isolation of Pseudomonas pseudomallei from Clay layer at defined depths," Am. J. Epidemiol., 110, 515-521, 1979.

12.Thomas, A.D., J.C. Forbes-faulker., "Resistance of Pseudomonas pseudomallei in soil," Aust. Vet. J., 57, 535-536, 1981.

13.Ellison, D.W., H.J. Baker., and M. Mariappan, "Melioidosis in Malaysia," Am. J. Trop. Med. Hya., 18, 694-697, 1969.

14.Finkelstein, R.A., P. Atthasampunna, P. Chitrakorn, et.al., "Report of SEATO medical research study on melioidosis," Period of Report : 1 April 1965 - 31 March 1966, 28-34.

15.สมพนธ์ บุณยคุปต์, "สถานการณ์ปัจจุบันของโรคเมลิออยโดสีสในประเทศไทย" การประชุมเชิงปฏิบัติการ เมลิออยโดสีส, หน้า 12-21, มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น, 2531.

16.Redfearn, M.S., N.J. Palleroni, and R.Y. Stanier, "A Comparative study of Pseudomonas pseudomallei and Bacillus mallei," J. Gen. Microbiol., 43, 293-313, 1966.

17.Whitmore, A., "An account of a glanders like disease occuring in Rangoon," J. Hug., 13, 1-34, 1913.

18.Stanton, A.T., and W. Fletcher, "Melioidosis a new disease of the tropics. Trans. 4 th Congr. Far-East Ass. Trop. Med. 2, 196-198, 1921.

19.Brindle, C.S., and S.T. Cowan, "Flagellation and Taxonomy of whitmore's Bacillus," J. Pathol. Bacteriol., 63, 571-575, 1951.

20.Breed, R.S. Genus II. *Malleomyees* Pribran. *In* Bergey,Breed, Murray and Hitchens (Editors), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 5 th Ed.,The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 298-300, 1939.

21.Wetmore, P.W., and W.S. Gochenour, "Comparative studies of the genus Malleomyces and selected Pseudomonas species," J. Bacteriol., 72, 79, 1956.

22.Levine, H.B., J.H. Dowling, M. Evenson, and O.G. Lien, "Growth of Malleomyces pseudomallei in simple chemically defined media," J. Bacteriol., 67, 350,1954.

23.Bokman, A.H., H.B. Levine, and M. Lusby, "Glucose Catabolism in Malleomyces pseudomallei," J. Bacteriol., 73, 649, 1957.

24.Levine, H.B., and H. Wolockow, "Occurance of Poly-β-hydroxy-butyrate in Pseudomonas pseudomallei," J. Bacteriol., 79, 305, 1960.

25.Burkholder, W.H, "Sour skin, a bacterial root of onion bulbs," Phytopatholygy., 40, 115-117, 1950.

26.Stanier, R.Y., N.J. Palleroni, and M. Doudoroff, " The Aerobic Pseudomonas : a Taxonomic Study," J. Gen. Microbiol., 43, 247-271,1966.

27.Morris, M.B., and J.B. Robert, "A group of Pseudomonads able to synthesize poly-β-hydroxybutyric acid," Nature (London)., 183, 1538, 1959.

28.Forsyth, W.G.C., A.C. Hayward, and J.B. Robert, "Occurance of poly-β-hydroxybutyric acid in aerobic Gram-negative bacteria," Nuture-(London).,182,800, 1958.

29.Hayward, A.C., W.G.C. Forsyth, and J.B. Roberts,

"Synthesis and breakdown of poly-β-hydroxy-butyric acid by bacteria," J. Gen. Microbiol., 20, 510,1959.

30.Ballard, R.W., H.J. Palleroni, and M. Doudoroff, "Taxonomy of the aerobic Pseudomonads : Pseudomonas cepacia,P.marginata,P.alliicola and P.caryophylli," J. Gen. Microbiol., 60, 199-214,1970.

31.Clara, F.M. "A comparative study of the green-fluorescent bacterial plant pathogens," Cornell Agr.Exptl,Sta.Mem., 159, 1-36, 1934.

32.Seleen, W.A., and C.N. Stark, "Some charcateristic of green fluorescent pigment-producing bacteria," J. Bacteriol., 46, 491, 1943.

