# บทที่ 3

## การทดสอบลักษณะต่าง ๆ และการจัดกลุ่มแบคทีเรียที่ทดสอบ

กลุ่มลักษณะที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย กลุ่มลักษณะต่าง ๆ จำนวน 42 กลุ่มลักษณะ (characters) โดยศึกษาทางสัณฐานวิทยา (Morphological characters),สรีรวิทยา (Physiological chracters) และ ชีวเคมี (Biochemical characters) รวมทั้งสิ้น 170 ลำดับการทดสอบ (features) ดังแสดงในตารางที่ 2 การเตรียมสารละลายแขวนตะกอน (inoculum) ของเชื้อ ที่จะใช้ในการทดสอบต่าง ๆ ซึ่งเตรียมโดยใช้ขดลวดวงกลมที่ปลาย (loop)ปลาตินั่ม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ขูดโคโลนีของเชื้อแต่ละสายพันธุ์จากผิวอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ (plate) ให้เต็มวงในหลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 13x100 มิลลิลิตร ซึ่งมีน้ำเกลือที่ฆ่าเชื้อแล้วความเข้มข้น 0.9 % จำนวน 2-3 หยดละเลงเชื้อที่ขูดได้เข้ากับด้านในของหลอดแก้วบริเวณก้นหลอด จนเชื้อทั้งหมดกระจายตัวดี จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) เพื่อให้ก้อนโคโลนีละลายไปกับน้ำเกลือ จากนั้นจึงเติมน้ำเกลือที่ฆ่าเชื้อแล้วความเข้มข้น 0.9 % ลงไปจนกระทั่งการแขวนตะกอนของเชื้อกระจายตัวในน้ำเกลืออย่างสม่ำเสมอ เทียบความขุ่นได้เท่ากับความขุ่นสม่ำเสมอของมาตรฐาน Mcfarland เบอร์ 5(Difco)เพื่อให้ได้ความขุ่นมาก ๆ และใช้ปริมาณ 2 หยด ในทุกการทดสอบที่ไม่ใช้โคโลนีของเชื้อโดยตรง ยกเว้นการทดสอบ ดูอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อเท่านั้น จึงจะใช้เทียบความขุ่นมาตรฐาน Mcfarland 1 (Difco)และใช้ปริมาณ 2 หยดเท่ากัน ส่วนการอบเชื้อโดยทั่วไป ทุกการทดสอบจะใช้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน การทดสอบที่ให้ผลบวกในเวลา 2 วันจะทิ้งไป ส่วนการทดสอบที่ให้ ผลลบ จะเก็บไว้อ่านผลโดยอ่านทุกวันเป็นเวลา 7 วัน ในกรณีที่ผลการทดสอบไม่ชัดเจนจะทำการทดสอบใหม่ รายละเอียดของวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ การย้อมสีและสารเคมีเพื่อใช้ทดสอบจะกล่าวไว้ในภาคผนวก

รายละเอียดของการทดสอบแต่ละลักษณะมีดังนี้ คือ

**กลุ่มลักษณะที่ 1 Colony morphology** (73)

ลำดับการทดสอบที่ 1 เมื่อโคโลนีแบน (flat)

ลำดับการทดสอบที่ 2 เมื่อโคโลนีนูน (convex)

ลำดับการทดสอบที่ 3 เมื่อโคโลนีมีขอบไม่เรียบ (irregular)

ลำดับการทดสอบที่ 4 เมื่อโคโลนีมีขอบเรียบ (entire)

ลำดับการทดสอบที่ 5 เมื่อโคโลนีเหี่ยวย่น (wrinkle)

ดูลักษณะของโคโลนีที่เจริญบน nutrient agar อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

**กลุ่มลักษณะที่ 2 Hemolysis on sheep blood agar plate** (73)

ลำดับการทดสอบที่ 6 hemolyse เซลล์เม็ดเลือดแดงได้หมด (complete)

ลำดับการทดสอบที่ 7 hemolyse เซลล์เม็ดเลือดแดงได้เพียงบางส่วน (partial)

ดูความสามารถในการ hemolyse เซลล์เม็ดเลือดแดง หลังจากเลี้ยงเชื้อบน sheep blood agar plate เป็นเวลา 2 วัน

**กลุ่มลักษณะที่ 3 Emulsification of colonies** (26)

ลำดับการทดสอบที่ 8 การละลายของเชื้อยาก (difficult)

ลำดับการทดสอบที่ 9 การละลายของเชื้อง่าย (easy)

ดูการละลาย(suspension) ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในน้ำกลั่นว่าง่ายหรือยาก โดยหยดน้ำกลั่น 1 หยดบนกระจกสไลด์ แล้วเขี่ยเชื้อเล็กน้อย แตะลงไปในหยดน้ำนั้น ถ้าหยดน้ำขุ่นแสดงว่าเชื้อนั้นละลายง่ายแต่ถ้ายังมองเห็นเป็นก้อนเชื้ออยู่ แสดงว่าละลายยาก

**กลุ่มลักษณะที่ 4 Cell morphology** (26)

ลำดับการทดสอบที่ 10 เมื่อเชื้อมีอัตราส่วนระหว่างความกว้างและความยาวในอัตราส่วน 1:1 (coccobacillus)

ลำดับการทดสอบที่ 11 เมื่อเชื้อมีอัตราส่วนระหว่างความกว้างและความยาวในอัตราส่วน 1:>1 แต่ <,หรือ=3 (short rod)

ลำดับการทดสอบที่ 12 เมื่อเชื้อมีอัตราส่วนระหว่างความกว้างและความยาวในอัตราส่วน 1:>3 (long rod)

ลำดับการทดสอบที่ 13 ลักษณะของเซลล์ไม่แน่นอน (pheomorphism)

ลำดับการทดสอบที่ 14 เมื่อย้อมสีติดสีเข้มบริเวณส่วนหัวและส่วนท้าย (bipolar)

ดูรูปร่างของเซลล์หลังจากย้อมสีกรัม โดยใช้อัตราส่วนระหว่างความกว้างและความยาวเป็นหลักพิจารณา คือ long rod เมื่ออัตราส่วนเป็น 1:>3, short rod เมื่ออัตราส่วนเป็น 1:>1แต่<,หรือ=3, coccoid (Coccobacilli) เมื่ออัตราส่วนเป็น 1:1 และเมื่อเป็น pleomorphism ถ้ามีการผสมกันของ 2 ลักษณะขึ้นไป, แต่ถ้าย้อมสีกรัมแล้วเชื้อติดสีเข้มบริเวณส่วนหัว และส่วนท้ายเรียก bipolar

**กลุ่มลักษณะที่ 5 Flagella number** (57)

ลำดับการทดสอบที่ 15 จำนวนแฟลกเจลลา 1 เส้น

ลำดับการทดสอบที่ 16 จำนวนแฟลกเจลลามากกว่า 1 เส้น

ตรวจนับจำนวนแฟลกเจลลา เมื่อย้อมเชื้อด้วยสีย้อมแฟลกเจลลาโดย Ryu method (วิธีการเตรียมดูในภาคผนวก ก.) วิธีการทดสอบ ใช้เชื้อที่เลี้ยงบน blood agar plate อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อ (ไม่ให้โดนเนื้อวุ้น)แตะเบาๆบนน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่หยดบนสไลด์ที่สะอาด เอียงสไลด์ให้หยดน้ำไหลลงมา ทิ้งไว้ให้แห้งในอุณหภูมิห้องหยด

น้ำยาย้อมแฟลกเจลลาให้ท่วมทิ้งไว้ 2-5 นาทีล้างน้ำทิ้งไว้ให้แห้ง ตรวจนับจำนวนแฟลกเจลลาด้วยกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 1,000 เท่า