33.Stanier, R.Y.,"Acetic acid production from ethanol by fluorescent Pseudomonads," J. Bacteriol, 54, 191,1947.

34.Rhodes, M.E, "The Characterization of Pseudomonas fluorescens," J. Gen. Microbiol., 21, 221-263, 1959.

35.Blazevic, D.J., M.H. Koepcke, and J.M. Matsen, "Incidence and Identification of Pseudomonas fluorescens and Pseudomonas putida in the Clinical Laboratory," Appl. Microbiol., 25(1), 107-110,1973.

36.King, E.O., W.K. Ward, and D.E. Raney, "Two simple

media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein," J. Lab. Clin. Med., 44, 301-307, 1954.

37.Stenstrom, I.M., A. Zakaria, A. Ternstrom, and G. Molin, "Numerical taxonomy of fluorescent Pseudomonas associated with tomato roots," Ant. Van. Leeuwenhoek., 57(4), 223-236, 1990.

38.Ringen, L.M., and C.H. Drade, "A study of the incidence of Pseudomonas aeruginosa from various natural sources," J. Bacteriol., 64, 841, 1952.

39.Gould, J.C., and J.W. McLeod, "A study of the use of agglutinating sera and phage lysis in the classification of strains of Pseudomonas aeruginosa," J. Path, Bact., 79, 295, 1960.

40.Haynes, W.C, "Pseudomonas aeruginosa: its characterization and identification," J. Gen. Microbiol, 5, 939, 1951.

41.Gaby, W.L., and E. Free, "Differential diagnosis of Pseudomonas-like microorganisms in the clinical Laboratory," J. Bacteriol., 76, 442, 1958.

42.Kovacs, N., "Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxidase reaction," Nature (London)., 178, 703, 1956.

43.Rhodes, M.E., "The characterization of Pseudomonas fluorescens with the aid of an electronic computer, J. Gen. Microbiol., 25, 331, 1961.

44.Colwell, R.R., and J. Liston, "Taxonomic relationships among the Pseudomonads," J. Bacteriol., 82, 1, 1961 a.

45.Colwell, R.R., and J. Liston, "Taxonomic analysis with the electronic computer of some Xanthomonas and Pseudomonas species," J. Bacteriol., 82, 913, 1961 b.

46.Liston, J., W. Wiebe and R.R. Colwell, "Quantitative approach to the study of bacteria species," J. Bacteriol., 85, 1061-1070, 1963.

47.Ralston, E., N.J. Palleroni, and M. Doudoroff, Pseudomonas pickettii, a new species of clinical origin related to Pseudomonas solanacearum," Int. J. Syst. Bacteriol., 23, 15-19, 1973.

48.Riley, P.S., and R.E. Weaver, "Recognition of Pseudomonas pickettii in the Clinical Laboratory : Biochemical Characterization of 62 Strains," J. Clin. Microbiol., 1(1), 61-64, 1975.

49.Gilardi, G.L., S. Hirschl, and M. Mandel, "Characteristics of Yellow-Pigmented Nonfermentative Bacilli (Group VE-1 and VE-2) Encountered in Clinical Bacteriology," J. Clin. Microbiol., 1(4), 384-389, 1975.

50.Pickett, M.J., and M.M. Pedersen, "Characterization of saccharolytic nonfermentative bacteria associated with man," Can. J. Microbiol., 16, 351-362, 1970.

51.Palleroni, N.J., M. Doudoroff, and R.Y. Stanier, "Taxonomy of the Aerobic Pseudomonads : the Properies of the Pseudomonas stutzeri Group," J. Gen, Microbiol., 60, 215-231, 1970.

52.Ballard, R.W., M. Doudoroff, and R.Y. Stanier, "Taxonomy of the Aerobic Pseudomonads : Pseudomonas diminuta and P. vesiculariae," J. Gen, Microbiol., 53, 349-361, 1968.

53.Hugh, R., and E. Ryschenkow, "Pseudomonas maltophilia, and alcaligenes-like species," J. Gen. Microbiol., 26, 123, 1961.

54.Iizuka, H., and K. Komagate, "Microbiological studies on petroleum and natural gas," J. Gen, Appl. Microbiol., 10, 207-221, 1964 a.

55.Thibault, P., "A propos d' Alcaligenes faecalis," Ann. Inst. Pasteur., 100(suppl), 59, 1961.

56.Monias, B.L., "Classification of Bacterium alcaligenus, Pyoeyaneum and fluorescens," J. infect, Dis., 43, 330, 1928.

57.Kodaka, H., A.Y. Armfield, G.L. Lombard and V.R. Dowell, JR.,"Practical Procedure for Demonstrating Bacterial Flagella," J. Clin. Microbiol., 16, 948-952, 1982.

58.Hygh, R., and E. Leifson, "The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrate by various Gram negative bacteria,"

J. Bacteriol., 66, 24-26, 1953.

59.Oberhofer, T.R., J.W. Rowen, and G.F. Cunningham, "Characterization and identification of Gram-negative, nonfermentative bacteria," J. Clin, Microbiol., 5, 208, 1977.

60.Christensen, W.B, "Urea decomposition as a means of differentiaing Proteus and paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella types," J, Microbiol., 52, 461, 1946.

61.Clarke, P.H., "Hydrogen sulphide production by bacteria," J. Gen. Microbiol., 8, 397, 1953 a.

62.Cowan, S.T., and K.J. Steel, "Manual for the identification of medical bacteria," Cambridge Univ, Press, London., P30-31, 1966.

63.Lapage, S.P., A. Efstratiou, and L.R. Hill, "The ortho-nitrophenol (ONPG) test and acid from lactose in Gram negative genera," J. Clin, Pathol., 26, 821, 1973.

64.Lynch, W.H., J. Macleod, and M. Franklin, "Effect of growth temperature on the accumulation of glucose-oxidation products in Pseudomonas fluorescens", Can, J. Microbiol., 21, 1553-1558, 1975.

65.Carpenter, K.P, "The relationship of the enterobacterium A. 12 (Sachs) to Shigella boydii 14," J. Gen. Microbiol., 26, 535-542, 1961.

66.Oberhofer, T.R., and J.W. Rowen, "Acetamide agar for

differentiation of non-fermentative bacteria," Appl. Microbiol., 28, 720, 1974.

67.Klinge, K., "Differential techniques and methods of isolated of Pseudomonas," J. Appl, Microbiol., 23, 442, 1960.

68.Oberhofer, T.R., "Growth of nonfermentative bactevia 42°C," J. Clin. Microbiol., 10, 800, 1979.

69.Lindell, S,S., and P. Quinn, "Use of bile-esculin agar for rapid differentiation of Enterobacteriaceae," J. Clin. Microbiol., 1, 440, 1975.

70.Sneath, P.H.A., Computer Taxonomy, In "Method in Microbiology" Ed. J.R. Norris and D.W. Ribbons. Vol.7. Academic Press : 29-98.

71.Sokal, R.R., and C.D. Michesner, "A Statistical method for Evaluating Systemic Relationship," Kansas. University. Science. Bullentin. 38 : 1409-1438, 1958.

72.Sneath, P.H.A., "The Application of Computer to Taxonomy," J. Gen. Microbiol., 17, 201-226, 1957.

73.Lysenko, O., "Pseudomonas - An attempt at a general Classification," J. Gen. Microbiol., 25, 379-408, 1961.

74.Wallace, G.I., and S.L. Neave, "The nitrites test as applied to bacterial cultures," J. Bacteriol., 14, 377, 1927.

75.Arden, S.B., and L. Barksdale, "Nitrate reductase activities in lysogenic and non-lysogenic strains

of Corynebacterium diphtheriae and related species,"Int. J. Syst. Bacteriol.,26,66,1976.

76.Leifson., E, "The fermentative of sodium malonate as a means of defferentiating Aerobacter and Escherichia," J. Bacteriol., 26, 329, 1933.

77.Moeller, V., "Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system," Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 36, 158, 1955.

78.Sherris, J.C., and J.G. Shoesmith, "Tests for the rapid breakdown of arginine by bacteria : Their use in the identification of Pseudomonads," J. Gen. Microbiol., 21, 389, 1959.

79.Esselmann, M.T., and P.V. Liu, "Lecithinase production by Gramnegative bacteria," J. Bacteriol., 81, 939, 1961.

80.Owens. J.J., "The egg yolk reaction produced by several species of bacteria,: J. Appl. Bacteriol., 37, 137, 1974.