**กลุ่มลักษณะที่ 6 Cytochrom oxidase test** (42,100,101)

ลำดับการทดสอบที่ 17 oxidase test

ทดสอบการสร้าง indophenol oxidase (cytochrome) โดยเลี้ยงเชื้อใน nutrient agar (เตรียม nutrient agar ในหลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร วาง slant ) อบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม indophenol oxidase reagent A ลงไป 3 หยด และ solution B 3 หยด (วิธีการเตรียมดูในภาคผนวก ค.) เขย่าเบาๆ ถ้าเกิดสีน้ำเงินเข้มบนโคโลนี ภายในเวลา 30 วินาที แสดงว่าให้ผลบวก

**กลุ่มลักษณะที่ 7 Catalase production** (62)

ลำดับการทดสอบที่ 18 Catalase test

ทดสอบการสร้างเอ็นซัยม์ Catalase วิธีทดสอบหยด 3 % $H_2O_2$ จำนวน 2 หยด ลงบนสไลด์ เขี่ยโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบแตะลงไปบน 3%$H_2O_2$ สังเกตุดูการเกิดฟอง ถ้าให้ฟองเกิดขึ้นแสดงว่าการทดสอบให้ผลบวก

**กลุ่มลักษณะที่ 8 Reaction on Triple Sugar Iron (TSI) agar** (95)

ลำดับการทดสอบที่ 19 No change butt, Alkaline slant

ลำดับการทดสอบที่ 20 Alkaline butt, Alkaline slant

ลำดับการทดสอบที่ 21 Acid butt, Acid slant

ทดสอบปฏิกิริยาของเชื้อที่เจริญบน triple sugar iron agar วิธีการทดสอบใช้ลวดปลายแหลม(needle) แตะเชื้อที่เลี้ยงใน nutrient

agar 18 ชั่วโมง แทง (stab) ลงไปที่ก้นหลอดของ TSI agar จากนั้นละ-เลงเชื้อที่ผิวหน้าของ TSI agar อบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ถ้าเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแสดงว่าเกิดกรด,สีแดงแสดงว่าเกิดด่าง,ไม่เปลี่ยนแปลงอ่านว่า no change

**กลุ่มลักษณะที่ 9 Diffusable pigment production** (26)

ลำดับการทดสอบที่ 22 Diffusable

ดูการแพร่กระจายของรงควัตถุ (Pigment) เข้าสู่เนื้ออาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar ถ้าสามารถแพร่กระจายได้จะเกิดสีกระจายทั่วบริเวณอาหารเลี้ยงเชื้อ

**กลุ่มลักษณะที่ 10 Colonial pigmentation** (86)

ลำดับการทดสอบที่ 23 เมื่อโคโลนีมีสีเขียว (Green)

ลำดับการทดสอบที่ 24 เมื่อโคโลนีมีสีน้ำตาล (Brown)

ลำดับการทดสอบที่ 25 เมื่อโคโลนีมีสีเหลือง (Yellow)

ลำดับการทดสอบที่ 26 เมื่อโคโลนีมีสีส้ม (Organge)

ลำดับการทดสอบที่ 27 เมื่อโคโลนีมีสีขาว (White)

ดูการเกิดสีของโคโลนี เมื่อเลี้ยงเชื้อบน nutrient agar

**กลุ่มลักษณะที่ 11 Motility test** (59)

ลำดับการทดสอบที่ 28 เคลื่อนที่ได้ (Motile)

ดูความสามารถในการเคลื่อนที่ ของเชื้อที่เลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของ agar 0.3 % อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง อ่านผลในกรณีพบว่าเชื้อไม่เคลื่อนที่ ให้อบที่อุณหภูมิห้องต่ออีกเป็นเวลา 7 วัน อ่านผลทุกวัน

**กลุ่มลักษณะที่ 12 Hugh and Leifson's oxidative & Fermentative** (58)

ลำดับการทดสอบที่ 29 oxidative

ลำดับการทดสอบที่ 30 Fermentative

ตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรท ทั้งแบบ oxidative (ในสภาวะที่มีอากาศ) และแบบ Fermantation (ในสภาวะที่ไร้อากาศ) ซึ่งในสภาวะไร้อากาศ แบคทีเรียจะแตกสลาย glucose เป็นโมเลกุลของคาร์บอน 2-3 โมเลกุล ซึ่งจะรวมตัวเป็นกรดแลคติก ( Lactic acid) และกรดฟอร์มิก (formic acid) ส่วนในสภาวะที่มีอากาศ ซึ่งมีออกซิเจนอยู่ กลุ่มแอคดีฮัย (Aldehyde group) ของglucoseจะถูก oxidise เป็นกลุ่มคาร์บอกซิล ( Carboxyl ) รวมตัวเป็นกรดกลูโคนิก ( gluconic acid) เหตุผลที่ต้องใช้OF basal medium ในการทดสอบการใช้glucoseในสภาวะที่มีอากาศ ของกลุ่มเชื้อพวก non-fermentative gram negative rod เนื่องจากเหตุผล 3 ประการ คือ

1. การใช้glucoseในสภาวะมีอากาศเกิดกรดน้อยกว่าในสภาวะไร้อากาศ

2. ความแรงของกรดในสภาวะมีอากาศ (กรดกลูโคนิก) ไม่แรงเท่าความแรงของกรดในสภาวะไร้อากาศ (แลคติกแอซิด, ฟอร์มิก แอซิด)

3. มีเดียตัวอื่น เช่น peptone broth มีโปรตีนสูง ทำให้เกิดด่างจากขบวนการ metabolism ซึ่งจะมาทำให้สภาวะที่เป็นกลาง (Neutralize) กรดที่เกิดจากการใช้ glucoseในสภาวะมีอากาศได้ ดังนั้น การใช้ OF basal medium จึงเหมาะสมในการทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรทโดยเฉพาะ glucose ในสภาวะที่มีอากาศ เนื่องจากได้เพิ่มอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรทต่อ peptone อีกทั้งยังมีส่วนผสมของวุ้นอีกเล็กน้อย เพื่อป้องกันมิให้กรดที่เกิดขึ้นซึ่งมีเพียงเล็กน้อย และเป็นกรดอ่อน กระจายตัวออก ทำให้ปริมาณกรดจำนวนเล็กน้อยนี้รวมตัวกันเป็นกลุ่ม บนผิวอาหาร

**กลุ่มลักษณะที่ 13 Citrate Utilization test (Simmons)** (62)

ลำดับการทดสอบที่ 31 Citrate test

ทดสอบดูความสามารถในการใช้สารประกอบ Citrate เป็นแหล่งคาร์บอน (carbon source) เพื่อเป็นพลังงาน ผลที่ได้จะปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะรวมตัวกันเป็นด่าง โดยเปลี่ยนสี indicator ชนิด bromothymal blue เป็นสีน้ำเงิน

**กลุ่มลักษณะที่ 14 Urease test, Christensen's** (60)

ลำดับการทดสอบที่ 32 Urease test

ดูความสามารถในการ hydrolyse สารประกอบ Urea โดยเอ็นซัมย์ Urease เป็นแอมโมเนีย 2 โมเลกุล และคาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมเลกุล แอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะมีฤทธิ์เป็นด่าง ซึ่งจะเปลี่ยนสี indicator ชนิด phenol red เป็นสีแดง

**กลุ่มลักษณะที่ 15 Hydrogen sulfide test** (61)

ลำดับการทดสอบที่ 33 $H_2S$ on TSI

ลำดับการทดสอบที่ 34 $H_2S$ on Lead acetate paper

ดูการเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งทดสอบ 2 วิธี คือ

1. เลี้ยงเชื้อใน TSI agar (สำหรับการทดสอบที่ 19-21) โดยวิธีป้ายเชื้อบนส่วนลาดเอียง (slant) แทงเชื้อลงก้นหลอด (butt) ถ้าเกิดตะกอนสีดำบริเวณก้นหลอด แสดงว่าเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์
2. เลี้ยงเชื้อใน nutrient broth สอดกระดาษกรองที่ชุบ lead acetate (ตัดกระดาษกรองขนาดกว้าง 5-10 มิลลิเมตร ยาว 50-60 มิลลิเมตร ชุบสารละลาย lead acetate ที่อิ่มตัว นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส) ไว้ข้างหลอดทดลอง ถ้ามีก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ กระดาษจะเป็นสีดำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**กลุ่มลักษณะที่ 16 Potassium Cyanide test** (60)