81.Jefferies, C.D., D.F. Holtman, and D.G. Guse, "Rapid method for determining the activity of micro-organisms on nucleic acid," J. Bacteriol., 73, 590, 1957.

82.Smith, P.B., G.A. Hancock and D.L. Rhoden, "Improved medium for detecting deoxyribonuclease-producing bacteria," Appl. Microbiol., 18, 991, 1969.

83.Niven, C.F. JR., K.L. Smiley, and J.M. Sherman, "The hydrolysis of arginine by streptococci," J. Bacteriol., 43, 651, 1942.

84.Sierra, G., "A simple method for detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observation on the influence of the contact between cells and fatty substrates," Antonic Van Leeuwenhock., 23, 15, 1957.

85.Oberhofer, T.R., "Cultural and biochemical characteristics of Clinical isolates of unusual colistin- resistant pseudomonads," J. Clin. Microbiol., 12, 156, 1980.

86.Paton, A.M., "Enhancement of pigment production by Pseudomonas," Nature (London)., 184, 1254, 1959.

87.Smith, R.F., and S.L. Dayton, "Use of Acetamide Broth in the Isolation of Pseudomonas aeruginosa from Ractal swabs," Appl. Microbiol., 24(1), 143, 1972.

88.Rosenthal, S.L, "A Simplified Method for Single Carbon Source Test with Pseudomonas species," J. Appl. Bacteriol., 37, 437, 1974.

89.Annie, B., "Differential between Pseudomonas cepacia and Pseudomonas pseudomallei in clinical bacteriology," Acta. Path. Microbiol. Scand., Sect.B, 83, 65-70, 1975.

90.Swings, J., P.D. Vos, V.D Motter, and J.D key, "Trans-

fer of Pseudomonas maltophilia Hugh 1981 to the genus Xanthomonas maltophilia (Hugh 1981) Comb. nov," J. Syst. Bacteriol., 33, 409, 1983.

91.Redfearn, M.S., and N.J. Palleroni, "Glanders and melioidosis" In Hubbert, McCulloch and Schnurrenberger (Editors), Diseases Transmitted from Animal to man, 6 th Ed., C.C Thomas, Springfield, Illinois, PP. 110-128, 1975.

92.Palleroni, N.J., and B. Holmes, "Pseudomonas cepacia sp. nov., nom. rev," Int. J. Syst. Bacteriol., 31, 479-481, 1981.

93.Pickett, M.J., and J.R. Greenwood, "A study of the Va-1 group of Pseudomonads and its relationship to Pseudomonas pickettii," J. Gen. Microbiol., 120, 439-446, 1980.

94.King, A., B. Holmes, I. phillip and S.P. Lapages "A taxonomic study of clinical isolates of Pseudomonas pickettii, P. thomasii and Group IVD bacteria,"J. Gen. Microbiol., 114, 137-147, 1979.

95.Hugh, R., and G.L. Gilardi, "Pseudomonas, *In* Lennette, balows, Hausler, JR, Truant (Editors), Manual of Clinical Microbiology, 3 rd Ed., American Society for Microbilogy, Washington, D.C., PP. 289-317, 1980.

96.Gilardi, G.L., "Characterization of Pseudomonas species Isolated from Clinical Speciemens," App. Microbiol.,

21, 414-419, 1971.

97.Kodama, K., N. Kimura, and K. Komagata, Two new species of Pseudomonas : P. oryzihabitans isloated from rice paddy and Clinical specimens and P. luteala isolated from Clinical speciemens," Int. J. Syst. Bacteriol., 35, 467-474, 1985.

98.Amber, I.J. and L.G. Reimer "Pseudomonas sp. group VE-2 Bacterial Peritoneal in a patient on Continuous Ambulatory Peritonial Dialysis," J. Clin.Microbiol., 25, 744-745, 1987.

99.Sneath,P.H.A.,"Bergey's Manual of Systemic Bacteriology," Vol. 1 (Kriey, N.R. ed.) PP. 141-198, Wilkins, Baltimore, London, 1984.

100.Ewing, W.H., and J.G. Johnson, "The differentiation of Aeromonas and C27 culture from Enterobacteriaceae," Bull. Bacteriol Nomencl. Taxon., 10, 223, 1960.

101.Gaby, W.L., and C. Hadley., "Practical laboratory test for the identification of Pseudomonas aeruginosa," J. Bacteriol., 74, 356-358, 1957.

102.Lennette, E.H.,A. Balow,W.J. Hausler, and J.P. Truant Jr, "MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY,"3 rd ed. Washington DC: American Society of Microbiology, 1980.

103.Oberhofer,T.R.,"MANUAL OF NONFERMENTATIVE GRAM - NEGATIVE BACTERIA, "A Wiley medical publication,1985.

104.Mac Faddin,J.F.,"BIOCHEMICAL TESTS for IDENTIFICATION of MEDICAL BACTERIA,"The Williams & Wilkins Company, Baltimore,1976.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

การย้อมสีแฟลกเจลลา

I. วิธีของ Ryu (57) ประกอบด้วย

1. 5 % aqueous solution of $K_2Al_2(SO_4)_2$ 12 H_2O 10 มิลลิลิตร
   (Potasium aluminum sulphate)
2. tannic acid 2 กรัม
3. 5 % phenol (Carbolic acid)* 10 มิลลิลิตร
4. 10 % Basic fuchsin (in a 95 % ethanol)** 2.2 มิลลิลิตร

* Stock solution เก็บที่อุณหภูมิห้อง

** Stock sulution เก็บในตู้เย็นได้นานประมาณ 1 เดือน

วิธีเตรียม

1. เตรียมสารละลายข้อ 1 ก่อนแล้วจึงเติม tannic acid ในข้อ 2 (tannic acid เมื่อละลาย ต้องเป็นสารละลายที่ใสไม่ขุ่น)
2. เติม 5 % phenol ในข้อ 3 และ 10 % Basic fuchsin ในข้อ 4 ตามลำดับ
3. ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้ตกตะกอนก่อนใช้
4. น้ำยาย้อมแฟลกเจลลา เก็บที่อุณหภูมิห้องได้นานกว่า 6 เดือน

II. การเตรียม Slide ที่จะใช้ย้อมแฟลกเจลลา

1. ล้าง slide ด้วยผงซักฟอกหรือน้ำยาล้างจาน
2. แช่ slide ในกรด HCl 1 คืน
3. นำ slide ขึ้นและชะกรด HCl ออกให้หมดด้วยน้ำประปา
4. rinse slide ด้วยน้ำกลั่น อบให้แห้ง
5. เก็บในกล่องเก็บ Slide

III. การเตรียมเชื้อเพื่อย้อมแฟลกเจลลา

1. เพาะเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง บน blood agar plate (อาจใช้ Muller Hinton agar แทนได้)
2. เขี่ยเชื้อ (ไม่ให้โดนเนื้อ agar) แตะเบา ๆ บนน้ำกลั่น ปราศจากเชื้อที่หยดบน slide
3. เอียง slide ให้หยดน้ำไหลลงมาเป็นทาง
4. ทิ้งไว้ให้แห้ง (ห้ามลนไฟ)
5. หยดน้ำยาย้อมแฟลกเจลลาให้ท่วม ทิ้งไว้โดยให้เวลา 2-15 นาที (ขึ้นอยู่กับอายุของน้ำยา ควรทดลองหาเวลาที่เหมาะสม) น้ำยาใหม่ใช้เวลาประมาณ 2 นาที น้ำยาที่มีอายุนาน 1 เดือน ใช้เวลาประมาณ 5 นาที ถ้าเก็บน้ำยาย้อมไว้นานเป็นปีเวลาที่ใช้ในการย้อมประมาณ 15-20 นาที
6. ทิ้งไว้ให้แห้ง, ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ภาคผนวก ข.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Semisolid motility agar (104)

ส่วนประกอบ

Casitone (Difco)	10.0 กรัม
Yeast extract (Difco)	3.0 กรัม
NaCl	5.0 กรัม
Agar	3.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1. ละลายส่วนประกอบทั้งหมดโดยวิธีการต้ม
2. ถ่ายใส่หลอดทดลอง หลอดละ 3.5 มิลลิลิตร
3. ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีการ Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. Oxidative and fermentative (OF) basal medium (Difco)(103)