ลำดับการทดสอบที่ 35 KCN test

ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการเจริญเติบโตใน KCN broth วิธีการทดสอบใช้เชื้อจำนวน 1 ขดลวดวงกลมที่ปลายเลี้ยงใน KCN brothซึ่งประกอบด้วย Potassium Cyanide 0.005 % ที่เตรียมในหลอดทดลองชนิดฝาจุกเกลียว (เพื่อป้องกันการระเหยของ KCN) ปิดจุกให้แน่นอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตุความขุ่นของ KCN broth ถ้าขุ่นแสดงว่าเชื้อที่ใช้ทดสอบสามารถเจริญเติบโตได้ใน KCN broth

**กลุ่มลักษณะที่ 17 β-Galactosidase (ONPG) test** (63)

ลำดับการทดสอบที่ 36 ONPG test

ทดสอบการสร้างเอ็นซัมย์ β-galactosidase ซึ่งจะhydrolyse o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG)ให้ o-nitrophenyl มีสีเหลือง

**กลุ่มลักษณะที่ 18 ทดสอบหารงควัตถุ Pyocynin และ Fluorescein** (36)

ลำดับการทดสอบที่ 37 King A (pyocyanin)

ลำดับการทดสอบที่ 38 King B (fluorescein)

ใช้ทดสอบเพื่อหารงควัตถุ Pyocyanin ใน King A และรงควัตถุ fluorescin ใน King B สำหรับ King A medium อบที่ 37 องศาเซล-เซียส เป็นเวลา 24-96 ชั่วโมง และใน King B medium อบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาอบไว้ที่อุณหภูมิห้องต่ออีก 72 ชั่วโมง

**กลุ่มลักษณะที่ 19 Nitrate reduction and denitrification** (74,75)

ลำดับการทดสอบที่ 39 Nitrate

ลำดับการทดสอบที่ 40 Nitrogen gas

เชื้อบางสายพันธุ์สามารถใช้ Nitrate ในขบวนการหายใจเพื่อเป็นแหล่งของ electron aceptor การทดสอบ nitrate reduction เพื่อดูความสามารถในการผลิตเอ็นซัยม์ Nitrase (nitrate reductase) ซึ่ง reduce nitrate ให้เป็น nitrite และอาจ reduce ต่อไป กลายเป็น ก๊าซไนโตรเจน, ก๊าซ แอมโมเนีย และเอมีน (amines) ซึ่งเรียกขบวนการนี้ว่า denitrification การทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อใน nitrate broth ที่มีหลอด Durham คว่ำอยู่ ภายในเพื่อใช้ดักก๊าซที่อาจเกิดขึ้น จากนั้นนำมาอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 2 วัน สังเกตุดูก๊าซที่เกิดขึ้น ภายในหลอด Durham จากนั้นใช้ไปเปตดูด nitrate broth ที่เลี้ยงไว้แล้วนี้ประมาณ 1 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ในหลอดขนาดเล็ก เติมน้ำยาทดสอบ reagent A (0.8 % Sulphanilic acid ใน 5 N-acetic acid) 0.4 มิลลิลิตร (ประมาณ 8 หยด), reagent B(0.6 % dimethyl α naphthylamine ใน 5N-acetic acid) 0.2 มิลลิลิตรประมาณ 4 หยด สังเกตุดูการเกิดสีแดงเข้มในหลอด ซึ่งเกิดจากสารประกอบเชิงซ้อน *p*-Benzoic Sulfonic Acid-Azo-Alpha-Naphthylamine ถ้าการทดสอบให้ผลลบ เติมผงสังกะสี (Zinc dust) ลงไปใน nitrate broth ที่ทดสอบในบริมาณเล็กน้อย ถ้าเกิดสีแดงขึ้น แสดงว่ายังคงมี nitrate เหลืออยู่อ่านผลการทดสอบเป็นลบ ทั้งนี้เนื่องจากผงสังกะสีจะไปทำหน้าที่ reduction Catalyst เปลี่ยน nitrate ให้เป็น nitrite เมื่อถูกกับ reagent A และ B ที่มีอยู่ใน nitrate broth จึงเกิดสีแดงขึ้น แต่ถ้าเติมผงสังกะสีแล้วไม่เกิดสีแดง แสดงว่า ถูก reduce เป็นก๊าซไนโตเจนและแอมโมเนีย หมดแล้ว (Denitrification)ซึ่งจะสังเกตุการเกิดก๊าซในหลอด Durham

**กลุ่มลักษณะที่ 20 Gluconate oxidation** (64)

ลำดับการทดสอบที่ 41 Gluconate

เชื้อบางสายพันธุ์สามารถ oxidise potassium gluconate ให้เป็น 2 keto gluconate (reducing compound) ซึ่งจะสะสมเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อเติมสารคอปเปอร์ซัลเฟต (Copper Sulfate) จะถูก reduce เกิดเป็นตะกอนสีส้มอมน้ำตาล วิธีการทดสอบ เติมน้ำยา เบนนีดิกส์ (Benedict's qualitative solution : ใน 1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย Sodium citrate 17.3 กรัม, $Na_2Co_3$ anhyd. 10 กรัม, $CuSO_4$ 5 $H_2O$ 1.73 กรัม) จำนวน 1 มิลลิลิตรใน gluconate broth ซึ่งอบเลี้ยงเชื้อไว้แล้วเป็นเวลา 2 วัน เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ถ้าเกิดตะกอนสีส้มอมน้ำตาล แสดงว่าการทดสอบให้ผลบวก Carpenter (1961)(69) ได้แนะนำให้ใช้ Clinitest tablet (Ames & Co.) ซึ่งเป็นเม็ดยาที่ใช้ทดสอบหาน้ำตาลในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเบาหวาน ซึ่งให้ผลรวดเร็วกว่า และสะดวกกว่า ไม่ต้องต้มในน้ำเดือด

**กลุ่มลักษณะที่ 21 Indole test (59)**

ลำดับการทดสอบที่ 42 Indole

ทดสอบดูการสร้างเอ็นซัยม์ tryptophanase ซึ่งสามารถตัด side chain ของสาร tryptophan ให้เป็น aromatic ring ในรูปของ indole การทดสอบเลี้ยงเชื้อใน trypticase soy broth 3 มิลลิลิตร อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ไปเปตดูด tryticase soy broth ที่เลี้ยงเชื้อไว้มาส่วนหนึ่งเติม Kovacs reagent ลงไป ถ้าการทดสอบให้ผลลบให้เติม Xylene ลงไปในหลอดที่เหลือ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันด้วยเครื่อง Vortex mixer จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 2 นาที เติม Ehrlich's reagent ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาทีถ้าเกิดวงแหวนสีแดงระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อและ Xylene แสดงว่า ปฏิกริยาเป็นบวก

**กลุ่มลักษณะที่ 22 Malonate Utilization** (76)

ลำดับการทดสอบที่ 43 malonate

ทดสอบการใช้ malonate เป็นแหล่งของคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งของไนโตรเจน ทำให้เกิด pyruvate,sodium hydroxide และ sodium bicarbonate ขบวนการนี้ก่อให้เกิดสภาวะที่เป็นด่าง ซึ่งจะเปลี่ยนสี indicator ชนิด bromothymal blue จากสีเขียวให้กลายเป็นสีน้ำเงิน