ส่วนประกอบ

Bacto tryptone	2.0 กรัม
NaCl	5.0 กรัม
K_2HPO_4	0.3 กรัม
Bromthymol Blue	0.08 กรัม
Agar	2.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ปรับ pH 6.8 $\pm$ 0.2

วิธีเตรียม

1.) ละลายส่วนประกอบทั้งหมดโดยวิธีการต้ม

2.) แบ่งใส่ flask flask ละ 100 มิลลิลิตร

3.) เติม สารละลาย 10 % คาร์โบไฮเดรท ทำให้ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 %

4.) ใช้วิธีการ aseptic technique ถ่ายใส่หลอดทดลอง หลอดละ 3-4 มิลลิลิตร

5.) การเตรียมสารละลาย 10 % คาร์โบไฮเดรท ใช้วิธีการ Autoclave ที่ 116 องศาเซลเซียส 10 นาที เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ เมื่อความดันลดลงมาถึง 0 ให้รีบนำขวดออกจากเครื่อง Autoclave ทันที จากนั้นทำให้เย็นลงทันที โดยแช่ในน้ำเย็น เก็บไว้ในตู้เย็น

3. Urea agar (Christensen)(104)

ส่วนประกอบ

A	Peptone	1.0 กรัม
	NaCl	5.0 กรัม
	Glucose	1.0 กรัม
	KH_2PO_4	2.0 กรัม
	Phenol red	0.012 กรัม
	Agar	15.0 กรัม
	น้ำกลั่น	900.0 มิลลิลิตร
B	Urea	20.0 กรัม
	น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1.) ละลายส่วนประกอบ A และ Autoclave 121 องศาเซลเซียส

2.) ละลายส่วนประกอบ B และทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการกรอง

3.) หลังจากส่วนประกอบ A เย็นลงประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส นำมารวมกับส่วนประกอบ B ด้วยวิธีการปราศจากเชื้อ

4.) บรรจุใส่หลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิลิตร เอียงหลอดทดลองเพื่อให้เกิดส่วนลาดเอียง (Slant)

4. King A mudium (Pseudomonas agar P)(103)

ส่วนประกอบ

Bacto peptone	20.0 กรัม
Potassium Sulfate	10.0 กรัม
$MgCl_2$ anhydrous	1.4 กรัม
Glycerol	10.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

pH 7.2

King B medium (Pseudomonas agar F)(103)

ส่วนประกอบ

Bacto peptone*	
Protease peptone No.3*	10.0 กรัม
K_2HPO_4	1.5 กรัม
$MgSO_4.2H_2O$	1.5 กรัม
Glycerol	10.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

pH 7.0

* = อาจใช้ Protease peptone No.3 เพียงตัวเดียว แต่ใช้ 20 กรัม/ลิตร

วิธีเตรียม

1.) ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นต้ม

2.) ถ่ายใส่หลอดทดลอง หลอดละ 2 มิลลิลิตร Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.) วาง slant

5. KCN broth(104)

ส่วนประกอบ

Peptone	3.0 กรัม
NaCl	5.0 กรัม
KH_2PO_4	0.225 กรัม
$Na_2HPO_4 . 2H_2O$	5.64 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1.) ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น แบ่งใส่ flask 100 มิลลิลิตร Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2.) ผสม 0.5 % KCN จำนวน 1.5 มิลลิลิตร ใน 100 มิลลิลิตร ของส่วนผสมในข้อ 1

3.) ผสมให้เข้ากัน ถ่ายใส่หลอดทดลองที่เป็นฝาจุกเกลียว หลอดละ 5 มิลลิลิตร

หมายเหตุ 0.5 % KCN ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ โดยสารละลาย KCN ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ

6. Beta-Galactosidase (ONPG) test(104)

ส่วนประกอบ

A. ONPG (Sigma Chemical)	6.0 กรัม
sodium phosphate buffer, pH 7.5, 0.01 M*	1,000 มิลลิลิตร
B. Peptone	10.0 กรัม
NaCl	5.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1.) ในส่วนประกอบ A มาละลายใน Sodium phosphate buffer ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการกรอง

2.) ในส่วนประกอบ B ผสม Peptone และ NaCl ในน้ำกลั่น ทำให้ละลายโดยใช้ความร้อน ปรับ pH ระหว่าง 8.0-8.4 จากนั้นต้ม 10 นาที นำไปกรอง ปรับ pH ระหว่าง 7.2-7.4 จากนั้นนำไป Autoclave 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.) ใช้วิธีการปราศจากเชื้อผสม sterile ONPG ในข้อ 1 จำนวน 1 ส่วน (250 มิลลิลิตร) ใน sterile 1 % peptone water ข้อ 2 จำนวน 3 ส่วน (750 มิลลิลิตร)

4.) ถ่ายบรรจุในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อจำนวนหลอดละ 2.5 มิลลิลิตร

* Sodium phosphate buffer, pH 7.5, 0.01 M เตรียมโดย

1.) ใช้ Na_2HPO_4 6.9 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2.) เติม 5 N NaOH จำนวน 7.5 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.5

3.) เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 50 มิลลิลิตร

7. Nitrate broth(104)

ส่วนประกอบ

Casitone	10.0 กรัม
Yeast extract	3.0 กรัม
KNO_3	2.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1.) ละลายส่วนผสม ถ่ายใส่หลอดทดลอง หลอดละ 3 มิลลิลิตร

2.) ใส่หลอด Durham tube

3.) Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

8. Gluconate broth(104)

ส่วนประกอบ

K_2HPO_4	5.4 กรัม
KNO_3	2.0 กรัม
Potassium gluconate	20.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

pH 6.5

วิธีเตรียม

1.) ละลายส่วนผสม ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการกรอง

2.) ถ่ายใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร

9. Malonate broth(103)

ส่วนประกอบ

Yeast extract	1.0 กรัม
Sodium malonate	3.0 กรัม
Glucose	0.25 กรัม
Ammonium sulfate	2.0 กรัม
K_2HPO_4	0.6 กรัม
KH_2PO_4	0.4 กรัม
Bromthymol blue	0.025 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1.) ละลายส่วนผสม ถ่ายใส่หลอดทดลอง หลอดละ 3 มิลลิลิตร

2.) Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

10. Phenylalanine agar(103)

Yeast extract	3.0 กรัม
K_2HPO_4	1.0 กรัม
NaCl	5.0 กรัม
DL-phenylalanine	2.0 กรัม
Agar	12.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

pH 7.3

วิธีเตรียม

1.) ละลายส่วนผสมด้วยความร้อน ถ่ายใส่หลอดทดลอง หลอดละ 2 มิลลิลิตร

2.) Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.) วาง slant

11. Bacto Decarboxylase Base Moeller(103)

ส่วนประกอบ

Bacto peptone	5.0 กรัม
Bacto beef extract	5.0 กรัม
Glucose	0.5 กรัม
Brom cresol purple	0.01 กรัม
Cresol red	0.005 กรัม
Peridoxal	0.005 กรัม

pH 6.0

วิธีเตรียม

1.) ละลายส่วนประกอบที่เป็นผงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ใช้ความร้อนช่วยในการละลาย

2.) ถ่ายใส่ flask flask ละ 250 มิลลิลิตร

3.) เติม L-lysine.HCl, L-arginine.HCl และ L-ornithine.HCl ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 % flaskที่ 4 ใช้เป็น Control

4.) ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 3 แต่ละอย่างลงในหลอดทดลองฝาเกลียว หลอดละ 3 มิลลิลิตร

5.) Autoclave 121 องศาเซลเซียส 10 นาที

12. Egg Yolk Agar(103)

ส่วนประกอบ

Blood agar base (Difco)	75.0 กรัม
Egg Yolk enrichment (Difco)	100.0 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1.) ละลาย blood agar base ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ละลายในความร้อน ปรับ pH 7.4 $\pm$ 0.2

2.) Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ปล่อยให้เย็นลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

3.) เติม egg yolk enrichment 10 มิลลิลิตร ต่อ blood agar base 90 มิลลิลิตร จากนั้นเทใส่ sterile petri dishes

13. Aesculin agar(104)

ส่วนประกอบ

Heart infusion agar	1,000 มิลลิลิตร
Aesculin	1.0 กรัม
Ferric ammonium citrate	0.5 กรัม

(อาจใช้ Ferric chloride แทน)