**กลุ่มลักษณะที่ 23 Phenylalanine deamination** (67)

ลำดับการทดสอบที่ 44 P.D. test

ทดสอบการ deaminate oxidative phenylalanine ให้กรด phenylpyruvic และก๊าซแอมโมเนีย กรด phenylpyruvic จะรวมตัวกับ ferric ions ในน้ำยา Ferric chloride (10 % $FeCl_3$ aq.solution) เกิดสีเขียว

วิธีการทดสอบ ใส่เชื้อจำนวนมาก ๆ ลงไปบน phylalanine agar slope อบ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เติม 10 % $FeCl_3$ จำนวน 0.2 มิลลิลิตร บนผิววุ้นที่เชื้อขึ้น ถ้าเกิดสีเขียวบนวุ้นแสดงว่าให้ผลบวก

**กลุ่มลักษณะที่ 24 Decarboxylase reaction** (77,78)

ลำดับการทดสอบที่ 45 Arginine dihydrolase

ลำดับการทดสอบที่ 46 Lysine decarboxylase

ลำดับการทดสอบที่ 47 Ornithine decarboxylase

ทดสอบขบวนการ decarboxylation และ dihydration เพื่อดูความสามารถในการ decarboxylate กรดอะมิโน ชนิด lysine และ ornithine ให้เป็น cadaverine (1,5-diaminopentane), putrescine

(1,4-diaminobutane) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ตามลำดับ ส่วน arginine ใช้ขบวนการ dihydration โดยเอ็นซัยม์ dihydrolase ให้เป็น putrescine, ก๊าซแอมโมเนีย และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ putrescine และ cadaverine จะจับกับไฮโดรเจนอิออน ทำให้ pH เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจะเปลี่ยนสี indicator ชนิด bromcresol purple ให้เป็นสีม่วงเข้มขึ้น การทดสอบ decarboxylase reaction ในเชื้อ pseudomonads ซึ่งเป็นกลุ่ม Non-fermentative ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส ดังนั้น ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงจึงเกิดสภาวะที่เป็นด่างอย่างเดียวไม่ผ่านขั้นตอนของการเกิดกรดอันเนื่องมาจากการหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส

**กลุ่มลักษณะที่ 25 Lecithinase (Egg Yolk Opacity) test** (79,80)

ลำดับการทดสอบที่ 48 Lecithinase

ทดสอบการสร้างเอ็นซัยม์ lecithinase ซึ่งจะ hydrolyse lecithin (lipoprotein ส่วนหนึ่งใน egg yolk) ให้ fatty acid, glycerophosphoric acid และ choline เกิดเป็นตะกอนของไขมันรอบ ๆ โคโลนี ทำให้มองเห็นรอบ ๆ โคโลนีขุ่น (opaleseence)

**กลุ่มลักษณะที่ 26 Aesculin hydrolysis** (69)

ลำดับการทดสอบที่ 49 Aesculin hydrolysis

ทดสอบการ hydrolyse aesculin (beta-D glucose-6,7-dihydroxycoumarine) ในส่วนของ beta-glucose linkage ให้กลูโคสและ aesculetin ซึ่ง aesculetin จะไปจับกับ ferric ions ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ferric citrate) ให้สารประกอบที่เป็นสีดำ วิธีการทดสอบเลี้ยงเชื้อใน trypticase soy agar plate ซึ่งมีส่วนผสมของ Aesculin 0.1 % (W/V),ferric citrate 0.05 % (W/V) อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตุดูตะกอนสีดำรอบ ๆ บริเวณที่เชื้อขึ้น

**กลุ่มลักษณะที่ 27 Polysorbate (tween) 80 hydrolysis** (84)

ลำดับการทดสอบที่ 50 Tween 80

ทดสอบการ hydrolyse polysorbate (Tween) 80 โดยเอ็นซัยม์ lipase เกิดฝ้าตะกอนรอบ ๆ โคโลนี

**กลุ่มลักษณะที่ 28 Starch hydrolysis** (62)

ลำดับการทดสอบที่ 51 Starch hydrolysis

ทดสอบการ hydrolyse แป้ง (starch) โดยเอ็นซัยม์ amylase ทดสอบโดยใส่น้ำยาไอโอดีน บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ ถ้ามีการ hydrolyse แป้งจะเกิดวงใส ๆ (clear zone) รอบ ๆ บริเวณที่เชื้อเจริญเติบโต

**กลุ่มลักษณะที่ 29 Deoxyribonuclease (DNAse) test** (81,82)

ลำดับการทดสอบที่ 52 DNAse

เอ็นซัยม์ Deoxyribonuclase จะ hydrolyse nucleic acid แตกสลาย ไม่ตกตะกอน (non-precipitate) เมื่อเติม 1N hydrochloric acid (1N HCl) ลงไป กรดจะตกตะกอน nucleic acid ที่ไม่ถูก hydrolyse ส่วนของ nucleic acid ที่ถูก hydrolyse รอบ ๆ เชื้อจะเกิดเป็นวงใส ๆ รอบ ๆ บริเวณที่ใส่เชื้อลงไป การทดสอบนี้ใช้แยกเชื้อ P. maltophilia ออกจาก P. cepacia และ P. vesicularis

**กลุ่มลักษณะที่ 30 Gelatin liquefaction** (59)

ลำดับการทดสอบที่ 53 gelatin test

ทดสอบการสร้างเอ็นซัยม์ proteolytic (gelatinase) ซึ่งจะ hydrolyse gelatin เป็น peptides และจาก peptides เป็นกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ การทดสอบใช้หลักการว่า gelatin จะอ่อนตัวเมื่ออยู่ในอุณหภูมิ

มากกว่า 30 องศาเซลเซียส และจะแข็งตัวเมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส ดังนั้น เมื่อ gelatin ถูก hydrolyse แล้วจะทำให้คุณสมบัติในการแข็งตัวที่ภายใต้อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส เสียไป

**กลุ่มลักษณะที่ 31 Acetamide hydrolysis** (66,87)

ลำดับการทดสอบที่ 54 Acetamide

ทดสอบการสร้างเอ็นซัยม์ acylamidase ซึ่งจะ deamidates สาร acetamide ให้ก๊าซแอมโมเนีย การทดสอบใส่เชื้อลงไปใน mineral base broth medium ($MgSO_4$ anhydrous 0.1 กรัม, NaCl 5.0 กรัม, $(NH_4)_2HPO_4$ 5.0 กรัม, $KH_2PO_4$ anhydrous 1.0 กรัม, น้ำกลั่น 1 ลิตร) ที่มีส่วนผสมของ Acetamide 0.1 % อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง หยด Nessler's reagent (วิธีเตรียมในภาคผนวก ค.)จำนวน 1 หยด ถ้าเกิดตะกอนสีน้ำตาลแดง แสดงว่าเกิดก๊าซแอมโมเนียจากปฏิกิริยาacylamidase action การทดสอบนี้ใช้แยก fluorescent psendomonads (70) โดย P. aeruginosa สามารถ hydrolyse acetamide ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ขณะที่ fluorescent psendomonads อื่น ๆ ไม่ให้ปฏิกิริยานี้

**กลุ่มลักษณะที่ 32 Arginine hydrolysis** (83)

ลำดับการทดสอบที่ 55 Arginine

ทดสอบการ hydrolyse arginine วิธีการทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อใน arginine broth อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติม Nessler's reagent 0.25 มิลลิลิตร ผลบวกจะเกิดสีน้ำตาลขึ้นเมื่อเติม Nessler's reagent

**กลุ่มลักษณะที่ 33 Growth on MacConkey agar** (67)

ลำดับการทดสอบที่ 56 Growth on MacConkey agar

ทดสอบการเจริญเติบโตบน differential media การทดสอบใช้เชื้อที่เลี้ยงใน trypticase soy broth 18 ชั่วโมง เทียบวัด Mcfarland เบอร์ 1 (difco) นำขดลวดวงกลมที่ปลาย ถ่ายเชื้อลงบนผิวของ MacConkey agar ด้วยวิธีการละเลง (Streak) นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อ่านผลใน 24 ชั่วโมง ถ้าให้ผลลบอบต่ออีก 24 ชั่วโมง

**กลุ่มลักษณะที่ 34 Growth on Salmonella Shigella agar** (67)

ลำดับการทดสอบที่ 57 Growth on SS agar

ทดสอบการเจริญเติบโตบน highly selective media การทดสอบทำวิธีเดียวกับการทดสอบที่ 56

**กลุ่มลักษณะที่ 35 Growth on 1 % TTC** (73)

ลำดับการทดสอบที่ 58 1 % TTC

ทดสอบความสามารถของเชื้อในการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 1 % triphenyl tetrazolium chloride วิธีการทดสอบเช่นเดียวกับวิธีการทดสอบที่ 56

**กลุ่มลักษณะที่ 36 Salt tolerance** (73)

ลำดับการทดสอบที่ 59 NaCl 0 %

ลำดับการทดสอบที่ 60 NaCl 2.5 %

ลำดับการทดสอบที่ 61 NaCl 5 %

ลำดับการทดสอบที่ 62 NaCl 6.5 %

ลำดับการทดสอบที่ 63 NaCl 8 %

ทดสอบความสามารถของเชื้อในการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเกลือแกง (NaCl) ในปริมาณต่าง ๆ กัน การทดสอบใช้เชื้อที่เลี้ยงใน nutrient broth 18 ชั่วโมง เทียบวัดความขุ่นให้ได้มาตรฐาน Mcfarland เบอร์ 1 (Difco) ใช้ไปเปต ดูดเชื้อใส่ลงไปใน salt broth (Beef extract 10 กรัม, peptone 10 กรัม, เกลือแกงตามปริมาณที่ใช้ทดสอบ, น้ำ 1 ลิตร) จำนวน 1 หยด นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อ่านผลดูความขุ่นของเชื้อใน salt broth ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน

**กลุ่มลักษณะที่ 37 pH tolerance** (73)

ลำดับการทดสอบที่ 64 เจริญเติบโตที่ pH 3

ลำดับการทดสอบที่ 65 เจริญเติบโตที่ pH 5

ลำดับการทดสอบที่ 66 เจริญเติบโตที่ pH 7

ลำดับการทดสอบที่ 67 เจริญเติบโตที่ pH 9

ทดสอบความสามารถของเชื้อในการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH ต่าง ๆ กัน การทดสอบกระทำเช่นเดียวกับลำดับการทดสอบที่ 59-63 โดยใช้ nutrient broth ปรับระดับ pH ตามที่กำหนด อ่านผลโดยดูความขุ่นของเชื้อใน nutrient broth ที่ปรับระดับ pH แล้วนี้ ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน

**กลุ่มลักษณะที่ 38 Temperature to growth** (67,68)

ลำดับการทดสอบที่ 68 เจริญเติบโตที่ 4 องศาเซลเซียส

ลำดับการทดสอบที่ 69 เจริญเติบโตที่ 42 องศาเซลเซียส

ลำดับการทดสอบที่ 70 เจริญเติบโตที่ 45 องศาเซลเซียส

เชื้อกลุ่ม Nonfermentative สปีชีส์ต่าง ๆ จะมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิต่าง ๆ กัน (ตั้งแต่ 4 ถึง 45 องศาเซลเซียส) ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้ มีประโยชน์ในการแยกเชื้อเหล่านี้ การทดสอบใช้เชื้อที่เลี้ยงใน nutrient broth เช่นเดียวกับลำดับการทดสอบที่ 59-63 ตักเชื้อ

1 ขดลวดวงกลมที่ปลาย (loop) ปลาตินั่มขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่ปลาย 3 มิลลิเมตร ใส่ลงไปบนส่วนลาดเอียงของ trypticase soy agar (TSA) จำนวนเชื้อละ 2 หลอด เป็นหลอดทดสอบ 1 หลอด และหลอดควบคุม 1 หลอด นำหลอดทดสอบไปอบที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันตามกำหนด ถ้าทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโต ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 37 องศาเซลเซียสขึ้นไป กระทำในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath)ควบคุมอุณหภูมิอยู่ระหว่าง $\pm$ 0.5 องศาเซลเซียส ส่วนการทดสอบในอุณหภูมิที่ต่ำทำการทดสอบในตู้ปรับอุณหภูมิเย็น(refrigerate incubator) หลอดควบคุมที่เหลือ 1 หลอด นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้อบปกติทั่ว ๆ ไป อ่านผลทุกวันเป็นเวลา 7 วัน

**กลุ่มลักษณะที่ 39 Bile tolerance** (69)

ลำดับการทดสอบที่ 71 เจริญเติบโตในเกลือน้ำดี 5 เปอร์เซ็นต์

ลำดับการทดสอบที่ 72 เจริญเติบโตในเกลือน้ำดี 10 เปอร์เซ็นต์

ลำดับการทดสอบที่ 73 เจริญเติบโตในเกลือน้ำดี 20 เปอร์เซ็นต์

ลำดับการทดสอบที่ 74 เจริญเติบโตในเกลือน้ำดี 40 เปอร์เซ็นต์

ทดสอบดูความสามารถของเชื้อในการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของเกลือน้ำดี (Bile salt) ในปริมาณต่าง ๆ กัน การทดสอบใช้เชื้อที่เลี้ยงใน nutrient broth เช่นเดียวกับการทดสอบที่ 59-63 ใช้ไปเปตดูดเชื้อลงไปใน nutrient agar ที่มีส่วนผสมของเกลือน้ำดีในปริมาณต่าง ๆ กัน จำนวน 2 หยด นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ถ้ามีเชื้อเกิดขึ้นบนลาดเอียง(slant)ของอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงว่า ให้ผลบวก

**กลุ่มลักษณะที่ 40 Acid production from Carbohydrate and sugar derivative** (26,58,85)

ลำดับการทดสอบที่ 75 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Aesculin

ลำดับการทดสอบที่ 76 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Arabinose

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับการทดสอบที่ 77 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Adonitol
ลำดับการทดสอบที่ 78 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Cellobiose
ลำดับการทดสอบที่ 79 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Dulcitol
ลำดับการทดสอบที่ 80 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Dextrin
ลำดับการทดสอบที่ 81 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Ethanol
ลำดับการทดสอบที่ 82 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Erythriol
ลำดับการทดสอบที่ 83 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Fructose
ลำดับการทดสอบที่ 84 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Galactose
ลำดับการทดสอบที่ 85 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Glucose
ลำดับการทดสอบที่ 86 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Inositol
ลำดับการทดสอบที่ 87 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Inulin
ลำดับการทดสอบที่ 88 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Lactose
ลำดับการทดสอบที่ 89 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Melibiose
ลำดับการทดสอบที่ 90 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Mannose
ลำดับการทดสอบที่ 91 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Mannitol
ลำดับการทดสอบที่ 92 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Melizitose
ลำดับการทดสอบที่ 93 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Maltose
ลำดับการทดสอบที่ 94 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Rhamnose
ลำดับการทดสอบที่ 95 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Raffinose
ลำดับการทดสอบที่ 96 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Ribose
ลำดับการทดสอบที่ 97 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Sorbose
ลำดับการทดสอบที่ 98 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Salicin
ลำดับการทดสอบที่ 99 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Starch
ลำดับการทดสอบที่ 100 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Sorbitol
ลำดับการทดสอบที่ 101 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Saccharose
ลำดับการทดสอบที่ 102 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Trehalose

ลำดับการทดสอบที่ 103 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด Xylose

ลำดับการทดสอบที่ 104 ผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิด 10 % Lactose

ดูความสามารถของเชื้อ Pseudomonas spp. ในการผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรท การทดสอบโดย เลี้ยงเชื้อใน OF basal medium ที่มีส่วนผสมของสารประกอบคาร์โบไฮเดรท ในความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ (การทดสอบดูการผลิตกรดใน 10 % Lactose ใช้ purple agar base) อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อ่านผลโดยดูการเปลี่ยนสีของindicator จากสีเขียวเป็นสีเหลือง อ่านผลทุกวันเป็นเวลา 7 วัน

**กลุ่มลักษณะที่ 41 Utilization of Carbohydrate and sugar derivative as the sole carbon source (26,73,88)**

ลำดับการทดสอบที่ 105 การใช้ Carbon source จาก Aesculin

ลำดับการทดสอบที่ 106 การใช้ Carbon source จาก Arabinose

ลำดับการทดสอบที่ 107 การใช้ Carbon source จาก Adonitol

ลำดับการทดสอบที่ 108 การใช้ Carbon source จาก Cellobiose

ลำดับการทดสอบที่ 109 การใช้ Carbon source จาก Dulcitol

ลำดับการทดสอบที่ 110 การใช้ Carbon source จาก Dextrin

ลำดับการทดสอบที่ 111 การใช้ Carbon source จาก Ethanol

ลำดับการทดสอบที่ 112 การใช้ Carbon source จาก Erythriol

ลำดับการทดสอบที่ 113 การใช้ Carbon source จาก Fructose

ลำดับการทดสอบที่ 114 การใช้ Carbon source จาก Glucose

ลำดับการทดสอบที่ 115 การใช้ Carbon source จาก Galactose

ลำดับการทดสอบที่ 116 การใช้ Carbon source จาก Gluconate

ลำดับการทดสอบที่ 117 การใช้ Carbon source จาก Glycerol

ลำดับการทดสอบที่ 118 การใช้ Carbon source จาก Inositol

ลำดับการทดสอบที่ 119 การใช้ Carbon source จาก Inulin
ลำดับการทดสอบที่ 120 การใช้ Carbon source จาก Lactose
ลำดับการทดสอบที่ 121 การใช้ Carbon source จาก Melibiose
ลำดับการทดสอบที่ 122 การใช้ Carbon source จาก Mannose
ลำดับการทดสอบที่ 123 การใช้ Carbon source จาก Mannitol
ลำดับการทดสอบที่ 124 การใช้ Carbon source จาก Melizitose
ลำดับการทดสอบที่ 125 การใช้ Carbon source จาก Maltose
ลำดับการทดสอบที่ 126 การใช้ Carbon source จาก Rhamnose
ลำดับการทดสอบที่ 127 การใช้ Carbon source จาก Raffinose
ลำดับการทดสอบที่ 128 การใช้ Carbon source จาก Ribose
ลำดับการทดสอบที่ 129 การใช้ Carbon source จาก Sorbose
ลำดับการทดสอบที่ 130 การใช้ Carbon source จาก Salicin
ลำดับการทดสอบที่ 131 การใช้ Carbon source จาก Starch
ลำดับการทดสอบที่ 132 การใช้ Carbon source จาก Sorbitol
ลำดับการทดสอบที่ 133 การใช้ Carbon source จาก Saccharose
ลำดับการทดสอบที่ 134 การใช้ Carbon source จาก Trehalose
ลำดับการทดสอบที่ 135 การใช้ Carbon source จาก Xylose

ดูความสามารถของเชื้อในการใช้สารประกอบคาร์โบไฮเดรท เป็นแหล่งของคาร์บอน โดยเตรียมอาหารแข็งที่ผสมสารประกอบคาร์โบไฮเดรทให้มีความเข้มข้น 0.2 % (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข.)โดยมี phenol red เป็น indicator วิธีการทดสอบเลี้ยงเชื้อใน nutrient broth 18 ชั่วโมง เทียบวัดความขุ่นให้ได้มาตรฐาน Mcfarland เบอร์ 1 หยดเชื้อลงไป 2 หยด นำเข้าตู้อบ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน การอ่านผลจะให้บวกเมื่อมีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีส้มเป็นสีชมภู

**กลุ่มลักษณะที่ 42 Utilization of organic compound as the carbon and nitrogen source (26,73,88)**

ลำดับการทดสอบที่ 136 การใช้ Carbon source Acetate

ลำดับการทดสอบที่ 137 การใช้ Carbon source Caproate

ลำดับการทดสอบที่ 138 การใช้ Carbon source n-valerate

ลำดับการทดสอบที่ 139 การใช้ Carbon source Butyrate

ลำดับการทดสอบที่ 140 การใช้ Carbon source Malonate

ลำดับการทดสอบที่ 141 การใช้ Carbon source Succinate

ลำดับการทดสอบที่ 142 การใช้ Carbon source Fumarate

ลำดับการทดสอบที่ 143 การใช้ Carbon source Oxalate

ลำดับการทดสอบที่ 144 การใช้ Carbon source D-malate

ลำดับการทดสอบที่ 145 การใช้ Carbon source Tartrate

ลำดับการทดสอบที่ 146 การใช้ Carbon source Lactate

ลำดับการทดสอบที่ 147 การใช้ Carbon source Pyruvate

ลำดับการทดสอบที่ 148 การใช้ Carbon source Methylamine

ลำดับการทดสอบที่ 149 การใช้ Carbon source Ethanolamine

ลำดับการทดสอบที่ 150 การใช้ Carbon source Formate

ลำดับการทดสอบที่ 151 การใช้ Carbon source Phenol

ลำดับการทดสอบที่ 152 การใช้ Carbon source Benzoate

ลำดับการทดสอบที่ 153 การใช้ Carbon source m-hydroxybenzoate

ลำดับการทดสอบที่ 154 การใช้ Carbon source L-alanine

ลำดับการทดสอบที่ 155 การใช้ Carbon source L-valine

ลำดับการทดสอบที่ 156 การใช้ Carbon source L-glutamate

ลำดับการทดสอบที่ 157 การใช้ Carbon source L-isoleucine

ลำดับการทดสอบที่ 158 การใช้ Carbon source n-dodecane

ลำดับการทดสอบที่ 159 การใช้ Carbon source Hippurate

ลำดับการทดสอบที่ 160 การใช้ Carbon source Acetamide
ลำดับการทดสอบที่ 161 การใช้ Carbon source L-histidine
ลำดับการทดสอบที่ 162 การใช้ Carbon source L-proline
ลำดับการทดสอบที่ 163 การใช้ Carbon source L-tyrosine
ลำดับการทดสอบที่ 164 การใช้ Carbon source L-arginine
ลำดับการทดสอบที่ 165 การใช้ Carbon source L-threonine
ลำดับการทดสอบที่ 166 การใช้ Carbon source L-tryptophan
ลำดับการทดสอบที่ 167 การใช้ Carbon source L-serine
ลำดับการทดสอบที่ 168 การใช้ Carbon source L-lysine
ลำดับการทดสอบที่ 169 การใช้ Carbon source L-ornithine

ทดสอบดูความสามารถของเชื้อในการใช้สารประกอบเกลือของกรดอินทรีย์ (organic acid) เป็นแหล่งของคาร์บอน การทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบที่ 106-136

**กลุ่มลักษณะที่ 43 Litmus milk** (59)

ลำดับการทดสอบที่ 170 Peptonization

ทดสอบดู Casein hydrolysis โดย proteolytic เอ็นซัยม์ Casein การทดสอบโดย ใส่เชื้อที่เลี้ยงจาก nutrient broth 18 ชั่วโมง ลงไปในหลอด litmus milk (Difco) อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ถ้าเป็นเชื้อ fluorescent pseudomonads อบที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) อ่านผลทุกวันเป็นเวลา 7 วัน ถ้าให้ผลบวก คือเกิดปฏิกิริยา peptonization ซึ่งเกิดจากเชื้อที่สามารถผลิตเอ็นซัยม์ proteolytic สามารถก่อให้เกิด rennin curd ในน้ำนม ซึ่งเกิดจากการ hydrolyse casein โดยเอ็นซัยม์ extra cellular proteolytic เปลี่ยนโปรตีนในน้ำนมให้เป็นสารประกอบที่ละลายได้ ผลดังกล่าว จะเกิดการแยกตัวของน้ำนม เกิดขึ้น คือส่วนบนของน้ำนมจะเป็นน้ำใสบางครั้งอาจเห็นเป็นน้ำใส สีม่วง ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา

การสร้างด่างจากโปรตีน (casein) ให้เป็นก๊าซแอมโมเนีย ซึ่งมีฤทธิ์เป็นด่าง

เมื่อได้ทำการทดสอบจนครบทุกลักษณะการทดสอบแล้ว ได้ทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อแต่ละสปีชีส์จากเชื้อที่นำมาศึกษาทั้งหมดจำนวน 100 สายพันธุ์ เพื่อทำการการทดสอบซ้ำ ด้วยวิธีการสุ่มตัวอย่างตามสัดส่วน (Quota sampling) ได้เชื้อที่นำมาทดสอบซ้ำดังนี้ P. pseudomallei 21 สายพันธุ์, P. cepacia, P. maltophilia, P. putida, P.aeruginosa, P. pickettii, P. stutzeri, P. acidovorans, P. fluorescens,P. alcaligenes, Pseudomonas species gr. VE-2, P. diminuta อย่างละ 2 สายพันธุ์ และ Unclassified Pseudomonas 1 สายพันธุ์ รวมเป็นเชื้อที่ได้จากการสุ่มจำนวนทั้งสิ้น 44 สายพันธุ์

ตารางที่ 2 กลุ่มลักษณะ, จำนวนลักษณะที่ทดสอบ และ ลำดับการทดสอบ

| กลุ่มลักษณะ (Characters) | จำนวนลักษณะที่ทดสอบ (Tests) | ลำดับการทดสอบ (Features) |
|---|---|---|
| 1. Colony morphology | 5 | 1.Flat<br>2.Convex<br>3.Irregular<br>4.Entire<br>5.Wrinkle |

ตารางที่ 2 (ต่อ)

| กลุ่มลักษณะ (Characters) | จำนวนลักษณะที่ทดสอบ (Tests) | ลำดับการทดสอบ (Features) |
|---|---|---|
| 2. Hemolysis on sheep blood agar plate | 2 | 6.Complete<br>7.Partial |
| 3. Emulsification of colonies | 2 | 8.Easy<br>9.Difficult |
| 4. Cell morphology | 5 | 10.Coccobacillus<br>11.Short rod<br>12.Long rod<br>13.Pleomorphism<br>14.Bipolar |
| 5. Flagella numbers | 2 | 15. 1<br>16. > 1 |
| 6. Cytochrom oxidase test | 1 | 17.Oxidase test |
| 7. Catalase production | 1 | 18.Catalase test |
| 8. Reaction on Triple Sugar Iron agar (TSI) | 3 | 19.Alkaline/ No change<br>20.Alkaline/ Alkaline<br>21.Acid/Acid |

ตารางที่ 2 (ต่อ)

| กลุ่มลักษณะ (Characters) | จำนวนลักษณะที่ทดสอบ (Tests) | ลำดับการทดสอบ (Features) |
|---|---|---|
| 9. Diffusable pigment production | | 22.Diffusable |
| 10.Colonial pigmentation | 5 | 23.Green |
| | | 24.Brown |
| | | 25.Yellow |
| | | 26.Organge |
| | | 27.White |
| 11.Motility test | 1 | 28.Motile |
| 12.Hugh and Leifson's Oxidative & Fermentive | 2 | 29.Oxidative |
| | | 30.Fermentative |
| 13.Citrate utilization test (Simmons) | 1 | 31.Citrate test |
| 14.Urease test,Christensen's | 1 | 32.Urease test |
| 15.Hydrogen Sulfide test | 2 | 33.Black in TSI |
| | | 34.Black in lead acetate paper |
| 16.Potassium cyanide test | 1 | 35.KCN test |
| 17.β-Galactosidase (ONPG) test | 1 | 36.ONPG test |

ตารางที่ 2 (ต่อ)

| กลุ่มลักษณะ (Characters) | จำนวนลักษณะที่ทดสอบ (Tests) | ลำดับการทดสอบ (Features) |
|---|---|---|
| 18.Pyocyanin & Fluorescein pigment | 2 | 37.King A<br>38.King B |
| 19.Nitrate reduction and denitrification test | 2 | 39.Nitrate<br>40.Nitrogen gas |
| 20.Gluconate oxidation | 1 | 41.Gluconate |
| 21.Indole test | 1 | 42.Indole |
| 22.Malonate utilization | 1 | 43.Malonate test |
| 23.Phenylalanine deamination | 1 | 44.P.D. test |
| 24.Decarboxylase reaction | 3 | 45.Arginine dihydrolase<br>46.Lysine decarboxylase<br>47.Ornithine decarboxylase |
| 25.Lecithinase (Egg yolk - opacity) test | 1 | 48.Lecithinase |
| 26.Aesculin hydrolysis | 1 | 49.Aesculin |

ตารางที่ 2 (ต่อ)

| กลุ่มลักษณะ (Characters) | จำนวนลักษณะที่ทดสอบ (Tests) | ลำดับการทดสอบ (Features) |
|---|---|---|
| 27.Polysorbate (Tween) 80 hydrolysis | 1 | 50.Tween 80 |
| 28.Starch hydrolysis | 1 | 51.Starch |
| 29.Deoxyribonuclease DNAse test | 1 | 52.DNAse test |
| 30.Gelatin liquefaction | 1 | 53.Gelatin |
| 31.Acetamide hydrolysis | 1 | 54.Acetamide |
| 32.Arginine hydrolysis | 1 | 55.Arginine |
| 33.Growth on MacConkey agar | 1 | 56.MacConkey agar |
| 34.Growth on Salmonella - Shigella agar | 1 | 57.SS agar |
| 35.Growth on 1% TTC | 1 | 58.1% TTC |
| 36.Salt tolerance | 5 | 59.NaCl 0%<br>60.NaCl 2.5%<br>61.NaCl 5.0%<br>62.NaCl 6.5%<br>63.NaCl 8.0% |
| 37.pH tolerance | 4 | 64.Growth at pH3 |

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 (ต่อ)

| กลุ่มลักษณะ (Characters) | จำนวนลักษณะที่ทดสอบ (Tests) | ลำดับการทดสอบ (Features) |
|---|---|---|
| | | 65.Growth at pH5 |
| | | 66.Growth at pH7 |
| | | 67.Growth at pH9 |
| 38.Temperature to growth | 3 | 68.Growth at 4°C |
| | | 69.Growth at 42°C |
| | | 70.Growth at 45°C |
| 39.Bile tolerance | 4 | 71.Growth at 5% bile |
| | | 72.Growth at 10% bile |
| | | 73.Growth at 20% bile |
| | | 74.Growth at 40% bile |
| 40.Acid production from carbohydrate and sugar derivative | 30 | 75.Aesculin |
| | | 76.Arabinose |
| | | 77.Adonitol |
| | | 78.Cellobiose |
| | | 79.Dulcitol |

ตารางที่ 2 (ต่อ)

| กลุ่มลักษณะ (Characters) | จำนวนลักษณะที่ทดสอบ (Tests) | ลำดับการทดสอบ (Features) |
|---|---|---|
| | | 80.Dextrin<br>81.Ethanol<br>82.Erythriol<br>83.Fructose<br>84.Galactose<br>85.Glucose<br>86.Inositol<br>87.Inulin<br>88.Lactose<br>89.Melibiose<br>90.Mannose<br>91.Mannitol<br>92.Melizitose<br>93.Maltose<br>94.Rhamnase<br>95.Raffinose<br>96. Ribose<br>97. Sorbose<br>98. Salicin |

ตารางที่ 2 (ต่อ)

| กลุ่มลักษณะ (Characters) | จำนวนลักษณะที่ทดสอบ (Tests) | ลำดับการทดสอบ (Features) |
|---|---|---|
| 41.Utilization of carbohydrate and sugar derivative as the sole carbon source | 31 | 99. Starch<br>100.Sorbitol<br>101.Saccharose<br>102.Trehalose<br>103.Xylose<br>104.10% Lactose<br>105.Aesculin<br>106.Arabinose<br>107.Adonitol<br>108.Cellobiose<br>109.Dulcitol<br>110.Dextrin<br>111.Ethanol<br>112.Erythriol<br>113.Fructose<br>114.Glucose<br>115.Galactose<br>116.Gluconate<br>117.Glycerol |

ตารางที่ 2 (ต่อ)

| กลุ่มลักษณะ (Characters) | จำนวนลักษณะที่ทดสอบ (Tests) | ลำดับการทดสอบ (Features) |
|---|---|---|
| | | 118.Inositol<br>119.Inulin<br>120.Lactose<br>121.Melibiose<br>122.Mannose<br>123.Mannitol<br>124.Melizitose<br>125.Maltose<br>126.Rhamnose<br>127.Raffinose<br>128.Ribose<br>129.Sorbose<br>130.Salicin<br>131.Starch<br>132.Sorbitol<br>133.Saccharose<br>134.Trehalose<br>135.Xylose |

ตารางที่ 2 (ต่อ)

| กลุ่มลักษณะ (Characters) | จำนวนลักษณะที่ทดสอบ (Tests) | ลำดับการทดสอบ (Features) |
|---|---|---|
| 42. Utilization of organic compound as the sole carbon and nitrogen source | 33 | 136. Acetate<br>137. Caproate<br>138. n-valerate<br>139. Butyrate<br>140. Malonate<br>141. Succinate<br>142. Fumarate<br>143. Oxalate<br>144. D-malate<br>145. Tartrate<br>146. Lactate<br>147. Pyruvate<br>148. Methylamine<br>149. Ethanolamine<br>150. Formate<br>151. Phenol<br>152. Benzoate<br>153. m-hydroxybenzoate |

ตารางที่ 2 (ต่อ)

| กลุ่มลักษณะ (Characters) | จำนวนลักษณะที่ทดสอบ (Tests) | ลำดับการทดสอบ (Features) |
|---|---|---|
| | | 154.L-alanine<br>155.L-valine<br>156.Glutamate<br>157.L-isoleucine<br>158.n-dodecane<br>159.Hippurate<br>160.Acetamide<br>161.L-histidine<br>162.L-proline<br>163.L-tyrosine<br>164.L-arginine<br>165.L-threonine<br>166.L-tryptophan<br>167.L-serine<br>168.L-lysine<br>169.L-ornithine |
| 43.Litmus milk | 1 | 170.Peptoniza-<br>tion |

การจัดกลุ่มแบคทีเรีย

หลังจากทำการทดสอบจนครบทุกลักษณะแล้วนำมาคำนวณหาค่าความคล้ายคลึงกันเนื่องจากเป็นข้อมูลขนาดใหญ่จึงต้องใช้คอมพิวเตอร์มาช่วยในการคำนวณ ปัจจุบันได้มีโปรแกรมสำเร็จรูปเพื่อใช้หาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงและการจัดแบ่งกลุ่มโดยวิธี Unweight Group Method with Arithmatic Average linkage technique (UPGMA) ซึ่งจะแสดงการจัดแบ่งกลุ่มออกมาในรูปของตารางเดนโดแกรม (Dendrogram) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปที่ชื่อว่า The Numerical Taxonomy Program(PC-TAXAN) Version1.2 ได้รับจาก Prof R.R. Colwell Maryland, U.S.A. โดยใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ยี่ห้อ ARC รุ่น 80286 AT มาช่วยคำนวณ

ก่อนจะนำเครื่องคอมพิวเตอร์มาคำนวณหาค่าเปอร์เซนต์ความคล้ายคลึงต้องเปลี่ยนผลการทดสอบลักษณะทั้งหมดจากเครื่องหมายบวกและลบ เป็นสัญลักษณ์ตัวเลข 1 และ 0 ตามลำดับ แบบ Two state coding (70) การคำนวณหาค่าความคล้ายคลึงมี 2 แบบ คือ

1. ใช้สูตรของ Sokal และ Michener (71) โดยคำนวณเปอร์เซนต์ความคล้ายคลึง แบบ matching coefficient ($S_{sm}$) ซึ่งมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$\% S_{sm} = \frac{a}{a + d} \times 100$$

เมื่อ a = จำนวนของการทดสอบระหว่างเชื้อ 2 สายพันธุ์ ที่เป็นบวกทั้งคู่และเป็นลบทั้งคู่

d = จำนวนของการทดสอบระหว่างเชื้อ 2 สายพันธุ์ที่เป็นบวก และเป็นลบ

2. การคำนวณเปอร์เซนต์ความคล้ายคลึงโดยใช้ coefficient แบบ Jaccard เรียกว่า Jaccard coefficient ($S_j$)(72)ซึ่งการคำนวณจะคล้ายกับ matching coefficient แต่ต่างกันตรงที่ไม่เอาจำนวณที่ผลการทดสอบเป็นลบทั้งคู่ มาคิดคำนวณ สูตรการคำนวณ มีดังนี้

$$\% S_j = \frac{a}{all - d} \times 100$$

เมื่อ a = จำนวนของการทดสอบระหว่างเชื้อ 2 สายพันธุ์ที่เป็นบวกทั้งคู่

d = จำนวนของการทดสอบระหว่างเชื้อ 2 สายพันธุ์ที่เป็นลบทั้งคู่

all = จำนวนของการทดสอบทั้งหมด

เมื่อได้ตารางเดนโดแกรมมาแล้วขั้นตอนต่อไป คือ การจัดกลุ่มของเชื้อโดย การเลือกค่าเปอร์เซนต์ ความคล้ายคลึงที่สูงที่สุดมาเป็นแนวตัดแบ่งกลุ่มให้ได้จำนวนกลุ่มมากที่สุด จากนั้นคำนวณค่าเปอร์เซนต์ของ แต่ละกลุ่มที่แสดงปฏิกิริยาบวก ต่อการทดสอบลักษณะทั้ง 170 ลำดับการทดสอบ แล้วนำค่าเปอร์เซนต์ที่ได้นี้ไปใช้ในการหา ลักษณะสำคัญที่ใช้แยกความแตกต่างของกลุ่มต่าง ๆ โดยมีหลักเกณฑ์ ดังนี้

1. ผลการทดสอบลักษณะใดที่อยู่ในช่วง 0-16 เปอร์เซนต์ ที่แสดงปฏิกิริยาบวกของแต่ละกลุ่มให้ลักษณะนั้น เป็น "-"

2. ผลการทดสอบลักษณะใดที่อยู่ในช่วง 17-50 เปอร์เซนต์ ที่แสดงปฏิกิริยาบวกของแต่ละกลุ่มให้ลักษณะนั้น เป็น "$\mp$"

3. ผลการทดสอบลักษณะใดที่อยู่ในช่วง 51-84 เปอร์เซนต์ ที่แสดงปฏิกิริยาบวกของแต่ละกลุ่มให้ลักษณะนั้น เป็น "$\pm$"

4. ผลการทดสอบลักษณะใดที่อยู่ในช่วง 85-100เปอร์เซนต์ ที่แสดงปฏิกิริยาบวกของแต่ละกลุ่มให้ลักษณะนั้น เป็น "+"