วิธีเตรียม

1.) ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยความร้อน

2.) ถ่ายใส่หลอดทดลอง หลอดละ 2 มิลลิลิตร

3.) Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

4.) วาง Slant

14. Polysorbate (Tween) 80 agar(102)

ส่วนประกอบ

Heart infusion agar	1,000 มิลลิลิตร
$CaCl_2$	0.1 กรัม
Tween 80	10.0 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1.) นำส่วนผสมทั้งหมดมา Autoclave 121 องศาเซลเซียส

15 นาที

2.) เทใส่ใน sterile petri dishes 20 มิลลิลิตร

15. Starch agar

วิธีเตรียม

1.) ผสม soluble starch ใน Mueller-Hinton agar ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 %

2.) Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.) เทใส่ใน sterile petri dishes 20 มิลลิลิตร

16. DNA agar(103)

ส่วนประกอบ

DNase test agar (Difco)	1,000 มิลลิลิตร
Toluidin blue*	0.1 กรัม

วิธีเตรียม

1.) ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ถ่ายใส่หลอดทดลอง หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร

2.) Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.) วาง slant

* อาจใช้ 1 % toluidin blue aqueous solution ในปริมาณ 10 มิลลิลิตร แทน

17. Nutrient gelatin(103)

ส่วนประกอบ

Bacto Beef extract	3.0 กรัม
Bacto peptone	5.0 กรัม
Bacto gelatin	120 กรัม

pH 6.8

วิธีเตรียม

1.) ละลายส่วนผสมทั้งหมดโดยใช้ความร้อน 50 องศาเซลเซียส

2.) ถ่ายใส่หลอดทดลองฝาเกลียว Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

18. Medium for carbohydrate and organic compound as sole carbon and nitrogen source(62)

ส่วนประกอบ

NaCl	1.0 กรัม
$MgSO_4.7\ H_2O$	0.2 กรัม
$(NH_4)_2\ HPO_4$	1.0 กรัม
Agar	20.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร
Phenol red, 0.2 % Solution*	4.0 มิลลิลิตร

pH 6.8

วิธีเตรียม

1.) ละลาย Agar ในน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร ใช้ความร้อนช่วยให้ละลายและส่วนผสมที่เหลือละลายในน้ำกลั่นที่เหลือ นำมาผสมให้เข้ากันปรับ pH 6.8 เติม phenol red, 0.2 % solution 4.0 มิลลิลิตร แบ่งใส่ flask ละ 100 มิลลิลิตร

2.) Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.) ผสมสารประกอบชนิดต่างๆที่ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการกรองความเข้มข้นสุดท้าย ดังนี้ สารประกอบคาร์โบไฮเดรท 0.2 %, สารประกอบอินทรีย์ 0.1 % , Phenol 0.025 %

4.) ถ่ายใส่หลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อหลอดละ 2.5 มิลลิลิตร

5.) วาง Slant

* ละลาย Phenol red 1 กรัมใน 0.1 N NaOH เติมน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

การเตรียมน้ำยาเคมีสำหรับการทดสอบ

1. Nessler's reagent(102)

Solution A	
Mercuric Chloride	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	6.0 มิลลิลิตร
Solution B	
Potassium iodide	2.5 กรัม
น้ำกลั่น	6.0 มิลลิลิตร

ผสม Solution A เข้ากับ Solution B เติมน้ำกลั่น 13 มิลลิลิตร

2. Ehrlich reagent(103)

Ethyl alcohol, 95 %	95 มิลลิลิตร
p-Dimethylaminobenzaldehyde	1.0 กรัม
Hydrochloric acid, concentrated	20 มิลลิลิตร

ละลาย aldehyde ใน alcohol จากนั้นผสมกรดลงไปช้า ๆ เก็บไว้ในตู้เย็น

3. Indophenol oxidase test(102)

Solution A	
α-naphthol	1.0 กรัม
Ethyl alcohol, 95 %	100 มิลลิลิตร
Solution B	
p-Aminodimethylanilic hydrochloride	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ประวัติของผู้เขียน

นายกำพล เจริญสุขโสภณ เกิดวันที่ 20 ธันวาคม 2498 จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี ได้รับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากมหาวิทยาลัยมหิดล ปีการศึกษา 2521

ปัจจุบัน เป็นข้าราชการพลเรือนสามัญ ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ระดับ 5 ฝ่ายพยาธิวิทยาคลินิค ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 2 ชลบุรี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข