BRT T-646005

การศึกษาคุณภาพสายพันธุ์แบคทีเรียหลังจัดเก็บด้วยวิธีการแช่แข็ง

ศิริพร ชันทน์โรจน์

วิทยานิพนธ์เสนอต่อมหาวิทยาลัยรามคำแหง
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)
ปีการศึกษา 2549

0497/50

RECEIVED
BY gmr DATE 1A/6/50

การศึกษาคุณภาพสายพันธุ์แบคทีเรียหลังจัดเก็บด้วยวิธีการแช่แข็ง

ศิริพร จันทน์โรจน์

วิทยานิพนธ์เสนอต่อมหาวิทยาลัยรามคำแหง
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยรามคำแหง

QUALITY OF BACTERIUM STRAINS AFTER COLLECTION BY THE FREEZING METHOD

SIRIPORN CHANTAROJ

A THESIS PRESENTED TO RAMKHAMHAENG UNIVERSITY

IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

(BIOLOGY)

2006

COPYRIGHTED BY RAMKHAMHAENG UNIVERSITY

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาคุณภาพสายพันธุ์แบคทีเรียหลังจัดเก็บด้วยวิธีการแช่แข็ง

ชื่อผู้เขียน นางสาวศิริพร จันทน์โรจน์

ภาควิชาและคณะ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิมล จันทร์แจ่ม ประธานกรรมการ

รองศาสตราจารย์ ดร. นวลฉวี เวชประสิทธิ์

อาจารย์สุรางค์ เดชศิริเลิศ

มหาวิทยาลัยรามคำแหงอนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิมล พูพิพิธ)

คณะกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิมล จันทร์แจ่ม)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นวลฉวี เวชประสิทธิ์)

.....กรรมการ

(อาจารย์สุรางค์ เดชศิริเลิศ)

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การศึกษาคุณภาพสายพันธุ์แบคทีเรียหลังจัดเก็บด้วยวิธีการแช่แข็ง
ชื่อผู้เขียน	นางสาวศิริพร จันทน์โรจน์
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2549

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิมล จันทร์แจ่ม ประธานกรรมการ
2. รองศาสตราจารย์ ดร. นวลฉวี เวชประสิทธิ์
3. อาจารย์สุรางค์ เดชศิริเลิศ

จากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีสมัยใหม่ ทำให้มีการค้นพบคุณค่าของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มากมาย รวมทั้งมีความต้องการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์มากขึ้นเป็นลำดับด้วย จึงมีการเก็บรักษาจุลินทรีย์เหล่านั้นไว้ โดยจัดตั้งเป็นแหล่งเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่เก็บรักษา ดูแล และให้บริการ ดังนั้น จุลินทรีย์ทุกสายพันธุ์ที่เก็บรักษาไว้แล้วควรมีคุณภาพดี มีความถูกต้อง และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประสิทธิภาพมากที่สุด การดูแลรักษา และการตรวจสอบคุณภาพจึงเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา (1) การตรวจสอบคุณภาพด้านความมีชีวิตของแบคทีเรียที่เหลือ (viability) (2) การตรวจสอบความความบริสุทธิ์ (purity) และความคงคุณลักษณะด้าน phenotype (morphology และ biochemical test) และ (3) การตรวจสอบความคงคุณลักษณะด้วยวิธีทางพันธุกรรมในส่วนของยีน 16S rRNA

ได้ทำการทดลองคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางการแพทย์และพบได้บ่อยในผู้ป่วยที่ได้จัดเก็บไว้แล้วโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°ซ. ในช่วงระยะเวลา

2-12 ปี จำนวน 300 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens, Enterobacter cloacae, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, Burkholderia cepacia* และ *Haemophilus influenzae* นำมาตรวจสอบคุณภาพในด้านต่าง ๆ พบว่า ค่าความมีชีวิตของแบคทีเรีย (viability) ส่วนใหญ่มีค่าอยู่ระหว่าง 5-11 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร และค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันทั้งในสปีชีส์เดียวกันและต่างสปีชีส์กัน ยกเว้นเชื้อกลุ่มตายง่าย ได้แก่ *S. pneumoniae* และ *H. influenzae* ค่าความมีชีวิตอยู่ระหว่าง 5-7 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity) ด้วยตาเปล่า ความคงคุณลักษณะด้านสรีรวิทยาโดยวิธีทางชีวเคมี พบว่ายังคงความบริสุทธิ์และคงคุณสมบัติทางสรีรวิทยา ส่วนการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้ universal primers ขยายยีนส่วน 16S rRNA ได้ผลผลิตยีนขนาดประมาณ 996 bp เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III ส่วนใหญ่ให้แถบ DNA ต่างกัน ยกเว้นผลผลิตยีนของ *E. coli, K. pneumoniae, S. marcescens* และ *E. cloacae* ให้แถบ DNA เหมือนกัน แต่เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I หรือ *Bst* BI จะให้แถบ DNA ต่างกัน ผลผลิตยีนของ *E. faecium* และ *E. faecalis* ให้แถบ DNA เหมือนกัน แต่เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I จะให้แถบ DNA ต่างกัน สำหรับผลผลิตยีนของ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ไม่สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Hae* III ดังกล่าว แต่เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mnl* I จะให้แถบ DNA ต่างกัน ซึ่งใช้ยืนยันชนิดของเชื้อเดิมได้ จะเห็นได้ว่าแนวทางการศึกษาคุณภาพของจุลินทรีย์นี้เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของแบคทีเรียบางสายพันธุ์หลังการจัดเก็บ และเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทำการศึกษาในครั้งนี้ ยังมีคุณสมบัติ และมีคุณภาพดีพอเหมาะสมที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในงานด้านต่าง ๆ รวมทั้งการใช้ในงานด้านวิชาการได้

ABSTRACT

Thesis Title	Quality of Bacterium Strains After Collection by the Freezing Method
Student's Name	Miss Siriporn Chantaroj
Degree Sought	Master of Science
Major	Biology
Academic Year	2006

Advisory Committee

1. Asst. Prof. Dr. Wimon Chanchaem — Chairperson
2. Assoc. Prof. Dr. Nuanchawee Wetprasit
3. Mrs. Surang Dejsirilert

With the advent of new technologies microorganisms have found new uses in meeting human needs, thereby increasing their value. To be effective, however, the quality and stability of microbial strains must be assured, making quality control systems of utmost importance.

The objectives of this research study were to assess the viability of bacteria after freezing and to check on the purity, phenotype (both morphology and biochemistry) and genotype (determined by DNA analysis of the 16S rRNA gene) of the organisms collected.

Quality control is an extremely important feature in maintaining a culture collection. At the Department of Medical Sciences Thailand Culture

Collection (DMST-CC) most bacterial strains have been preserved by the freezing method. In this study, 300 strains of common pathogens including *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens, Enterobacter cloacae, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, Burkholderia cepacia* and *Haemophilus influenzae* which have been preserved by freezing for between two and 12 years were investigated for their viability, purity, phenotype, and genotype. The findings indicated that the viability values of these bacteria were about 5-11 $\log_{10}$CFU/ml, and not significantly different among species, except for some fastidious bacteria such as *S. pneumonia* and *H. influenzae*, which exhibited viability values of about 5-7 $\log_{10}$CFU/ml. From these results, all cultures were deemed pure as examined by the eye, with phenotype, morphology and biochemical properties all within acceptable limits. Genotype studies were done using the PCR-RFLP technique with universal primers to amplify a portion of the 16S rRNA gene, followed by restriction analysis. The sizes of the amplified products from the bacteria were the same (996 bp), but the restriction patterns of PCR products generated by *Hae* III digestion were different. PCR products from *E. coli, K. pneumoniae, S. marcescens* and *E. cloacae* had the same *Hae* III digestion pattern but different pattern when digested with *Dde* I or *Bst* BI. PCR products from *E. faecium and E. faecalis* gave the same *Hae* III digestion pattern but had different patterns that could

be differentiated by *Alu* I digestion. PCR products from *S. aureus* and *S. epidermidis* could not be digested by *Hae* III but showed different patterns when digested with *Mnl* I. The results of the study showed the potential of these methods as tools for determining the quality of bacteriam strains after collection by the freezing method. It should be noted that the quality of all bacterial species in this study was acceptable for utilization and academic support.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นวลฉวี เวชประสิทธิ์ และอาจารย์สุรางค์ เดชศิริเลิศ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และสอบวิทยานิพนธ์ได้ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีบางชนิดที่จำเป็นต้องใช้ในการทดลองและบันทึกผลการทดลอง

ขอขอบพระคุณอาจารย์วันเชิญ โพธาเจริญ ที่ให้ความอนุเคราะห์ แนะนำแนวทางการทดลอง และให้ความกรุณาตรวจสอบ ซักถาม เพื่อความเข้าใจในงาน รวมทั้งการเสนอแนะความคิดเห็นต่าง ๆ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผลงานที่ข้าพเจ้าได้ตั้งใจจัดทำขึ้น

ขอขอบคุณแหล่งทุน ซึ่งได้รับการสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT T. 646005

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา เจ้าหน้าที่สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่ให้ความสะดวกในการเบิกจ่ายอุปกรณ์ และสารเคมีบางชนิดที่จำเป็นต้องใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณน้อง ๆ ในสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข และในภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ได้แสดงน้ำใจไมตรีต่อข้าพเจ้า

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ทรงพระคุณอันประเสริฐ ได้แก่ บิดาและมารดาของข้าพเจ้า เป็นผู้เห็นคุณค่าของการศึกษา และให้ความเข้าใจในการดำเนินการศึกษาในหัวข้อของวิทยานิพนธ์นี้

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณประธานที่ปรึกษาและสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิมล จันทร์แจ่ม เป็นผู้สอนและให้โอกาสทุก ๆ อย่างกับข้าพเจ้าให้ได้ทำในสิ่งที่ข้าพเจ้ารัก คือ งานที่เป็นเนื้อหาของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ศิริพร จันทน์โรจน์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... (4)

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... (6)

กิตติกรรมประกาศ ..... (9)

สารบัญตาราง ..... (12)

สารบัญภาพประกอบ ..... (15)

บทที่

1 บทนำ 1

ความนำ 1

ความสำคัญของปัญหา 2

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 4

ขอบเขตของการวิจัย 5

สมมติฐานของการวิจัย 5

นิยามศัพท์เฉพาะ 5

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 6

2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 8

แหล่งเก็บรักษาจุลินทรีย์ (culture collection) 8

ประวัติแหล่งเก็บรักษาจุลินทรีย์ 9

การเก็บรักษาจุลินทรีย์ 10

วิธีการเก็บรักษาแบคทีเรีย 12

การทดสอบคุณภาพจุลินทรีย์หลังการเก็บรักษา 15

3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 34

วัสดุอุปกรณ์ (materials) 34

วิธีดำเนินการวิจัย 37

บทที่ หน้า
4 ผลการดำเนินการวิจัย 49
การหาค่าความมีชีวิตของแบคทีเรียที่เหลือ (viability) 49
การตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity) 56
การตรวจสอบความคงคุณลักษณะด้านฟีโนไทป์ (phenotype) 56
การตรวจสอบพันธุกรรมของสายพันธุ์แบคทีเรีย (genetic characteristics) 154
5 สรุป อภิปรายผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ 177
สรุปผลการทดลอง 177
อภิปรายผลการทดลอง 179
ข้อเสนอแนะ 184
บรรณานุกรม 185
ประวัติผู้เขียน 192

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	การเปรียบเทียบลักษณะเซลล์ของสิ่งมีชีวิตพวก Prokaryote และ Eukaryote	18
2	ชื่อของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ชื่อจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดนั้น ๆ และตำแหน่งลำดับเบสจำเพาะที่ถูกตัด	27
3	รายละเอียดของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด	28
4	ส่วนประกอบของไรโบโซม	32
5	จำนวนและชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกสำหรับใช้ในการทดลอง	35
6	อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง อุณหภูมิ และเวลาบ่มที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิด	39
7	การทดสอบและปฏิกิริยาที่ได้ของเชื้อ *S. aureus, S. epidermidis, E. faecalis* และ *E. faecium*	41
8	การทดสอบและปฏิกิริยาที่ได้ของเชื้อ *S. agalactiae, S. pyogenes* และ *S. pneumoniae*	42
9	การทดสอบและปฏิกิริยาที่ได้ของเชื้อ *E. coli, E. cloacae, S. marcescens* และ *K. pneumoniae*	43
10	การทดสอบและปฏิกิริยาที่ได้ของเชื้อ *B. cepacia, P. aeruginosa* และ *A. baumannii*	44
11	วิธีใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ตัดกลุ่ม PCR product ของแบคทีเรียแต่ละชนิด	47
12	ช่วงค่าความมีชีวิตของแบคทีเรียหลังจัดเก็บไว้แล้วช่วงเวลา 2-12 ปี	50
13	ค่าความมีชีวิตของแบคทีเรียแต่ละชนิดหลังการจัดเก็บด้วยวิธีแช่แข็งอุณหภูมิ -70 °ซ. ในช่วงเวลา 2-12 ปี	51

ตาราง หน้า

14 ค่า $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร ความมีชีวิตของแบคทีเรียแต่ละชนิดหลังการจัดเก็บด้วยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 °ซ. ในช่วงเวลา 2-12 ปี 55

15 ร้อยละของเชื้อแต่ละชนิดที่ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีและ อื่น ๆ เป็นบวกชนิดละ 20 สายพันธุ์ 67

16 ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ *S. aureus* หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี 70

17 ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ *S. epidermidis* หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี 74

18 ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ *S. pneumoniae* หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี 78

19 ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ *S. pyogenes* หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี 82

20 ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ *S. agalactiae* หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี 86

21 ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ *E. faecalis* หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี 90

22 ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ *E. faecium* หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี 94

23 ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ *K. pneumoniae* หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี 98

24 ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ *E. coli* หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี 108

25 ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ *E. cloacae* หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี 118

ตาราง หน้า

26 ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ *S. marcescens* หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี 127
27 ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ *P. aeruginosa* หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี 137
28 ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ *A. baumannii* หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี 141
29 ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ *B. cepacia* หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี 146
30 ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ *H. influenzae* หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี 151

สารบัญภาพประกอบ

ภาพ		หน้า
1	ไดอะแกรมของหลักการพิสูจน์ความคล้ายกันของดีเอ็นเอ	22
2	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ 1 รอบ 3 ขั้นตอน	24
3	หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบที่เรียกว่า ปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction--PCR).....	26
4	1) ลำดับเบสที่ปลาย 3' ของ 16S rRNA ของ *E. coli* 2) ตัวอย่างการสร้างพันธะไฮโดรเจนของเบสคู่สมระหว่างปลาย 3' ของ 16S rRNA และลำดับเบสที่ปลาย 5' เหนือ โคดอน AUG	31
5	แผนภูมิขั้นตอนการทดลอง	48
6	กราฟแนวโน้มความมีชีวิตของแบคทีเรียแต่ละชนิดหลังจัดเก็บด้วยวิธีแช่แข็งอุณหภูมิ -70°ซ. ในช่วงเวลา 2-12 ปี	56
7	ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity) และความคงคุณลักษณะด้าน phenotype ในส่วนของลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
	ก ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *S. aureus*	59
	ข ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *S. epidermidis*	59
	ค ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *S. pyogenes*	59
	ง ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *S. pneumoniae*	59
	จ ลักษณะโคโลนี บน chaocalate agar ของ *H. influenzae*	60
	ฉ ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *S. agalactiae*	60
	ช ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *E. faecium*	60
	ซ ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *E. faecalis*	60
	ฌ ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *E. coli*	60
	ญ ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *E. cloacae*	60
	ฎ ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *S. marcescens*	61

ฎ ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *K. pneumoniae* 61
ฐ ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *A. baumannii* 61
ฑ ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *P. aeruginosa* 61
ฒ ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *B. cepacia* 61
8 ผลการทดสอบ X V factor ของเชื้อ *H. influenzae* 67
9 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย universal primers ของยีนส่วน 16S rRNA ของเชื้อทั้ง 12 ชนิด 155
10 PCR product ของ *K. pneumoniae, S. marcescens, E. coli* และ *E. cloacae* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III 156
11 PCR product ของ *K. pneumoniae* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Dde* I 157
12 PCR product ของ *E. coli* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Dde* I 158
13 PCR product ของ *S. marcescens* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Dde* I 159
14 PCR product ของ *E. cloacae* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Dde* I 159
15 PCR product ของ *K. pneumoniae* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Bst* BI 160
16 PCR product ของ *E. cloacae* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Bst* BI 161
17 PCR product ของ *S. marcescens* และ *E. coli* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Bst* BI 161
18 PCR product ของ *S. aureus* และ *S. epidermidis* เมื่อตัดด้วย เอนไซม์ *Hae* III 162
19 PCR product ของ *S. aureus* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Mnl* I 163
20 PCR product ของ *S. epidermidis* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Mnl* I 163
21 PCR product ของ *E. faecalis* และ *E. faecium* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III 164
22 PCR product ของ *E. faecalis* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I 165
23 PCR product ของ *E. faecium* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I 165

ภาพ หน้า

24 PCR product ของ *P. aeruginosa* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III 166
25 PCR product ของ *A. baumannii* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III 167
26 PCR product ของ *H. influenzae* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III..... 168
27 PCR product ของ *B. cepacia* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III..... 169
28 รูปแบบแถบดีเอ็นเอรูปแบบที่ 1-4 ที่พบในตัวอย่างแบคทีเรียเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III ตัด PCR product..... 170
29 รูปแบบแถบดีเอ็นเอรูปแบบที่ 5 ที่พบในตัวอย่างแบคทีเรียเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III ตัด PCR product..... 171
30 แผนภูมิการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ..... 172
31 รูปแบบแถบดีเอ็นเอหลังใช้เอนไซม์ *Dde* I และ *Bst* BI ตัด 174
32 รูปแบบแถบดีเอ็นเอหลังใช้เอนไซม์ *Alu* I และ *Mnl* I ตัด..... 175

คำอธิบายคำย่อ

µl	=	microliter
µM	=	micromolar
CFU	=	colony forming unit
Ed. (Eds.)	=	editor (editors)
et al.	=	*et alii*; and others
g	=	gram
ml	=	mililiter
mM	=	milimolar
ng	=	nanogram
p. (pp.)	=	page (pages)
sp.	=	species
°ซ.	=	องศาเซลเซียส
มม.	=	มิลลิเมตร
มล.	=	มิลลิลิตร

บทที่ 1
บทนำ

ความนำ

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาเทคโนโลยีชีวภาพมีความก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว ทำให้โอกาสในการค้นพบมูลค่าทางเศรษฐกิจของจุลินทรีย์มีมากขึ้น ความต้องการใช้จุลินทรีย์เพื่อการศึกษาค้นคว้าวิจัยจึงเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นแหล่งเก็บจุลินทรีย์จึงมีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่รวบรวม เก็บรักษา และดูแลจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยช่วยสร้างงานสร้างอาชีพ และพัฒนาการศึกษาด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของประเทศให้เป็นไปด้วยดี (วันเชิญ โพธาเจริญ และมรกต ตันติเจริญ, 2542) แหล่งเก็บรักษาจุลินทรีย์ (culture collection) เข้ามามีบทบาทอย่างมากต่อการเปลี่ยนแปลงของโลกในปัจจุบัน ซึ่งมีการขยายตัวในการนำองค์ความรู้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพมาช่วยพัฒนางานด้านต่าง ๆ อย่างมาก เช่น การเกษตรกรรม การประมง อุตสาหกรรมการอาหาร สิ่งแวดล้อม การแพทย์ เภสัชศาสตร์ ฯลฯ และมีการสนับสนุนการใช้ประโยชน์ทางทรัพยากรชีวภาพในด้านการวิจัย การเก็บรักษา และส่งเสริมประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์อย่างกว้างขวาง

ศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีการเก็บรวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียทางการแพทย์ไว้เป็นจำนวนมาก และมีการให้บริการแก่หน่วยงานต่าง ๆ เพื่อนำไปศึกษา ควบคุมคุณภาพ และใช้ในงานวิจัย ดังนั้นแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่เก็บรักษาไว้ด้วยวิธีแช่แข็งอุณหภูมิ -70°ซ. ควรมีคุณภาพดี มีคุณลักษณะที่ถูกต้อง และมีจำนวนความมีชีวิตได้มาตรฐาน ซึ่งจะต้องมีกระบวนการตรวจสอบคุณภาพอย่างเหมาะสม ไม่ให้สูญเสียทรัพยากรชีวภาพของชาติไป เพราะมีปัจจัยหลายอย่างที่อาจส่งผลกระทบต่อความคงคุณลักษณะ และคุณภาพของสายพันธุ์แบคทีเรียได้ เช่น จากวิธีการเก็บรักษา จากลักษณะทางชีววิทยาของตัวเชื้อเอง และจากปัจจัยต่าง ๆ

ทางเทคนิคของบุคลากรที่ทำหน้าที่เก็บรักษา ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการจัดทำระบบการควบคุมคุณภาพ ซึ่งเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับงานการเก็บรักษาจุลินทรีย์ และนำแนวคิดดังกล่าวมาทดลองใช้ในการศึกษาคุณภาพของสายพันธุ์แบคทีเรียหลังการจัดเก็บด้วยวิธีการแช่แข็ง เพื่อให้ประเทศไทยได้มีทรัพยากรชีวภาพที่มีคุณภาพดีเหมาะสำหรับการใช้งานทางวิทยาศาสตร์การแพทย์และมีระบบการจัดเก็บที่ได้มาตรฐานเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนต่อไป

ความสำคัญของปัญหา

ในหลาย ๆ ประเทศส่วนใหญ่มีการจัดตั้งศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ (culture collection) เช่น The American Type Culture Collection (ATCC) ประเทศสหรัฐอเมริกา Japan Collection of Microorganism (JCM) ประเทศญี่ปุ่น National Collection of Type Cultures (NCTC) ประเทศอังกฤษ เป็นต้น (Sugawara, Ma, Miyazaki, Shimura, & Takishima, 1993) สำหรับในประเทศไทยมีการจัดตั้งเครือข่ายศูนย์เก็บจุลินทรีย์แห่งประเทศไทย Thailand Network on Culture Collection (TNCC) โดยความร่วมมือของ 4 หน่วยงานหลักที่มีความพร้อมในด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ กำลังคน กิจกรรม และมีนโยบายขององค์กรที่ส่งเสริมกิจการการเก็บรักษาจุลินทรีย์ ได้แก่ ศูนย์เก็บจุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) ศูนย์เก็บจุลินทรีย์กรมวิชาการเกษตร ศูนย์เก็บจุลินทรีย์กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และศูนย์เก็บจุลินทรีย์ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.) แต่ละศูนย์จะมีความเชี่ยวชาญและประสบการณ์ที่แตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ดูแลอยู่ (กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม, สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2546, หน้า 24-25) ทำให้มีส่วนช่วยส่งเสริมให้มีการค้นพบ และนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์มากขึ้น ทั้งทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร การเกษตร การศึกษาและวิจัย การสาธารณสุขและการผลิตชีวภัณฑ์ทางการแพทย์ และทางทหาร เป็นต้น ซึ่งเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีแหล่งเก็บรักษาจุลินทรีย์เหล่านั้นไว้

การเก็บรวบรวม และรักษาสายพันธุ์แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ไว้เป็นจำนวนมากในหน่วยงานที่เรียกว่า Culture Collection มีส่วนช่วยสนับสนุนการใช้ประโยชน์ทางทรัพยากรชีวภาพในด้านการศึกษา วิจัย และส่งเสริมประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์อย่างกว้างขวาง หน้าที่หลักที่สำคัญ คือ การเก็บรวบรวม (collection) การบำรุงรักษา (maintenance) และการให้บริการสายพันธุ์ (supply) (Kirsop & Doyle, 1991, p. 4)

การเก็บรักษาแบคทีเรียอาศัยหลักการลดอัตราเมแทบอลิซึมของเซลล์เพื่อชะลอการเจริญหรือการแบ่งตัว และควบคุมสารอาหารหรือการทำให้เซลล์กลายเป็นน้ำแข็ง (Lapage & Shelton, 1970, p. 169) อุณหภูมิสำหรับการแช่แข็งเซลล์มีตั้งแต่ -20, -30, -40, -70, -140 และ -196°ซ. แต่ที่อุณหภูมิสูงกว่า -30°ซ. จะให้ผลการเก็บรักษาไม่ดีเท่ากับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า -70°ซ. ซึ่งถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการเก็บรักษาแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้หลายชนิด และในระยะยาวได้ดี (Snell, 1991, p. 29)

ในการเก็บรักษาแบคทีเรียด้วยวิธีการแช่แข็ง น้ำจะถูกดึงออกจากเซลล์โดยการเปลี่ยนเป็นเกล็ดน้ำแข็ง และเซลล์อยู่ในสภาพคายน้ำ (dehydrate) ภายใต้อุณหภูมิเย็นยิ่งยวด (Heckly, 1978) ความเสียหายของเซลล์มักเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม และการที่เซลล์อยู่ในสภาพคายน้ำนาน ๆ ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์แตกเพราะความเข้มข้นภายในเซลล์สูงมากเกินไป และการที่ผนังเซลล์ถูกผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ทิ่มตำ (Grout & Morris, 1987, pp. 147-174) การปรับอัตราการแช่แข็งให้เหมาะสมกับเซลล์แต่ละชนิด และการเติมสารป้องกันความเย็น (cryoprotectants) จะช่วยป้องกันความเสียหายที่จะเกิดกับเซลล์ได้ (Feltham, Power, Pell, & Sneath, 1978, pp. 313-316) เช่น การป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งขนาดใหญ่ภายในเซลล์ การป้องกันการลดขนาดของเซลล์ การป้องกันอันตรายอันเนื่องมาจากความไม่สมดุลของเกลือแร่และอิเล็คโทรไลท์ และช่วยคงไว้ซึ่งคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกเนลส์ สารป้องกันความเย็นมีให้เลือกใช้หลายชนิด ได้แก่ Glycerol, Dimethylsulfoxide (DMSO), Sucrose, Methanol, Skim Milk, Polyvinylpyrrolidone (PVP), Mannitol, Dextran และ Trehalose (กฤษณ์ มงคล-ปัญญา, 2536) การใช้สารเคมีที่เรียกว่า cryoprotectants มาช่วยเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเหลว จะช่วยให้เซลล์รอดชีวิตจากการแช่แข็งได้ (Perry, 1995, p. 23)

เนื่องจากการแช่แข็งเซลล์มักมีปัญหาเกี่ยวกับการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ และมีปัญหาเกี่ยวกับอันตรายเนื่องจากการสูญเสียน้ำจนทำให้ของเหลวภายในเซลล์มีความเข้มข้นสูง จนเป็นอันตรายต่อเซลล์ (Morris, Coulson, & Clarke, 1988, pp. 471-482) ดังนั้นจึงต้องมีการบำรุงรักษา หรือการดูแลคลังจุลินทรีย์ซึ่งเป็นงานหนักและมีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับงาน Culture Collection การเก็บรักษาจุลินทรีย์เพื่อไว้ใช้ในงานด้านต่าง ๆ นั้น ควรมีการดูแลการเก็บรักษาโดยไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงในตัวจุลินทรีย์เกิดขึ้น และให้มีความถูกต้องเหมาะสมสำหรับผู้ใช้ที่จะนำไปใช้ในงานของตนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการนี้จึงต้องอาศัยระบบควบคุมคุณภาพ เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาไว้ (Smith, 1996, p. 137) ส่วนใหญ่ใน Culture Collection จะใช้ระบบการควบคุมคุณภาพคล้าย ๆ กันแต่สามารถมีรูปแบบและการดำเนินงานที่แตกต่างกันไปได้ขึ้นอยู่กับความสำคัญ และวัตถุประสงค์ในการใช้งานของจุลินทรีย์นั้น ๆ (Nakase, 1996, p. 144) ดังนั้น เมื่อต้องมีการเก็บรักษาแบคทีเรียไว้เป็นระยะเวลายาวนาน ควรมีการตรวจสอบจำนวนความมีชีวิตของแบคทีเรียที่เหลือ (viability) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity) และตรวจสอบความคงคุณลักษณะ(identity) (Nakase, 1996, pp. 144-146) เพื่อใช้เป็นข้อมูล และแนวทางในการดำเนินงานเก็บรักษาทรัพยากรชีวภาพที่มีคุณภาพ (reference material) และใช้ประโยชน์ได้สูงสุด ช่วยลดการสั่งซื้อและนำเข้าเชื้อมาตรฐานจากต่างประเทศ อีกทั้งยังเป็นแหล่งเก็บรักษาสายพันธุ์แบคทีเรียแก่นักวิจัยรุ่นหลังและหน่วยงานต่าง ๆ ได้ใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อตรวจสอบคุณภาพสายพันธุ์แบคทีเรียทางการแพทย์หลังจัดเก็บด้วยวิธีการแช่แข็งมาแล้ว จากช่วงเวลา 2-12 ปี ดังนี้

1. การตรวจสอบคุณภาพด้านความมีชีวิตของแบคทีเรียที่เหลือ (viability)

2. การตรวจสอบความความบริสุทธิ์ (purity) และความคงคุณลักษณะด้าน ฟีโนไทป์ (morphology และ biochemical test)

3. การตรวจสอบความคงคุณลักษณะด้วยวิธีทางพันธุกรรมในส่วนของยีน 16S rRNA

ขอบเขตของการวิจัย

1. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางการแพทย์จากตู้แช่แข็งที่เก็บรักษาโดยศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการแพทย์ไว้แล้วในช่วงเวลา 2-12 ปี จำนวน 15 สปีชีส์ และไม่ต่ำกว่า 200 สายพันธุ์

2. เชื้อแบคทีเรียจากข้อ 1 นำมาหาค่าความมีชีวิตของแบคทีเรียที่เหลือ (viability) ด้วยวิธี pour plate และ spread plate ตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity) และตรวจสอบความคงคุณลักษณะทั้งด้าน phenotype (photomicrographs, biochemical test) และ genotype (DNA analysis ในส่วนของ 16S rRNA gene)

สมมติฐานของการวิจัย

วิธีเก็บรักษาแบคทีเรียด้วยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°ซ. และมี cryoprotectants ที่เหมาะสม สามารถใช้เก็บรักษาแบคทีเรียแบบระยะยาวได้หลายชนิด และมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนความมีชีวิต (viability) ความบริสุทธิ์ (purity) และความคงคุณลักษณะทั้งด้านฟีโนไทป์ และจีโนไทป์ เป็นที่ยอมรับได้ และสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการเก็บรักษาแบคทีเรียได้ดี

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. Cryoprotectants หมายถึง สารเคมีที่สามารถป้องกันไม่ให้เซลถูกทำลายหลังการแช่แข็ง

2. Phenotype หมายถึง ลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตที่แสดงออกให้เห็นได้ภายใต้การควบคุมของหน่วยพันธุกรรม

3. Genotype หมายถึง ลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

4. Deoxyribonucleic acid {DNA (ดีเอ็นเอ)} หมายถึง โมเลกุลที่เป็นรหัสข่าวสารทางพันธุกรรมดีเอ็นเอเป็นโมเลกุลที่มีสองเส้นเข้าคู่กันด้วยพันธะอย่างอ่อน ระหว่างเบสของนิวคลีโอไทด์ ในดีเอ็นเอมี นิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด ประกอบด้วยเบสต่าง ๆ ดังนี้ อะดีนีน (Adenine--A), กัวนีน (Guanine--G), ไซโตซีน (Cytosine--C), และไธมีน (Thymine--T) ในธรรมชาติคู่เบสจะสร้างพันธะอย่างอ่อน ระหว่าง A กับ T และระหว่าง G กับ C ดังนั้น ลำดับของเบสต่าง ๆ ในแต่ละเส้นเดี่ยวนั้น สามารถทราบได้จากสายที่เป็นคู่

5. ยีน (Gene) หมายถึง ลำดับที่เป็นคำสั่งของนิวคลีโอไทด์ อยู่ในตำแหน่งที่เฉพาะบนโครโมโซมซึ่งเป็นรหัสสำหรับผลิตโปรตีน หรืออาร์เอ็นเอโมเลกุล รวมทั้งบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออก และบริเวณที่เป็นรหัสสำหรับผลผลิตที่ทำหน้าที่เฉพาะ

6. เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) หมายถึง โปรตีนที่ได้จากแบคทีเรีย ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษคือ จดจำอย่างจำเพาะต่อลำดับของนิวคลีโอไทด์ช่วงสั้นและดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนี้

7. Electrophoresis หมายถึง วิธีการสำหรับการแยกสารชีวโมเลกุล เช่น ชิ้นส่วนของ ดีเอ็นเอ (DNA fragment) เพปไทด์ (peptide) หรือโปรตีน (protein) ออกจากกันภายใต้สนามไฟฟ้า โมเลกุลจะเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางในอัตราที่ต่างกันขึ้นอยู่กับประจุไฟฟ้าและขนาดของโมเลกุล ชิ้นส่วนที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้ไกลกว่า

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ใช้เป็นเอกสารอ้างอิงทางวิชาการและเป็นข้อมูลสำหรับใช้ในการจัดการและพัฒนาระบบงานควบคุมคุณภาพของศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการแพทย์

2. เป็นข้อมูลเบื้องต้น สำหรับการพัฒนาการแยกชนิดและตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียทางการแพทย์บางชนิด จากสิ่งส่งตรวจชนิดต่าง ๆ

บทที่ 2
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

แหล่งเก็บรักษาจุลินทรีย์ (culture collection)

แหล่งเก็บรักษาจุลินทรีย์ (culture collection) หมายถึง สถานที่ที่มีการรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์และข้อมูล และทำการเก็บรักษา เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในยามที่ต้องการ (วันเชิญ โพธาเจริญ และมรกต ตันติเจริญ, 2542) แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ตามลักษณะความต้องการในการใช้งานของแต่ละหน่วยงานที่จัดตั้งขึ้น (Sly, 1996, p. 3)

แหล่งเก็บรักษาจุลินทรีย์แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ดังนี้ (Nakase, 1996, pp. 144-147; Sly, 1996, p. 3)

1. Service Collection หรือ Public Collection เป็นแหล่งเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่มีจุดประสงค์หลักเพื่อการให้บริการเชื้อจุลินทรีย์และข้อมูล สำหรับหน่วยงาน หรือบุคคลที่เกี่ยวข้อง นำไปใช้ในงานต่าง ๆ ได้แก่ การเรียนการสอน การวิจัย และใช้เป็นสายพันธุ์มาตรฐานสำหรับการทดสอบและควบคุมคุณภาพทางห้องปฏิบัติการ มีบางแหล่งที่จะทำหน้าที่รวมไปถึงการให้บริการการตรวจแยกชนิด (identification) การเก็บรักษา (preservation) และการรับฝากเก็บ (safe storage) เฉพาะ สายพันธุ์ที่มีความสำคัญหรือได้รับการจดสิทธิบัตรแล้ว นอกจากนี้ยังมีการรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับพื้นที่ที่พบเชื้อและคุณลักษณะของเชื้อที่สามารถตรวจพบได้ด้วย

2. Institutional Collection หรือ In-house Collection เป็นแหล่งเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่หน่วยงานหรือสถาบันต่าง ๆ จัดตั้งขึ้นเพื่อสนับสนุนงานตามความต้องการของหน่วยงานหรือสถาบันเท่านั้น

3. Private Collection หรือ Personal Research Collections หรือ Speciallzed Collection เป็นการจัดเก็บกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีจำนวนและชนิดไม่มากนัก ส่วนใหญ่เป็นชนิดที่ต้องใช้ในงานวิจัยหรือนักวิจัยต้องทำงานการวิจัยในระยะยาวอย่างต่อเนื่อง

เพื่อให้มีความสะดวกในการใช้งาน หรืออาจเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีคุณค่ามากหรือมีความเสี่ยงภัยต่อชุมชนได้

ประวัติแหล่งเก็บรักษาจุลินทรีย์

วันเชิญ โพธาเจริญ (2543) รายงานว่า แหล่งเก็บรักษาจุลินทรีย์แห่งแรกของโลกถูกจัดตั้งขึ้นในปี ค.ศ. 1890 คือ Kralsche Sammlung von Mikroorganism โดย Dr. Frantisek Kral ณ กรุงปราค ต่อมาก็มีการจัดตั้งเพิ่มขึ้นกระจายไปทั่วโลก เช่น The Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) หรือ Fungal Biodiversity Center จัดตั้งขึ้นเพื่อเก็บรักษาเชื้อรา ในปี ค.ศ. 1904 ณ ประเทศเนเธอแลนด์ The American Type Culture Collection (ATCC) เป็นแหล่งเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ประสบความสำเร็จแห่งเดียวในโลก ตั้งขึ้นเมื่อปี ค.ศ. 1925 ณ ประเทศสหรัฐอเมริกา Japanese Federation of Culture Collection (JFCC) ตั้งขึ้นเมื่อ ปี ค.ศ. 1963 ณ ประเทศญี่ปุ่น นอกจากนี้มีการจัดตั้งสหพันธ์การเก็บรักษาจุลินทรีย์ของโลก World Federation of Culture Collection (WFCC) เมื่อปี ค.ศ. 1970 และจัดตั้งศูนย์กลางข้อมูลจุลินทรีย์โลก World Data Center of Microorganism (WDCM) เมื่อปี ค.ศ. 1976

สำหรับในประเทศไทยมีการจัดตั้งเครือข่ายศูนย์เก็บจุลินทรีย์แห่งประเทศไทย Thailand Network on Culture Collection (TNCC) ปี ค.ศ. 1990 โดยความร่วมมือของ 4 หน่วยงานหลักที่มีความพร้อมในด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ กำลังคน กิจกรรม และมีนโยบายขององค์กรที่ส่งเสริมกิจการการเก็บรักษาจุลินทรีย์ ได้แก่ ศูนย์เก็บจุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) ศูนย์เก็บจุลินทรีย์กรมวิชาการเกษตร ศูนย์เก็บจุลินทรีย์กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และศูนย์เก็บจุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.) แต่ละศูนย์จะมีความเชี่ยวชาญและประสบการณ์ที่แตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ดูแลอยู่

การเก็บรักษาจุลินทรีย์

การเก็บรักษาจุลินทรีย์ (preservation) มีหลายวิธีแต่ที่สำคัญมี 2 วิธีหลัก คือ (วันเชิญ โพธาเจริญ, 2532, หน้า 1-10; Snell, 1991, pp. 24-30)

1. การเก็บรักษาแบบกึ่งถาวร อาศัยหลักการลดอัตราเมแทบอลิซึมของเซลล์เพื่อชะลอการเจริญหรือการแบ่งตัวโดยการควบคุมสารอาหาร เช่น วิธีเปลี่ยนถ่ายอาหาร (subculturing) เก็บในพาราฟินเหลว (liquid paraffin) เก็บรักษาในน้ำกลั่น เก็บรักษาบนกระดาษกรอง (micro-dry) เก็บรักษาในหยดเจลาติน (gelatin disc) เก็บแบบแห้งบน silica gel เก็บรักษาในดิน และเก็บรักษาแบบ liquid drying

ข้อดีของการเก็บรักษาแบบกึ่งถาวร คือ ทำได้ง่าย ราคาไม่แพง และเหมาะสำหรับใช้เป็นวิธีการขนส่งจุลินทรีย์ได้

ข้อเสียของการเก็บรักษาแบบกึ่งถาวร คือ มีโอกาสปนเปื้อนเชื้ออื่น ๆ ได้ง่าย มีโอกาสกลายพันธุ์สูง และเกิดความผิดพลาดของบุคคลได้ง่าย

2. การเก็บรักษาแบบถาวร อาศัยหลักการหยุดการเจริญของเซลล์โดยการควบคุมน้ำและกำจัดน้ำ เช่น การเก็บด้วยการแช่แข็งเซลล์ในตู้แช่แข็ง (deep freezer) ที่อุณหภูมิ -70 หรือ -80°ซ. หรือเก็บในถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) ที่อุณหภูมิ -140 หรือ -196°ซ. และการเก็บโดยวิธีระเหิดแห้ง (freeze-drying)

ข้อดีของการเก็บรักษาแบบถาวร คือ เชื้อจะมีชีวิตอยู่ยาวนาน มีโอกาสปนเปื้อนเชื้ออื่น ๆ ได้น้อย และมีการกลายพันธุ์น้อย

ข้อเสียของการเก็บรักษาแบบถาวร คือ ใช้อุปกรณ์และวัสดุ มีราคาแพง ต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการบำรุงรักษาเครื่องมือ และอาจเกิดอันตรายจากความเย็นจัดของผู้ปฏิบัติงานได้

เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์มีหลายวิธี การเลือกวิธีการเก็บรักษานั้นควรอาศัยคุณสมบัติของวิธีการ ชนิดของจุลินทรีย์ และความต้องการของผู้ใช้ประกอบด้วย ดังนี้ (สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, 2539, หน้า 1-26; Snell, 1991, pp. 21-23)

1. การเก็บรักษาให้จุลินทรีย์รอดชีวิต (maintenance of viability) เซลล์อาจตายระหว่างการเก็บรักษา ควรคำนึงถึงวิธีการเก็บรักษาที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดมากที่สุดทั้งขณะทำการเก็บรักษาและระหว่างการเก็บรักษา

2. การคัดเลือกทำให้ประชากรเปลี่ยนแปลง (population changes through selection) สัดส่วนของเซลล์อาจลดลงในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการเก็บรักษา จึงควรใช้เซลล์เริ่มต้นให้มีจำนวนมาก การรอดชีวิตอาจเป็นผลมาจากการคัดเลือกของประชากรที่ทนทานกว่า และนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงลักษณะบางประการของเซลล์นั้นได้ การเก็บรักษาที่ดีควรให้มีเซลล์รอดชีวิต และคงลักษณะเช่นเดียวกับตอนเริ่มต้นให้มากที่สุด

3. การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม (genetic change) ระหว่างการเก็บรักษา เซลล์อาจมีการกลายพันธุ์หรือสูญเสียพลาสมิด (plasmid) ได้ จึงควรเลือกใช้วิธีที่เหมาะสม

4. ความบริสุทธิ์ (purity) เซลล์ที่เก็บรักษาควรอยู่ในสภาพบริสุทธิ์ และไม่ให้มีการปะปนของเซลล์อื่นขณะทำการเก็บรักษาด้วย

5. ค่าใช้จ่าย (expense) ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษารวมถึงค่าจ้างผู้ร่วมงาน วัสดุ อุปกรณ์และสิ่งอำนวยความสะดวกอื่นให้เหมาะสมกับการเก็บรักษาจุลินทรีย์นั้น ๆ

6. จำนวนเชื้อ (number of culture) ควรพิจารณาจำนวนจุลินทรีย์ที่จะจัดเก็บให้สัมพันธ์กับวิธีที่เลือกใช้

7. คุณค่าของจุลินทรีย์ (value of culture) ควรเลือกเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้วยวิธีการที่ไม่เสี่ยงต่อการสูญเสีย และที่มีความสำคัญน้อยควรคำนึงถึงค่าใช้จ่าย

8. การขนส่งจุลินทรีย์ (transportation of culture) ถ้าต้องมีการขนส่งควรเลือกใช้วิธีที่เหมาะสมและสามารถเก็บรักษาชีวิตของจุลินทรีย์นั้น ๆ ได้

9. ความบ่อยของการใช้จุลินทรีย์ (frequency of use of culture) จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การผลิตทางอุตสาหกรรมหรือการควบคุมคุณภาพอาจต้องใช้บ่อยในห้องปฏิบัติการ จึงควรคำนึงถึงความสะดวกในการเลี้ยง และความเสี่ยงต่อการปะปนของเซลล์อื่น

วิธีการเก็บรักษาแบคทีเรีย

วิธีถ่ายเชื้อ (subculture)

วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและมักใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เป็นการเก็บในระยะเวลาอันสั้น โดยการเพาะเชื้อลงบนอาหารที่เหมาะสมภายในหลอดหรือขวดแล้วบ่มไว้ในอุณหภูมิที่เหมาะสม เมื่อเชื้อเจริญสูงสุดและเข้าสู่ระยะที่จะตายก็ต้องถ่ายเชื้อลงบนอาหารใหม่ ซึ่งระยะที่จะต้องถ่ายเชื้อแต่ละครั้งจะแตกต่างกันไป แล้วแต่ชนิดของแบคทีเรียและอาหารที่ใช้ซึ่งอาจแตกต่างกันตั้งแต่ 1 สัปดาห์ ถึง 6 เดือน เช่น *Staphylococcus* จะมีชีวิตรอดได้หลายปี ขณะที่เชื้อจำพวกตายง่าย เช่น *Neisseria* จะตายเร็วจึงต้องต่อเชื้ออีกภายในสองถึงสามสัปดาห์ การที่ต้องถ่ายเชื้อบ่อย ๆ มักทำให้เกิดผลเสียหาย เช่น เกิดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น (contamination) เกิดความผิดพลาดหรือสับสนในการถ่ายเชื้อแต่ละชนิด อย่างไรก็ตามวิธีนี้จำเป็นสำหรับเชื้อบางชนิดที่ใช้วิธีอื่นเก็บรักษาไม่ได้ เช่น เชื้อที่ไม่ทนทานต่ออุณหภูมิที่เย็นจัดหรือความแห้ง (Snell, 1991, pp. 24-30)

วิธีเก็บรักษาเชื้อในสภาพแห้ง (drying)

วิธีนี้เป็นการทำเชื้อให้แห้ง โดยการเอาน้ำออกจากเซลล์และไม่ให้เกิดความชื้นอีก ส่วนใหญ่ใช้กับเชื้อรา ซึ่งต้านทานกับความแห้งได้ดีมากกว่าเชื้อกลุ่มอื่น วิธีการนี้ใช้ได้กับเชื้อยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น มีการใช้สารบางชนิด เช่น หางนมผง (skim milk) หรือโซเดียมกลูตาเมต 10% การทำแห้งโดยใช้วัสดุต่าง ๆ มีดังนี้ (Snell, 1991, pp. 25-27)

1. ทราย ดิน ซิลิกาเจล และดินเผา เชื้อราที่สร้างสปอร์รอดชีวิตแบบแห้งในดินหลายเชื้อเก็บได้นานถึง 5 ปี โดยลักษณะไม่เปลี่ยนแปลง ยีสต์ ราและแบคทีเรียบางชนิดเก็บรักษาแบบแห้งได้บนซิลิกาเจล มีรายงานว่าแบคทีเรียหลายชนิดรอดชีวิตโดยลักษณะไม่เปลี่ยนแปลง แต่เชื้อยีสต์มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไป

2. แผ่นกระดาษหรือดิสก์ (paper disc) การเก็บเชื้อบนแผ่นกระดาษใช้ได้กับเชื้อยีสต์ และ *Staphylococcus* หลังจากทำแห้งแล้วเก็บแผ่นกระดาษหรือดิสก์ไว้ในห่อฟอยล์ภายในภาชนะปิดไม่ให้อากาศเข้า หรือระหว่างแผ่นกระดาษมีสารทำให้ยึดติดกันได้ วิธีการนี้เหมาะสำหรับส่งเชื้อทางไปรษณีย์ได้เป็นจำนวนมาก

3. เจลาตินดิสก์ (gelatin disc) เป็นวิธีหนึ่งที่เหมาะสำหรับเก็บเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิดและได้เป็นระยะเวลานาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นวิธีที่ดีในการเก็บเชื้อที่ต้องการนำมาใช้เป็นประจำ ได้แก่ เชื้อที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อและสารทดสอบเชื้อ

4. วัสดุอื่น ๆ (predried plug) เช่น แป้ง เปปโตนหรือเดกซแตรน เมื่อสารนี้สัมผัสกับสารแขวนลอยเชื้อ (suspension) จะช่วยดูดซับน้ำ ก่อนนำไปทำแห้งอีกครั้งและเก็บภายใต้สูญญากาศ วิธีการนี้ใช้ได้ดีกับเชื้อที่ตายง่าย เช่น *Neisseria gonorrhoeae*

วิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying)

วิธีนี้เป็นกระบวนการทำให้น้ำระเหยไปจากสารแขวนลอยเชื้อ ที่อุณหภูมิเยือกแข็ง (-30°ซ. ถึง -50°ซ.) โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารวุ้น เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วผสมกับของเหลวตัวกลาง (freeze-drying suspending fluid) เช่น horse serum หรือ innositol จากนั้นถ่ายสารแขวนลอยเชื้อ ในปริมาณเล็กน้อยลงในหลอด (ampule) นำไปทำให้เยือกแข็งในระบบสุญญากาศ ซึ่งจะทำให้เชื้ออยู่ในสภาพเย็นจัด (-30°ซ. ถึง -50°ซ.) และแข็งตัวในสภาพสุญญากาศ น้ำในเซลล์จะระเหิดออกจากเซลล์ แบคทีเรียจึงอยู่ในสภาพแห้งแล้วปิดหลอดเพื่อรักษาสภาพสุญญากาศ การปฏิบัติจะต้องกระทำภายใต้สภาพปลอดเชื้อทุกขั้นตอน การเก็บเชื้อโดยวิธีนี้ทำให้แบคทีเรียบางชนิดคงสภาพมีชีวิตอยู่ได้นานนับ 10 ปี (Snell, 1991, pp. 24-30)

วิธีเก็บที่อุณหภูมิเยือกแข็งหรือแช่แข็ง (freezing)

การเก็บรักษาเชื้อโดยการแช่แข็ง ถือเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะยาว สามารถเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิดและรวมทั้งให้ผลการเก็บรักษาครอบคลุม 100% (Kirsop & Doyle, 1991, pp. 287-314) การเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง

น้ำจะถูกดึงออกจากเซลล์แบคทีเรียโดยการเปลี่ยนเป็นเกล็ดน้ำแข็ง และเซลล์จะอยู่ในสภาพ dehydrate ที่อุณหภูมิต่ำมากสามารถเก็บรักษาได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ -20°ซ. ถึง -30°ซ. แต่ที่จัดว่าเป็นอุณหภูมิมาตรฐานคือการเก็บที่อุณหภูมิ -70°ซ. หรือโดยใช้ liquid nitrogen อุณหภูมิ -196°ซ. หรือไอของ liquid nitrogen อุณหภูมิ -140°ซ. ที่อุณหภูมิต่ำนี้เซลล์จะสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานและลักษณะทางด้านพันธุกรรมไม่เปลี่ยนแปลง (Heckly, 1978, pp. 1-76) การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ช่วงอุณหภูมิ -60°ซ. ถึง -80°ซ. มักจะให้ค่าความมีชีวิตดีและสามารถใช้กับแบคทีเรียได้หลายชนิด ส่วนอุณหภูมิที่มากกว่า -30°ซ. มักจะให้ผลการเก็บรักษาที่ไม่ดีเท่าเพราะจะมีการสร้าง eutectic และภายในเซลล์เกิดมีความเข้มข้นของเกลือแร่สูงมากเกินไป (Morris, Coulson, & Clarke, 1988, pp. 471-482) การแช่แข็งเซลล์จะเกิดอันตรายโดยทั่ว ๆ ไปมี 2 ชนิด คือ (Griffiths, 1978, pp. 517-529; Mazur, 1977, pp. 251-272)

1. อัตราการแช่แข็ง (cooling rates) ที่ไม่เหมาะสม น้ำนอกเซลล์จะกลายเป็นน้ำแข็งก่อนน้ำภายในเซลล์ จึงทำให้เกิดแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) น้ำภายในเซลล์ออกนอกเซลล์ทำให้เซลล์เหี่ยว

2. การอยู่ในสภาพคายน้ำ (dehydrate) ของเซลล์ ที่เกิดขึ้นเมื่อมีการแช่แข็งอาจมีผลทำให้ biological macromolecules และ/หรือส่วนประกอบของผนังเซลล์ เสื่อมสภาพ (denature) (Rudolph & Crowe, 1985, pp. 367-377)

การมีชีวิตภายใต้สิ่งแวดล้อมที่เย็นทำให้แบคทีเรียบางชนิดมีการพัฒนาแบบแผนอย่างหลากหลายขึ้น เช่น การรักษาผนังเซลล์ของตัวเชื้อและความคงตัวของขบวนการเมแทบอลิซึม (Ramos et al., 2001, pp. 166-171) และเป็นที่น่าแปลกใจที่มีแบคทีเรียจำนวนน้อยที่จะใช้สาร cryoprotectants สำหรับต้านกระบวนการถูกแช่แข็ง รวมทั้งแบคทีเรียมักจะประสบปัญหากับสภาวะเย็นจัดแต่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่หนาวจัดเหมือนที่ขั้วโลก (Antarctic และ Arctic) ได้ ในสิ่งแวดล้อมที่ถูกแช่แข็งของแบคทีเรีย น้ำจะถูกเปลี่ยนให้เป็นเกล็ดน้ำแข็ง เซลล์จะปรับสภาพโดยการเคลื่อนย้ายน้ำออกจากเซลล์เพื่อรักษาโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์โดยเซลล์จะอยู่ในสภาพคายน้ำการที่เซลล์อยู่ในสภาพแห้ง และภายในเซลล์ถูกเปลี่ยนไปเป็นเกล็ดน้ำแข็งนั้น เป็นการถูกคุกคามอย่างรุนแรงต่อหน้าที่ปกติและความมีชีวิตของสิ่งมีชีวิต (Beall, 1983, pp.

324-334) สำหรับจุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิด โดยเฉพาะพวกแบคทีเรียบางชนิดจะมีการผลิตโปรตีน หรือคาร์โบไฮเดรตขนาดเล็กเพื่อขัดขวางการคุกคามของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโมเลกุลน้ำไปเป็นเกล็ดน้ำแข็ง (ice nuclei) มี 2 แบบคือ homogeneous nucleation และ heterogeneous nucleation

1. homogeneous nucleation เกิดขึ้นจากอุณหภูมิเย็นยิ่งยวด (< -39°ซ.) ไม่มีผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ (ice-forming nuclei) โดยโมเลกุลของน้ำข้างในเย็นเพียงพอที่จะเริ่มก่อตัวเป็นเกล็ดน้ำแข็งโครงสร้างละเอียด (minute ice) เรียกว่า ice embryos ซึ่งรอบ ๆ โมเลกุลของน้ำจะประกอบด้วย ice embryos ที่ก่อเกิดเป็นผลึกตาข่าย

2. heterogeneous nucleation เป็นกระบวนการเกิดเกล็ดน้ำแข็งขนาดใหญ่ภายในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำ (< 15°ซ.) มี 3 รูปแบบคือ

2.1 น้ำเริ่มกลายเป็นผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ ที่ผิวหน้าโดยภายในหยดน้ำยังคงสภาพเป็นของเหลว

2.2 ภายในหยดน้ำกำลังเริ่มเข้าสู่การแช่แข็ง

2.3 ผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ เริ่มก่อตัวเป็นเกล็ดน้ำแข็ง ขั้นตอนนี้อยู่ในช่วงเข้าใกล้จุดเยือกแข็งเย็นยิ่งยวด (Bergeron & Findeisen, 1930)

การลดความเสียหายของเซลล์โดยปรับอัตราการทำให้เย็น (cooling rate) และการเติมสารป้องกันความเย็น เช่น dimethylsulfoxide หรือ glycerol ลงในสารแขวนลอยเชื้อ ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 5 ถึง 20% จะช่วยรักษาสภาพความมีชีวิตของเซลล์ไว้ได้ (Hew & Yang, 1992, pp. 33-42)

การทดสอบคุณภาพจุลินทรีย์หลังการเก็บรักษา

Nakase (1996, pp. 144-147) เสนอหลักการของการควบคุมคุณภาพแหล่งเก็บรักษาจุลินทรีย์ไว้ว่า "การทดสอบคุณภาพของจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาในแต่ละแหล่งเก็บรักษานั้น ควรตรวจสอบความมีชีวิต ความบริสุทธิ์ และความคงคุณลักษณะ ซึ่งต้องเป็นไปตามความต้องการการใช้งานของจุลินทรีย์นั้น ๆ และวิธีที่ใช้ให้เป็นไปตามความ

เหมาะสมและความต้องการของแต่ละห้องปฏิบัติการ" และมีข้อเสนอแนะจากผู้เชี่ยวชาญได้กล่าวไว้ ดังนี้

Smith (1996, p. 140) ให้ข้อเสนอว่า การควบคุมคุณภาพของงาน Culture Collection ประกอบด้วย

1. การตรวจวิเคราะห์ตรงตามสายพันธุ์ (identified, authenticated strain)
2. การหาความบริสุทธิ์ (purity)
3. การหาความมีชีวิต (viability)

Nakase (1996, pp. 144-147) ให้ข้อเสนอว่า การควบคุมคุณภาพของงาน Culture Collection ประกอบด้วย

1. การตรวจวิเคราะห์และหาความบริสุทธิ์ (identity and purity)
2. การหาความมีชีวิต (viability)
3. การตรวจความถูกต้องตามชื่อวิทยาศาสตร์ (correctness of scientific name)
4. การตรวจสอบความคงคุณสมบัติ (properties check)

Packer and Doyle (1996, p. 149) ให้ข้อเสนอว่า การควบคุมคุณภาพของงาน Culture Collection ประกอบด้วย การหาความมีชีวิต การหาความบริสุทธิ์ และความถูกต้องตรงตามสายพันธุ์

การหาค่าความมีชีวิตของแบคทีเรีย (viability)

1. การนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ (plate count) เป็นการนับเฉพาะเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น (viable count หรือ colony count) อาศัยหลักที่ว่าแต่ละเซลล์จะเจริญเป็นแต่ละโคโลนี ดังนั้นจึงต้องนำเชื้อมาทำให้เจือจางเป็นลำดับ (serial dilution 1 : 10) ในน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ที่ปราศจากเชื้อและทราบปริมาตรแน่นอน เพื่อให้จำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี ซึ่งเป็นค่าที่เชื่อถือได้ แล้วนำเชื้อในแต่ละหลอดที่มีความเจือจางต่าง ๆ มาเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม นับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร หนึ่งโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อถือว่ามาจากแบคทีเรียหนึ่งเซลล์ หรือหนึ่งกลุ่ม การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียอาจนับด้วยตาเปล่าหรือใช้เครื่องช่วยนับโคโลนี

(colony counter) ซึ่งมีเลนส์ช่วยขยายภาพทำให้เห็นชัด มี 3 วิธีคือ (สุวณี สุดเวชย์ และมาลัย วรจิตร, 2536, หน้า 46-47)

1.1 วิธี pour plate หลักการคือ เตรียมหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นเหลวที่แช่ใน water bath อุณหภูมิประมาณ 45°ซ. เจือจางเชื้อ 1 : 10 (ten fold dilution) ตามจำนวนที่ต้องการ ใช้ปิเปตปราศจากเชื้อดูดตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีวุ้นเหลว แล้วรีบเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ หรือใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ใส่อาหารวุ้นเหลว หมุนจานโดยให้หมุนวนไปรอบ ๆ หลาย ๆ ครั้งอย่างรวดเร็วก่อนที่อาหารเริ่มแข็ง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเพื่อให้วุ้นแข็งตัว นำไปบ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสม นับโคโลนีเฉพาะจานที่มีเชื้อขึ้นอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี

1.2 วิธี spread plate หรือ surface count หลักการคล้าย pour plate แต่ใช้อาหารวุ้นแข็งที่ผิวหน้าแห้งแทนอาหารวุ้นเหลว โดยใช้ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร จากหลอดเจือจางที่ต้องการหาจำนวนแบคทีเรียใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อใช้แท่งแก้วที่ดัดเป็นรูปสามเหลี่ยม หรือตัว L (spreader) ปาดให้กระจายทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อจนกว่าจะแห้ง เพื่อให้เชื้อกระจาย นำไปบ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสม นับโคโลนีเฉพาะจานที่มีเชื้อขึ้นอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี

1.3 วิธี drop count method วิธีนี้เป็นการนับแบคทีเรียโดยใช้วิธีหยด (drop) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นวิธีที่ประหยัดอาหารเลี้ยงเชื้อและเวลา วิธีการคือ หยดเชื้อ 0.02 มิลลิลิตร จากหลอดเชื้อที่เจือจางตามลำดับแล้ว (1: 10) ทุกหลอดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผิวหน้าค่อนข้างแห้ง ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปบ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสม การทำมักนิยมทำซ้ำสามครั้ง (triplicate) การหยดอาจใช้ปิเปต เข็มฉีดยาเบอร์ 19 หรือ autopipette ถ้านับได้น้อยกว่า 10 โคโลนี ใน 5 หลอดของตัวอย่าง แสดงว่า ตัวอย่างนั้นมีน้อยกว่า 100 โคโลนี แต่ถ้านับไม่ได้หรือมากกว่า 40 โคโลนี แสดงว่า ตัวอย่างนั้นมีโคโลนีมากกว่า 2000 โคโลนี

2. การนับจำนวนแบคทีเรียบนเยื่อกรอง (membrane-filter count) เป็นการนับจำนวนแบคทีเรียบนเยื่อกรองโดยใช้เยื่อกรองที่ทราบขนาดของรู และสามารถกรองแบคทีเรียไว้ได้ วิธีนี้มีประโยชน์มากในการนับจำนวนแบคทีเรียที่มีปริมาณน้อยในตัวอย่างปริมาณมาก เมื่อกรองตัวอย่างนั้นแล้ว จึงนำแผ่นเยื่อกรองที่มีแบคทีเรียติดอยู่วาง

บนกระดาษซับที่ชุบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม อาจใช้อาหารพิเศษและสี (dye) เพื่อช่วยให้เห็นความแตกต่างระหว่างโคโลนีของเชื้อที่เจริญ หลังจากบ่มเชื้อในอุณหภูมิที่เหมาะสม แบคทีเรียจะเจริญเป็นโคโลนีบนผิวของเยื่อกรอง เลือกนับโคโลนีของแบคทีเรียที่ต้องการ

การจำแนกแบคทีเรียเพื่อการตรวจวิเคราะห์ (identification)

การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตออกเป็นหมวดหมู่ เรียกว่า อนุกรมวิธาน (taxonomy) วัตถุประสงค์ของการจัดอนุกรมวิธานของสิ่งมีชีวิตเพื่อจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยบอกถึงความสัมพันธ์และความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งกับสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง

มีการแบ่งสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำออกเป็นพวก prokaryote และ eukaryote แบคทีเรียจัดอยู่ในพวก prokaryote เป็นเซลล์ที่มีโครงสร้างไม่สลับซับซ้อน ซึ่งประกอบด้วยผนังเซลล์ และมีเยื่อหุ้มเซลล์หรือเซลล์เมมเบรนหุ้มรอบส่วนที่เป็นโพรโทพลาสซึม มีองค์ประกอบของเซลล์ (organelle) และสารที่ทำหน้าที่ถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม (genetic material) อยู่กระจัดกระจายทั่วไป ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) และไม่มี mitotic apparatus และลักษณะอื่น ๆ ดังแสดงการเปรียบเทียบในตาราง 1

ตาราง 1

การเปรียบเทียบลักษณะเซลล์ของสิ่งมีชีวิตพวก Prokaryote และ Eukaryote

	Prokaryotic cell	Eukaryotic cell
DNA	วงกลม	เส้นตรง
Histone	ไม่มี	มี
Ribosome	70S	80S
การเจริญเติบโต	แบ่งตัวจากหนึ่งเป็นสอง (binary fission)	วิธีไมโทซิส (mitosis)

ที่มา. จาก *จุลชีววิทยาทั่วไป: การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์* (หน้า 210), โดย นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2541, กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาเพื่อจัดจำแนกชนิดอาศัยข้อมูลการทดสอบต่อไปนี้ประกอบกัน

1. การตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) รูปร่างลักษณะของเซลล์ไม่ได้บอกถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมากนัก แต่อาจใช้ในการช่วยตรวจสอบชนิด (identify) แบคทีเรียได้

1.1 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง (colonial morphology) ขนาดและลักษณะโคโลนีเป็นหลักเกณฑ์สำคัญในการช่วยพิสูจน์ชนิดแบคทีเรียโดยให้สังเกตลักษณะดังต่อไปนี้

1.1.1 ขนาดของโคโลนี (size) ขนาดของโคโลนีที่มีขนาดเล็กมาก (pinpoint) เส้นผ่าศูนย์กลางไม่ถึงมิลลิเมตรจนถึง โคโลนีขนาดใหญ่ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-10 มิลลิเมตร แบคทีเรียบางชนิดมีโคโลนีขนาดจำกัดแม้จะบ่มเชื้อไว้เป็นเวลานานก็ตาม หรือเชื้อบางชนิด โคโลนีมีลักษณะเป็นเมือกและลามไปถึงโคโลนีอื่น

1.1.2 รูปร่างของโคโลนี (form) โคโลนี มีรูปร่างลักษณะต่าง ๆ กัน ดังนี้

punctiform	โคโลนีมีขนาดเล็กมาก แต่มองเห็นด้วยตาเปล่า มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร
circular	โคโลนีมีลักษณะกลม
filamentous	โคโลนีประกอบด้วยเส้นสายพันกันแน่น
irregular	รูปร่างโคโลนีไม่แน่นอน
rhizoid	ลักษณะการเจริญมีการแตกกิ่งก้านไม่แน่นอน และมีลักษณะคล้ายราก

1.1.3 ขอบหรือริมของโคโลนี (margin edge) ขอบหรือริมของโคโลนีมีหลายรูปแบบขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย บางชนิดมีขอบเรียบเป็นวงกลม บางชนิดขอบไม่เรียบเป็นรอยหยัก หรือมีส่วนที่ยื่นออกคล้ายนิ้วมือ ลักษณะขอบมีดังนี้

entire	ขอบโคโลนีเรียบ
undulate	ขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย
lobate	ขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งเว้าและยื่นมาก
erose	ขอบโคโลนีเป็นหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ

filamentous	ขอบโคโลนีเป็นเส้นสายยาวไม่แน่นอน
curled	ขอบโคโลนีเป็นเส้นซ้อนกันเป็นคลื่นและหยักในลักษณะที่ขนานกัน

1.1.4 พื้นผิวของโคโลนี (surface texture) พื้นผิวของโคโลนีของแบคทีเรียบางชนิดอาจเรียบเป็นมันวาวหรือขรุขระ หรือเป็นเมือกเยิ้มบางชนิดบนผิวหน้าเป็นรอยหยักหรือเป็นร่อง สำหรับเชื้อบริสุทธิ์ทุก ๆ โคโลนีบนผิวอาหารวุ้นควรมีลักษณะโคโลนีเป็นแบบเดียวกัน แต่อาจเกิดการแปรผันได้ เนื่องจากเกิดการผ่าเหล่าทำให้เซลล์ปกติที่เคยสร้างโคโลนีชนิดผิวเรียบ (smooth) มีบางเซลล์เปลี่ยนไปสร้างโคโลนีชนิดขรุขระ (rough)

1.1.5 ความสูงของโคโลนี (elevation) ความสูงของโคโลนีจะแตกต่างไปตามชนิดของแบคทีเรีย บางชนิดโคโลนีแบนบางชนิดนูนมาก มีลักษณะต่าง ๆ ดังนี้

flat	โคโลนีแบนราบติดกับอาหาร
raised	โคโลนีมีความหนาสูงขึ้นมาจากผิวหน้าอาหาร
convex	โคโลนีมีความนูนโค้งขึ้นเล็กน้อย
pulvinate	โคโลนีมีความนูนมากโค้งขึ้นจากผิวอาหารมาก

1.1.6 ความหนืด (consistency) ของโคโลนี

1.1.7 ความขุ่น (optical features) ของโคโลนี โคโลนีอาจขุ่น (ทึบแสง) โปร่งแสง

1.1.8 การสร้างสีหรือรงควัตถุ (chromogenesis หรือ pigmentation)

1.1.9 ปฏิกิริยาต่อเม็ดเลือดแดงบน blood agar plate (นงลักษณ์ สุวรรณ-พินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2541, หน้า 128-131)

Blood agar plate นอกจากใช้สำหรับเพาะเชื้อแล้วยังสามารถใช้ในการช่วยวินิจฉัยแบคทีเรียบางชนิดที่สร้างเอนไซม์ hemolysin สลายเม็ดเลือดแดงได้ ปฏิกิริยาสลายเม็ดเลือดแดงจำแนกได้ 3 ประเภท คือ

1.1.9.1 เป็นการสลายเม็ดเลือดแดงโดยสมบูรณ์ จะสังเกตเห็นเป็นวงใสรอบโคโลนีแบคทีเรีย เรียกลักษณะการสลายเม็ดเลือดแดงแบบนี้ว่า β-hemolysis

1.1.9.2 เป็นการสลายเม็ดเลือดแดงไม่สมบูรณ์ (partial hemolysis) จะสังเกตเห็นเป็นวงสีเขียวรอบโคโลนีแบคทีเรีย เรียกลักษณะการสลายเม็ดเลือดแดงแบบนี้ว่า α-hemolysis

1.1.9.3 กรณีแบคทีเรียไม่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ เรียกว่า γ-hemolysis

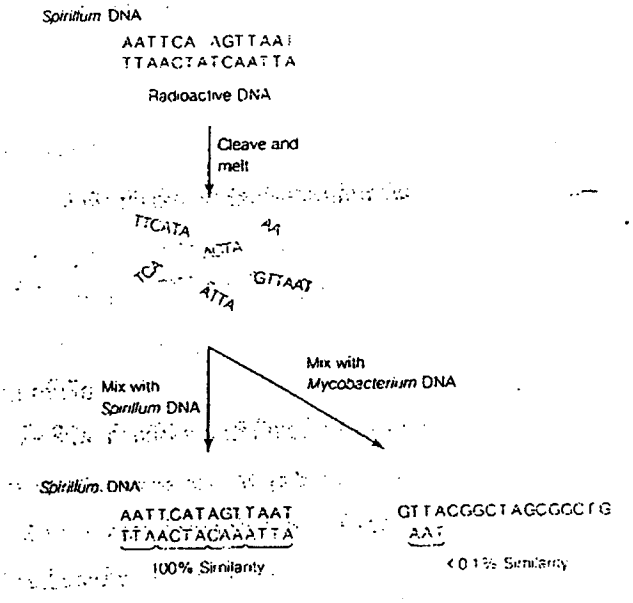
1.2 ลักษณะเซลล์จากการย้อมสี (microscopic morphology) การย้อมสี เพื่อศึกษาการติดสี และลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย ใช้เป็นแนวทางที่สำคัญในการพิสูจน์ชนิดของแบคทีเรีย เช่น การย้อมสีแกรม (Gram's stain) ปฏิกิริยาต่อสีแกรมเป็นเกณฑ์สำคัญในการแยกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ แบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนรูปร่างจะเป็นรูปแท่ง (bacilli หรือ rod) และกลม (cocci)

2. การทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย เป็นการแสดงถึงเอนไซม์ที่มีอยู่ในแบคทีเรีย โดยประเมินจากผลทางชีวเคมีหรือเมแทบอลิซึมที่เกิดจากแบคทีเรียนั้น ๆ เช่น ความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต น้ำตาล และการสร้างกรด เป็นต้น แต่ละลักษณะมีความสำคัญเท่าเทียมกัน อาศัยหลักการที่ว่าสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะเหมือนกันมาก จะมีความใกล้ชิดกันมาก และควรจัดไว้ในพวกเดียวกัน แต่สิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะต่างกันควรจัดไว้อีกพวกหนึ่ง วิธีนี้ไม่สามารถหาระดับเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงที่เป็นมาตรฐานเพื่อจัดแบคทีเรียอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ (โชติชนะ วิลัยลักษณคณา, พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์ และวิภาวดี แมนมนตรี, 2534, หน้า 221-222)

การทดสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relatedness)

ความคล้ายคลึงของลักษณะทางพันธุกรรมดูได้จาก mol% G + C ในสปีชีส์ที่ใกล้กันจะมี mol% G + C คล้ายกันมาก แต่บางครั้งพบว่าสิ่งมีชีวิตไม่มีความสัมพันธ์กันเลย แต่อาจมี mol% G + C คล้ายกันมากได้ ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการตรวจหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมหลายวิธี ดังนี้ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2541, หน้า 215-217)

1. การหาความคล้ายกันของดีเอ็นเอ (DNA homology) หลักการคือ ดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) เมื่อได้รับความร้อน จะแยกออกจากกัน และเมื่อทิ้งให้เย็น สายของดีเอ็นเอจะกลับมาจับคู่ (base pairing) กันอีก โดยอาศัยการจับคู่เบสบนสายของดีเอ็นเอจึงนำมาใช้ศึกษาหาความคล้ายกันของลำดับเบสของดีเอ็นเอในแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้ แบคทีเรียสองชนิดมีความคล้ายคลึงกันหรือใกล้ชิดกันมากดีเอ็นเอจะสามารถจับคู่ (hybridize) กันได้มาก และในทางตรงกันข้าม ถ้าแบคทีเรียสองชนิดไม่ใกล้ชิดกันเลย ก็จะไม่สามารถจับคู่กันได้ ดังภาพ 1 วิธีนี้ทดลองในระดับสปีชีส์ เรียกว่า nucleic acid hybridization



ภาพ 1 ไดอะแกรมของหลักการพิสูจน์ความคล้ายกันของดีเอ็นเอ

ที่มา. จาก *จุลชีววิทยาทั่วไป: การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์* (หน้า 216), โดย นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2541, กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

2. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction--PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ

เป้าหมายในหลอดทดลอง ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้เป็นล้าน ๆ เท่าภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมงโดยอาศัยองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้ คือ

2.1 ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template DNA)

2.2 เอนไซม์เทอร์โมสเตเบิล ดีเอ็นเอ โพลิเมอร์เรส (thermostable DNA polymerase)

2.3 ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ทั้ง 4 ชนิด (deoxyribonucleotide triphosphate-dNTPs)

2.4 ไพร์เมอร์ (primer) 1 คู่

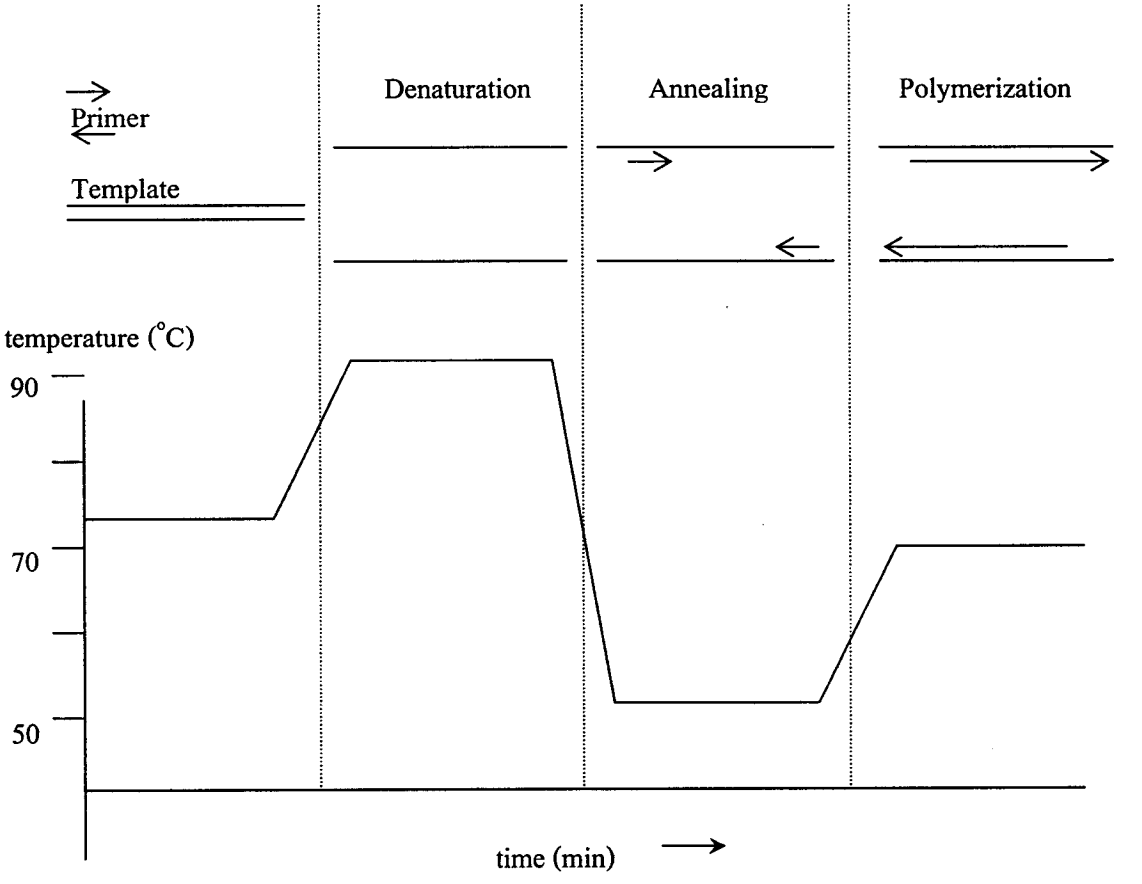
2.5 บัฟเฟอร์ (buffer) ที่เหมาะสม

2.6 รอบของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอซึ่งจะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลาย ๆ รอบ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหนึ่งรอบ ดังแสดงในภาพ 2 มีสามขั้นตอน ได้แก่

2.6.1 ขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น เพื่อทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดียว เรียกขั้นตอนนี้ว่า denaturation

2.6.2 ขั้นตอนการลดอุณหภูมิเพื่อทำให้ไพร์เมอร์เกาะกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว เรียกขั้นตอนนี้ว่า annealing

2.6.3 ขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อเร่งการทำงานของเอนไซม์ *Taq* polymerase เรียกขั้นตอนนี้ว่า extension หรือpolymerization ดังแสดงในภาพ 2



ภาพ 2 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ 1 รอบ 3 ขั้นตอน

ที่มา. จาก "Taq Polymerase," by A. Landdgraf and H. Wolfes, 1993, in B. M. Michael (Ed.), *Enzymes of Molecular Biology* (p. 35), Totowa, NJ: Humana Press.

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอนซ้ำกันเป็นจำนวน 20-30 รอบ ทำให้เกิดเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ซึ่งเรียกว่า ผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ (amplified or PCR product) จำนวนมากมาย ลักษณะการเพิ่มผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ จะเป็นแบบทวีคูณ (exponential) โดยหลังการทำ PCR จำนวน n รอบ ผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ ที่เกิดขึ้นตามทฤษฎีจะเท่ากับ 2^n

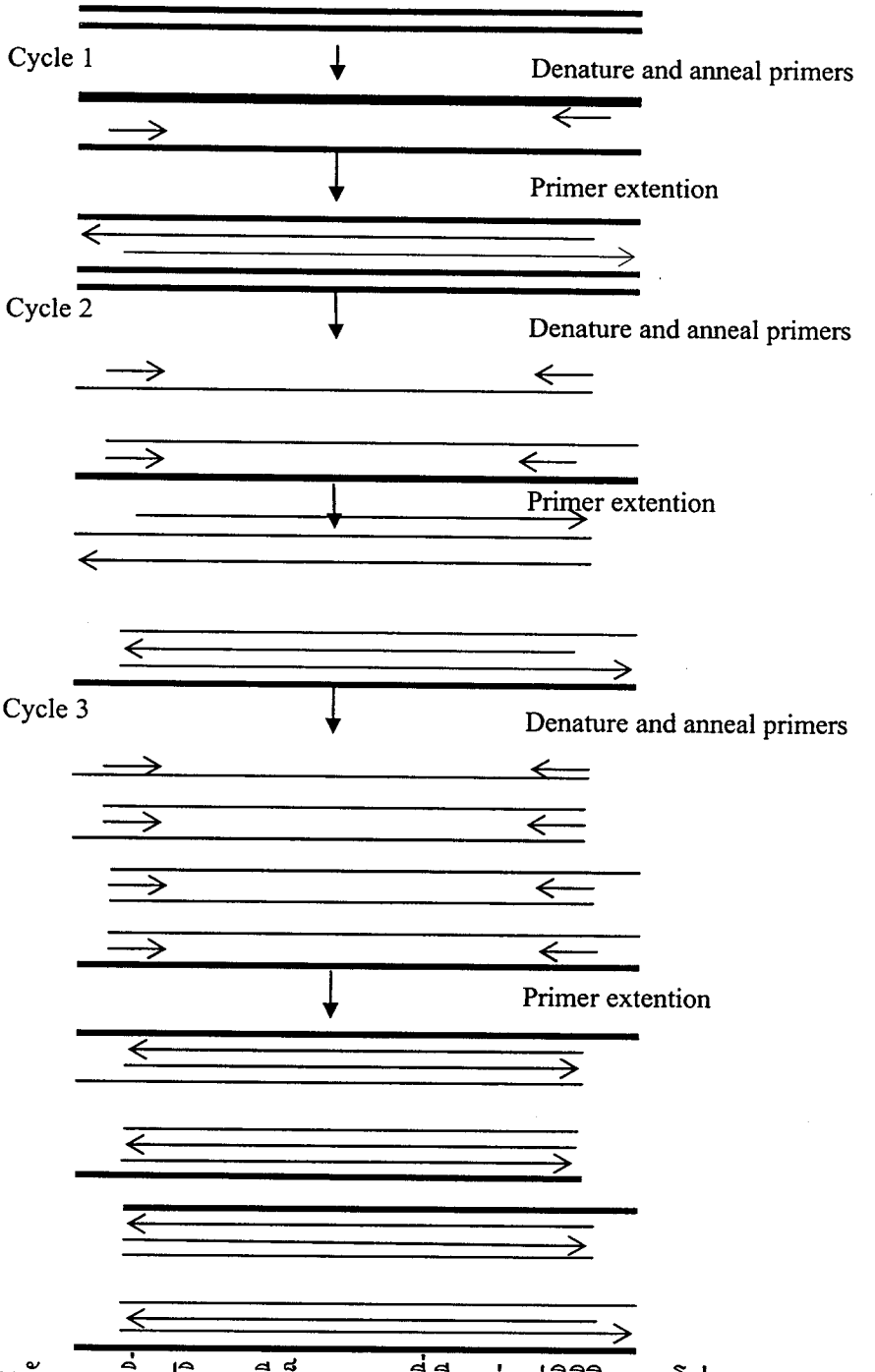
ดีเอ็นเอเส้นที่สร้างขึ้นใหม่ในรอบถัดไป จะทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ (template) ให้ไพร์เมอร์เข้ามาเกาะ และเป็น substrate ของ *Taq* polymerase ซึ่งมีลักษณะคล้ายปฏิกิริยา

ลูกโซ่ (chain reaction) จึงเรียกปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองว่า ปฏิกิริยาลูกโซ่ ดังแสดงในภาพ 3

3. การตัดดีเอ็นเอด้วย restriction enzyme เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme หรือ restriction endonuclease) เป็นเอนไซม์ที่พบในแบคทีเรียและเชื้อราหลายสปีชีส์ มีหน้าที่ป้องกันการบุกรุกและการเข้าไปขยายจำนวนของดีเอ็นเอแปลกปลอมของไวรัสต่อแบคทีเรีย (bacteriophage) โดยจะตัดดีเอ็นเอที่แปลกปลอมนั้นออกเป็นชิ้น ๆ ตรงตำแหน่งของลำดับเบสที่จำเพาะซึ่งเป็นกระบวนการของเซลล์เจ้าบ้าน (host cells) ในการทำให้เกิดการจำกัด (restriction) การเจริญเติบโตของไวรัสได้ จึงได้ชื่อว่า restriction enzyme หรือ restriction endonuclease (ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์, นเรศวร สุขเจริญ, อภิวัฒน์ มุทิรางกูล และยง ภู่วรวรรณ, 2541, หน้า 41)

มีการค้นพบที่สำคัญของเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่า เอนไซม์ตัดจำเพาะจากเชื้อ *Haemophilus influenzae* สามารถตัดหรือย่อยดีเอ็นเอของไวรัสที่ตรงบริเวณเดิมทุกครั้ง และยังสามารถตัดดีเอ็นเอที่มาจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ไม่ว่าเป็น จุลชีพ พืช สัตว์ และคน ถ้ามีบริเวณจดจำอยู่บนดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ๆ

การเรียกชื่อเอนไซม์ตัดจำเพาะเรียกตามชื่อของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดนั้น ๆ โดยอักษรตัวแรกเป็นชื่อสกุล (genus) ของแบคทีเรีย (ตัวเอน) อักษรสองตัวถัดมาเป็นอักษรสองตัวแรกของชนิด (species) อักษรถัดมาเป็นสายพันธุ์ (strain) ของแบคทีเรียนั้น ตัวสุดท้ายเป็นตัวเลขโรมันที่บอกถึงลำดับการค้นพบเอนไซม์นั้น ๆ ดังแสดงในตาราง 2 ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ *Eco* RI มาจาก *Escherichia* (*E*) *coli* (*co*) strain RY13 (R), first endonuclease (I)



ภาพ 3 หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบที่เรียกว่า ปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction--PCR)

ที่มา. จาก "Taq Polymerase," by A. Landdgraf and H. Wolfes, 1993, in B. M. Michael (Ed.), *Enzymes of Molecular Biology* (p. 42), Totowa, NJ: Humana Press.

ตาราง 2

ชื่อของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ชื่อจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดนั้น ๆ และตำแหน่งลำดับเบสจำเพาะที่ถูกตัด

ชื่อจุลินทรีย์	ชื่อเอนไซม์	ตำแหน่งลำดับเบสจำเพาะที่ถูกตัด
Haemophilus aegypticus	*Hae* III	5'...GG▼CC...3'
		3'...GG▲CC...5'
Moraxella nonliquefaciens	*Mnl* I	5'...CCTC $(N)_7$▼...3'
		3'...GGAG$(N)_6$▲...5'
Arthrobacter luteus	*Alu* I	5'...AG▼CT...3'
		3'...TC▲GA...5'
Desulfovibrio desulfuricans	*Dde* I	5'...C▼TNAG...3'
		3'...GANT▲C...5'
Bacillus stearothermophilus	*Bst* B I	5'...TT▼CGAA...3'
		3'...AAGC▲TT...5'

ที่มา. จาก "Taq Polymerase," by A. Landdgraf and H. Wolfes, 1993, in B. M. Michael (Ed.), *Enzymes of Molecular Biology* (p. 44), Totowa, NJ: Humana Press.

ในปัจจุบันเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ค้นพบและแยกสกัดจากแบคทีเรียต่าง ๆ มีมากชนิดขึ้นทุกขณะ อย่างไรก็ตามสามารถแบ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะตามคุณสมบัติความต้องการ cofactor และวิธีการตัดดีเอ็นเอออกเป็น 3 ชนิด ดังข้อมูลที่ปรากฏ (ดูตาราง 3)

ตาราง 3

รายละเอียดของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด

	Type I	Type II	Type III
Example	*Eco* K	*Eco* RI	*Eco* P
Subunits	Three different	Two identical	Two different
Activity	Restriction, modification topoisomerase, ATPase	Only restriction	Restriction, modification, ATPase
Cofactor requirements	Mg^{2+}, ATP, S-AdoMet	Mg^{2+}	Mg^{2+}, ATP, S-AdoMet
Recognition sequence	AACNNNNGTGC	GAATTC	AGACC
Position of cleavage	Variable and great distance from recognition site	Within the recognition site	25 bp away from the recognition site

ที่มา. จาก "Restriction Enzymes," by A. Pinggoud, J. Alves, and R. Geiger, 1993, in M. M. Burrell (Ed.), *Methods in Molecular Biology, vol. 16: Enzymes of Molecular Biology* (p. 108), Totowa, NJ: Humana Press.

เอนไซม์ชนิดที่สอง (Type II) เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่นำมาใช้ประโยชน์มากที่สุดแบ่งย่อยได้ตามจำนวนคู่เบสในบริเวณจดจำบนเส้นดีเอ็นเอ เช่น เรียกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดดีเอ็นเอในบริเวณจดจำที่มีเบสอยู่ 4 คู่ 6 คู่ และ 8 คู่ ว่า four base cutter, six base cutter และ eight base cutter ตามลำดับ

ประโยชน์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เนื่องจากดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ พืช สัตว์ และคน จะมีส่วนประกอบพื้นฐานเหมือนกันหมด คือ เป็นกรดนิวคลีอิกที่มีส่วนประกอบเป็น 4 แบบ คือ กัวนีน อะดีนีน ไซโตซีน และไธมีน ดังนั้น ดีเอ็นเอจึงมีลักษณะเป็นแบบเดียวกัน และเอนไซม์ตัดจำเพาะไม่ว่าจะมาจากจุลินทรีย์ชนิดใดก็สามารถใช้ได้กับดีเอ็น-เอที่มาจากต่างที่มาได้เสมอ จึงนำมาใช้ประโยชน์ ดังนี้

3.1 ทำให้เกิดศาสตร์ที่เรียกว่าพันธุวิศวกรรมขึ้น โดยใช้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ และเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการปรับแต่งดีเอ็นเอร่วมด้วย

3.2 นำไปใช้ศึกษาความแตกต่างแปรผันของขนาดความยาวของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อให้เกิดเป็นแบบแผนที่จำเพาะและมีความแตกต่างในระหว่างกลุ่ม หรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เช่น เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ซึ่งแตกต่างจากเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ดังนี้

3.2.1 เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นการศึกษาการผันแปรของดีเอ็นเอในโครโมโซมของกลุ่มสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ โดยการตัดดีเอ็นเอ จากโครโมโซมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดเป็นแบบแผนที่จำเพาะและมีความแตกต่างในระหว่างกลุ่ม หรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ แบบแผนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะเหล่านี้จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

Lu, Perng, Lee, and Wan (2000, pp. 2076-2080) ได้ทำการออกแบบ Universal PCR primers สำหรับขยายยีนส่วน 16S rRNA ของพวก eubacteria ซึ่งได้แก่ *S. aureus, S. epidermidis, S. pyogenes, S. agalactiae, S. pneumoniae, E. faecium, E. faecalis, M. tuberculosis, L. pneumophila, E. coli, K. pneumoniae, S. marcescens, E. cloacae, P. aeruginosa, A baumannii, P. mirabilis, H. influenzae* และ *N. meningitidis* ได้ยีนที่มีขนาดเท่ากันทั้งหมด 996 bp และเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด ตัดทีละครั้งพบว่าได้แถบดีเอ็นเอเหมือนกันในสปีชีส์เดียวกันและต่างกันในแต่ละสปีชีส์

3.2.2 เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นการศึกษาการผันแปรของดีเอ็นเอในโครโมโซมของกลุ่ม ชนิด และเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน แต่มีวิธีการแตกต่างจาก RFLP คือ จะอาศัยการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR ที่มีการเลือก primer เป็นชนิดสุ่ม แบบแผนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกขยายจะนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

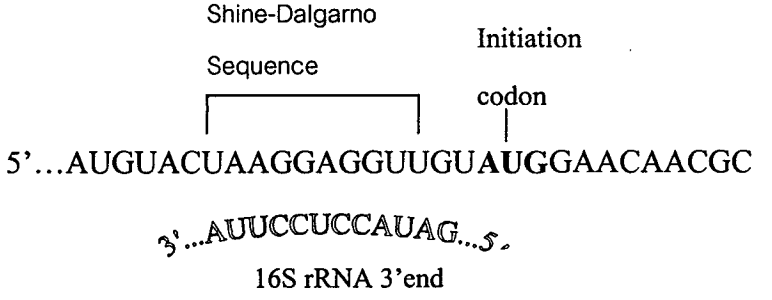
Nakagawa et al. (1998, pp. 15-21) ได้ใช้ประโยชน์จากวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting ในการควบคุมคุณภาพการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียใน Culture Collection โดยศึกษาความแตกต่างของลักษณะโคโลนีในแต่ละสายพันธุ์และแสดงให้เห็นถึงรูปแบบ RAPD ของแต่ละโคโลนีที่ให้ผลแตกต่างกัน และรายงานว่าผลของ RAPD fingerprinting สามารถเป็นตัวกำหนดลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันหรือโคโลนีที่เป็นการปนเปื้อน และวิธีนี้เหมาะสำหรับใช้ในการควบคุมคุณภาพในการดูแลการเก็บรักษาแบคทีเรียได้

4. การหาความคล้ายกันของไรโบโซม (ribosome) ประกอบด้วยอาร์อาร์เอ็นเอและโปรตีน (ribonucleoprotein) เป็นส่วนสำคัญของกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ทำหน้าที่ เป็นที่ยึดเกาะของสายเอ็มอาร์เอ็นเอและทีอาร์เอ็นเอซึ่งมีกรดอะมิโนติดอยู่ และเป็นที่ซึ่งเกิดการสร้างพันธะเพปไทด์ (peptide bond) ระหว่างกรดอะมิโน 2 ตัวที่อยู่ใกล้กัน

1) Sequence at 3' end

16S rRNA 3' end 3'...AUUCCUCCAUAG...5'

2) Example of mRNA leader and 16S rRNA pairing



ภาพ 4 1) ลำดับเบสที่ปลาย 3' ของ 16S rRNA ของ *E. coli*

2) ตัวอย่างการสร้างพันธะไฮโดรเจนของเบสคู่สมระหว่างปลาย 3' ของ 16S rRNA และลำดับเบสที่ปลาย 5' เหนือโคดอน AUG

ที่มา. จาก *จุลชีววิทยาทั่วไป: พันธุกรรมในแบคทีเรีย* (หน้า 91), โดย ชวนพิศ ดีเอกนามกุล และวัฒนาลัย ปานบ้านเกล็ด, 2545, กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยมหิดล.

ไรโบโซมของแบคทีเรียประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunits) 2 หน่วย คือ หน่วยเล็ก (small subunits) และหน่วยใหญ่ (large subunits) ในการเรียกแต่ละหน่วยจะเรียกตามค่า สเวดจ์เบิร์กยูนิต (svedgeberg unit) ที่คำนวณได้จากการปั่นด้วยเครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง ไรโบโซมของพวก prokaryotic และ eukaryotic จะมีความแตกต่างกันดังข้อมูลที่ปรากฏ (ดูตาราง 4)

ตาราง 4

ส่วนประกอบของไรโบโซม

Prokaryotic cell		Eukaryotic cell	
Component	Mass, kDa	Component	Mass, kDa
Small (30S) subunit	850	Small (40S) subunit	1440
16S RNA	500	18S RNA	700
Proteins (21)	350 (total)	Proteins (~30)	740
Large (50S) subunit	1450	Large (60S) subunit	2800
23S RNA	950	28S RNA	1700
5S RNA	40	5.8S RNA	51
		5S RNA	39
Proteins (32-34)	460	Proteins (~46)	1010
Complete (70S) ribosome	2300	Complete (80S) ribosome	4240

ที่มา. จาก *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells* (p. 1672), by D. E. Metzler, 2003, Millbrae, CA: Academic Press.

แบคทีเรียสองชนิดอาจไม่ใกล้ชิดกันมากพอที่จะมีดีเอ็นเอคล้ายกัน แต่ยังมีไรโบโซมที่คล้ายกันได้ ไรโบโซมเป็นโครงสร้างเล็ก ๆ ภายในเซลล์ ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน ประกอบด้วยโปรตีนและไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ (Ribosomal RNA, rRNA) สร้างโดยอาศัยคำสั่งจากดีเอ็นเอ ดังแสดงในภาพ 4 ในแบคทีเรียทุกชนิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA ยีนมีความคงตัวสูง แม้จะมีวิวัฒนาการมานาน แต่มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก แม้ว่าแบคทีเรียสองตัวจะมีความใกล้ชิดกันน้อยและไม่มีดีเอ็นเอที่คล้ายกัน แต่ยังมีลำดับ นิวคลีโอไทด์ใน rRNA cistron คล้ายกัน ความคล้ายกันนี้สามารถใช้เป็นเครื่องวัดความใกล้ชิดกันในระหว่างจีนัส ตระกูล หรืออันดับได้ พบว่า มีการทดลองขยายยีนส่วน 16S rRNA ของแบคทีเรียหลายชนิดเพื่อพิสูจน์ชนิด ดังนี้

Klausegger et al. (1999, pp. 464-466) ได้ทำการออกแบบชุด primers ใช้เป็น broad-range PCR ขยายยีนส่วน 16S rRNA ที่มีความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Gram

positive และ Gram negative เมื่อนำมาทดลองกับแบคทีเรียก่อโรคชนิดต่าง ๆ แล้วพบว่า สามารถขยายยีนของแบคทีเรียก่อโรคได้จำนวนถึง 62 สปีชีส์

Radstrom et al. (1994, pp. 2738-2744) ได้ทำการออกแบบ primers โดยเลือกจากบางส่วนของลำดับเบสในยีนส่วน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรีย *N. meningitidis, H. influenzae, S. pneumoniae, S. agalactiae* และ *S. epidermidis* แล้วนำมาตรวจด้วยวิธี PCR โดยการขยายยีน 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกขยายส่วนของ bacteria amplicon และขั้นตอนที่สอง ขยายส่วน species-specific amplicon พบว่า มีความจำเพาะสูงโดยสามารถใช้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้ 28 สปีชีส์ 133 สายพันธุ์

Wilson, Blitchington, and Greene (1990, pp. 1942-1946) รายงานว่า ได้ทำการขยายยีนของแบคทีเรียส่วน 16S ribosomal DNA โดยเทคนิค PCR ใช้ primers ส่วนต้น 5' และปลาย 3' ที่ ตำแหน่งตรงกลางของยีน 16S ribosomal DNA แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus* sp., *Coxiella* sp., *Rickettsia* sp., *Clostridium* sp., *Neisseria* sp., *Mycobacterium* sp., *Bilophia* sp., *Eubacterium* sp., *Fusobacterium* sp., *Lactobacillus* sp. และเชื้อในตระกูล Enterobacteriacae แต่เดิมผลการทดลองมักไม่แน่นอนเพราะ primers จะจับคู่กันเอง (self complementary) ที่ปลาย 3' แต่ reverse primers จะไม่มีการจับกันเองและสามารถให้ผลผลิตมากพอถ้าใช้ปริมาณดีเอ็นเอของ *E. coli* จำนวน 4 พิโคกรัม จะสามารถให้แถบดีเอ็นเอที่มองเห็นได้หลังการเพิ่มจำนวน วิธีนี้มีประโยชน์ในการเพิ่มจำนวนยีนส่วน 16S ribosomal DNA ของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อนำยีนส่วนที่ได้นี้ไปทดลองทำ sequencing และทำ probing ถือว่าเป็นวิธีที่เป็น broad-range applications รวมทั้งการตรวจหาและแยกชนิดของเชื้อก่อโรคที่ทราบชนิดแล้วและยากต่อการเพาะเชื้อ และเป็นไปได้ว่าวิธีนี้จะเป็นวิธีใหม่สำหรับใช้ในการแยกชนิดเชื้อพวกก่อโรคที่ไม่สามารถเพาะเชื้อได้

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ (materials)

แบคทีเรีย (bacteria)

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่เก็บรักษาไว้โดยวิธีแช่แข็งอุณหภูมิ -70° ซ. เป็นเวลา 2-12 ปี ที่ ศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมจุลินทรีย์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 300 สายพันธุ์ จากเชื้อแบคทีเรีย 15 ชนิด ชนิดละ 20 สายพันธุ์ ประกอบด้วย เชื้อมาตรฐาน (reference strains) จำนวน 18 สายพันธุ์ เชื้อจากต่างประเทศ (import strains) จำนวน 31 สายพันธุ์ และเชื้อที่แยกได้ในประเทศไทย (local strains) จำนวน 251 สายพันธุ์ ดังแสดงในตาราง 5

เอนไซม์ (enzyme)

Hae III (BioLabs® Inc, NEW ENGLAND)

Dde I (BioLabs® Inc, NEW ENGLAND)

Bst BI (BioLabs® Inc, NEW ENGLAND)

Mnl I (BioLabs® Inc, NEW ENGLAND)

Alu I (BioLabs® Inc, NEW ENGLAND)

Taq DNA polymerase

ตาราง 5

จำนวนและชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกสำหรับใช้ในการทดลอง

ชนิดของแบคทีเรีย	เชื้อที่แยกได้ในประเทศไทย	เชื้อจากต่างประเทศ	เชื้อมาตรฐาน	รวม (สายพันธุ์)
Staphylococcus aureus	8	5	7	20
Staphylococcus epidermidis	16	3	1	20
Streptococcus pneumoniae	14	2	4	20
Streptococcus pyogenes	17	3	-	20
Streptococcus agalactiae	8	8	4	20
Enterococcus faecalis	18	2	-	20
Enterococcus faecium	19	1	-	20
Klebsiella pneumoniae	17	1	2	20
Escherichia coli	19	1	-	20
Enterobacter cloacae	18	2	-	20
Serratia marcescens	19	1	-	20
Pseudomonas aeruginosa	20	-	-	20
Acinetobacter baumannii	20	-	-	20
Bukholderia cepacia	20	-	-	20
Haemophilus influenzae	18	2	-	20
Total	251	31	18	300

เครื่องมือ (instrument)

Automatic pipetters

Horizontal gel electrophoresis chamber, Minicell, Mupid, Tokyo Co.Ltd., Japan

Horizontal gel electrophoresis chamber, 9X15 cm., Bio-Rad.

Microcentrifuge, Eppendorf, Germany

CCD Video Camera Module, Video copy processor Mitsubishi, Computer set with Bio® Print program

UV Transilluminator, Upland, CA 91786, USA

Universal Platform Shaker-Rocker BioSan

UV-Visible spectrophotometer

Vortex Genie-2™, Scientific Industries, USA

Water bath, BK-53 yamato, Japan

Colony counter, colony Anderman counter

อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture media)

Blood agar

Chocolate agar

Plate Count agar

น้ำยา (reagent)

1. น้ำยาสำหรับตรวจสอบการแยกชนิดแบคทีเรีย

   Gram's stain

   VP solution A, B

   Kovac's reagent

   Nitrate test solution

   Biochemical test Set

2. แผ่นชุบน้ำยาสำหรับตรวจสอบการแยกชนิดแบคทีเรียกลุ่ม *Streptococcus* sp., *Haemophilus* sp.

   แผ่น X, V factor

   แผ่นยา Optochin

   แผ่นยา Bacitracin

3. น้ำยาสำหรับสกัดแยก chromosomal DNA จากเชื้อแบคทีเรีย

   Lysis buffer : 1% Triton X-100, 10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA

4. น้ำยาสำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction)

   20 ng/μl Template DNA

   1 μM ของแต่ละ Primer

2.5 units ของ *Taq* DNA polymerase

Reaction buffer: 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.001 % gelatin

200 µM แต่ละ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP)

5. น้ำยาสำหรับ agarose gel electrophoresis

Loading buffer: 40% (W/V) sucrose, 0.25% (W/V) bromophenol blue

10 X TBE buffer ต่อ1000 มิลลิลิตร: 108 g Tris-base, 55 g boric acid, 9.3 g EDTA

วิธีดำเนินการวิจัย

การตรวจสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่เก็บรักษา (viability)

ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตใช้วิธี pour plate หรือ spread plate ตามความเหมาะสมกับชนิดของเชื้อ คือ สำหรับเชื้อ *S. aureus, S. epidermidis, E. faecalis, E. faecium, A. baumannii, P. aeruginosa, E. cloacae, K. pneumoniae, E. coli, S. macescens, B. cepacia* ใช้วิธี pour plate โดยนำเชื้อออกจากตู้แช่แข็ง ปล่อยให้ละลายในที่เย็น ดูดสารแขวนลอยของเชื้อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่เตรียมไว้แล้วปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ทำ Ten-fold dilution ตามลำดับจนถึงหลอดที่มีความเจือจางตามที่ต้องการ (ประมาณ 10^{-7}หรือมากกว่า) ใช้ปิเปตปราศจากเชื้อดูดตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อเปล่าที่ปราศจากเชื้อ เทอาหารวุ้นเหลว (plate count agar) ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 45°ซ. ลงในจานเดียวกัน หมุนจานโดยให้หมุนวนไปรอบ ๆ หลาย ๆ ครั้ง อย่างรวดเร็วก่อนที่อาหารเริ่มแข็ง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเพื่อให้วุ้นแข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. ข้ามคืน สำหรับเชื้อ *S. pneumoniae, S. pyogenes, S. agalactiae, H. influenzae* ใช้วิธี spread plate โดยการเตรียมตัวอย่างและเจือจางเหมือนกับวิธี pour plate แต่จะใช้ปิเปตปราศจากเชื้อดูดตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนผิวหน้าของอาหารวุ้นแข็งซึ่งได้แก่ blood agar plate สำหรับเชื้อ *S. pneumoniae, S. pyogenes, S. agalactiae* และ chocolate agar plate สำหรับเชื้อ *H. influenzae* แล้วใช้แท่ง

แก้ว spreader เกลี่ยตัวอย่างให้คลุมทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. ใน candle jar (CO_2) ข้ามคืน

นับโคโลนีที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อโดยใช้เครื่องนับ (colony counter) นับเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อขึ้นอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนีและคำนวณการรอดชีวิตหน่วยเป็น Colony Forming Unit CFU/มิลลิลิตร หรือ viable count/มิลลิลิตร มีสูตรเป็น

$X = N \times 10^{n+1}$ CFU/มิลลิลิตร หรือ $X = N \times 10^{n}$ CFU/0.1 มิลลิลิตร

X = จำนวนแบคทีเรียใน 1 มิลลิลิตร

N = จำนวนแบคทีเรียที่นับได้จากตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร

n = dilution factor ของหลอดที่นับจำนวนแบคทีเรีย

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อแบคทีเรียที่เก็บรักษา (purity)

โดยการขีดเชื้อ (streak method) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแล้วนำไปบ่มในอุณหภูมิเหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิด ดังข้อมูลที่ปรากฏ (ดูตาราง 6) สังเกตการปนเปื้อนโดยใช้สายตา บันทึกผล

การตรวจสอบฟีโนไทป์ของสายพันธุ์แบคทีเรียที่เก็บรักษา

1. การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ (morphology)

1.1 ตรวจลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง (colonial morphology) โดยการเพาะเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เหมาะสม สังเกตลักษณะโคโลนี ที่พบ

1.2 ลักษณะเซลล์จากการย้อมสี (microscopic morphology) จากโคโลนีที่ตรวจพบได้นำมาย้อมสี Gram's stain ตรวจสอบลักษณะเซลล์และการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

2. การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์และคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical test)

2.1 การทดสอบคาตาเลส (catalase test) ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) เขี่ยเชื้อตรงกลางโคโลนี แตะบนสไลด์ที่สะอาด หยด 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ลงบนเชื้อที่อยู่บนสไลด์ ถ้าเกิดฟองก๊าซขึ้นในทันทีหมายถึงให้ผลบวก

ตาราง 6

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง อุณหภูมิ และเวลาบ่มที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิด

แบคทีเรีย	ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ/อุณหภูมิ/เวลาที่ใช้บ่ม
Staphylococcus aureus	blood agar plate/37°C/16-18 ชั่วโมง
Staphylococcus epidermidis	blood agar plate/37°C/16-18 ชั่วโมง
Streptococcus pneumoniae	blood agar plate/37°C+5%CO_2/16-18 ชั่วโมง
Streptococcus pyogenes	blood agar plate/37°C+5%CO_2/16-18 ชั่วโมง
Streptococcus agalactiae	blood agar plate/37°C+5%CO_2/16-18 ชั่วโมง
Enterococcus faecalis	blood agar plate/37°C/16-18 ชั่วโมง
Enterococcus faecium	blood agar plate/37°C/16-18 ชั่วโมง
Serratia marcescens	blood agar plate/37°C/16-18 ชั่วโมง
Klebsiella pneumoniae	blood agar plate/37°C/16-18 ชั่วโมง
Escherichia coli	blood agar plate/37°C/16-18 ชั่วโมง
Enterobacter cloacae	blood agar plate/37°C/16-18 ชั่วโมง
Pseudomonas aeruginosa	blood agar plate/37°C/16-18 ชั่วโมง
Acinetobacter baumannii	blood agar plate/37°C/16-18 ชั่วโมง
Haemophilus influenzae	chocolate agar plate/37°C+5%CO_2/16-18 ชั่วโมง
Bukholderia cepacia	blood agar plate/37°C/16-18 ชั่วโมง

2.2 การทดสอบออกซิเดส (oxidase test) เตรียมสารละลาย 1% tetramethy-p-phenylene diamine dihydrochloride หยดสารละลายลงบนกระดาษกรองปราศจากเชื้อ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อขีดลงบนกระดาษกรองนั้น สังเกตสีของแบคทีเรียที่ขีดลงบนกระดาษกรอง ถ้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือสีม่วง ภายใน 10 วินาทีหมายถึงให้ผลบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีหมายถึงให้ผลลบ ไม่ควรใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ทำด้วยเหล็กหรือนิโครม เพราะอาจให้ผลบวกปลอมได้

2.3 การทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) แบ่งตามกลุ่มของแบคทีเรียแต่ละชนิด ดังนี้

2.3.1 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. faecium* ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ

1 โคโลนี นำมาเพิ่มจำนวนโดยเพาะเลี้ยงบน blood agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จนเชื้อเจริญดี แล้วจึงนำมาทดสอบกับอาหารชนิดต่าง ๆ และเปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้ ดังแสดงในตาราง 7

2.3.2 *S. agalactiae, S. pyogenes, S. pneumoniae* ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี นำมาเพิ่มจำนวนโดยเพาะเลี้ยงบน blood agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. ในบรรยากาศ 5% CO_2 เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จนเชื้อเจริญดี แล้วจึงนำมาทดสอบกับอาหารชนิดต่าง ๆ และเปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้ ดังแสดงในตาราง 8

2.3.3 *E. coli, E. cloacae, S. marcescens, K. pneumoniae* ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี นำมาเพิ่มจำนวนโดยเพาะเลี้ยงใน Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มบนเครื่องเขย่า (shaking) ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง จนเชื้อเจริญดี แล้วจึงนำมาทดสอบกับอาหารชนิดต่าง ๆ และเปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้ ดังแสดงในตาราง 9

2.3.4 *B. cepacia, P. aeruginosa, A. baumannii* ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี นำมาเพิ่มจำนวนโดยเพาะเลี้ยงใน TSB นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า (shaking) ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง จนเชื้อเจริญดี แล้วจึงนำมาทดสอบกับอาหารชนิดต่าง ๆ และเปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้ ดังข้อมูลที่ปรากฏ (ดูตาราง 10)

2.3.5 *H. influenzae* ใช้การทดสอบความต้องการ X, V factor

การตรวจสอบพันธุกรรมของสายพันธุ์แบคทีเรียที่เก็บรักษา (genetic characteristics)

1. การสกัดแยก chromosomal DNA จากเชื้อแบคทีเรีย ทำการแยกโครโมโซมจากแบคทีเรียแต่ละชนิดตามที่ระบุข้างต้น ให้ได้ดีเอ็นเอ ที่มีคุณภาพดีเหมาะสำหรับนำไปใช้ขยายยีนส่วนที่ต้องการ ด้วยวิธี boiling lysis method (Lu et al., 2000, p. 2076) โดยเพาะเชื้อบน enriched media ที่เหมะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิด เขี่ยเชื้อใส่ลงใน microcentrifuge tube ที่มี lysis buffer 1 มิลลิลิตร ให้เชื้อมีจำนวนประมาณ 10^5 CFU ปั่นล้างเซลล์ที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งจากนั้นใส่ lysis buffer ปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำไปต้มใน water bath เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เซลล์แตก ครบเวลานำไปปั่นที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่สำหรับนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต่อไป

ตาราง 7

การทดสอบและปฏิกิริยาที่ได้ของเชื้อ S. aureus, S. epidermidis, E. faecalis, และ E. faecium

การทดสอบ	*S. aureus*	*S. epidermidis*	การทดสอบ	*E. faecalis*	*E. faecium*
oxidase	-	-	motility	-	-
catalase	+	+	mannitol	+[d]	+[d]
staphylocoagulase	+	-	sucrose	+[d]	+[d]
glucose O/F	+/+(-)	+/+(-)	arabinose	-	+
maltose	+	+	esculin	+	+
lactose	+	d	raffinose	-	v
mannose	+	(+)	arginine	+[d]	+
raffinose	-	-	sorbitol	+	v
sucrose	+	+	0.04% tellurite	+	-
xylose	-	-	PYR	+	+
mannitol	+	-			
arabinose	-	-			
trehalose	+	-			
nitrate	+	+			
urease	d	+			
arginine	+	d			
motility	-	-			
6.5% NaCl agar	+	+			

+, 90% or more strains positive; -, 90% or more strains negative; (+), parentheses indicate a delayed reaction; d, 11 to 89% of strains positive; +[d], occasional exceptions occur (< 3% of strains show aberrant reaction); v, variable (11 to 89% of the strains are positive)

ที่มา. จาก *Manual of Clinical Microbiology* (8th ed., pp. 285, 288, 311), by R. P. Murray, J. E. Baron, A. M. Pfaller, C. F. Tenover, and H. R. Yolken, 1995, Washington, DC: ASM Press.

ตาราง 8

การทดสอบและปฏิกิริยาที่ได้ของเชื้อ S. agalactiae, S. pyogenes และS. pneumoniae

การทดสอบ	*S. agalactiae*	การทดสอบ	*S. pyogenes*	การทดสอบ	*S. pneumoniae*
PYR	-	PYR	+	optochin	+
alpha-hemolysis	-	alpha-hemolysis	-	alpha-hemolysis	+
beta-hemolysis	d	beta-hemolysis	+	beta-hemolysis	-
CAMP test	+	CAMP test	-	bile solubility	+
esculin	-	VP	-	bile esculin	-
6.5% NaCl	d				
VP	+				
lactose	d				
mannitol	-				
raffinose	-				
trehalose	+				
arginine	+				

+, 90% or more strains positive; -, 90% or more strains negative; d, 11 to 89% of strains positive

ที่มา. จาก 1. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed., pp. 552-555), by G. J. Holt, R.N. Krieg, H. A. P. Sneath, T. J. Staley, and T. S. Williams, 1994, North Andover, MA: Williams & Wilkins Press.

2. *Manual of Clinical Microbiology* (8th ed., pp. 302-304), by R. P. Murray, J. E. Baron, A. M. Pfaller, C. F. Tenover, and H. R. Yolken, 1995, Washington, DC: ASM Press.

ตาราง 9

การทดสอบและปฏิกิริยาที่ได้ของเชื้อ E. coli, E. cloacae, S. marcescens และ K. pneumoniae

การทดสอบ	*E. cloacae*	*E. coli*	*S. marcescens*	*K. pneumoniae*
oxidase	-	-	-	-
indole	-	+	-	-
motility	+	+	+	-
citrate	+	-	+	+
urease	+	-	[-]	+
VP	+	-	+	+
glucose	+	+	+	+
gas from glucose	+	+	d	+
lactose	+	+	-	+
maltose	+	+	+	+
mannitol	+	+	+	+
xylose	+	+	-	+
rhamnose	+	[+]	-	+
arabinose	+	+	-	+
inositol	[-]	-	[+]	+
adonitol	[-]	-	d	+
sorbitol	+	+	+	+
malonate	[+]	-	-	+
lysine	-	+	+	+
arginine	+	[-]	-	-
ornithine	+	d	+	-
sucrose	+	d	+	+
esculin	d	d	+	+
raffinose	+	d	-	+

ตาราง 9 (ต่อ)

การทดสอบ	*E. cloacae*	*E. coli*	*S. marcescens*	*K. pneumoniae*
salicin	[+]	d	+	+

-, 0-10% positive; [-], 11-25% positive; d, 26-27% positive; [+], 76-89% positive; +, 90-100% positive

ที่มา. จาก *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed., pp. 205, 209, 211, 217), by G. J. Holt et al., 1994, North Andover, MA: Williams & Wilkins Press.

ตาราง 10

การทดสอบและปฏิกิริยาที่ได้ของเชื้อ B. cepacia, P. aeruginosa และ A. baumannii

การทดสอบ	*A. baumannii*	การทดสอบ	*P. aeruginosa*	การทดสอบ	*B. cepacia*
oxidase	0	oxidase	100	oxidase	93
indole	0	indole	0	indole	0
motility	0	motility	96	motility	99
citrate	100	citrate	96	citrate	99
gelatin	0	urease	66	urease	45
glucose	95	gelatin	46	gelatin	74
malonate	98	glucose	98	glucose	100
growth at 44°C	100	lactose	0	lactose	99
growth at 41°C	100	maltose	11	maltose	98
arginine	98	mannitol	68	mannitol	100
ornithine	93	xylose	85	xylose	99
		growth at 42°C	100	growth at 42°C	60
		esculin	0	esculin	65
		nitrate	75	nitrate	37
		lysine	0	lysine	92
		arginine	99	arginine	0

ตาราง 10 (ต่อ)

การทดสอบ	*A. baumannii*	การทดสอบ	*P. aeruginosa*	การทดสอบ	*B. cepacia*
		ornithine	0	ornithine	66
% of strains positive					

ที่มา. จาก 1. *คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป: การวินิจฉัยเชื้อกลุ่ม Non-fermentative Gram-Negative Bacilli* (หน้า 99, 105-106), โดย สุรางค์ เดชศิริเลิศ, 2543, กรุงเทพฯ: กองโรงพยาบาลภูมิภาค.

2. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed., pp. 129, 151), by G. J. Holt et al., 1994, North Andover, MA: Williams & Wilkins Press.

2. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนที่ใช้วิเคราะห์ชนิดเชื้อโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.1 การออกแบบ primer ในการศึกษาครั้งนี้ เลือกใช้ primer ที่สามารถเพิ่มขยายส่วนของยีน 16S rRNA บริเวณที่มีจำนวนและลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะ (conserved region) ในพวก eubacteria แต่ไม่พบในพวก eukaryotes, archaebacteria หรือ mitochondria การออกแบบ primer ทำโดยใช้ข้อมูลยีน 16S rRNA sequence ของเชื้อแบคทีเรียสปีชีส์ต่าง ๆ ตามที่ได้ระบุไว้ข้างต้นได้ primer 2 สาย ดังนี้ (Lu et al., 2000, p. 2076)

U1 (5' -CCAGCAGCCGCGGTAATACG -3')

U2 (5' -ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGACTTC -3')

2.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR โดยนำ chromosomal DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มขยายส่วนของยีน 16S rRNA ที่มีความจำเพาะกับแบคทีเรียที่ศึกษาและปรับสภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองให้เหมาะสม ดังนี้

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

denaturation 94°ซ.	เป็นเวลา	1 นาที
annealing 55°ซ.	เป็นเวลา	1 นาที
extension 72°ซ.	เป็นเวลา	2 นาที

ผสมสารต่อไปนี้ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรสุดท้าย 50 µl

dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ของแต่ละชนิด ความเข้มข้น 200 µM

$MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 mM

Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 0.25 U

primer ความเข้มข้นเส้นละ 10 µM

ดีเอ็นเอแม่แบบความเข้มข้น 20 ng/µl

1X PCR buffer

2.3 การตรวจดู PCR product ด้วยวิธี gel electrophoresis ใช้ 1% agarose gel ละลายใน 0.5X TBE buffer (4.5 mM Tris boric acid, 1 mM EDTA) ทำให้ละลายดีด้วยอ่างน้ำเดือดหรือเตา นำออกตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 60-70°ซ. เทลงในถาด (tray) ที่วางหวี (comb) ไว้แล้ว กะความหนาประมาณ 4 มิลลิเมตร รอให้วุ้น (gel) แข็ง (~20-30 นาที) ดึงหวีออก นำออกวางใน chamber ที่มี 0.5X TBE buffer ท่วมแผ่นวุ้น หยอดดีเอ็นเอตัวอย่าง และ marker (100 bp DNA Ladder) ลงหลุมโดยผสม loading dye ก่อนในอัตราส่วน 1 : 6 นำ chamber ต่อเข้ากับ power supply แล้วเปิดเครื่องให้ทำงานด้วยไฟฟ้า 100 Volt จนกระทั่งเห็น loading dye เกือบถึงปลายแผ่นวุ้น (ใช้เวลาประมาณ 1 ชม.) ดึงปลั๊กออก นำแผ่นวุ้นออกมาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 µg ต่อมิลลิลิตร 10 นาที ล้างแผ่นวุ้นในน้ำเขย่าประมาณ 15-30 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator (λ = 312 nm) ถ่ายรูปเก็บไว้

3. การวิเคราะห์ส่วนของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยวิธี restriction endonuclease

3.1 การตัด PCR product ของแบคทีเรียแต่ละชนิดออกเป็นชิ้นส่วนย่อยโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมด 5 ชนิด โดยใช้เอนไซม์ 5 Unit ปริมาตร 0.5 µl ผสมกับ

PCR product 10 µl และ 10X buffer 2 µl เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ปริมาตรครบ 20 µl

3.2 ทำการวิเคราะห์ restriction product ที่ได้จากการตัด PCR product ออกเป็นชิ้นส่วนย่อยโดยใช้ restriction endonuclease แล้ว โดยนำมาแยกโดยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 3% Nusieve 3 ส่วนต่อ agarose gel 1 ส่วน จะได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันหลังการย้อมด้วย ethidium bromide และส่องดูด้วยแสง UV ที่มีความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร บนเครื่อง UV transilluminator เป็นรูปแบบของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อสปีชีส์ต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่ทำการศึกษา

ตาราง 11

วิธีใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ตัดกลุ่ม PCR product ของแบคทีเรียแต่ละชนิด

PCR product ของ	เอนไซม์ ตัดครั้งที่ 1	เอนไซม์ ตัดครั้งที่ 2	เอนไซม์ ตัดครั้งที่ 3
E. coli	*Hae* III	*Dde* I	*Bst* BI
E. cloacae	*Hae* III	*Dde* I	*Bst* BI
S. marcescens	Hae III	Dde I	Bst BI
K. pneumoniae	Hae III	Dde I	Bst BI
บ่มที่อุณหภูมิ/เวลาที่ใช้	37oซ. 2 ชม.	37 °ซ. 2 ชม.	65 °ซ. 2 ชม.
E. faecalis	*Hae* III	*Alu* I	
E. faecium	*Hae* III	*Alu* I	
บ่มที่อุณหภูมิ/เวลาที่ใช้	37 °ซ. 2 ชม.	37°ซ. 2 ชม.	
S. aureus	*Hae* III	*Mnl* I	
S. epidermidis	*Hae* III	*Mnl* I	
บ่มที่อุณหภูมิ/เวลาที่ใช้	37 °ซ. 2 ชม.	37°ซ. 2 ชม.	
B. cepacia	*Hae* III		
P. aeruginosa	*Hae* III		
A. baumannii	Hae III		
H. influenzae	Hae III		
บ่มที่อุณหภูมิ/เวลาที่ใช้	37°ซ. 2 ชม.		

สรุปขั้นตอนการทดลอง ดังแสดงในภาพ 5

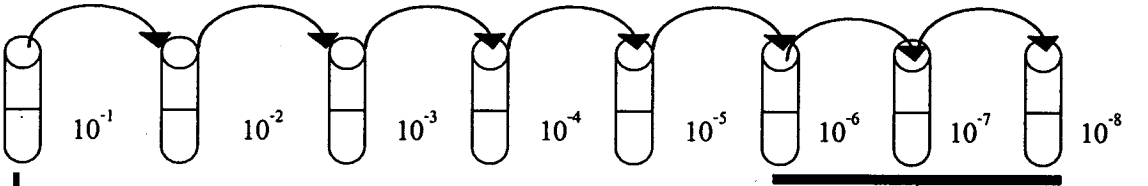
แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตู้แช่แข็ง

↓

ละลายในที่เย็น

↓ หาค่าความมีชีวิต (viability)

1. ดูดสารละลายเชื้อ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 4.5 มิลลิลิตร
2. ทำการเจือจางทีละ 10 เท่า (ten fold dilution)



เพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ blood agar เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity) และตรวจสอบความคงคุณลักษณะด้าน phenotype และ genotype (DNA analysis ในส่วนของ 16S rRNA gene) ดังนี้

1. Colonial morphology
2. Microscopic morphology
3. Biochemical test
4. Universal PCR
5. Digest with restriction endonuclease

ทำ pour plate หรือ spread plate โดยทำซ้ำ dilution ละ 2 plate นับจำนวนโคโลนี 30-300 โคโลนี

ภาพ 5 ขั้นตอนการทดลอง

บทที่ 4
ผลการดำเนินการวิจัย

การหาค่าความมีชีวิตของแบคทีเรียที่เหลือ (viability)

ผลการหาค่าความมีชีวิตที่เหลือของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 15 ชนิด ชนิดละ 20 สายพันธุ์ หลังเก็บรักษาไว้แล้วโดยวิธีแช่แข็งอุณหภูมิ -70°ซ. ใน ช่วงเวลา 2-12 ปี ณ ศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างจำนวน 8 ชนิด มีค่าความมีชีวิตอยู่ในช่วง 10^8-10^{11} CFU/มิลลิลิตร ได้แก่ *K. pneumoniae, E. coli, E. cloacae, S. marcescens, S. aureus, E. faecalis, E. faecium* และ *S. epidermidis* จำนวน 5 ชนิด มีค่าความมีชีวิตอยู่ในช่วง 10^7-10^{11} CFU/มิลลิลิตร ได้แก่ *P. aeruginosa, A. baumannii, B. cepacia, S. agalactiae* และ *S. pyogenes* ส่วน *H. influenzae* และ *S. pneumoniae* มีค่าความมีชีวิตอยู่ในช่วง 10^4 -10^8 CFU/มิลลิลิตร และ 10^5-10^7 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 12 และ13 เมื่อนำค่า $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร จากตาราง 14 เขียนในรูปแบบกราฟจุดจะเห็นได้ว่า ค่าความมีชีวิตของเชื้อแต่ละชนิดและในแต่ละปีนั้น อยู่ในกลุ่มเดียวกันยกเว้นแนวกราฟของเชื้อ *S. pneumoniae* ที่ส่วนใหญ่จะมีค่าความมีชีวิตน้อยกว่า 8 $\log_{10}$ CFU/มิลลิลิตร ดังแสดงในภาพ 6

ตาราง 12

ช่วงค่าความมีชีวิตของแบคทีเรียหลังจัดเก็บไว้แล้วช่วงเวลา 2-12 ปี

ชื่อเชื้อ	ช่วงของค่าความมีชีวิต	
	CFU/มิลลิลิตร	$\log_{10}$ CFU/มิลลิลิตร
Klebsiella pneumoniae	10^8 -10^{11}	9.02-10.94
Escherichia coli	10^8 -10^{11}	8.24-11.24
Enterobacter cloacae	10^8 -10^{11}	9.40-10.70
Serratia marcescens	10^8 -10^{11}	9.14-11.12
Staphylococcus aureus	10^8 -10^{11}	8.08-11.28
Enterococcus faecalis	10^8 -10^{11}	8.52-11.20
Enterococcus faecium	10^8 -10^{10}	8.72-9.82
Staphylococcus epidermidis	10^8 -10^9	8.66-9.70
Pseudomonas aeruginosa	10^7 -10^{11}	7.30-10.69
Acinetobacter baumannii	10^7 -10^{11}	8.62-10.79
Burkholderia cepacia	10^7 -10^{11}	7.81-11.37
Streptococcus agalactiae	10^7 -10^{10}	7.76-9.94
Streptococcus pyogenes	10^7 -10^9	6.26-9.16
Haemophilus influenzae	10^4 -10^8	5.15-8.26
Streptococcus pneumoniae	10^5 -10^7	5.36-7.15

ตาราง 13

ค่าความมีชีวิตของแบคทีเรียแต่ละชนิดหลังการจัดเก็บด้วยวิธีแช่แข็งอุณหภูมิ -70 °ซ. ในช่วงเวลา 2-12 ปี

ชนิดของแบคทีเรีย	จำนวนปีที่จัดเก็บและค่าความมีชีวิตของแบคทีเรียแต่ละชนิดหลังการจัดเก็บด้วยวิธีการแช่แข็งอุณหภูมิ -70°ซ.											
	2 ปี	3 ปี	4 ปี	5 ปี	6 ปี	7 ปี	8 ปี	9 ปี	10 ปี	11 ปี	12 ปี	ค่าเฉลี่ย
S. aureus	$1.81x10^{11}$	$7.45x10^{10}$	$7.0x10^{10}$	$2.945x10^{10}$	$8.3x10^{10}$	$1.54x10^{10}$	$5.9x10^{9}$	$5.6x10^{9}$	$2.10x10^{9}$	-	$1.215x10^{8}$	10^{8}-10^{11}
	$2.04x10^{11}$	$2.01x10^{11}$	$1.64x10^{10}$	$1.79x10^{11}$	$5.75x10^{10}$	$4.85x10^{9}$	$1.875x10^{10}$	$1.08x10^{10}$				
					$4.0x10^{10}$			$1.715x10^{10}$				
จำนวนตัวอย่าง (สายพันธุ์)	2	2	2	2	3	2	2	3	1	0	1	20
S. epidermidis	$5.1x10^{9}$	$1.67x10^{9}$	$4.15x10^{8}$	$1.7x10^{9}$	$5.05x10^{9}$	$8.8x10^{8}$	$3.2x10^{8}$	$4.65x10^{9}$	-	-	$3.1x10^{9}$	10^{8}-10^{9}
	$5.1x10^{9}$	$1.685x10^{9}$	$5.0x10^{8}$	$6.25x10^{9}$	$8.3x10^{8}$	$6.05x10^{8}$	$5.75x10^{8}$	$2.35x10^{9}$			$5.15x10^{9}$	
							$3.15x10^{8}$	$2.455x10^{9}$				
จำนวนตัวอย่าง (สายพันธุ์)	2	2	2	2	2	2	3	3	0	0	2	20
E. faecalis	$2.645x10^{11}$	$6.25x10^{9}$	$4.6x10^{8}$	$1.195x10^{9}$	$6.9x10^{8}$	$8.35x10^{8}$	$8.85x10^{8}$	$1.075x10^{9}$	$8.1x10^{10}$	-	$3.1x10^{8}$	10^{8}-10^{11}
	$9.4x10^{10}$	$7.0x10^{9}$	$1.51x10^{9}$	$3.1x10^{9}$	$3.4x10^{9}$		$9.0x10^{9}$	$2.49x10^{9}$	1.785x1		$3.55x10^{8}$	
		$8.85x10^{9}$							0^{9}			
จำนวนตัวอย่าง (สายพันธุ์)	2	3	2	2	2	1	2	2	2	0	2	20
E. faecium	$1.195x10^{10}$	$3.5x10^{9}$	$6.1x10^{8}$	$3.1x10^{9}$	$7.65x10^{8}$	$1.06x10^{9}$	$3.1x10^{8}$	$5.5x10^{8}$	-	-	-	10^{8}-10^{10}
	$1.395x10^{10}$	$3.3x10^{9}$	$1.305x10^{10}$	$1.735x10^{9}$	$8.95x10^{8}$	$9.3x10^{8}$	$9.0x10^{8}$					
	$1.75x10^{9}$	$2.295x10^{9}$	$2.79x10^{9}$		$1.33x10^{9}$							
		$1.03x10^{9}$										
จำนวนตัวอย่าง (สายพันธุ์)	3	4	3	2	3	2	2	1	0	0	0	20

ตาราง 13 (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรีย	จำนวนปีที่จัดเก็บและค่าความมีชีวิตของแบคทีเรียแต่ละชนิดหลังการจัดเก็บด้วยวิธีการแช่แข็งอุณหภูมิ -70°ซ.											
	2 ปี	3 ปี	4 ปี	5 ปี	6 ปี	7 ปี	8 ปี	9 ปี	10 ปี	11 ปี	12 ปี	ค่าเฉลี่ย
E. coli	$1.735x10^{11}$	$1.645x10^{10}$	$4.25x10^{9}$	$1.525x10^{9}$	$5.8x10^{9}$	$9.5x10^{8}$	$1.825x10^{10}$	$4.45x10^{8}$	$1.82x10^{9}$	$1.75x10^{8}$	$6.75x10^{8}$	10^{8}-10^{11}
		$1.29x10^{10}$	$2.395x10^{9}$	$3.9x10^{9}$	$6.05x10^{9}$	$1.56x10^{10}$			$8.35x10^{9}$		$8.9x10^{8}$	
					$5.45x10^{9}$				$8.5x10^{8}$			
จำนวนตัวอย่าง (สายพันธุ์)	1	2	2	2	3	2	1	1	3	1	2	20
S. marcescens	$1.260x10^{11}$	$1.91x10^{10}$	$9.05x10^{9}$	$1.65x10^{10}$	$9.3x10^{9}$	$1.375x10^{9}$	-	-	-	-	-	10^{8}-10^{11}
	$1.345x10^{11}$	$7.9x10^{10}$	$5.05x10^{9}$	$7.95x10^{9}$	$5.0x10^{8}$							
	$9.95x10^{10}$	$1.155x10^{11}$	$9.05x10^{10}$	$1.8x10^{10}$								
	$1.815x10^{11}$	$1.5x10^{11}$	$2.51x10^{10}$	$1.375x10^{10}$								
				$1.175x10^{10}$								
จำนวนตัวอย่าง (สายพันธุ์)	4	4	4	5	2	1	0	0	0	0	0	20
E. cloacae	$2.4x10^{10}$	$1.305x10^{11}$	$2.125x10^{9}$	$1.06x10^{10}$	$1.76x10^{10}$	$6.05x10^{9}$	$2.59x10^{8}$	-	-	-	-	10^{8}-10^{11}
	$1.945x10^{10}$	$1.57x10^{10}$	$4.9x10^{9}$	$1.75x10^{10}$	$2.04x10^{10}$		$8.45x10^{8}$					
	$2.69x10^{11}$		$1.83x10^{9}$	$1.195x10^{10}$			$3.3x10^{8}$					
			$2.015x10^{9}$	$1.90x10^{11}$								
				$4.0x10^{9}$								
จำนวนตัวอย่าง (สายพันธุ์)	3	2	4	5	2	1	3	0	0	0	0	20

ตาราง 13 (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรีย	จำนวนปีที่จัดเก็บและค่าความมีชีวิตของแบคทีเรียแต่ละชนิดหลังการจัดเก็บด้วยวิธีการแช่แข็งอุณหภูมิ -70°ซ.											
	2 ปี	3 ปี	4 ปี	5 ปี	6 ปี	7 ปี	8 ปี	9 ปี	10 ปี	11 ปี	12 ปี	ค่าเฉลี่ย
K. pneumoniae	1.9×10^{10}	2.41×10^{10}	4.4×10^{9}	6.9×10^{9}	1.495×10^{9}	1.835×10^{8}	-	1.79×10^{9}	-	-	-	10^{8}-10^{11}
	1.595×10^{11}	1.27×10^{10}	8.85×10^{8}	9.85×10^{9}	9.5×10^{10}	4.15×10^{9}						
	2.14×10^{11}	1.765×10^{10}	1.055×10^{9}	1.275×10^{10}		3.2×10^{9}						
				8.05×10^{9}		8.45×10^{10}						
จำนวนตัวอย่าง (สายพันธุ์)	3	3	3	4	2	4	0	1	0	0	0	20
จำนวนตัวอย่าง (สายพันธุ์)	0	2	3	2	0	0	2	2	2	2	5	20
B. cepacia	1.145×10^{12}	2.975×10^{11}	2.10×10^{8}	-	-	-	2.045×10^{10}	2.48×10^{10}	8.0×10^{7}	6.5×10^{7}	1.95×10^{8}	10^{7}-10^{11}
	1.36×10^{10}	1.41×10^{11}	9.6×10^{10}				1.285×10^{10}	3.2×10^{7}	6.75×10^{8}		4.95×10^{8}	
	2.37×10^{10}	3.25×10^{10}						5.35×10^{8}				
	8.9×10^{11}							3.75×10^{9}				
จำนวนตัวอย่าง (สายพันธุ์)	4	3	2	0	0	0	2	4	2	1	2	20
P. aeruginosa	5.05×10^{10}	3.95×10^{8}	1.12×10^{9}	5.6×10^{9}	-	4.95×10^{10}	1.16×10^{11}	1.21×10^{5}	1.21×10^{8}	7.2×10^{8}	9.2×10^{7}	10^{7}-10^{11}
		1.63×10^{11}						5.2×10^{8}	3.25×10^{8}	2.075×10^{6}	1.01×10^{7}	
								3.0×10^{8}	1.1×10^{7}	3.15×10^{8}	8.4×10^{8}	
										3.3×10^{8}		
จำนวนตัวอย่าง (สายพันธุ์)	1	2	1	1	0	1	1	3	3	4	3	20

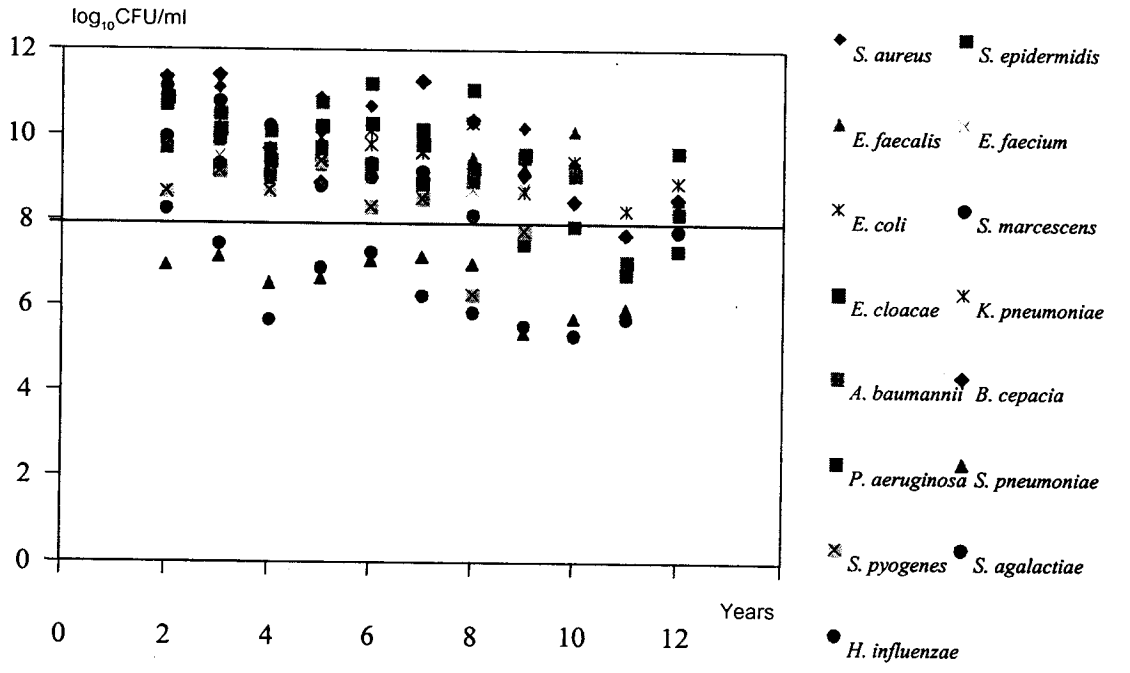
ตาราง 13 (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรีย	จำนวนปีที่จัดเก็บและค่าความมีชีวิตของแบคทีเรียแต่ละชนิดหลังการจัดเก็บด้วยวิธีการแช่แข็งอุณหภูมิ -70°ซ.											
	2 ปี	3 ปี	4 ปี	5 ปี	6 ปี	7 ปี	8 ปี	9 ปี	10 ปี	11 ปี	12 ปี	ค่าเฉลี่ย
S. pneumoniae	$1.11x10^{7}$	$1.125x10^{7}$	$6.1x10^{6}$	$3.5x10^{6}$	$8.5x10^{6}$	$1.4x10^{7}$	$2.1x10^{7}$	$1.71x10^{5}$	$6.55x10^{5}$	$8.55x10^{5}$	-	10^{5}-10^{7}
	$6.4x10^{6}$	$1.7x10^{7}$	$2.16x10^{7}$	$6.7x10^{7}$	$1.515x10^{7}$		$4.0x10^{6}$	$3.05x10^{5}$	$3.75x10^{5}$			
			$1.2x10^{7}$	$4.0x10^{6}$								
จำนวนตัวอย่าง (สายพันธุ์)	2	2	3	3	2	1	2	2	2	1	0	20
S. pyogenes	$1.145x10^{9}$	$6.05x10^{9}$	$6.6x10^{8}$	$2.415x10^{9}$	$2.06x10^{8}$	$3.4x10^{8}$	$1.8x10^{8}$	$3.1x10^{8}$	-	-	-	10^{7}-10^{9}
	$1.8x10^{8}$	$7.6x10^{8}$	$3.6x10^{8}$	$2.165x10^{9}$				$1.03x10^{7}$				
	$4.25x10^{8}$	$6.65x10^{8}$	$1.735x10^{8}$									
		$1.205x10^{9}$	$1.27x10^{9}$									
		$1.57x10^{9}$	$5.0x10^{8}$									
จำนวนตัวอย่าง (สายพันธุ์)	3	5	5	2	0	1	1	2	0	0	0	20
S. agalactiae	$9.6x10^{9}$	$2.095x10^{9}$	$8.5x10^{8}$	$1.48x10^{9}$	$8.15x10^{8}$	$9.25x10^{8}$	$3.95x10^{8}$	-	-	-	$1.62x10^{8}$	10^{7}-10^{10}
	$7.95x10^{9}$		$1.8x10^{9}$	$2.66x10^{8}$	$1.21x10^{9}$	$4.8x10^{8}$	$4.7x10^{7}$				$1.99x10^{7}$	
			$1.175x10^{10}$	$8.45x10^{8}$	$9.5x10^{8}$	$1.86x10^{9}$						
						$8.15x10^{8}$						
จำนวนตัวอย่าง (สายพันธุ์)	2	1	3	3	3	4	2	0	0	0	2	20
H. influenzae	$1.75x10^{8}$	$7.0x10^{7}$	$1.785x10^{6}$	$1.215x10^{7}$	$2.4x10^{7}$	$6.3x10^{4}$	$1.05x10^{7}$	$1.185x10^{5}$	$2.585x10^{5}$	$4.85x10^{6}$	-	10^{4}-10^{8}
	$1.98x10^{8}$	$1.065x10^{7}$	$1.15x10^{5}$	$4.5x10^{6}$	$1.535x10^{7}$	$1.19x10^{7}$	$2.085x10^{6}$	$9.65x10^{5}$	$8.05x10^{4}$	$1.39x10^{5}$		
จำนวนตัวอย่าง (สายพันธุ์)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	20

ตาราง 14

ค่า log_{10}CFU/มิลลิลิตร ความมีชีวิตของแบคทีเรียแต่ละชนิดหลังการจัดเก็บด้วยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°ซ. ในช่วงเวลา 2-12 ปี

ชื่อเชื้อ/จำนวนปีที่จัดเก็บ	2 ปี	3 ปี	4 ปี	5 ปี	6 ปี	7 ปี	8 ปี	9 ปี	10 ปี	11 ปี	12 ปี	ค่าเฉลี่ย log_{10}CFU/ml
S. aureus	11.283	11.087	10.529	10.860	10.760	9.936	10.021	10.005	9.322	-	8.084	8.084-11.283
S. epidermidis	9.707	9.224	8.658	9.512	9.311	8.862	8.587	9.476	-	-	9.601	8.658-9.707
E. faecalis	11.197	9.862	8.920	9.284	9.184	8.921	9.450	9.213	10.079	-	8.520	8.520-11.197
E. faecium	9.821	9.358	9.448	9.365	8.985	8.996	8.722	8.740	-	-	-	8.722-9.821
E. coli	11.239	9.163	9.503	9.387	9.760	9.585	10.261	8.648	9.370	8.243	8.889	8.243-11.239
S. marcescens	11.120	10.854	10.253	10.187	9.333	9.138	-	-	-	-	-	9.138-11.120
E. cloacae	10.699	10.655	9.395	10.245	10.277	9.781	8.619	-	-	-	-	8.619-10.699
K. pneumoniae	10.936	10.243	9.024	9.960	10.075	9.578	-	9.252	-	-	-	9.024-10.936
A. baumannii	-	10.513	10.115	10.794	-	-	9.233	9.573	9.074	7.745	8.622	8.622-10.794
B. cepacia	11.128	11.377	9.652	-	-	-	10.210	9.062	8.366	7.813	8.493	7.813-11.377
P. aeruginosa	10.703	9.904	9.049	9.748	-	10.694	11.064	7.425	7.879	8.047	7.963	7.425-10.703
S. pneumoniae	6.925	7.141	7.066	6.990	7.054	7.146	6.962	5.359	5.695	5.929	-	5.359-7.146
S. pyogenes	8.648	9.153	8.683	9.359	8.314	8.531	8.255	7.752	-	-	-	7.752-9.153
S. agalactiae	9.941	9.321	9.418	8.840	8.991	8.957	8.135	-	-	-	7.755	7.755-9.941
H. influenzae	8.269	7.436	5.657	6.869	7.283	5.937	6.670	5.530	5.159	5.914	-	5.159-8.269



ภาพ 6 แนวโน้มความมีชีวิตของแบคทีเรียแต่ละชนิดหลังจัดเก็บด้วยวิธีแช่แข็งอุณหภูมิ -70°ซ. ในช่วงเวลา 2-12 ปี

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity)

ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยใช้สายตาสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 15 ชนิด ชนิดละ 20 สายพันธุ์ หลังเก็บรักษาไว้แล้วด้วยวิธีแช่แข็งอุณหภูมิ -70°ซ. พบว่า เชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์มีความบริสุทธิ์เนื่องจากมีลักษณะโคโลนีเฉพาะลักษณะเดียวของแต่ละสายพันธุ์ ดังแสดงในภาพ 7

การตรวจสอบความคงคุณลักษณะด้านฟีโนไทป์

1. คุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา ผลการตรวจสอบลักษณะส่วนของสัณฐานวิทยา พบว่า เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมีลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง (colonial morphology) และลักษณะเซลล์จากการย้อมสี (microscopic morphology) เป็นดังนี้

1.1 *Staphylococcus aureus* มีลักษณะโคโลนี บน blood agar กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่น ผิวเรียบเป็นมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มม. และลักษณะเซลล์จากการย้อมสี ติดสีแกรมบวก รูปกลม (cocci) เรียงตัวเป็นกลุ่มทั้ง 20 สายพันธุ์ ภาพ 7 ก

1.2 *Staphylococcus epidermidis* มีลักษณะโคโลนีบน blood agar กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่น ผิวเรียบเป็นมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มม. บน blood agar และลักษณะเซลล์จากการย้อมสี ติดสีแกรมบวก รูปกลม (cocci) เรียงตัวเป็นกลุ่ม ทั้ง 20 สายพันธุ์ ภาพ 7 ข

1.3 *Streptococcus pyogenes* มีลักษณะโคโลนีบน blood agar กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส ผิวเรียบเป็นมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1 มม. ให้ β-hemolysis และลักษณะเซลล์จากการย้อมสี ติดสีแกรมบวก รูปกลม (cocci) และทดสอบ PYR test ให้ผลบวก ทั้ง 20 สายพันธุ์ ภาพ 7 ค

1.4 *Streptococcus pneumoniae* มีลักษณะโคโลนีบน blood agar เป็นจุดเล็ก กลม นูนเล็กน้อย ขอบเรียบ สีขาวใสออกเขียว ผิวเรียบไม่เป็นมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1-1 มม. ให้ α-hemolysis และลักษณะเซลล์จากการย้อมสี ติดสีแกรมบวก รูปกลม (cocci) เรียงตัวแบบ diplococci ทั้ง 20 สายพันธุ์ ภาพ 7 ง

1.5 *Haemophilus influenzae* มีลักษณะโคโลนีบน chaocolate agar กลม นูนเล็กน้อย ขอบเรียบ สีขาวขุ่น ผิวเรียบเป็นมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1 มม. และลักษณะเซลล์จากการย้อมสี ติดสีแกรมลบ รูปแท่ง (rod) ทั้ง 20 สายพันธุ์ ภาพ 7 จ

1.6 *Streptococcus agalactiae* มีลักษณะโคโลนีบน blood agar กลม ทั้งนูนเล็กน้อยจนถึงโค้งนูน ขอบเรียบและไม่เรียบ สีขาวขุ่นและใส ผิวเรียบเป็นมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มม. บางสายพันธุ์ให้ β-hemolysis และลักษณะเซลล์จากการย้อมสี ติดสีแกรมบวก รูปกลม (cocci) ทั้ง 20 สายพันธุ์ ภาพ 7 ฉ

1.7 *Enterococcus faecium* มีลักษณะโคโลนีบน blood agar กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่นและใส ผิวเรียบเป็นมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มม. บางสายพันธุ์ให้ β-hemolysis และลักษณะเซลล์จากการย้อมสี ติดสีแกรมบวก รูปกลม (cocci) ทั้ง 20 สายพันธุ์ ภาพ 7 ช

1.8 *Enterococcus faecalis* มีลักษณะโคโลนีบน blood agar กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่นและใส ผิวเรียบเป็นมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มม. บางสายพันธุ์ให้ β-hemolysis และลักษณะเซลล์จากการย้อมสี ติดสีแกรมบวก รูปกลม (cocci) ทั้ง 20 สายพันธุ์ ภาพ 7 ซ

1.9 *Escherichia coli* มีลักษณะโคโลนีบน blood agar กลม ทั้งนูนเล็กน้อย จนถึงโค้งนูน ขอบเรียบและไม่เรียบ สีขาวขุ่นและใส ผิวเรียบเป็นมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-3 มม. บางสายพันธุ์ให้ β-hemolysis และลักษณะเซลล์จากการย้อมสี ติดสีแกรมลบ รูปแท่ง (rod) ทั้ง 20 สายพันธุ์ ภาพ 7 ฌ

1.10 *Enterobacter cloacae* มีลักษณะโคโลนีบน blood agar กลม ทั้งโค้งนูนและนูนสูง ขอบเรียบและไม่เรียบ สีขาวขุ่นและใส ผิวเรียบเป็นมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-3 มม. และลักษณะเซลล์จากการย้อมสี ติดสีแกรมลบ รูปแท่ง (rod) ทั้ง 20 สายพันธุ์ ภาพ 7 ญ

1.11 *Serratia marcescens* มีลักษณะโคโลนีบน blood agar กลม ทั้งโค้งนูนและนูนสูง ขอบเรียบและไม่เรียบ สีขาวขุ่น ใส และสีแดง ผิวเรียบเป็นมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-3 มม. และลักษณะเซลล์จากการย้อมสี ติดสีแกรมลบ รูปแท่ง (rod) ทั้ง 20 สายพันธุ์ ภาพ 7 ฎ

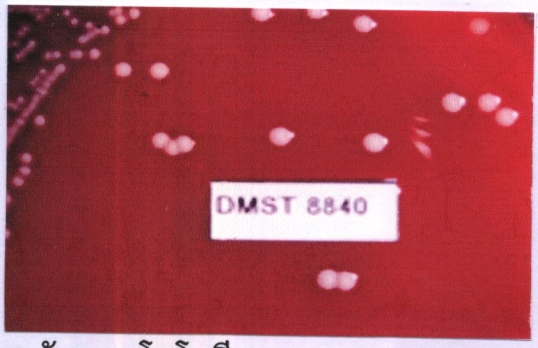
1.12 *Klebsiella pneumoniae* มีลักษณะโคโลนีบน blood agar กลม ทั้งโค้งนูนและนูนสูง ขอบเรียบและไม่เรียบสีขาวขุ่น และใส ผิวเรียบเป็นมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-3 มม. และลักษณะเซลล์จากการย้อมสี ติดสีแกรมลบ รูปแท่ง (rod) ทั้ง 20 สายพันธุ์ ภาพ 7 ฏ

1.13 *Acinetobacter baumannii* มีลักษณะโคโลนีบน blood agar กลม ทั้งโค้งนูนและนูนสูง ขอบเรียบและไม่เรียบ สีขาวขุ่น และใส ผิวเรียบเป็นมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-2 มม. และลักษณะเซลล์จากการย้อมสี ติดสีแกรมลบ รูปแท่ง (rod) ทั้ง 20 สายพันธุ์ ภาพ 7 ฐ

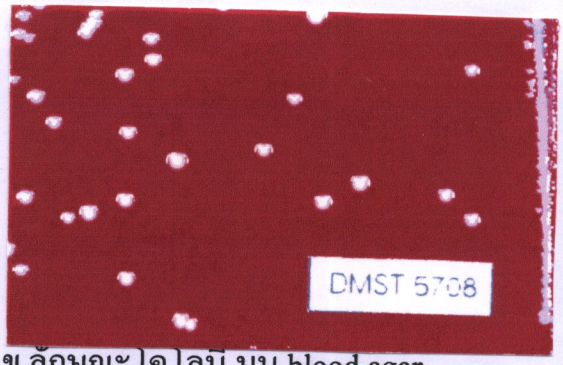
1.14 *Pseudomonas aeruginosa* มีลักษณะโคโลนีบน blood agar กลม ทั้งโค้งนูนและนูนสูง ขอบเรียบและไม่เรียบ สีขาวขุ่น และใส ผิวเรียบเป็นมัน ขนาดเส้นผ่า-

ศูนย์กลาง 1-3 มม. และลักษณะเซลล์จากการย้อมสี ติดสีแกรมลบ รูปแท่ง (rod) ทั้ง 20 สายพันธุ์ ภาพ 7 ฑ

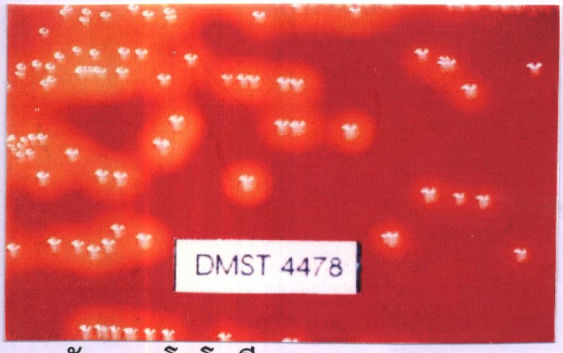
1.15 *Bukholderia cepacia* มีลักษณะโคโลนีบน blood agar กลม โค้งนูน ขอบเรียบและไม่เรียบ สีขาวขุ่น และใส ผิวเรียบเป็นมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-2 มม. และลักษณะเซลล์จากการย้อมสี ติดสีแกรมลบ รูปแท่ง (rod) ทั้ง 20 สายพันธุ์ ภาพ 7 ฒ



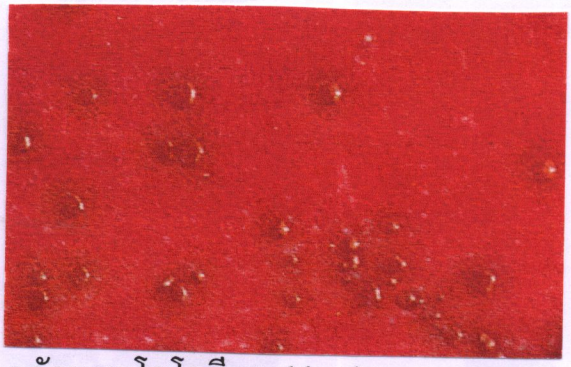
ก ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *S. aureus*



ข ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *S. epidermidis*

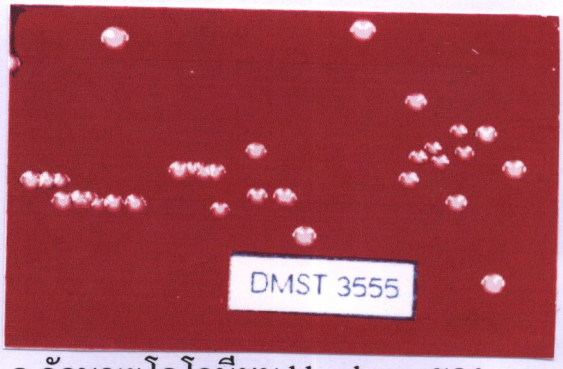


ค ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *S. pyogenes*

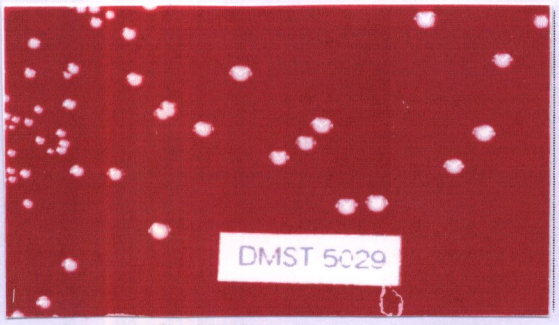


ง ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *S. pneumoniae*

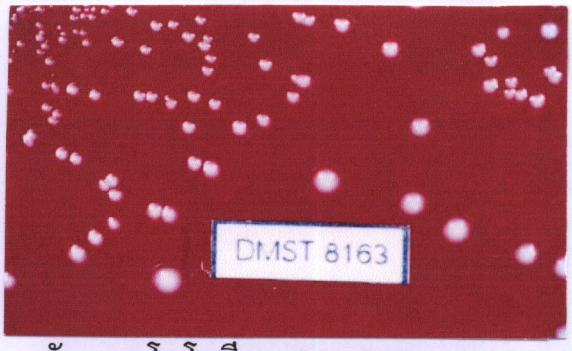
จ ลักษณะโคโลนีบน chaocalate agar ของ *H. influenzae*



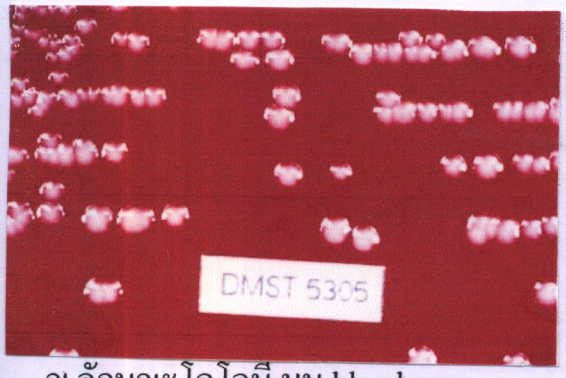
ฉ ลักษณะโคโลนีบน blood agar ของ *S. agalactiae*



ช ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *E. faecium*

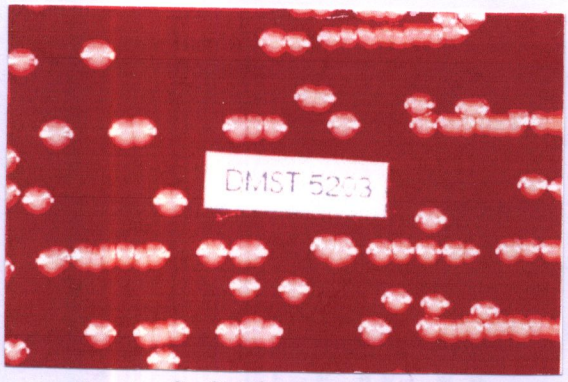


ซ ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *E. faecalis*



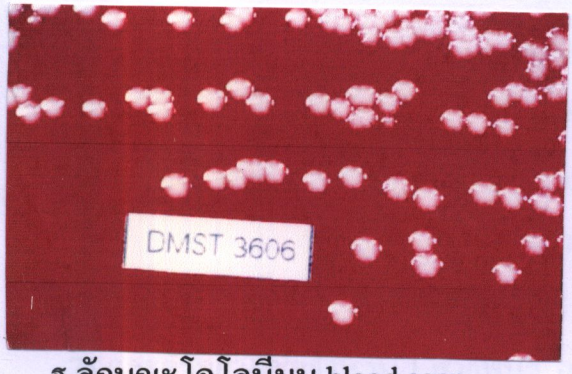
ฌ ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *E. coli*

ญ ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *E. cloacae*

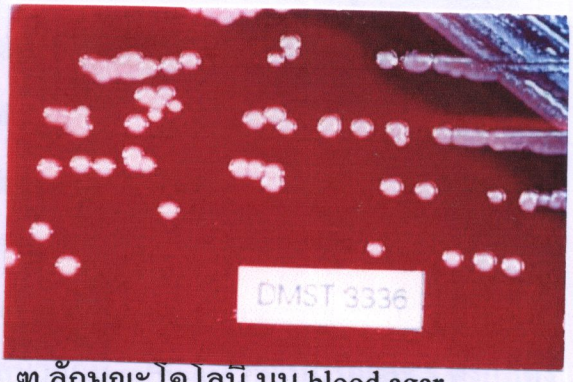


ฎ ลักษณะโคโลนีบน blood agar ของ *S. marcescens*

ฎ ลักษณะโคโลนีบน blood agar ของ *K. pneumoniae*



ฐ ลักษณะโคโลนีบน blood agar ของ *A. baumannii*



ฑ ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *P. aeruginosa*

ฒ ลักษณะโคโลนี บน blood agar ของ *B. cepacia*

ภาพ 7 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity) และความคงคุณลักษณะด้าน phenotype ในส่วนของลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2. คุณลักษณะทางชีวเคมี (biochemical test) ผลการตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยแยกการทดสอบตามกลุ่มและชนิดของเชื้อนั้น ๆ ดังนี้

2.1 เชื้อกลุ่ม Gram positive cocci ทำการทดสอบเชื้อตัวอย่างจำนวน 7 ชนิด ชนิดละ 20 สายพันธุ์ รวมทั้งสิ้น 140 สายพันธุ์ พบว่า ทั้ง 7 ชนิดมีลักษณะทางชีวเคมีเหมือนและแตกต่างกัน ได้ผลดังนี้

2.1.1 *S. aureus* มีลักษณะทางชีวเคมีตรงตาม Key จากหนังสือ *Manual of Clinical Microbiology* พบว่า ตัวอย่างเชื้อทั้งหมดจำนวน 20 สายพันธุ์ ให้ผลลบกับ oxidase test, motility, xylose และ arabinose ให้ผลบวกกับ catalase test, staphylocoagulase, glucose oxsidized, maltose, mannose, trehalose, nitrate reduction และ arginine ตัวอย่างเชื้อจำนวน 19 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ urease, glucose fermented, mannitol และ sucrose คิดเป็นร้อยละ 95 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 17 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ 6.5% NaCl คิดเป็นร้อยละ 85 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 15 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ lactose คิดเป็นร้อยละ 75 และตัวอย่างเชื้อจำนวน 1 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ raffinose คิดเป็นร้อยละ 5 ดังแสดงในตาราง 15 และ 16

2.1.2 *S. epidermidis* มีลักษณะทางชีวเคมีตรงตาม Key จากหนังสือ Manual of Clinical Microbiology พบว่า ตัวอย่างเชื้อทั้งหมดจำนวน 20 สายพันธุ์ ให้ผลลบกับ oxidase test, staphylocoagulase, motility, raffinose, xylose และ arabinose ให้ผลบวกกับ catalase test, urease, glucose fermented, glucose oxidized, sucrose, 6.5% NaCl และ nitrate reduction ตัวอย่างเชื้อจำนวน 19 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ lactose และ arginine คิดเป็นร้อยละ 95 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 17 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ maltose คิดเป็นร้อยละ 85 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 16 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ mannose คิดเป็นร้อยละ 80 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 1 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ mannitol และ trehalose คิดเป็นร้อยละ 5 ดังแสดงในตาราง 15 และ 17

2.1.3 *S. pneumoniae* มีลักษณะทางชีวเคมีตรงตาม Key จากหนังสือ *Manual of Clinical Microbiology* และ *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* ประกอบกัน พบว่า ตัวอย่างเชื้อทั้งหมดจำนวน 20 สายพันธุ์ ให้ผลลบกับ bile esculin ให้

ผลบวกกับการทดสอบ bile solubility, optochin test และการสลายเม็ดเลือดแดงเป็นแบบ alpha-hemolysis ดังแสดงในตาราง 15 และ 18

2.1.4 *S. pyogenes* มีลักษณะทางชีวเคมีตรงตาม Key จากหนังสือ *Manual of Clinical Microbiology* และ *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* ประกอบกัน พบว่า ตัวอย่างเชื้อทั้งหมดจำนวน 20 สายพันธุ์ ให้ผลลบกับ CAMP test ให้ผลบวกกับการทดสอบ PYR test และการสลายเม็ดเลือดแดงเป็นแบบ beta-hemolysis ดังแสดงในตาราง 15 และ 19

2.1.5 *S. agalactiae* มีลักษณะทางชีวเคมีตรงตาม Key จากหนังสือ *Manual of Clinical Microbiology* และ *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* ประกอบกัน พบว่า ตัวอย่างเชื้อทั้งหมดจำนวน 20 สายพันธุ์ ให้ผลลบกับ PYR test, esculin, mannitol และ raffinose ให้ผลบวกกับ CAMP test, trehalose และ arginine ตัวอย่างเชื้อจำนวน 1 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ lactose คิดเป็นร้อยละ 5 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 11 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ VP คิดเป็นร้อยละ 55 และตัวอย่างเชื้อจำนวน 8 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ 6.5% NaCl คิดเป็นร้อยละ 40 ดังแสดงในตาราง 15 และ 20

2.1.6 *E. faecalis* มีลักษณะทางชีวเคมีตรงตาม Key จากหนังสือ *Manual of Clinical Microbiology* พบว่า ตัวอย่างเชื้อทั้งหมดจำนวน 20 สายพันธุ์ ให้ผลลบกับ motility, raffinose และ arabinose ให้ผลบวกกับ PYR test, esculin, mannitol, sorbitol, arginine และ 0.04% tellurite และตัวอย่างเชื้อจำนวน 18 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ sucrose คิดเป็นร้อยละ 90 ดังแสดงในตาราง 15 และ 21

2.1.7 *E. faecium* มีลักษณะทางชีวเคมีตรงตาม Key จากหนังสือ *Manual of Clinical Microbiology* พบว่า ตัวอย่างเชื้อทั้งหมดจำนวน 20 สายพันธุ์ ให้ผลลบกับ motility และ 0.04% tellurite ให้ผลบวกกับ PYR test, esculin, mannitol, arabinose และ arginine ตัวอย่างเชื้อจำนวน 17 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ sorbitol คิดเป็นร้อยละ 85 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 15 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ sucrose คิดเป็นร้อยละ 75 และตัวอย่างเชื้อจำนวน 3 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ raffinose คิดเป็นร้อยละ 15 ดังแสดงในตาราง 19 และ 22

2.2 เชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae ทำการทดสอบเชื้อตัวอย่างจำนวน 4 ชนิด ชนิดละ 20 สายพันธุ์ รวมทั้งสิ้น 80 สายพันธุ์ พบว่า ทั้ง 4 ชนิดมีลักษณะทางชีวเคมีเหมือนและแตกต่างกัน ได้ผลดังนี้

2.2.1 *K. pneumoniae* มีลักษณะทางชีวเคมีตรงตาม Key จากหนังสือ *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* พบว่า ตัวอย่างเชื้อทั้งหมดจำนวน 20 สายพันธุ์ ให้ผลลบกับ oxidase test, indole, motility, ornithine และarginineให้ผลบวกกับ glucose, gas from glucose, lactose, mannitol, raffinose, sucrose, xylose, arabinose, rhamnose, sorbitol และ lysine ตัวอย่างเชื้อจำนวน 19 สายพันธุ์ให้ผลบวกกับ esculin และ malonate คิดเป็นร้อยละ 95 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 18 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ citrate, maltose และ inositol คิดเป็นร้อยละ 90 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 17 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ urease, adonitol และ salicin คิดเป็นร้อยละ 85 และตัวอย่างเชื้อจำนวน 14 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ VP คิดเป็นร้อยละ 70 ดังแสดงในตาราง 15 และ 23

2.2.2 *E. coli* มีลักษณะทางชีวเคมีตรงตาม Key จากหนังสือ *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* พบว่า ตัวอย่างเชื้อทั้งหมดจำนวน 20 สายพันธุ์ ให้ผลลบกับ oxidase test, citrate, urease, inositol, malonate, adonitol และ VP ให้ผลบวกกับ indole, motility, glucose, maltose, xylose, arabinose, และ lysine ตัวอย่างเชื้อจำนวน 19 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ mannitol และ rhamnose คิดเป็นร้อยละ 95 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 17 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ gas form glucose และ sorbitol คิดเป็นร้อยละ 85 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 14 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ lactose คิดเป็นร้อยละ 70 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 9 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ esculin, ornithine และ salicin คิดเป็นร้อยละ 45 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 6 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ raffinose คิดเป็นร้อยละ 30 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 5 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ sucrose คิดเป็นร้อยละ 25 และตัวอย่างเชื้อจำนวน 4 สายพันธุ์ให้ผลบวกกับ arginine คิดเป็นร้อยละ 20 ดังแสดงในตาราง 15 และ 24

2.2.3 *E. cloacae* มีลักษณะทางชีวเคมีตรงตาม Key จากหนังสือ *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* พบว่า ตัวอย่างเชื้อทั้งหมดจำนวน 20 สายพันธุ์ ให้ผลลบกับ oxidase test, indole, adonitol และ lysine ให้ผลบวกกับ citrate, glucose,

gas form glucose, raffinose, sucrose, xylose, arabinose, rhamnose, malonate และ ornithine ตัวอย่างเชื้อจำนวน 19 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ urease, maltose, mannitol, VP และ arginine คิดเป็นร้อยละ 95 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 16 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ sorbitol คิดเป็นร้อยละ 80 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 14 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ motility คิดเป็นร้อยละ 70 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 8 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ lactose คิดเป็นร้อยละ 40 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 6 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ esculin คิดเป็นร้อยละ 30 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 4 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ salicin คิดเป็นร้อยละ 20 และตัวอย่างเชื้อจำนวน 3 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ inositol คิดเป็นร้อยละ 15 ดังแสดงในตาราง 15 และ 25

2.2.4 *S. marcescens* มีลักษณะทางชีวเคมีตรงตาม Key จากหนังสือ *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* พบว่า ตัวอย่างเชื้อทั้งหมดจำนวน 20 สายพันธุ์ ให้ผลลบกับ oxidase test, indole, lactose, raffinose, xylose, arabinose, rhamnose, malonate และ arginine ให้ผลบวกกับ esculin, glucose, mannitol, VP, lysine และ ornithine ตัวอย่างเชื้อจำนวน 19 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ citrate, sucrose, sorbitol, inositol และ salicin คิดเป็นร้อยละ 95 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 18 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ maltose คิดเป็นร้อยละ 90 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 12 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ adonitol คิดเป็นร้อยละ 60 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 10 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ motility คิดเป็นร้อยละ 50 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 7 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ urease คิดเป็นร้อยละ 35 และตัวอย่างเชื้อจำนวน 1 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ gas form glucose คิดเป็นร้อยละ 5 ดังแสดงในตาราง 15 และ 26

2.3 เชื้อกลุ่ม Non-carbohydrate ferment ทำการทดสอบเชื้อตัวอย่างจำนวน 3 ชนิด ชนิดละ 20 สายพันธุ์ รวมทั้งสิ้น 60 สายพันธุ์ พบว่า ทั้ง 3 ชนิดมีลักษณะทางชีวเคมีเหมือนและแตกต่างกัน ได้ผลดังนี้

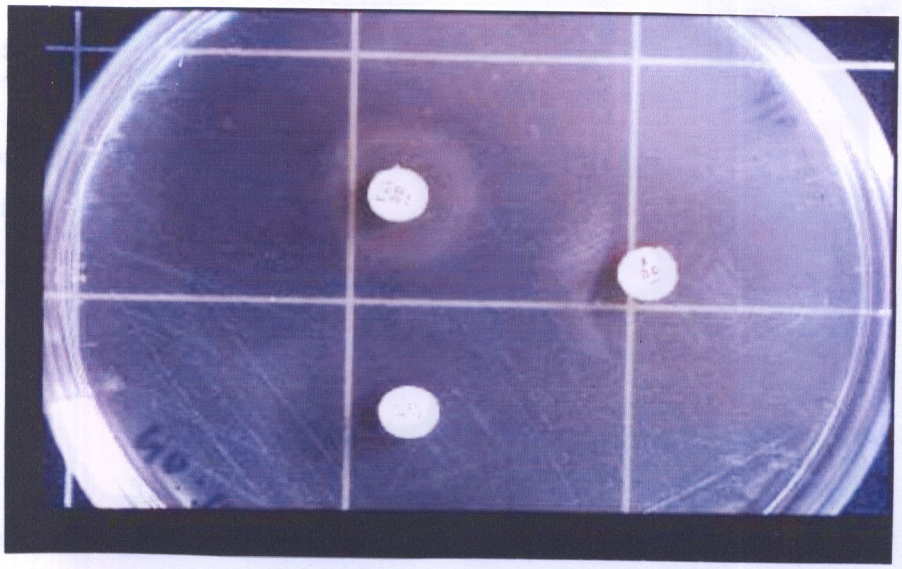
2.3.1 *P. aeruginosa* มีลักษณะทางชีวเคมีตรงตาม Key จากหนังสือ *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* และคู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป ประกอบกัน พบว่า ตัวอย่างเชื้อทั้งหมดจำนวน 20 สายพันธุ์ ให้ผลลบกับ indole, esculin, lactose, lysine และ ornithine ให้ผลบวกกับ oxidase test, citrate, glucose, growth at 42°C และ arginine ตัวอย่างเชื้อ

จำนวน 19 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ nitrate reduction คิดเป็นร้อยละ 95 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 18 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ urease และ xylose คิดเป็นร้อยละ 90 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 17 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ motility คิดเป็นร้อยละ 85 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 16 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ mannitol คิดเป็นร้อยละ 80 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 15 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ gelatin คิดเป็นร้อยละ 75 และตัวอย่างเชื้อจำนวน 1 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ maltose คิดเป็นร้อยละ 5 ดังแสดงในตาราง 15 และ 27

2.3.2 *A. baumannii* มีลักษณะทางชีวเคมีตรงตาม Key จากหนังสือ *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* และคู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป ประกอบกัน พบว่า ตัวอย่างเชื้อทั้งหมดจำนวน 20 สายพันธุ์ ให้ผลลบกับ oxidase test, indole และ motility ให้ผลบวกกับ citrate, glucose, malonate, growth at 41°C, growth at 44°C, ornithine และ arginine ตัวอย่างเชื้อจำนวน 1 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ gelatin คิดเป็นร้อยละ 5 ดังแสดงในตาราง 15 และ 28

2.3.3 *B. cepacia* มีลักษณะทางชีวเคมีตรงตาม Key จากหนังสือ Bergey's manual of determinative bacteriology และคู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป ประกอบกัน พบว่า ตัวอย่างเชื้อทั้งหมดจำนวน 20 สายพันธุ์ ให้ผลลบกับ indole, lysine, ornithine, และ arginine ให้ผลบวกกับ oxidase test, motility, urease, glucose, mannitol และ xylose ตัวอย่างเชื้อจำนวน 19 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ citrate คิดเป็นร้อยละ 95 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 18 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ lactose คิดเป็นร้อยละ 90 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 17 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ maltose คิดเป็นร้อยละ 85 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 15 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ growth at 42°C คิดเป็นร้อยละ 75 ตัวอย่างเชื้อจำนวน 12 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ nitrate reduction คิดเป็นร้อยละ 60 และตัวอย่างเชื้อจำนวน 8 สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับ esculin คิดเป็นร้อยละ 40 ดังแสดงในตาราง 15 และ 29

2.4 เชื้อ *Haemophilus* sp. เมื่อทดสอบกับแผ่นชุบ XV factor ให้ผลบวกทั้ง 20 สายพันธุ์ ดังแสดงในตาราง 30 และภาพ 8



ภาพ 8 ผลการทดสอบ X V factor ของเชื้อ *H. influenzae*

ตาราง 15

ร้อยละของเชื้อแต่ละชนิดที่ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีและอื่น ๆ เป็นบวกชนิดละ 20 สายพันธุ์

Test/ % Positive	*S. aureus*	*S. epidermidis*	*E. faecalis*	*E. faecium*	*E. coli*	*S. marcescens*	*E. cloacae*	*K. pneumoniae*	*A. baumannii*	*B. cepacia*	*P. aeruginosa*	*S. agalactiae*	*S. pyogenes*	*S. pneumoniae*
alpha-hemolysis												0	0	100
beta-hemolysis												80	100	0
optochin test														100
CAMP test												100	0	
bile solubility														100
bile esculin														0
PYR test			100	100								0	100	
oxidase test	0	0			0	0	0	0	0	100	100			
catalase test	100	100												
staphylocoagulase	100	0												
indole					100	0	0	0	0	0	0			

ตาราง 15 (ต่อ)

Test/ % Positive	*S. aureus*	*S. epidermidis*	*E. faecalis*	*E. faecium*	*E. coli*	*S. marcescens*	*E. cloacae*	*K. pneumoniae*	*A. baumannii*	*B. cepacia*	*P. aeruginosa*	*S. agalactiae*	*S. pyogenes*	*S. pneumoniae*
motility	0	0	0	0	100	50	70	0	0	100	85			
citrate					0	95	100	90	100	95	100			
urease	95	100			0	35	95	85		100	90			
esculin			100	100	45	100	30	95		40	0	0		
O/F glucose oxi.	100	100												
O/F glucose fer.	95	100												
glucose					100	100	100	100	100	100	100			
gas from glucose					85	5	100	100						
lactose	75	95			70	0	40	100		90	0	5		
maltose	100	85			100	90	95	90		85	5			
mannose	100	80												
6.5% NaCl	85	100										40		
growth at 41°C									100					
growth at 42°C										75	100			
growth at 44°C									100					
gelatin									5		75			
nitrate reduction	100	100								60	95			
lysine					100	100	0	100		0	0			
ornithine					45	100	100	0	100	0	0			
arginine	100	95	100	100	20	0	95	0	100	0	100	100		
0.04 % tellurite			100	0										
salicin					45	95	20	85						
Total Strains	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

จากการตรวจสอบความมีชีวิต ความบริสุทธิ์ และลักษณะทางฟีโนไทป์ ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 15 ชนิดหลังจัดเก็บไว้แล้วช่วงเวลา 2-12 ปี คือ *S. aureus, S. epidermidis, E. faecalis, E. faecium, A. baumannii, P. aeruginosa, E. cloacae, K. pneumoniae, E. coli, S. macescens, B. cepacia, S. agalactiae, S. pyogenes, H. influenzae* และ *S. pneumoniae* เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดทั้งในส่วนของ ความมีชีวิต แหล่งที่ตรวจพบเชื้อ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทางชีวเคมี มาพิจารณาประกอบกัน ดังแสดงในตาราง 16-30 จะได้เป็นภาพรวมของการตรวจสอบคุณภาพแบคทีเรียหลังการเก็บรักษา นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยตรวจวินิจฉัยแบคทีเรียทางการแพทย์ได้ด้วย

ตาราง 16

ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ S. aureus หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี

DMST	11474	11425	8247	8098	6522
จำนวนปีที่จัดเก็บ	2	2	3	3	4
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	11.257	11.309	10.872	11.303	10.845
แหล่งที่มาของเชื้อ	แม่สอด	เชียงราย	กทม.	ATCC	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	pus	urine	blood	12715	sputum
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่นขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
oxidase	-	-	-	-	-
catalase	+	+	+	+	+
staphylocoagulase	+	+	+	+	+
glucose O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
maltose	+	+	+	+	+
lactose	+	+	+	-	-
mannose	+	+	+	+	+
raffinose	-	-	-	-	-
sucrose	+	+	+	+	+
xylose	-	-	-	-	-
mannitol	+	+	+	+	+
arabinose	-	-	-	-	-
trehalose	+	+	+	+	+
nitrate reduction	+	+	+	+	+
urease	+	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+	+
motility	-	-	-	-	-
6.5% NaCl	+	+	+	+	+

ตาราง 16 (ต่อ)

DMST	6473	5220	5199	4819	4746
จำนวนปีที่จัดเก็บ	4	5	5	6	6
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	10.214	10.469	11.252	10.919	10.759
แหล่งที่มาของเชื้อ	นครศรีฯ	กทม.	USA	Belgium	ATCC
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	pus	sputum	Q.C.	Q.C.	25923
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลมโค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลมโค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
oxidase	-	-	-	-	-
catalase	+	+	+	+	+
staphylocoagulase	+	+	+	+	+
glucose O/F	+/+	+/+	+/-	+/+	+/+
maltose	+	+	+	+	+
lactose	-	-	+w	+w	+w
mannose	+	+	+	+	+
raffinose	-	-	-	-	-
sucrose	+	+	+	+	+
xylose	-	-	-	-	-
mannitol	+	+	+	-	+
arabinose	-	-	-	-	-
trehalose	+	+	+	+	+
nitrate reduction	+	+	+	+	+
urease	+	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+	+
motility	-	-	-	-	-
6.5% NaCl	+	+	+	+	+

ตาราง 16 (ต่อ)

DMST	4738	4289	4213	4026	3429
จำนวนปีที่จัดเก็บ	6	7	7	8	8
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ					
log_{10}CFU/ml	10.602	10.187	9.685	9.770	10.273
แหล่งที่มาของเชื้อ	ATCC	กทม.	ATCC	กทม.	ATCC
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	43300	pus	25923	sputum	25923
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
oxidase	-	-	-	-	-
catalase	+	+	+	+	+
staphylocoagulase	+	+	+	+	+
glucose O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
maltose	+	+	+	+	+
lactose	+	-	+	+	+
mannose	+	+	+	+	+
raffinose	+	-	-	-	-
sucrose	-	+	+	+	+
xylose	-	-	-	-	-
mannitol	+	+	+	+	+
arabinose	-	-	-	-	-
trehalose	+	+	+	+	+
nitrate reduction	+	+	+	+	+
urease	+	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+	+
motility	-	-	-	-	-
6.5% NaCl	+	+	-	+	+

ตาราง 16 (ต่อ)

DMST	2929	2930	2932	2850	1386
จำนวนปีที่จัดเก็บ	9	9	9	10	12
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ					
log_{10}CFU/ml	9.748	10.033	10.234	9.322	8.084
แหล่งที่มาของเชื้อ	Japan	ATCC	UC	USA	control
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	-	8038	3844	CDC	camp test
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
oxidase	-	-	-	-	-
catalase	+	+	+	+	+
staphylocoagulase	+	+	+	+	+
glucose O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
maltose	+	+	+	+	+
lactose	+	+	+	+	+
mannose	+	+	+	+	+
raffinose	-	-	-	-	-
sucrose	+	+	+	+	+
xylose	-	-	-	-	-
mannitol	+	+	+	+	+
arabinose	-	-	-	-	-
trehalose	+	+	+	+	+
nitrate reduction	+	+	+	+	+
urease	+	-	+	+	+
arginine	+	+	+	+	+
motility	-	-	-	-	-
6.5% NaCl	-	+	+	-	+

ตาราง 17

ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ S. epidermidis หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี

DMST	15505	11263	9193	9181	6946
จำนวนปีที่จัดเก็บ	2	2	3	3	4
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.956	9.707	9.222	9.226	8.618
แหล่งที่มาของเชื้อ	ATCC	USA	กทม.	กทม.	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	12228	Q.C.	blood	blood	pus
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
oxidase	-	-	-	-	-
catalase	+	+	+	+	+
staphylocoagulase	-	-	-	-	-
glucose O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
maltose	+	+	+	+	+
lactose	+	+	+	+	+
mannose	+	+	-	+	-
raffinose	-	-	-	-	-
sucrose	+	+	+	+	+
xylose	-	-	-	-	-
mannitol	-	-	-	-	-
arabinose	-	-	-	-	-
trehalose	-	-	-	-	-
nitrate reduction	+	+	+	+	+
urease	+	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+	+
motility	-	-	-	-	-
6.5% NaCl	+	+	+	+	+

ตาราง 17 (ต่อ)

DMST	6943	5708	5676	5048	4987
จำนวนปีที่จัดเก็บ	4	5	5	6	6
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	8.688	9.230	9.795	9.703	8.919
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	เชียงใหม่	กทม.	กทม.	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	pus	urine	pus	blood	blood
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
oxidase	-	-	-	-	-
catalase	+	+	+	+	+
staphylocoagulase	-	-	-	-	-
glucose O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
maltose	+	+	+	+	+
lactose	+	+	+	+	+
mannose	+	-	-	+	+
raffinose	-	-	-	-	-
sucrose	+	+	+	+	+
xylose	-	-	-	-	-
mannitol	-	-	-	-	-
arabinose	-	-	-	-	-
trehalose	-	-	-	-	-
nitrate reduction	+	+	+	+	+
urease	+	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+	+
motility	-	-	-	-	-
6.5% NaCl	+	+	+	+	+

ตาราง 17 (ต่อ)

DMST	4370	4343	3992	3755	3547
จำนวนปีที่จัดเก็บ	7	7	8	8	8
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	8.944	8.781	8.505	8.587	8.498
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.	กทม.	กทม.	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	pus	urine	pus	CSF	ear
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
oxidase	-	-	-	-	-
catalase	+	+	+	+	+
staphylocoagulase	-	-	-	-	-
glucose O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
maltose	+	+	+	+	+
lactose	+	+	+	+	+
mannose	+	+	+	+	+
raffinose	-	-	-	-	-
sucrose	+	+	+	+	+
xylose	-	-	-	-	-
mannitol	-	-	-	-	-
arabinose	-	-	-	-	-
trehalose	-	-	-	-	-
nitrate reduction	+	+	+	+	+
urease	+	+	+	+	+
arginine	+	+	+	-	+
motility	-	-	-	-	-
6.5% NaCl	+	+	+	+	+

ตาราง 17 (ต่อ)

DMST	2950	2926	2927	1785	1359
จำนวนปีที่จัดเก็บ	9	9	9	12	12
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ $\log_{10}$CFU/ml	9.667	9.371	9.390	9.491	9.711
แหล่งที่มาของเชื้อ	Japan	กทม.	กทม.	-	Q.C.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	-	skin	skin	-	blood
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
oxidase	-	-	-	-	-
catalase	+	+	+	+	+
staphylocoagulase	-	-	-	-	-
glucose O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
maltose	+	-	-	+	-
lactose	+	+	+	-	+
mannose	+	+	+	+	+
raffinose	-	-	-	-	-
sucrose	+	+	+	+	+
xylose	-	-	-	-	-
mannitol	-	-	-	+	-
arabinose	-	-	-	-	-
trehalose	-	-	-	-	+
nitrate reduction	+	+	+	+	+
urease	+	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+	+
motility	-	-	-	-	-
6.5% NaCl	+	+	+	+	+

ตาราง 18

ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ S. pneumoniae หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี

DMST	10743	10742	8364	8360	7206
จำนวนปีที่จัดเก็บ	2	2	3	3	4
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ					
log_{10}CFU/ml	7.045	6.806	7.051	7.230	6.785
แหล่งที่มาของเชื้อ	อุบลราชธานี	เชียงราย	หาดใหญ่	หาดใหญ่	น่าน
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	blood	blood	blood	blood	sputum
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	จุดเล็ก ๆ นูน เล็กน้อย ขอบเรียบสีขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.	จุดเล็ก ๆ นูน เล็กน้อย ขอบเรียบสีขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.	จุดเล็ก ๆ นูน เล็กน้อย ขอบเรียบสีขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.	จุดเล็ก ๆ นูน เล็กน้อย ขอบเรียบสีขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.	จุดเล็ก ๆ นูน เล็กน้อย ขอบเรียบสีขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram+ cocci	gram+ cocci	gram+ cocci	gram+ cocci	gram+ cocci
alpha-hemolysis	+	+	+	+	+
beta-hemolysis	-	-	-	-	-
optochin susceptibility	+	+	+	+	+
bile solubility	+	+	+	+	+
bile esculin	-	-	-	-	-

ตาราง 18 (ต่อ)

DMST	7193	7172	5289	5150	5138
จำนวนปีที่จัดเก็บ	4	4	5	5	5
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	7.334	7.079	6.544	7.826	6.602
แหล่งที่มาของเชื้อ	หาดใหญ่	หาดใหญ่	ระยอง	นครสวรรค์	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	sputum	blood	blood	blood	blood
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	จุดเล็ก ๆ นูน เล็กน้อย ขอบเรียบสี ขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.	จุดเล็ก ๆ นูน เล็กน้อย ขอบเรียบสี ขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.	จุดเล็ก ๆ นูน เล็กน้อย ขอบเรียบสี ขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.	จุดเล็ก ๆ นูน เล็กน้อย ขอบเรียบสี ขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.	จุดเล็ก ๆ นูน เล็กน้อย ขอบเรียบสี ขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram+ cocci	gram+ cocci	gram+ cocci	gram+ cocci	gram+ cocci
alpha-hemolysis	+	+	+	+	+
beta-hemolysis	-	-	-	-	-
optochin susceptibility	+	+	+	+	+
bile solubility	+	+	+	+	+
bile esculin	-	-	-	-	-

ตาราง 18 (ต่อ)

DMST	5063	5033	4380	3416	3408
จำนวนปีที่จัดเก็บ	6	6	7	8	8
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	6.929	7.180	7.146	7.322	6.602
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.	กทม.	USA	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	sputum	sputum	bronchial	Q.C.	blood
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	จุดเล็ก ๆ นูนเล็กน้อย ขอบเรียบสีขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.	จุดเล็ก ๆ นูนเล็กน้อย ขอบเรียบสีขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.	จุดเล็ก ๆ นูนเล็กน้อย ขอบเรียบสีขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.	จุดเล็ก ๆ นูนเล็กน้อย ขอบเรียบสีขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.	จุดเล็ก ๆ นูนเล็กน้อย ขอบเรียบสีขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram+ cocci	gram+ cocci	gram+ cocci	gram+ cocci	gram+ cocci
alpha-hemolysis	+	+	+	+	+
beta-hemolysis	-	-	-	-	-
optochin susceptibility	+	+	+	+	+
bile solubility	+	+	+	+	+
bile esculin	-	-	-	-	-

ตาราง 18 (ต่อ)

DMST	3277	3264	2826	2825	2360
จำนวนปีที่จัดเก็บ	9	9	10	10	11
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	5.233	5.484	5.816	5.574	5.929
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.	-	-	-
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	blood	pus	-	-	-
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	จุดเล็ก ๆ นูน เล็กน้อย ขอบเรียบสีขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.	จุดเล็ก ๆ นูน เล็กน้อย ขอบเรียบสีขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.	จุดเล็ก ๆ นูน เล็กน้อย ขอบเรียบสีขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.	จุดเล็ก ๆ นูน เล็กน้อย ขอบเรียบสีขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.	จุดเล็ก ๆ นูน เล็กน้อย ขอบเรียบสีขาวใส α-hemolysis ขนาด ~ 0.1-1 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram+ cocci	gram+ cocci	gram+ cocci	gram+ cocci	gram+ cocci
alpha-hemolysis	+	+	+	+	+
beta-hemolysis	-	-	-	-	-
optochin susceptibility	+	+	+	+	+
bile solubility	+	+	+	+	+
bile esculin	-	-	-	-	-

ตาราง 19

ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ S. pyogenes หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี

DMST	11550	11461	11378	8658	8656
จำนวนปีที่จัดเก็บ	2	2	2	3	3
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.059	8.256	8.628	9.782	8.881
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.	กทม.	หาดใหญ่	หาดใหญ่
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	pus	blood	blood	pus	urine
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
alpha-hemolysis	-	-	-	-	-
beta-hemolysis	+	+	+	+	+
PYR	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-
CAMP test	-	-	-	-	-

ตาราง 19 (ต่อ)

DMST	8655	8592	8365	7521	7514
จำนวนปีที่จัดเก็บ	3	3	3	4	4
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	8.823	9.081	9.196	8.820	8.556
แหล่งที่มาของเชื้อ	หาดใหญ่	นครราชสีมา	หาดใหญ่	น่าน	พิษณุโลก
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	blood	blood	blood	pus	pus
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
alpha-hemolysis	-	-	-	-	-
beta-hemolysis	+	+	+	+	+
PYR	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-
CAMP test	-	-	-	-	-

ตาราง 19 (ต่อ)

DMST	7225	7224	7219	5262	5261
จำนวนปีที่จัดเก็บ	4	4	4	5	5
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	8.239	9.104	8.699	9.383	9.335
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.	กทม.	Belgium	Belgium
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	blood	pus	pus	Q.C.	Q.C.
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
alpha-hemolysis	-	-	-	-	-
beta-hemolysis	+	+	+	+	+
PYR	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-
CAMP test	-	-	-	-	-

ตาราง 19 (ต่อ)

DMST	4992	4478	3965	3373	3023
จำนวนปีที่จัดเก็บ	6	7	8	9	9
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	8.314	8.531	8.255	8.491	7.015
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.	-	-	-
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	pus	wound	-	abdominal fluid	-
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวใส β-hemolysis ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
alpha-hemolysis	-	-	-	-	-
beta-hemolysis	+	+	+	+	+
PYR	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-
CAMP test	-	-	-	-	-

ตาราง 20

ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ S. agalactiae หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี

DMST	11417	11390	8667	7576	7525
จำนวนปีที่จัดเก็บ	2	2	3	4	4
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ					
log_{10}CFU/ml	9.982	9.900	9.321	8.929	9.255
แหล่งที่มาของเชื้อ	หนองคาย	หาดใหญ่	กทม.	กทม.	น่าน
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	blood	blood	pus	สัตว์น้ำ	throat swab
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
alpha-hemolysis	-	-	-	-	-
beta-hemolysis	+	+	+	+	+
PYR	-	-	-	-	-
CAMP test	+	+	+	+	+
esculin	-	-	-	-	-
6.5% NaCl	-	+	+	+	+
VP	+	-	+	+	+
lactose	-	-	-	-	-
mannitol	-	-	-	-	-
raffinose	-	-	-	-	-
trehalose	+	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+	+

ตาราง 20 (ต่อ)

DMST	7216	5343	5342	5165	5067
จำนวนปีที่จัดเก็บ	4	5	5	5	6
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	10.070	9.170	8.425	8.926	8.911
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.	กทม.	กทม.	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	blood	urine	blood	pus	blood
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
alpha-hemolysis	-	-	-	-	-
beta-hemolysis	+	+	-	+	+
PYR	-	-	-	-	-
CAMP test	+	+	+	+	+
esculin	-	-	-	-	-
6.5% NaCl	-	-	-	-	-
VP	+	-	+	-	+
lactose	-	-	-	-	-
mannitol	-	-	-	-	-
raffinose	-	-	-	-	-
trehalose	+	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+	+

ตาราง 20 (ต่อ)

DMST	5058	5031	4507	4338	4324
จำนวนปีที่จัดเก็บ	6	6	7	7	7
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ					
log_{10}CFU/ml	9.083	8.978	8.966	8.681	9.270
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.	กทม.	กทม.	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	blood	blood	blood	blood	pus
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
alpha-hemolysis	-	-	-	-	-
beta-hemolysis	+	+	+	+	+
PYR	-	-	-	-	-
CAMP test	+	+	+	+	+
esculin	-	-	-	-	-
6.5% NaCl	-	-	+	-	+
VP	+	+	-	+	-
lactose	-	-	-	-	-
mannitol	-	-	-	-	-
raffinose	-	-	-	-	-
trehalose	+	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+	+

ตาราง 20 (ต่อ)

DMST	4312	3555	3404	1784	1389
จำนวนปีที่จัดเก็บ	7	8	8	12	12
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ					
log_{10}CFU/ml	8.911	8.597	7.672	8.210	7.299
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.	กทม.	-	Belgium
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	pancreas	feces	back	-	Q.C.
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม นูน เล็กน้อย ขอบไม่เรียบ สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
alpha-hemolysis	-	-	-	-	-
beta-hemolysis	+	-	+	-	-
PYR	-	-	-	-	-
CAMP test	+	+	+	+	+
esculin	-	-	-	-	-
6.5% NaCl	-	-	+	-	+
VP	-	-	-	+	-
lactose	-	-	+	-	-
mannitol	-	-	-	-	-
raffinose	-	-	-	-	-
trehalose	+	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+	+

ตาราง 21

ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ E. faecalis หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี

DMST	12502	12471	8163	8109	8080
จำนวนปีที่จัดเก็บ	2	2	3	3	3
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	11.422	10.973	9.795	9.845	9.946
แหล่งที่มาของเชื้อ	นนทบุรี	หาดใหญ่	กทม.	นนทบุรี	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	blood	blood	urine	urine	CSF
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
motility	-	-	-	-	-
mannitol	+	+	+	+	+
sucrose	+	+	+	+	+
arabinose	-	-	-	-	-
esculin	+	+	+	+	+
raffinose	-	-	-	-	-
arginine	+	+	+	+	+
sorbitol	+	+	+	+	+
PYR test	+	+	+	+	+
0.04% tellurite	+	+	+	+	+

ตาราง 21 (ต่อ)

DMST	6465	6337	5244	5242	4960
จำนวนปีที่จัดเก็บ	4	4	5	5	6
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	8.662	9.178	9.077	9.491	8.838
แหล่งที่มาของเชื้อ	ชลบุรี	หาดใหญ่	กทม.	กทม.	กาญจนบุรี
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	pus	urine	blood	blood	-
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
motility	-	-	-	-	-
mannitol	+	+	+	+	+
sucrose	+	+	+	+	+
arabinose	-	-	-	-	-
esculin	+	+	+	+	+
raffinose	-	-	-	-	-
arginine	+	+	+	+	+
sorbitol	+	+	+	+	+
PYR test	+	+	+	+	+
0.04% tellurite	+	+	+	+	+

ตาราง 21 (ต่อ)

DMST	4736	4421	3753	3752	3301
จำนวนปีที่จัดเก็บ	6	7	8	8	9
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.531	8.921	8.946	9.954	9.031
แหล่งที่มาของเชื้อ	ATCC	กทม.	กทม.	กทม.	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	29212	blood	pus	pus	pus
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
motility	-	-	-	-	-
mannitol	+	+	+	+	+
sucrose	+	+	+	-	+
arabinose	-	-	-	-	-
esculin	+	+	+	+	+
raffinose	-	-	-	-	-
arginine	+	+	+	+	+
sorbitol	+	+	+	+	+
PYR test	+	+	+	+	+
0.04% tellurite	+	+	+	+	+

ตาราง 21 (ต่อ)

DMST	2912	2861	2860	1396	1395
จำนวนปีที่จัดเก็บ	9	10	10	12	12
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.396	10.908	9.251	8.491	8.550
แหล่งที่มาของเชื้อ	ATCC	ATCC	ATCC	Japan	Japan
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	33186	29212	29212	-	-
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
motility	-	-	-	-	-
mannitol	+	+	+	+	+
sucrose	-	+	+	+	+
arabinose	-	-	-	-	-
esculin	+	+	+	+	+
raffinose	-	-	-	-	-
arginine	+	+	+	+	+
sorbitol	+	+	+	+	+
PYR test	+	+	+	+	+
0.04% tellurite	+	+	+	+	+

ตาราง 22

ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ E. faecium หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี

DMST	14718	12996	12994	8250	8192
จำนวนปีที่จัดเก็บ	2	2	2	3	3
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ $\log_{10}$CFU/ml	10.077	10.144	9.243	9.544	9.518
แหล่งที่มาของเชื้อ	นนทบุรี	กทม.	กทม.	กทม.	สิงห์บุรี
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	urine	pus	blood	pus	urine
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูนขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูนขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูนขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูนขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูนขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
motility	-	-	-	-	-
mannitol	+	+	+	+	+
sucrose	+	+	+	+	+
arabinose	+	+	+	+	+
esculin	+	+	+	+	+
raffinose	-	+	+	-	-
arginine	+	+	+	+	+
sorbitol	+	+	+	+	-
PYR test	+	+	+	+	+
0.04% tellurite	-	-	-	-	-

ตาราง 22 (ต่อ)

DMST	8186	8156	6673	6649	6367
จำนวนปีที่จัดเก็บ	3	3	4	4	4
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.012	9.360	8.785	10.115	9.445
แหล่งที่มาของเชื้อ	หาดใหญ่	กทม.	นนทบุรี	นนทบุรี	พิษณุโลก
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	blood	blood	urine	pus	urine
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูนขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูนขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูนขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูนขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูนขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
motility	-	-	-	-	-
mannitol	+	+	+	+	+
sucrose	-	+	+	-	+
arabinose	+	+	+	+	+
esculin	+	+	+	+	+
raffinose	-	-	-	-	-
arginine	+	+	+	+	+
sorbitol	+	+	+	+	+
PYR test	+	+	+	+	+
0.04% tellurite	-	-	-	-	-

ตาราง 22 (ต่อ)

DMST	5234	5200	5075	5029	4743
จำนวนปีที่จัดเก็บ	5	5	6	6	6
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ					
log_{10}CFU/ml	9.491	9.239	8.883	8.951	9.123
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	USA	กทม.	กทม.	UCLA192
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	blood	Q.C.	blood	blood	-
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
motility	-	-	-	-	-
mannitol	+	+	+	+	+
sucrose	+	-	+	+	+
arabinose	+	+	+	+	+
esculin	+	+	+	+	+
raffinose	-	-	-	-	-
arginine	+	+	+	+	+
sorbitol	+	-	-	+	+
PYR test	+	+	+	+	+
0.04% tellurite	-	-	-	-	-

ตาราง 22 (ต่อ)

DMST	4631	4582	3761	3759	3211
จำนวนปีที่จัดเก็บ	7	7	8	8	9
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	8.956	8.968	8.491	8.954	8.740
แหล่งที่มาของเชื้อ	Belgium	กทม.	กทม.	กทม.	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	Q.C.	blood	pus	pus	pus
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูนขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูนขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูนขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูนขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.	กลม โค้งนูนขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-2 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci	gram + cocci
motility	-	-	-	-	-
mannitol	+	+	+	+	+
sucrose	-	+	-	+	+
arabinose	+	-	+	+	+
esculin	+	+	+	+	+
raffinose	-	-	-	-	+
arginine	+	+	+	+	+
sorbitol	+	+	+	+	+
PYR test	+	+	+	+	+
0.04% tellurite	-	-	-	-	-

ตาราง 23

ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ K. pneumoniae หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี

DMST	12172	12171
จำนวนปีที่จัดเก็บ	2	2
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	10.278	11.202
แหล่งที่มาของเชื้อ	สุราษฎร์ธานี	สุราษฎร์ธานี
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	pus	sputum
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A^+	K/A^+
indole	-	-
motility	-	-
citrate	+	+
urease	+	-
VP	-	-
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	+	+
adonitol	+	+
sorbitol	+	+
malonate	+	+
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	-	-
sucrose	+	+
esculin	+	+
raffinose	+	+
salicin	+	+

ตาราง 23 (ต่อ)

DMST	12170	10562
จำนวนปีที่จัดเก็บ	2	3
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	11.330	10.382
แหล่งที่มาของเชื้อ	สุราษฎร์ธานี	สุราษฎร์ธานี
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	eye	urine
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A^+	A/A^+
indole	-	-
motility	-	-
citrate	+	+
urease	+	+
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	+
maltose	+	-
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	+	+
adonitol	+	+
sorbitol	+	+
malonate	+	+
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	-	-
sucrose	+	+
esculin	+	+
raffinose	+	+
salicin	+	+

ตาราง 23 (ต่อ)

DMST	9415	8216
จำนวนปีที่จัดเก็บ	3	3
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	10.103	10.246
แหล่งที่มาของเชื้อ	ราชบุรี	ATCC
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	urine	27736
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	A/A^+	K/A^+
indole	-	-
motility	-	-
citrate	-	+
urease	-	+
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	+	-
adonitol	-	+
sorbitol	+	+
malonate	+	+
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	-	-
sucrose	+	+
esculin	+	+
raffinose	+	+
salicin	+	+

ตาราง 23 (ต่อ)

DMST	7592	6501
จำนวนปีที่จัดเก็บ	4	4
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.643	8.946
แหล่งที่มาของเชื้อ	ATCC	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	700603	urine
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	A/A^+	K/A^+
indole	-	-
motility	-	-
citrate	+	-
urease	+	+
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	+
maltose	-	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	+	+
adonitol	+	+
sorbitol	+	+
malonate	+	+
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	-	-
sucrose	+	+
esculin	+	-
raffinose	+	+
salicin	+	+

ตาราง 23 (ต่อ)

DMST	6491	5548
จำนวนปีที่จัดเก็บ	4	5
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.023	9.838
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	-
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	urine	-
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A^+	A/A^+
indole	-	-
motility	-	-
citrate	+	+
urease	+	+
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	+	+
adonitol	+	+
sorbitol	+	+
malonate	+	+
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	-	-
sucrose	+	+
esculin	+	+
raffinose	+	+
salicin	+	+

ตาราง 23 (ต่อ)

DMST	5547	5492
จำนวนปีที่จัดเก็บ	5	5
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.993	10.105
แหล่งที่มาของเชื้อ	-	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	-	swab
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	A/A^+	A/A^+
indole	-	-
motility	-	-
citrate	+	+
urease	+	+
VP	+	-
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	+	+
adonitol	+	+
sorbitol	+	+
malonate	+	+
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	-	-
sucrose	+	+
esculin	+	+
raffinose	+	+
salicin	+	+

ตาราง 23 (ต่อ)

DMST	5365	5082
จำนวนปีที่จัดเก็บ	5	6
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.905	9.174
แหล่งที่มาของเชื้อ	นครราชสีมา	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	sputum	pus
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A^+	K/A^+
indole	-	-
motility	-	-
citrate	+	+
urease	+	+
VP	-	+
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	+	+
adonitol	+	+
sorbitol	+	+
malonate	+	+
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	-	-
sucrose	+	+
esculin	+	+
raffinose	+	+
salicin	-	+

ตาราง 23 (ต่อ)

DMST	5043	4535
จำนวนปีที่จัดเก็บ	6	7
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	10.977	8.263
แหล่งที่มาของเชื้อ	-	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	-	-
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A^+	K/A^+
indole	-	-
motility	-	-
citrate	+	+
urease	+	+
VP	-	+
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	+	+
adonitol	+	+
sorbitol	+	+
malonate	+	+
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	-	-
sucrose	+	+
esculin	+	+
raffinose	+	+
salicin	+	+

ตาราง 23 (ต่อ)

DMST	4532	4531
จำนวนปีที่จัดเก็บ	7	7
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.618	9.505
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	-	-
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A^+	K/A^+
indole	-	-
motility	-	-
citrate	+	+
urease	+	+
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	+	+
adonitol	+	-
sorbitol	+	+
malonate	+	+
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	-	-
sucrose	+	+
esculin	+	+
raffinose	+	+
salicin	+	-

ตาราง 23 (ต่อ)

DMST	4293	2957
จำนวนปีที่จัดเก็บ	7	9
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ $\log_{10}$CFU/ml	1.0926	9.252
แหล่งที่มาของเชื้อ	Belgium	-
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	Q.C.	-
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A^+	A/A^+
indole	-	-
motility	-	-
citrate	+	+
urease	+	-
VP	-	+
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	+	-
adonitol	+	-
sorbitol	+	+
malonate	+	-
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	-	-
sucrose	+	+
esculin	+	+
raffinose	+	+
salicin	-	+

ตาราง 24

ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ E. coli หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี

DMST	12151	10644
จำนวนปีที่จัดเก็บ	2	3
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	11.239	10.216
แหล่งที่มาของเชื้อ	ราชบุรี	ชัยภูมิ
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	urine	blood
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A$^-$	K/A$^-$
indole	+	+
motility	+	+
citrate	-	-
urease	-	-
VP	-	-
glucose	+	+
gas from glucose	-	+
lactose	-	-
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	-	-
adonitol	-	-
sorbitol	+	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	-	-
sucrose	-	-
esculin	-	-
raffinose	-	-
salicin	-	-

ตาราง 24 (ต่อ)

DMST	10098	6499
จำนวนปีที่จัดเก็บ	3	4
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	8.110	9.628
แหล่งที่มาของเชื้อ	นนทบุรี	มหาสารคาม
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	urine	blood
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A$^-$	A/A$^-$
indole	+	+
motility	+	+
citrate	-	-
urease	-	-
VP	-	-
glucose	+	+
gas from glucose	-	+
lactose	-	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	-	-
adonitol	-	-
sorbitol	+	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	-	-
sucrose	-	+
esculin	-	-
raffinose	-	+
salicin	-	-

ตาราง 24 (ต่อ)

DMST	6494	5305
จำนวนปีที่จัดเก็บ	4	5
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.379	9.183
แหล่งที่มาของเชื้อ	พิษณุโลก	น่าน
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	stool	urine
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A$^-$	A/A$^-$
indole	+	+
motility	+	+
citrate	-	-
urease	-	-
VP	-	-
glucose	+	+
gas from glucose	-	+
lactose	-	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	-	-
adonitol	-	-
sorbitol	+	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	-	-
sucrose	-	-
esculin	-	-
raffinose	-	+
salicin	-	+

ตาราง 24 (ต่อ)

DMST	5201	4936
จำนวนปีที่จัดเก็บ	5	6
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.591	9.763
แหล่งที่มาของเชื้อ	ATCC	Japan
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	25922	-
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	A/A^+	A/A^+
indole	+	+
motility	+	+
citrate	-	-
urease	-	-
VP	-	-
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	-	-
adonitol	-	-
sorbitol	+	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	+	-
ornithine	+	-
sucrose	-	-
esculin	+	+
raffinose	-	-
salicin	-	+

ตาราง 24 (ต่อ)

DMST	4818	4744
จำนวนปีที่จัดเก็บ	6	6
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.781	9.736
แหล่งที่มาของเชื้อ	Belgium	UCLA
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	Q.C.	-
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	A/A^+	A/A^+
indole	+	+
motility	+	+
citrate	-	-
urease	-	-
VP	-	-
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	-	-
adonitol	-	-
sorbitol	-	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	-	+
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	-	-
raffinose	+	-
salicin	+	-

ตาราง 24 (ต่อ)

DMST	4554	4212
จำนวนปีที่จัดเก็บ	7	7
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	8.977	10.193
แหล่งที่มาของเชื้อ	Belgium	ATCC
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	Q.C.	25922
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	A/A^+	A/A^+
indole	+	+
motility	+	+
citrate	-	-
urease	-	-
VP	-	-
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	-	+
arabinose	+	+
inositol	-	-
adonitol	-	-
sorbitol	-	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	-	+
ornithine	+	+
sucrose	+	-
esculin	-	+
raffinose	+	-
salicin	-	+

ตาราง 24 (ต่อ)

DMST	4121	2963
จำนวนปีที่จัดเก็บ	8	9
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	10.261	8.648
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	-
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	urine	-
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	A/A^+	K/A^+
indole	+	+
motility	+	+
citrate	-	-
urease	-	-
VP	-	-
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	-
maltose	+	+
mannitol	-	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	-	-
adonitol	-	-
sorbitol	+	-
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	+	+
sucrose	+	-
esculin	+	-
raffinose	+	-
salicin	+	-

ตาราง 24 (ต่อ)

DMST	2724	2723
จำนวนปีที่จัดเก็บ	10	10
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.260	9.921
แหล่งที่มาของเชื้อ	Japan	อุบลราชธานี
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	-	pus
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	A/A^-	A/A^+
indole	+	+
motility	+	+
citrate	-	-
urease	-	-
VP	-	-
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	-	-
adonitol	-	-
sorbitol	+	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	-	-
sucrose	-	-
esculin	+	+
raffinose	-	-
salicin	+	+

ตาราง 24 (ต่อ)

DMST	2722	2318
จำนวนปีที่จัดเก็บ	10	11
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	8.929	8.243
แหล่งที่มาของเชื้อ	Japan	-
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	-	-
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A^+	K/A^+
indole	+	+
motility	+	+
citrate	-	-
urease	-	-
VP	-	-
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	-
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	-	-
adonitol	-	-
sorbitol	+	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	+	-
ornithine	+	-
sucrose	-	-
esculin	+	+
raffinose	-	-
salicin	+	+

ตาราง 24 (ต่อ)

DMST	1393	1115
จำนวนปีที่จัดเก็บ	12	12
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	8.829	8.949
แหล่งที่มาของเชื้อ	Japan	Belgium
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	-	Q.C.
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	A/A^+	A/A^+
indole	+	+
motility	+	+
citrate	-	-
urease	-	-
VP	-	-
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	-	-
adonitol	-	-
sorbitol	+	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	+	-
sucrose	-	-
esculin	-	+
raffinose	+	-
salicin	-	-

ตาราง 25

ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ E. cloacae หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี

DMST	15643	12386
จำนวนปีที่จัดเก็บ	2 ปี	2 ปี
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	11.429	10.380
แหล่งที่มาของเชื้อ	หาดใหญ่	สุราษฎร์ธานี
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	urine	urine
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เข้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A^+	K/A^+
indole	-	-
motility	+	+
citrate	+	+
urease	+	+
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	-	-
adonitol	-	-
sorbitol	+	+
malonate	+	+
lysine	-	-
arginine	+	+
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	-	-
raffinose	+	+
salicin	+	-

ตาราง 25 (ต่อ)

DMST	12238	10567
จำนวนปีที่จัดเก็บ	2 ปี	3 ปี
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	10.288	10.195
แหล่งที่มาของเชื้อ	สุราษฎร์ธานี	สุราษฎร์ธานี
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	urine	sputum
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เข้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A^+	K/A^+
indole	-	-
motility	+	+
citrate	+	+
urease	+	+
VP	+	-
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	+	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	+	-
adonitol	-	-
sorbitol	+	+
malonate	+	+
lysine	-	-
arginine	+	+
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	-	-
raffinose	+	+
salicin	-	-

ตาราง 25 (ต่อ)

DMST	10456	9971
จำนวนปีที่จัดเก็บ	3 ปี	3 ปี
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.327	9.690
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	อุบลราชธานี
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	food	sputum
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A^+	K/A^+
indole	-	-
motility	+	+
citrate	+	+
urease	-	+
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	-	+
maltose	+	-
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	+	-
adonitol	-	-
sorbitol	-	-
malonate	+	+
lysine	-	-
arginine	+	+
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	+	-
raffinose	+	+
salicin	-	-

ตาราง 25 (ต่อ)

DMST	6506	6505
จำนวนปีที่จัดเก็บ	4 ปี	4 ปี
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.262	9.304
แหล่งที่มาของเชื้อ	อุบลราชธานี	อุบลราชธานี
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	urine	pus
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A^+	K/A^+
indole	-	-
motility	-	+
citrate	+	+
urease	+	+
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	-	-
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	+	-
adonitol	-	-
sorbitol	+	+
malonate	+	+
lysine	-	-
arginine	+	+
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	+	-
raffinose	+	+
salicin	-	-

ตาราง 25 (ต่อ)

DMST	6503	6498
จำนวนปีที่จัดเก็บ	4 ปี	4 ปี
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	10.025	11.278
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	diacharge	pus
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	A/A^-	K/A^+
indole	-	-
motility	+	+
citrate	+	+
urease	+	+
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	-	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	-	-
adonitol	-	-
sorbitol	+	+
malonate	+	+
lysine	-	-
arginine	+	+
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	+	-
raffinose	+	+
salicin	+	-

ตาราง 25 (ต่อ)

DMST	6433	6432
จำนวนปีที่จัดเก็บ	4 ปี	4 ปี
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	10.243	10.077
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	urine	B.W.
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A^-	K/A^+
indole	-	-
motility	-	+
citrate	+w	+
urease	+w	+
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	-	-
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	-	-
adonitol	-	-
sorbitol	-	+
malonate	+	+
lysine	-	-
arginine	+	+
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	+	-
raffinose	+	+
salicin	+	-

ตาราง 25 (ต่อ)

DMST	6249	5457
จำนวนปีที่จัดเก็บ	5 ปี	5 ปี
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	10.245	10.309
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	ลำปาง
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	blood	pus
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A^+	K/A^+
indole	-	-
motility	+	+
citrate	+	+
urease	+	+
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	-	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	-	-
adonitol	-	-
sorbitol	+	+
malonate	+	+
lysine	-	-
arginine	+	+
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	-	-
raffinose	+	+
salicin	-	-

ตาราง 25 (ต่อ)

DMST	5303	5254
จำนวนปีที่จัดเก็บ	5 ปี	5 ปี
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.781	11.115
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	blood	blood
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A^+	K/A^+
indole	-	-
motility	+	-
citrate	+	+
urease	+	+
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	-	-
maltose	+	+
mannitol	-	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	-	-
adonitol	-	-
sorbitol	-	+
malonate	+	+
lysine	-	-
arginine	-	+
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	+	-
raffinose	+	+
salicin	+	-

ตาราง 25 (ต่อ)

DMST	5231	5070
จำนวนปีที่จัดเก็บ	5 ปี	6 ปี
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	8.413	7.926
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	blood	pus
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A^+	A/A^-
indole	-	-
motility	-	-
citrate	+	+
urease	+	+
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	+	+
lactose	-	-
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	+	+
rhamnose	+	+
arabinose	+	+
inositol	-	-
adonitol	-	-
sorbitol	+	+
malonate	+	+
lysine	-	-
arginine	+	+
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	-	-
raffinose	+	+
salicin	-	-

ตาราง 26

ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ S. marcescens หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี

DMST	12280	12223
จำนวนปีที่จัดเก็บ	2	2
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	11.100	11.128
แหล่งที่มาของเชื้อ	สุราษฎร์ธานี	สุราษฎร์ธานี
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	sputum	sputum
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A-	K/A-
indole	-	-
motility	+	+
citrate	+	+
urease	-	-
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	-	-
lactose	-	-
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	-	-
rhamnose	-	-
arabinose	-	-
inositol	+	+
adonitol	+	-
sorbitol	+	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	+	+
raffinose	-	-
salicin	+	+

ตาราง 26 (ต่อ)

DMST	12191	12180
จำนวนปีที่จัดเก็บ	2	2
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	10.997	11.258
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	sputum	pus
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A-	K/A-
indole	-	-
motility	+	+
citrate	+	+
urease	-	-
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	-	-
lactose	-	-
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	-	-
rhamnose	-	-
arabinose	-	-
inositol	+	+
adonitol	-	+
sorbitol	+	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	+	+
raffinose	-	-
salicin	+	+

ตาราง 26 (ต่อ)

DMST	10571	10396
จำนวนปีที่จัดเก็บ	3	3
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	10.897	11.062
แหล่งที่มาของเชื้อ	ยะลา	นนทบุรี
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	pus	dialysis
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A-	K/A-
indole	-	-
motility	+	-
citrate	+	+
urease	-	-
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	-	-
lactose	-	-
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	-	-
rhamnose	-	-
arabinose	-	-
inositol	+	+
adonitol	+	+
sorbitol	+	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	+	+
raffinose	-	-
salicin	-	+

ตาราง 26 (ต่อ)

DMST	10341	8846
จำนวนปีที่จัดเก็บ	3	3
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	11.176	10.281
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	-
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	-	-
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A+	K/A+
indole	-	-
motility	-	+
citrate	+	+
urease	-	-
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	-	-
lactose	-	-
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	-	-
rhamnose	-	-
arabinose	-	-
inositol	+	+
adonitol	+	-
sorbitol	-	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	+	+
raffinose	-	-
salicin	+	+

ตาราง 26 (ต่อ)

DMST	7490	6978
จำนวนปีที่จัดเก็บ	4	4
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.956	9.703
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	USA
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	blood	Q.C.
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A-	K/A-
indole	-	-
motility	+	-
citrate	+	+
urease	+	+
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	-	-
lactose	-	-
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	-	-
rhamnose	-	-
arabinose	-	-
inositol	+	+
adonitol	+	-
sorbitol	+	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	+	+
raffinose	-	-
salicin	+w	+

ตาราง 26 (ต่อ)

DMST	6678	6651
จำนวนปีที่จัดเก็บ	4	4
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	10.956	10.399
แหล่งที่มาของเชื้อ	ราชบุรี	อุบลราชธานี
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	sputum	blood
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A-	K/A-
indole	-	-
motility	-	+
citrate	+	+
urease	-	-
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	-	-
lactose	-	-
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	-	-
rhamnose	-	-
arabinose	-	-
inositol	+	+
adonitol	+	+
sorbitol	+	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	+	+
raffinose	-	-
salicin	+	+

ตาราง 26 (ต่อ)

DMST	6079	5901
จำนวนปีที่จัดเก็บ	5	5
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	10.217	10.427
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	อุบลราชธานี
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	sputum	pus
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เข้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เข้ม ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A-	K/A+
indole	-	-
motility	-	-
citrate	+	+
urease	+w	-
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	-	-
lactose	-	-
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	-	-
rhamnose	-	-
arabinose	-	-
inositol	+	+
adonitol	-	-
sorbitol	+	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	+	+
raffinose	-	-
salicin	+	+

ตาราง 26 (ต่อ)

DMST	5897	5533
จำนวนปีที่จัดเก็บ	5	5
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	9.900	10.255
แหล่งที่มาของเชื้อ	มหาสารคาม	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	sputum	pus
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A+	K/A+
indole	-	-
motility	-	-
citrate	+	+
urease	+w	-
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	-	-
lactose	-	-
maltose	+	+
mannitol	+	+
xylose	-	-
rhamnose	-	-
arabinose	-	-
inositol	+	+
adonitol	+	-
sorbitol	+	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	+	+
raffinose	-	-
salicin	+	+

ตาราง 26 (ต่อ)

DMST	5203	5084
จำนวนปีที่จัดเก็บ	5	6
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	10.138	9.968
แหล่งที่มาของเชื้อ	ชลบุรี	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	-	blood
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A+	K/A-
indole	-	-
motility	-	+
citrate	+	+
urease	+	+
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	-	-
lactose	-	-
maltose	+	-
mannitol	+	+
xylose	-	-
rhamnose	-	-
arabinose	-	-
inositol	+	+
adonitol	+	+
sorbitol	+	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	+	+
sucrose	+	+
esculin	+	+
raffinose	-	-
salicin	+	+

ตาราง 26 (ต่อ)

DMST	4796	4424
จำนวนปีที่จัดเก็บ	6	7
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	8.698	9.138
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	Belgium
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	pus	-
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น เยิ้ม ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-
TSI	K/A-	K/A-
indole	-	-
motility	-	+
citrate	-	+
urease	-	+
VP	+	+
glucose	+	+
gas from glucose	-	+
lactose	-	-
maltose	-	+
mannitol	+	+
xylose	-	-
rhamnose	-	-
arabinose	-	-
inositol	-	+
adonitol	-	+
sorbitol	+	+
malonate	-	-
lysine	+	+
arginine	-	-
ornithine	+	+
sucrose	-	+
esculin	+	+
raffinose	-	-
salicin	+	+

ตาราง 27

ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ P. aeruginosa หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี

DMST	11592	9788	9787	6778	6108
จำนวนปีที่จัดเก็บ	2	3	3	4	5
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ					
log_{10}CFU/ml	10.703	8.596	11.212	9.049	9.748
แหล่งที่มาของเชื้อ	หาดใหญ่	สุรินทร์	สุรินทร์	ชลบุรี	อุดรธานี
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	blood	sputum	urine	pus	sputum
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod
oxidase	+	+	+	+	+
TSI	K/N	K/N	K/N	K/N	K/N
indole	-	-	-	-	-
motility	+	+	+	+	+
citrate	+	+	+	+	+
urease	-	+	+	+	+
gelatin	-	+	+	+	+
OF glucose	+	+	+	+	+
OF lactose	-	-	-	-	-
OF maltose	-	-	-	-	-
OF mannitol	-	+	+	+	+
OF xylose	-	+	+	+	-
growth at 42°C	+	+	+	+	+
esculin	-	-	-	-	-
nitrate reduction	-	+	+	+	+
lysine	-	-	-	-	-
arginine	+	+	+	+	+
ornithine	-	-	-	-	-

ตาราง 27 (ต่อ)

DMST	4275	3474	3344	3339	3336
จำนวนปีที่จัดเก็บ	7	8	9	9	9
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ					
log_{10}CFU/ml	10.694	11.064	5.083	8.716	8.477
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.	กทม.	กทม.	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	throad swab	bronchus	LT.	sputum	sputum
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod
oxidase	+	+	+	+	+
TSI	K/N	K/N	K/N	K/N	K/N
indole	-	-	-	-	-
motility	+	+	+	+	-
citrate	+	+	+	+	+
urease	+	+	+	+	+
gelatin	+	+	+	+	+
OF glucose	+	+	+	+	+
OF lactose	-	-	-	-	-
OF maltose	-	-	-	-	-
OF mannitol	-	+	+	+	+
OF xylose	+	+	+	+	+
growth at 42°C	+	+	+	+	+
esculin	-	-	-	-	-
nitrate reduction	+	+	+	+	+
lysine	-	-	-	-	-
arginine	+	+	+	+	+
ornithine	-	-	-	-	-

ตาราง 27 (ต่อ)

DMST	2772	2771	2421	2381	2376
จำนวนปีที่จัดเก็บ	10	10	11	11	11
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ					
log_{10}CFU/ml	8.512	7.041	8.857	6.317	8.498
แหล่งที่มาของเชื้อ	-	-	-	-	-
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	-	-	-	-	-
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod
oxidase	+	+	+	+	+
TSI	K/N	K/N	K/N	K/N	K/N
indole	-	-	-	-	-
motility	+	+	+	+	+
citrate	+	+	+	+	+
urease	-	+	+	+	+
gelatin	-	+	-	+	+
OF glucose	+	+	+	+	+
OF lactose	-	-	-	-	-
OF maltose	-	-	+	-	-
OF mannitol	-	+	+	+	+
OF xylose	+	+	+	+	+
growth at 42°C	+	+	+	+	+
esculin	-	-	-	-	-
nitrate reduction	+	+	+	+	+
lysine	-	-	-	-	-
arginine	+	+	+	+	+
ornithine	-	-	-	-	-

ตาราง 27 (ต่อ)

DMST	2136	2070	2066
จำนวนปีที่จัดเก็บ	12	12	12
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	7.964	5.004	8.924
แหล่งที่มาของเชื้อ	-	Japan	-
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	-	-	-
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ ใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ ใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod	gram-rod
oxidase	+	+	+
TSI	K/N	K/N	K/N
indole	-	-	-
motility	-	+	-
citrate	+	+	+
urease	+	+	+
gelatin	-	+	-
OF glucose	+	+	+
OF lactose	-	-	-
OF maltose	-	-	-
OF mannitol	+	+	+
OF xylose	+	+	+
growth at 42°C	+	+	+
esculin	-	-	-
nitrate reduction	+	+	+
lysine	-	-	-
arginine	+	+	+
ornithine	-	-	-

ตาราง 28

ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ A. baumannii หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี

DMST	8492	8478	6386	6384
จำนวนปีที่จัดเก็บ	3	3	4	4
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ				
log_{10}CFU/ml	9.939	11.088	10.942	9.736
แหล่งที่มาของเชื้อ	อุบลราชธานี	กทม.	กทม.	นนทบุรี
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	blood	sputum	sputum	sputum
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-	-	-
TSI	K/N	K/N	K/N	K/N
indole	-	-	-	-
motility	-	-	-	-
citrate	+	+	+	+
gelatin	-	-	-	-
OF glucose	+	+	+	+
malonate	+	+	+	+
growth at 44°C	+	+	+	+
growth at 41°C	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+
ornithine	+	+	+	+

ตาราง 28 (ต่อ)

DMST	6381	5418	5268	3606
จำนวนปีที่จัดเก็บ	4	5	5	8
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ				
log_{10}CFU/ml	9.667	10.877	10.711	8.898
แหล่งที่มาของเชื้อ	อุบลราชธานี	น่าน	อุบลราชธานี	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	tip	pus	blood	eye
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-	-	-
TSI	K/N	K/N	K/N	K/N
indole	-	-	-	-
motility	-	-	-	-
citrate	+	+	+	+
gelatin	-	-	-	-
OF glucose	+	+	+	+
malonate	+	+	+	+
growth at 44°C	+	+	+	+
growth at 41°C	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+
ornithine	+	+	+	+

ตาราง 28 (ต่อ)

DMST	3600	3254	3140	2785
จำนวนปีที่จัดเก็บ	8	9	9	10
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ				
log_{10}CFU/ml	9.568	9.090	9.173	9.021
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.	หาดใหญ่	สุราษฎร์ธานี
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	urine	sputum	urine	urine
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-	-	-
TSI	K/N	K/N	K/N	K/N
indole	-	-	-	-
motility	-	-	-	-
citrate	+	+	+	+
gelatin	-	-	-	-
OF glucose	+	+	+	+
malonate	+	+	+	+
growth at 44°C	+	+	+	+
growth at 41°C	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+
ornithine	+	+	+	+

ตาราง 28 (ต่อ)

DMST	2763	2523	2386	2080
จำนวนปีที่จัดเก็บ	10	11	11	12
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ				
log_{10}CFU/ml	9.127	7.720	7.771	8.643
แหล่งที่มาของเชื้อ	สุราษฎร์ธานี	กทม.	อุบลราชธานี	อุบลราชธานี
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	urine	food	urine	pus
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สี ขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สี ขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สี ขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สี ขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-	-	-
TSI	K/N	K/N	K/N	K/N
indole	-	-	-	-
motility	-	-	-	-
citrate	+	+	+	+
gelatin	-	-	+	-
OF glucose	+	+	+	+
malonate	+	+	+	+
growth at 44°C	+	+	+	+
growth at 41°C	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+
ornithine	+	+	+	+

ตาราง 28 (ต่อ)

DMST	2065	2063	1837	1374
จำนวนปีที่จัดเก็บ	12	12	12	12
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ				
log_{10}CFU/ml	8.498	10.093	7.659	8.021
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.	กทม.	ลำปาง
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	pus	B.W.	blood	pus
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สี ขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สี ขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สี ขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สี ขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod
oxidase	-	-	-	-
TSI	K/N	K/N	K/N	K/N
indole	-	-	-	-
motility	-	-	-	-
citrate	+	+	+	+
gelatin	-	-	-	-
OF glucose	+	+	+	+
malonate	+	+	+	+
growth at 44°C	+	+	+	+
growth at 41°C	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+
ornithine	+	+	+	+

ตาราง 29

ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ B. cepacia หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี

DMST	11534	11529	11528	11527
จำนวนปีที่จัดเก็บ	2	2	2	2
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ				
log_{10}CFU/ml	12.058	10.133	10.374	11.949
แหล่งที่มาของเชื้อ	นนทบุรี	ยะลา	นนทบุรี	นนทบุรี
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	blood	media	blood	blood
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod
oxidase	+	+	+	+
TSI	K/N	K/N	K/N	K/N
indole	-	-	-	-
motility	+	+	+	+
citrate	+	+	+	+
urease	+	+	+	+
gelatin	+	+	+	+
OF glucose	+	+	+	+
OF lactose	+	-	+	+
OF maltose	-	+	-	+
OF mannitol	+	+	+	+
OF xylose	+	+	+	+
growth at 42°C	+	+	+	+
esculin	-	-	-	-
nitrate reduction	-	-	+	+
lysine	-	-	-	-
arginine	-	-	-	-
ornithine	-	-	-	-

ตาราง 29 (ต่อ)

DMST	8549	8547	8498	6833
จำนวนปีที่จัดเก็บ	3	3	3	4
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	11.473	11.149	11.511	8.322
แหล่งที่มาของเชื้อ	สุรินทร์	สุรินทร์	กทม.	ลำปาง
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	urine	sputum	น้ำกลั่น	blood
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod
oxidase	+	+	+	+
TSI	K/N	K/N	K/N	K/N
indole	-	-	-	-
motility	+	+	+	+
citrate	+	+	-	+
urease	+	+	+	+
gelatin	+	+	+	+
OF glucose	+	+	+	+
OF lactose	+	+	+	+
OF maltose	+	+	+	+
OF mannitol	+	+	+	+
OF xylose	+	+	+	+
growth at 42°C	+	+	-	-
esculin	-	+	+	-
nitrate reduction	+	+	-	+
lysine	-	-	-	-
arginine	-	-	-	-
ornithine	-	-	-	-

ตาราง 29 (ต่อ)

DMST	6804	3586	3523	3244
จำนวนปีที่จัดเก็บ	4	8	8	9
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ $\log_{10}$CFU/ml	10.982	10.311	10.109	10.394
แหล่งที่มาของเชื้อ	ลำปาง	กทม.	กทม.	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	urine	B.W.	sputum	bronchial
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 0.5-1 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 0.5-1 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 0.5-1 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 0.5-1 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod
oxidase	+	+	+	+
TSI	K/N	K/N	K/N	K/N
indole	-	-	-	-
motility	+	+	+	+
citrate	+	+	+	+
urease	+	+	+	+
gelatin	+	+	+	+
OF glucose	+	+	+	+
OF lactose	+	+	+	+
OF maltose	+	+	+	+w
OF mannitol	+	+	+	+
OF xylose	+	+	+	+
growth at 42°C	-	+	-	+
esculin	-	-	+	-
nitrate reduction	+	+	-	+
lysine	-	-	-	-
arginine	-	-	-	-
ornithine	-	-	-	-

ตาราง 29 (ต่อ)

DMST	3238	3149	3084	2818
จำนวนปีที่จัดเก็บ	9	9	9	10
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	7.505	8.728	9.574	7.903
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.	กทม.	-
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	urine	pus	urine	-
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod
oxidase	+	+	+	+
TSI	K/N	K/N	K/N	K/N
indole	-	-	-	-
motility	+	+	+	+
citrate	+	+	+	+
urease	+	+	+	+
gelatin	+	+	+	+
OF glucose	+	+	+	+
OF lactose	+	-	+	+
OF maltose	+	-	+	+
OF mannitol	+	+	+	+
OF xylose	+	+	+	+
growth at 42°C	-	+	+	+
esculin	-	+w	-	+
nitrate reduction	+	+	+	-
lysine	-	-	-	-
arginine	-	-	-	-
ornithine	-	-	-	-

ตาราง 29 (ต่อ)

DMST	2775	2452	2283	2282
จำนวนปีที่จัดเก็บ	10	11	12	12
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	8.829	7.813	8.290	8.695
แหล่งที่มาของเชื้อ	-	ชลบุรี	กทม.	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	-	-	urine	urine
ลักษณะโคโลนีบน blood agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบใส สีขาวขุ่น ขนาด ~ 1-3 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod
oxidase	+	+	+	+
TSI	K/N	K/N	K/N	K/N
indole	-	-	-	-
motility	+	+	+	+
citrate	+	+	+	+
urease	+	+	+	+
gelatin	+	+	+	+
OF glucose	+	+	+	+
OF lactose	+	+	+	+
OF maltose	+	+	+	+
OF mannitol	+	+	+	+
OF xylose	+	+	+	+
growth at 42°C	+	+	+	+
esculin	-	+	+w	+
nitrate reduction	+	-	-	-
lysine	-	-	-	-
arginine	-	-	-	-
ornithine	-	-	-	-

ตาราง 30

ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพ H. influenzae หลังการเก็บรักษาในช่วงเวลา 2-12 ปี

DMST	11434	11433	8287	8237	6462	6460	5584
จำนวนปีที่จัดเก็บ	2	2	3	3	4	4	5
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ							
log_{10}CFU/ml	8.243	8.296	7.845	7.027	6.252	5.061	7.085
แหล่งที่มาของเชื้อ	หาดใหญ่	สุราษฎร์ธานี	กทม.	ขอนแก่น	นครราชฯ	นครราชฯ	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	sputum	CSF	blood	CSF	blood	sputum	blood
ลักษณะโคโลนีบน	กลม โค้งนูน	กลม โค้งนูน	กลม โค้งนูน	กลม โค้งนูน	กลม โค้งนูน	กลม โค้งนูน	กลม โค้งนูน
chocolate agar	ขอบเรียบ สี	ขอบเรียบ สี	ขอบเรียบ สี	ขอบเรียบ สี	ขอบเรียบ สี	ขอบเรียบ สี	ขอบเรียบ สี
	ขาวขุ่นขนาด	ขาวขุ่นขนาด	ขาวขุ่นขนาด	ขาวขุ่นขนาด	ขาวขุ่นขนาด	ขาวขุ่นขนาด	ขาวขุ่นขนาด
	~ 0.5-1 มม.	~ 0.5-1 มม.	~ 0.5-1 มม.	~ 0.5-1 มม.	~ 0.5-1 มม.	~ 0.5-1 มม.	~ 0.5-1 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod
xv factor	+	+	+	+	+	+	+

ตาราง 30 (ต่อ)

DMST	5581	5012	5011	4230	4189	3687	3681
จำนวนปีที่จัดเก็บ	5	6	6	7	7	8	8
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ							
log_{10}CFU/ml	6.653	7.361	7.186	4.799	7.076	7.021	6.319
แหล่งที่มาของเชื้อ	หาดใหญ่	กทม.	กทม.	กทม.	กทม.	กทม.	กทม.
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	sputum	pus	CSF	pleural fluid	blood	-	sputum
ลักษณะโคโลนีบน chocolate agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่นขนาด ~ 0.5-1 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่นขนาด ~ 0.5-1 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่นขนาด ~ 0.5-1 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่นขนาด ~ 0.5-1 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่นขนาด ~ 0.5-1 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่นขนาด ~ 0.5-1 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่นขนาด ~ 0.5-1 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod
xv factor	+	+	+	+	+	+	+

ตาราง 30 (ต่อ)

DMST	3272	3271	2849	2848	2449	2407
จำนวนปีที่จัดเก็บ	9	9	10	10	11	11
จำนวนความมีชีวิตที่เหลือ log_{10}CFU/ml	5.074	5.985	5.412	4.906	6.686	5.143
แหล่งที่มาของเชื้อ	กทม.	กทม.	-	-	กทม.	-
ตัวอย่างที่พบเชื้อ	CSF	CSF	-	-	-	-
ลักษณะโคโลนีบน chocolate agar	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาว ขุ่นขนาด ~ 0.5-1 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาว ขุ่นขนาด ~ 0.5-1 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาว ขุ่นขนาด ~ 0.5-1 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่นขนาด ~ 0.5-1 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่นขนาด ~ 0.5-1 มม.	กลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีขาว ขุ่นขนาด ~ 0.5-1 มม.
ลักษณะจากการย้อมสี	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod	gram-rod
xv factor	+	+	+	+	+	+

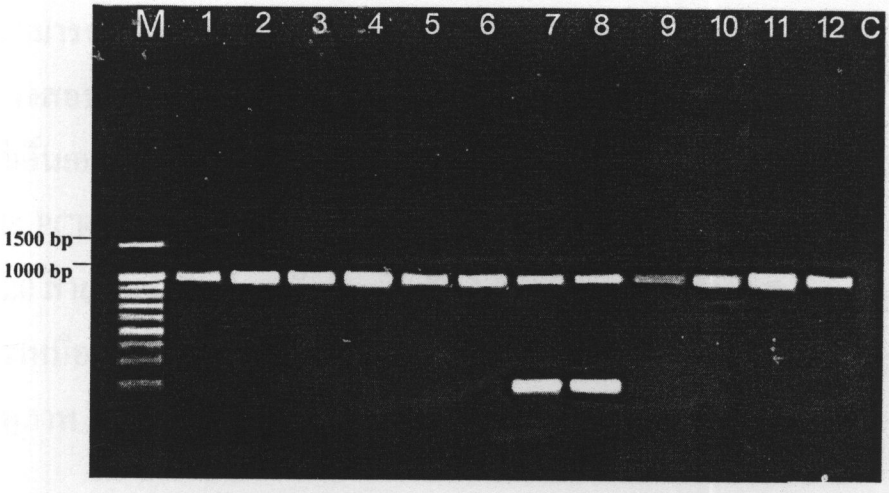
การตรวจสอบพันธุกรรมของสายพันธุ์แบคทีเรีย (genetic characteristics)

ผลการสกัดแยกดีเอ็นเอ

สามารถสกัดแยกดีเอ็นเอด้วยวิธี boiling lysis method จากเชื้อแบคทีเรียจำนวน 238 สายพันธุ์ จากแบคทีเรีย 12 ชนิด ได้แก่ *S. aureus, S. epidermidis, E. faecalis, E. faecium, K. pneumoniae, E. coli, E. cloacae, S. marcescens, P. aeruginosa, A. baumannii, B. cepacia* และ *H. influenzae* นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ดูลักษณะทางพันธุกรรมด้วยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ universal primer และ restriction analysis

ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR

สามารถใช้เทคนิค PCR ขยายยีนส่วน 16S rRNA ของเชื้อทั้ง 12 ชนิด จำนวน 238 สายพันธุ์ ด้วย universal primers U1 (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') และ U2 (5'-ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGACTTC-3') ที่สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ คือ denaturation 94°ซ. เป็นเวลา 1 นาที annealing 55°ซ. เป็นเวลา 1 นาที และ extension 72°ซ. เป็นเวลา 2 นาที เมื่อตรวจดู PCR product ที่ได้ ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose ที่ละลายใน TBE (Tris boric acid EDTA) buffer และเทียบขนาดของ DNA product ที่ได้ กับ DNA marker ขนาด 100 bp พบว่า เชื้อทั้งหมดได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 996 bp เหมือนกันทุกสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อบางสายพันธุ์ มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นที่ประมาณ 150 bp ด้วย คาดว่าอาจเกิดจาก nonspecific amplifications (ดูภาพ 9)



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1 หมายถึง PCR product ของ *E. coli*

แถวที่ 2 หมายถึง PCR product ของ *E. cloacae*

แถวที่ 3 หมายถึง PCR product ของ *S. marcescens*

แถวที่ 4 หมายถึง PCR product ของ *K. pneumoniae*

แถวที่ 5 หมายถึง PCR product ของ *A. baumannii*

แถวที่ 6 หมายถึง PCR product ของ *P. aeruginosa*

แถวที่ 7 หมายถึง PCR product ของ *E. faecalis*

แถวที่ 8 หมายถึง PCR product ของ *E. faecium*

แถวที่ 9 หมายถึง PCR product ของ *S. aureus*

แถวที่ 10 หมายถึง PCR product ของ *S. epidermidis*

แถวที่ 11 หมายถึง PCR product ของ *B. cepacia*

แถวที่ 12 หมายถึง PCR product ของ *H. influenzae*

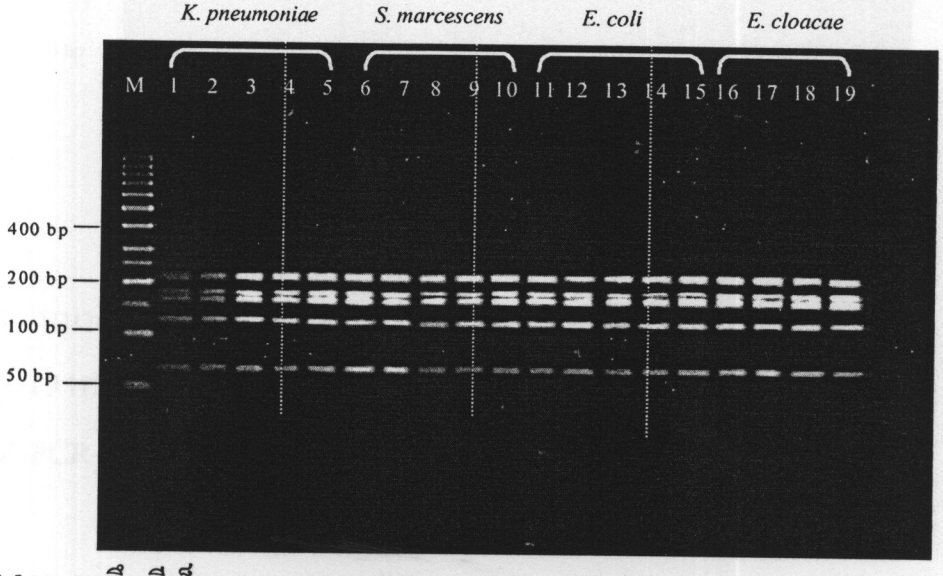
แถวที่ C หมายถึง negative and reagent control

ภาพ 9 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย universal primers ของยีนส่วน 16S rRNA ของเชื้อทั้ง 12 ชนิด

ผลการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตรวจสอบ PCR product ที่ได้

สามารถใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด คือ *Hae* III, *Dde* I, *Bst* BI, *Mnl* I และ *Alu* I ตรวจสอบ PCR product ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยการตัดทีละครั้ง พบว่าได้แถบดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด รูปแบบต่าง ๆ และจัดเป็นกลุ่มได้คือ

1. PCR product ของ *K. pneumoniae, S. marcescens, E. coli* และ*E. cloacae* ชนิดละ 20 สายพันธุ์ เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III พบว่าให้แถบดีเอ็นเอรูปแบบเดียว และเหมือนกันทั้งหมด จำนวน 5 แถบ มีขนาดประมาณ 68, 126, 161, 180 และ 210 bp (ดูภาพ 10)



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-5 หมายถึง PCR product ของ *K. pneumoniae* ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III

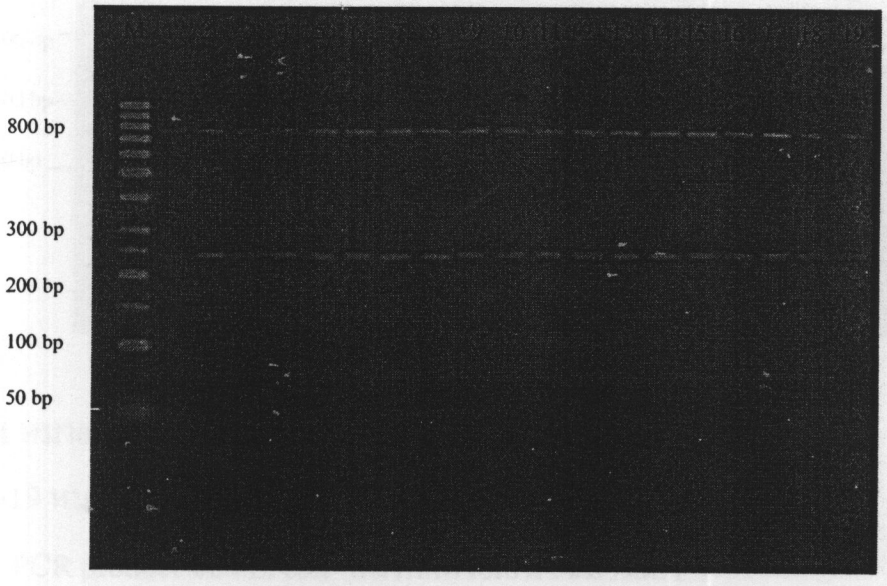
แถวที่ 6-10 หมายถึง PCR product ของ *S. marcescens* ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III

แถวที่ 11-15 หมายถึง PCR product ของ *E. coli* ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III

แถวที่ 16-19 หมายถึง PCR product ของ *E. cloacae* ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III

ภาพ 10 PCR product ของ *K. pneumoniae, S. marcescens, E. coli, E. cloacae* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III

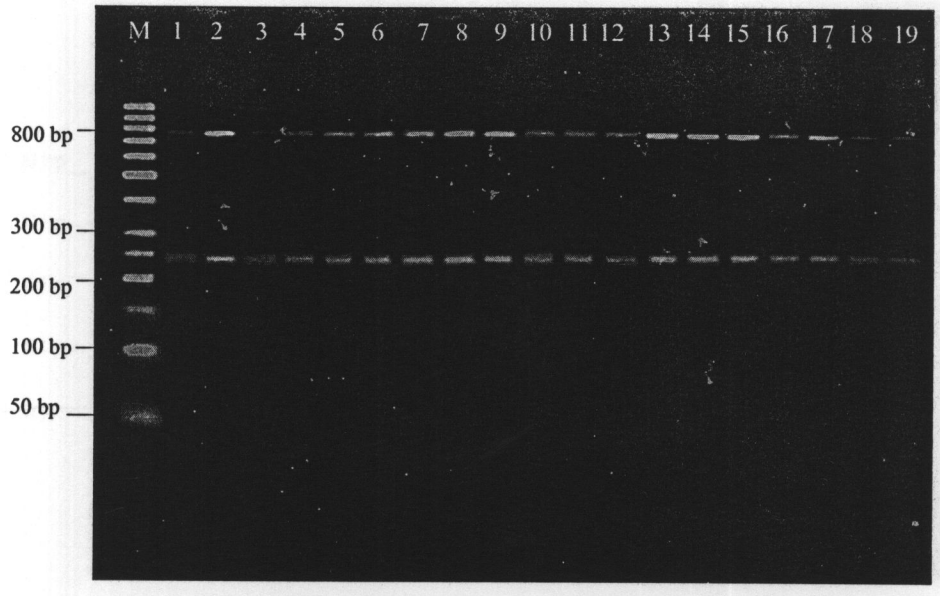
2. PCR product ของ *K. pneumoniae* และ *E. coli* ชนิดละ 20 สายพันธุ์ เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Dde* I พบว่า ให้แถบดีเอ็นเอรูปแบบเดียว และเหมือนกันทั้งหมด จำนวน 2 แถบ มีขนาดประมาณ 239 bp และ 757 bp (ดูภาพ 11 และ 12)



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-19 หมายถึง PCR product ของ *K. pneumoniae* ตัดด้วยเอนไซม์ *Dde* I

ภาพ 11 PCR product ของ *K. pneumoniae* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Dde* I

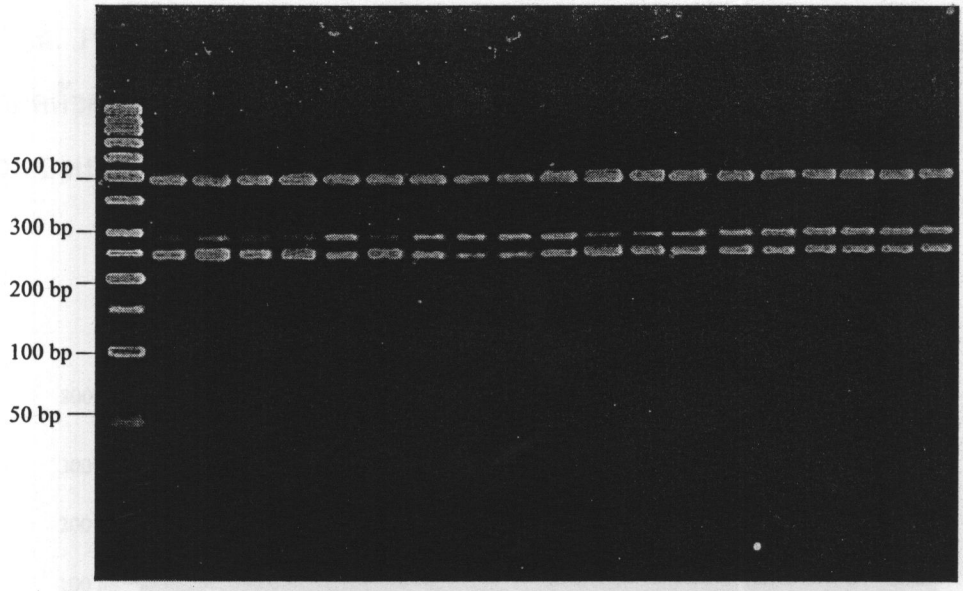


แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-19 หมายถึง PCR product ของ *E. coli* ตัดด้วยเอนไซม์ *Dde* I

ภาพ 12 PCR product ของ *E. coli* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Dde* I

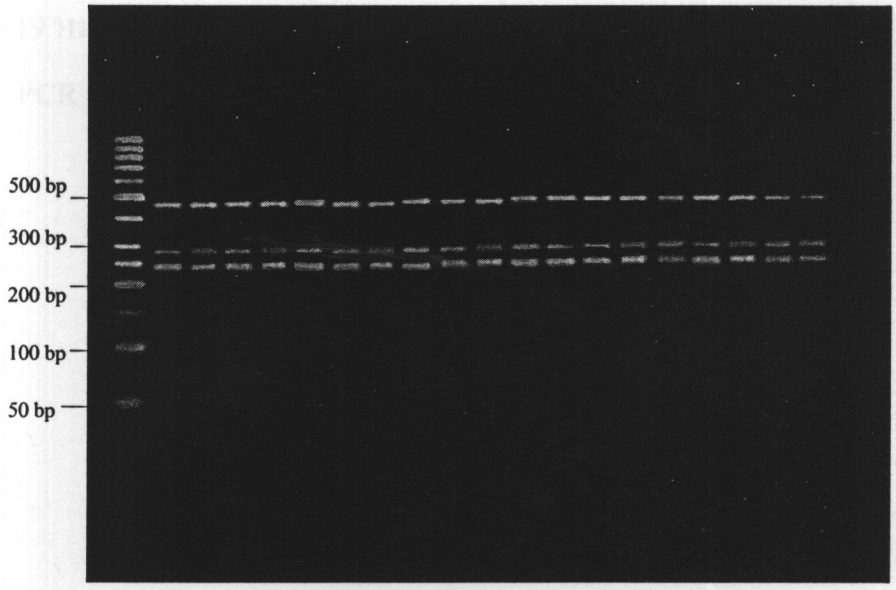
3. PCR product ของ *S. marcescens* และ *E. cloacae* ชนิดละ 20 สายพันธุ์ เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Dde* I พบว่าให้แถบดีเอ็นเอรูปแบบเดียว และเหมือนกันทั้งหมด จำนวน 3 แถบ ขนาดประมาณ 239, 283 และ 474 bp ดังแสดงในภาพ 13 และ 14



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-19 หมายถึง PCR product ของ *S. marcescens* ตัดด้วยเอนไซม์ *Dde* I

ภาพ 13 PCR product ของ *S. marcescens* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Dde* I

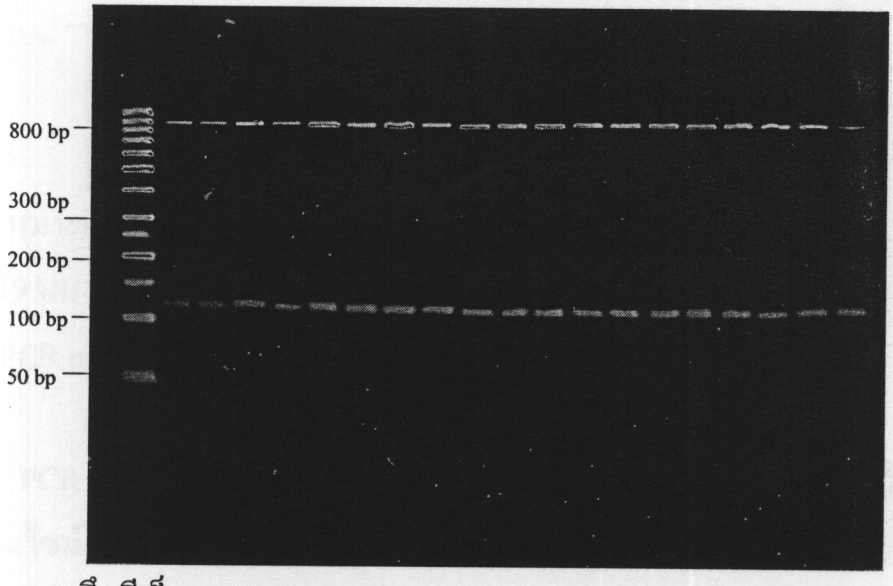


แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-19 หมายถึง PCR product ของ *E. cloacae* ตัดด้วยเอนไซม์ *Dde* I

ภาพ 14 PCR product ของ *E. cloacae* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Dde* I

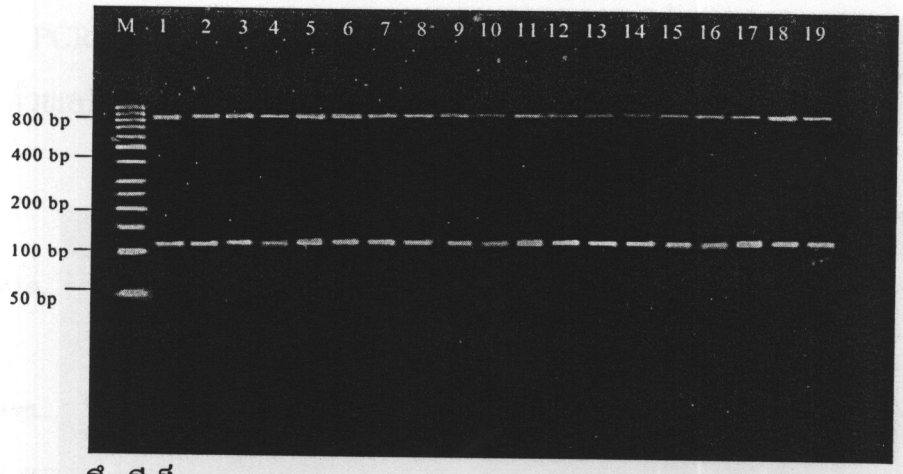
4. PCR product ของ *K. pneumoniae* และ *E. cloacae* ชนิดละ 20 สายพันธุ์ เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Bst* BI พบว่าให้แถบดีเอ็นเอรูปแบบเดียว และเหมือนกันทั้งหมด จำนวน 2 แถบ ขนาดประมาณ 120 และ 876 bp (ดูภาพ 15 และ 16)



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-19 หมายถึง PCR product ของ *K. pneumoniae* ตัดด้วยเอนไซม์ *Bst* BI

ภาพ 15 PCR product ของ *K. pneumoniae* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Bst* BI

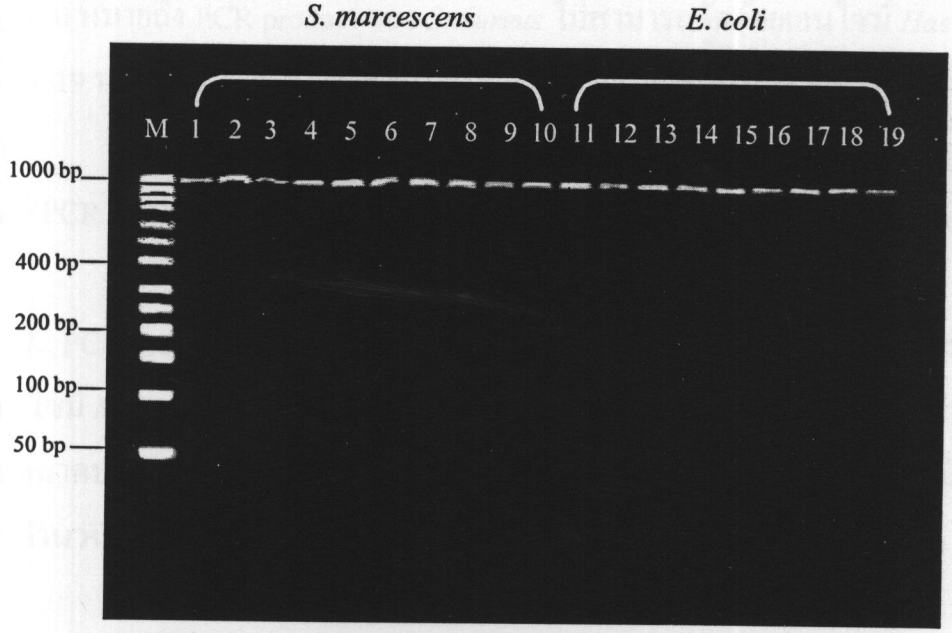


แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-19 หมายถึง PCR product ของ *E. cloacae* ตัดด้วยเอนไซม์ *Bst* BI

ภาพ 16 PCR product ของ *E. cloacae* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Bst* BI

5. PCR product ของ *S. marcescens* และ *E. coli* ชนิดละ 20 สายพันธุ์ เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Bst* BI พบว่า ไม่สามารถตัดได้ (ดูภาพ 17)



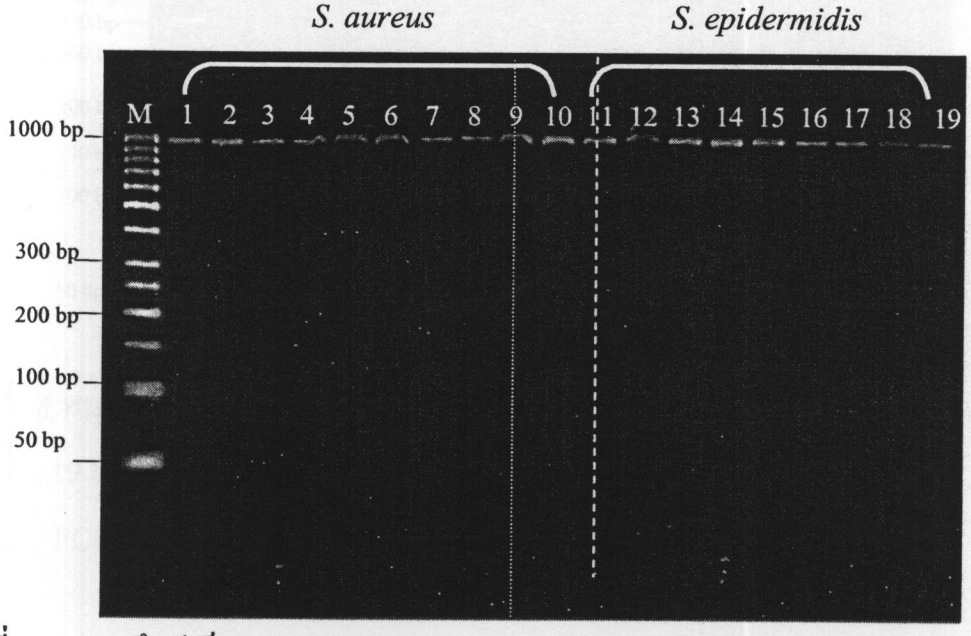
แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-10 หมายถึง PCR product ของ *S. marcescens* ไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ *Bst* BI

แถวที่ 11-19 หมายถึง PCR product ของ *E. coli* ไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ *Bst* BI

ภาพ 17 PCR product ของ *S. marcescens* และ *E. coli* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Bst* BI

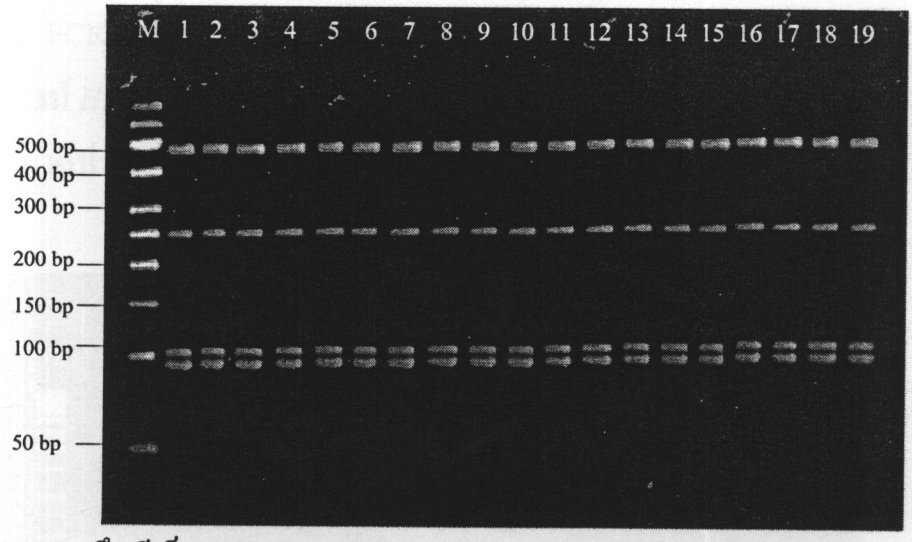
6. PCR product ของ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ชนิดละ 20 สายพันธุ์ เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III พบว่า ไม่สามารถตัดได้ (ดูภาพ 18)



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)
แถวที่ 1-10 หมายถึง PCR product ของ *S. aureus* ไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III
แถวที่ 11-19 หมายถึง PCR product ของ *S. epidermidis* ไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III

ภาพ 18 PCR product ของ *S. aureus* และ *S. epidermidis* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III

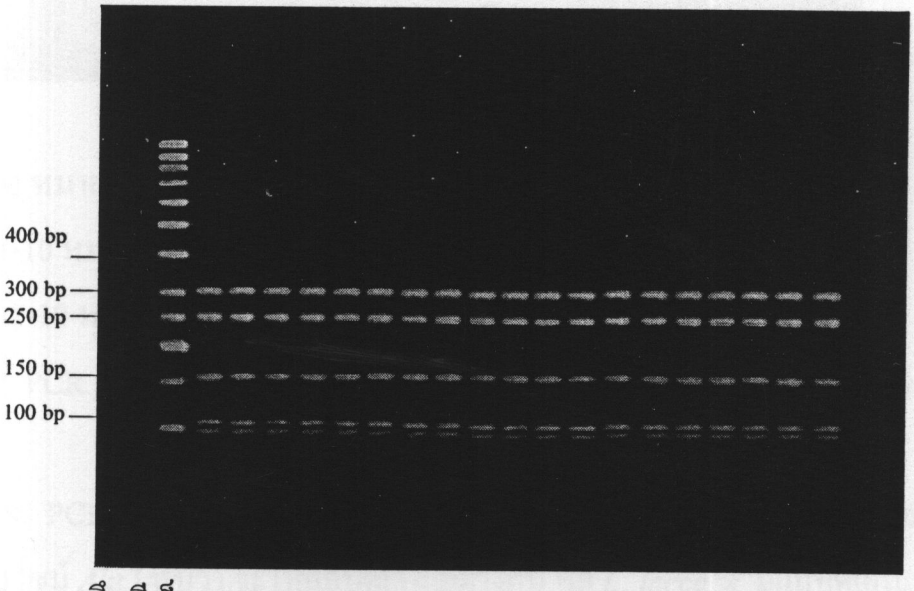
7. PCR product ของ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ชนิดละ 20 สายพันธุ์ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Mnl* I พบว่า จะให้แถบดีเอ็นเอต่างกัน คือ *S. aureus* มีแถบดีเอ็นเอ จำนวน 4 แถบ ขนาดประมาณ 99, 129, 259 และ 509 bp (ดูภาพ 19) ส่วน *S. epidermidis* มีแถบดีเอ็นเอจำนวน 5 แถบ ขนาดประมาณ 105, 130, 172, 269 และ 320 bp (ดูภาพ 20)



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-19 หมายถึง PCR product ของ *S. aureus* ตัดด้วยเอนไซม์ *Mnl* I

ภาพ 19 PCR product ของ *S. aureus* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Mnl* I

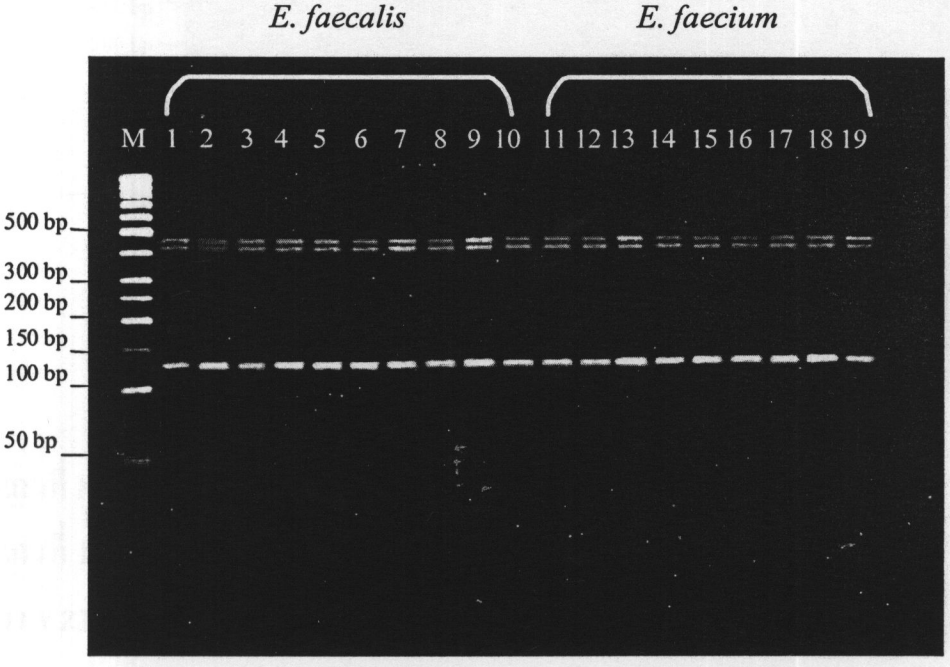


แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-19 หมายถึง PCR product ของ *S. epidermidis* ตัดด้วยเอนไซม์ *Mnl* I

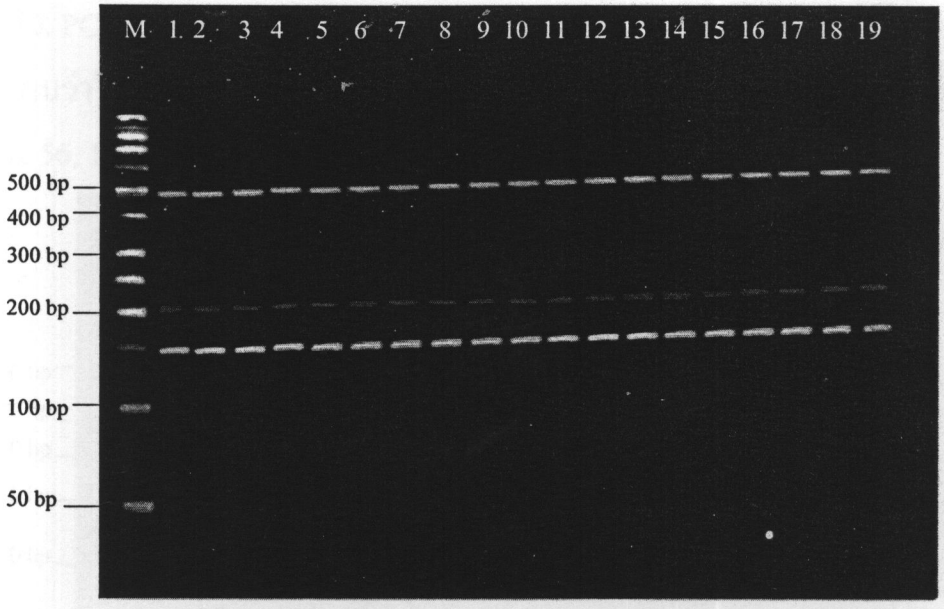
ภาพ 20 PCR product ของ *S. epidermidis* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Mnl* I

8. PCR product ของ *E. faecalis* และ *E. faecium* ชนิดละ 20 สายพันธุ์ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III พบว่าให้แถบดีเอ็นเอรูปแบบเดียว และเหมือนกันทั้งหมด จำนวน 3 แถบ ขนาดประมาณ 126, 413 และ 457 (ดูภาพ 21)



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)
แถวที่ 1-10 หมายถึง PCR product ของ *E. faecalis* ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III
แถวที่ 11-19 หมายถึง PCR product ของ *E. faecium* ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III
ภาพ 21 PCR product ของ *E. faecalis* และ *E. faecium* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III

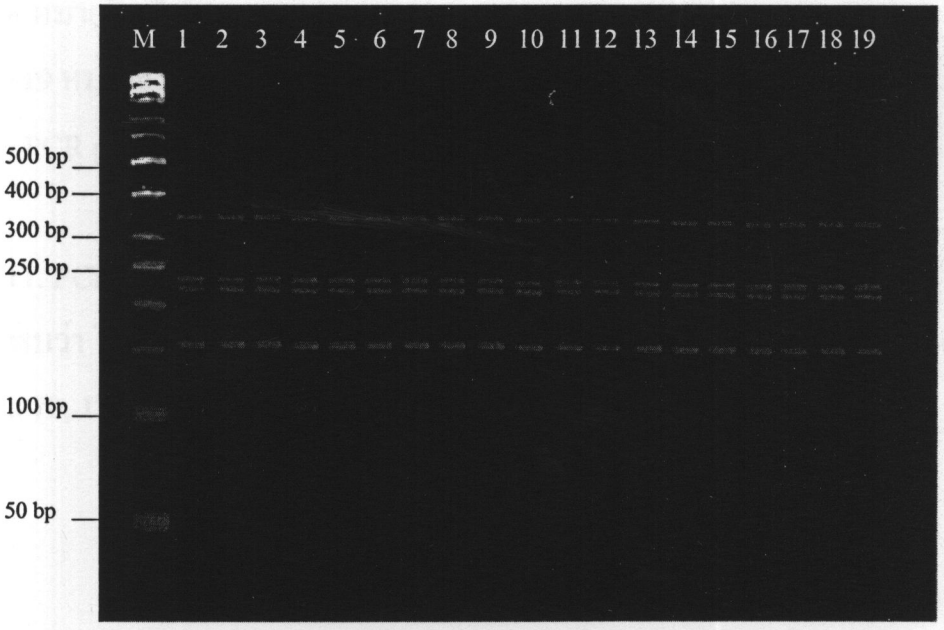
9. PCR product ของ *E. faecalis* และ *E. faecium* ชนิดละ 20 สายพันธุ์ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I พบว่า จะให้แถบดีเอ็นเอต่างกัน คือ *E. faecalis* มีแถบดีเอ็นเอ จำนวน 3 แถบ ขนาดประมาณ 156, 240 และ 570 bp (ดูภาพ 22) ส่วน *E. faecium* มีแถบดีเอ็นเอ จำนวน 4 แถบ ขนาดประมาณ 156, 230, 240 และ 370 bp (ดูภาพ 23)



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-19 หมายถึง PCR product ของ *E. faecalis* ตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I

ภาพ 22 PCR product ของ *E. faecalis* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Alu I*

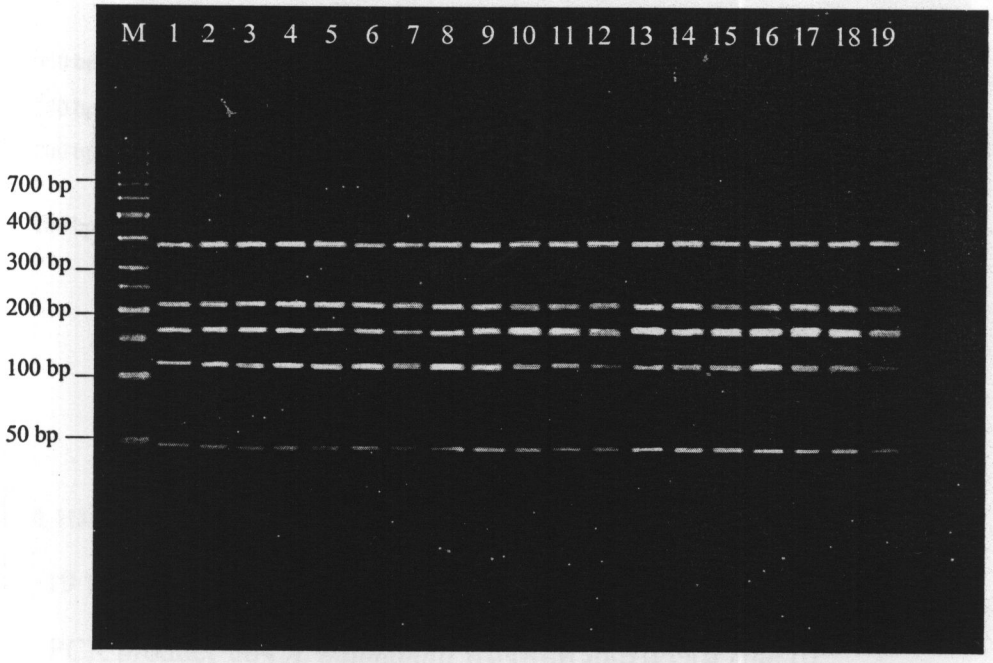


แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-19 หมายถึง PCR product ของ *E. faecium* ตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I

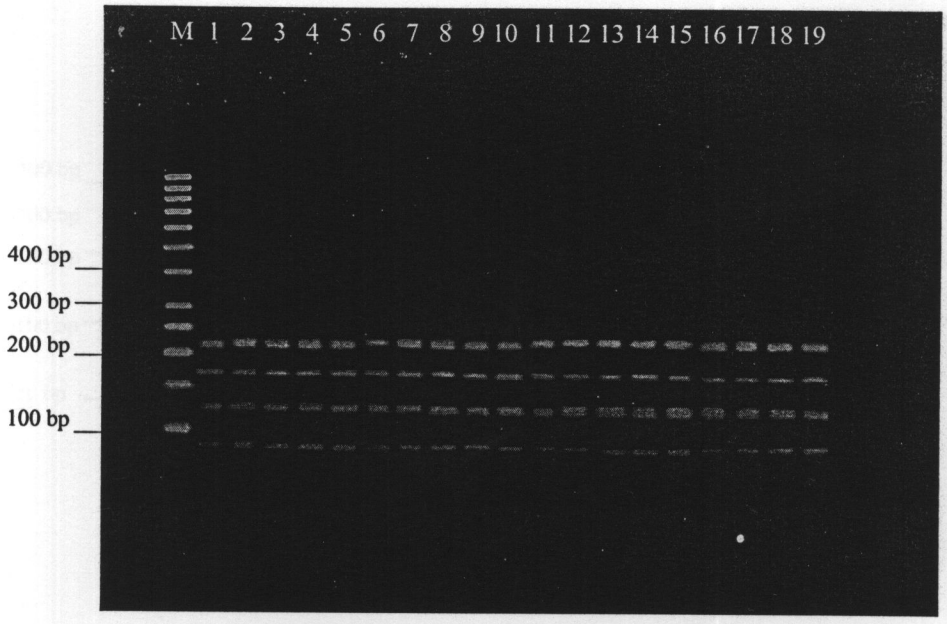
ภาพ 23 PCR product ของ *E. faecium* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I

10. PCR product ของ *P. aeruginosa,* จำนวน 20 สายพันธุ์ นำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III พบว่าให้แถบดีเอ็นเอรูปแบบเดียว และเหมือนกันทั้งหมด จำนวน 5 แถบ ขนาดประมาณ 56, 139, 179, 223 และ 399 bp ดังแสดงในภาพ 24



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)
แถวที่ 1-19 หมายถึง PCR product ของ *P. aeruginosa* ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III
ภาพ 24 PCR product ของ *P. aeruginosa* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III

11. PCR product ของ *A. baumannii* จำนวน 20 สายพันธุ์ นำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III พบว่า ให้แถบดีเอ็นเอรูปแบบเดียว และเหมือนกันทั้งหมด จำนวน 4 แถบ ขนาดประมาณ 70, 125, 180 และ 310 bp ดังแสดงในภาพ 25

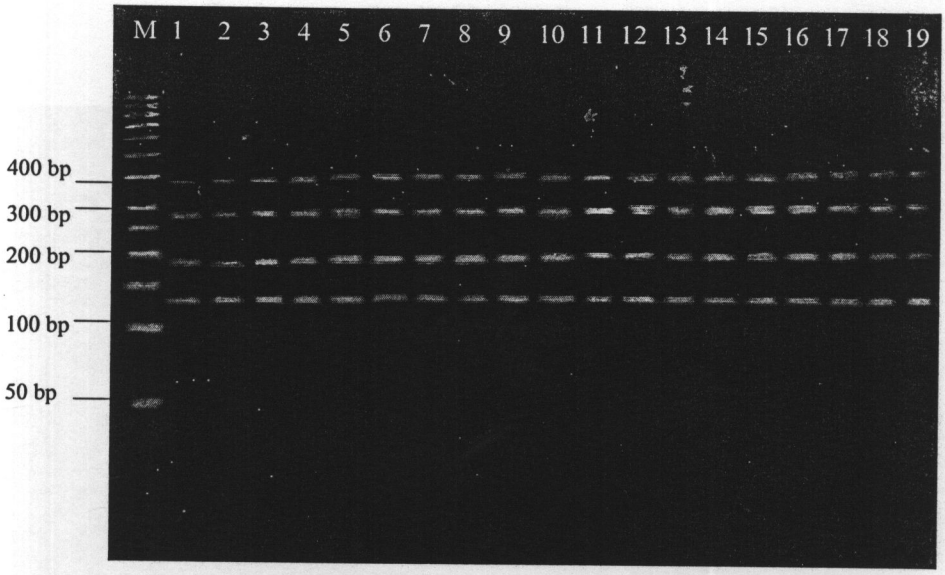


แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-19 หมายถึง PCR product ของ *A. baumannii* ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III

ภาพ 25 PCR product ของ *A. baumannii* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III

12. PCR product ของ *H. influenzae* จำนวน 20 สายพันธุ์ นำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III พบว่าให้แถบดีเอ็นเอรูปแบบเดียว และเหมือนกันทั้งหมด จำนวน 4 แถบ ขนาดประมาณ 135, 191, 280 และ 390 bp ดังแสดงในภาพ 26



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-19 หมายถึง PCR product ของ *H. influenzae* ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III

ภาพ 26 PCR product ของ *H. influenzae* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III

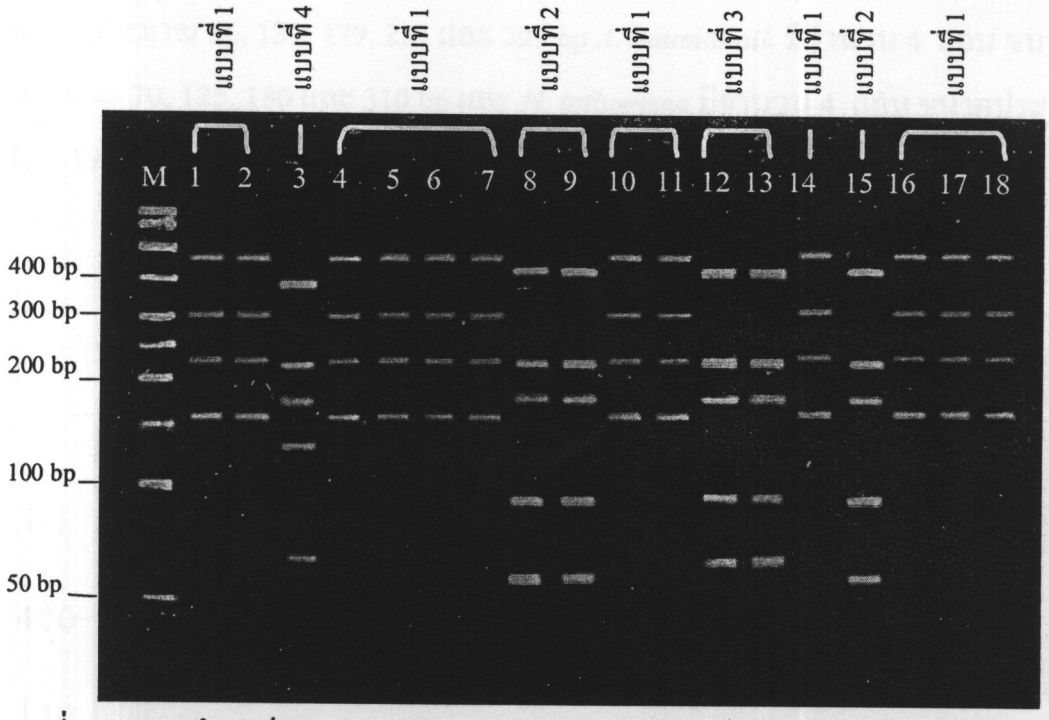
13. PCR product ของ *B. cepacia* จำนวน 18 สายพันธุ์ ให้แถบดีเอ็นเอต่างกัน 4 รูปแบบ คือ

13.1 แบบที่ 1 จำนวน 12 สายพันธุ์ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอ 4 แถบ ขนาดประมาณ 150, 210, 290 และ 450 bp ดังแสดงในภาพ 27 แถวที่ 1-2, 4-7, 10-11, 14, 16-18

13.2 แบบที่ 2 จำนวน 3 สายพันธุ์ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอ 5 แถบ ขนาดประมาณ 60, 99, 175, 230 และ 432 bp ดังแสดงในภาพ 27 แถวที่ 8-9, 15

13.3 แบบที่ 3 จำนวน 2 สายพันธุ์ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอ 5 แถบ ขนาดประมาณ 78, 99, 175, 224 และ 420 bp ดังแสดงในภาพ 27 แถวที่ 12-13

13.4 แบบที่ 4 จำนวน 1 สายพันธุ์ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอ 5 แถบ ขนาดประมาณ 78, 130, 163, 225 และ 400 bp ดังแสดงในภาพ 27 แถวที่ 3



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-19 หมายถึง PCR product ของ *B. cepacia* ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III

ภาพ 27 PCR product ของ *B. cepacia* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III

การตรวจสอบแบคทีเรียตัวอย่างจากแบบแผนดีเอ็นเอยีนส่วน 16S rRNA ที่ได้จากเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III, *Dde* I, *Bst BI*, *Mnl* I และ *Alu* I สามารถจัดรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างแบคทีเรียได้ โดยเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III ตัวแรกตัดจะได้รูปแบบดีเอ็นเอแบ่งออกเป็น 5 รูปแบบ คือ

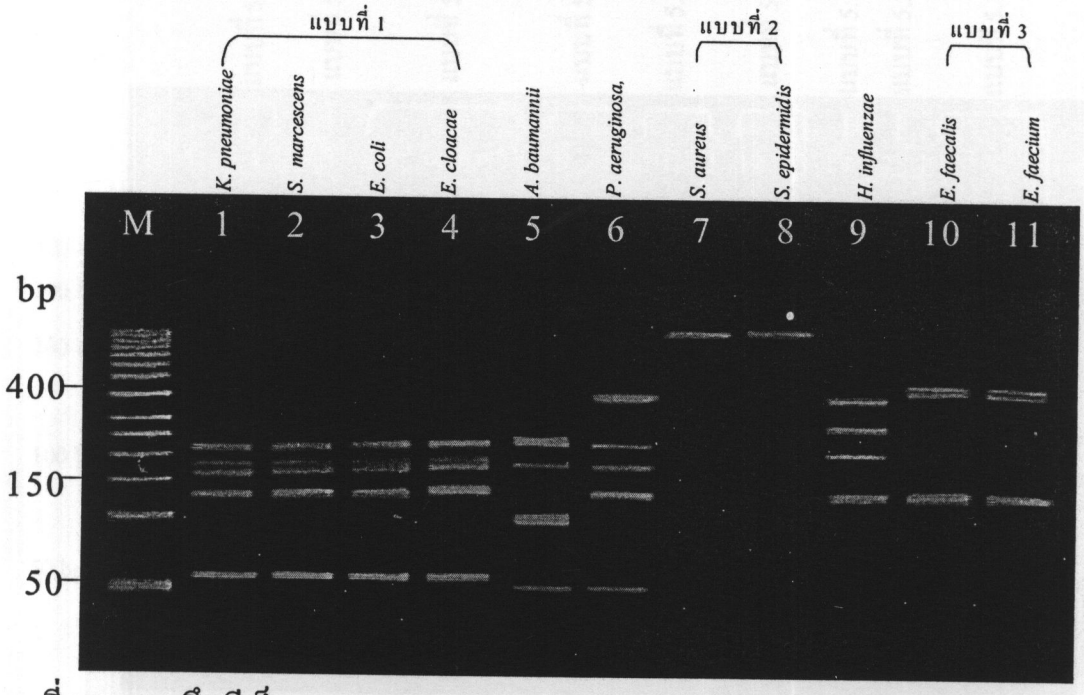
1. รูปแบบที่ 1 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกันจำนวน 5 แถบ ได้แก่ เชื้อ *K. pneumoniae, S. marcescens, E. coli* และ *E. cloacae* มีขนาดประมาณ 68, 126, 161, 180 และ 210 bp ดังแสดงในภาพ 28 แถวที่ 1-4

2. รูปแบบที่ 2 ไม่สามารถตัดได้ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ดังแสดงในภาพ 28 แถวที่ 7-8

3. รูปแบบที่ 3 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกันจำนวน 3 แถบ ได้แก่ เชื้อ *E. faecalis* และ *E. faecium* มีขนาดประมาณ 126, 413 และ 457 bp ดังแสดงในภาพ 28 แถวที่ 10-11

4. รูปแบบที่ 4 มีแถบดีเอ็นเอต่างกัน ได้แก่ เชื้อ *P. aeruginosa* มีจำนวน 5 แถบ

ขนาดประมาณ 56, 139, 179, 223 และ 399 bp *A. baumannii* มีจำนวน 4 แถบ ขนาดประมาณ 70, 125, 180 และ 310 bp และ *H. influenzae* มีจำนวน 4 แถบ ขนาดประมาณ 135, 191, 280 และ 390 bp ดังแสดงในภาพ 28 แถวที่ 5, 6 และ 9



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-4 หมายถึง รูปแบบดีเอ็นเอ รูปแบบที่ 1 (แถวที่ 1 *K. pneumoniae* แถวที่ 2 *S. marcescens* แถวที่ 3 *E. coli* และแถวที่ 4 *E. cloacae*)

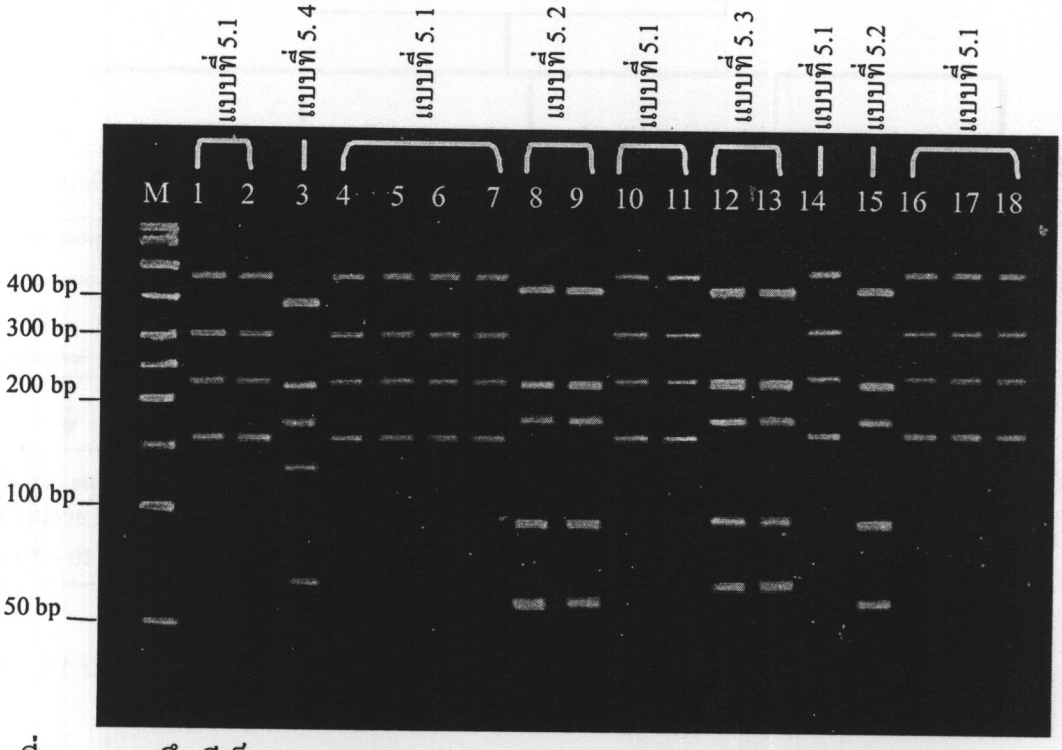
แถวที่ 7-8 หมายถึง รูปแบบดีเอ็นเอ รูปแบบที่ 2 (แถวที่ 7 *S. aureus* และแถวที่ 8 *S. epidermidis*)

แถวที่ 10-11 หมายถึง รูปแบบดีเอ็นเอ รูปแบบที่ 3 (แถวที่ 10 *E. faecalis* และแถวที่ 11 *E. faecium*)

แถวที่ 5, 6, 9 หมายถึง รูปแบบดีเอ็นเอ รูปแบบที่ 4 (แถวที่ 5 *A. baumannii* แถวที่ 6 *P. aeruginosa* แถวที่ 9 *H. influenzae*)

ภาพ 28 รูปแบบแถบดีเอ็นเอรูปแบบที่ 1-4 ที่พบในตัวอย่างแบคทีเรียเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III ตัด PCR product

5. รูปแบบที่ 5 มีแถบดีเอ็นเอ 4 รูปแบบในเชื้อชนิดเดียวกัน คือ *B. cepacia* ดังแสดงในภาพ 29

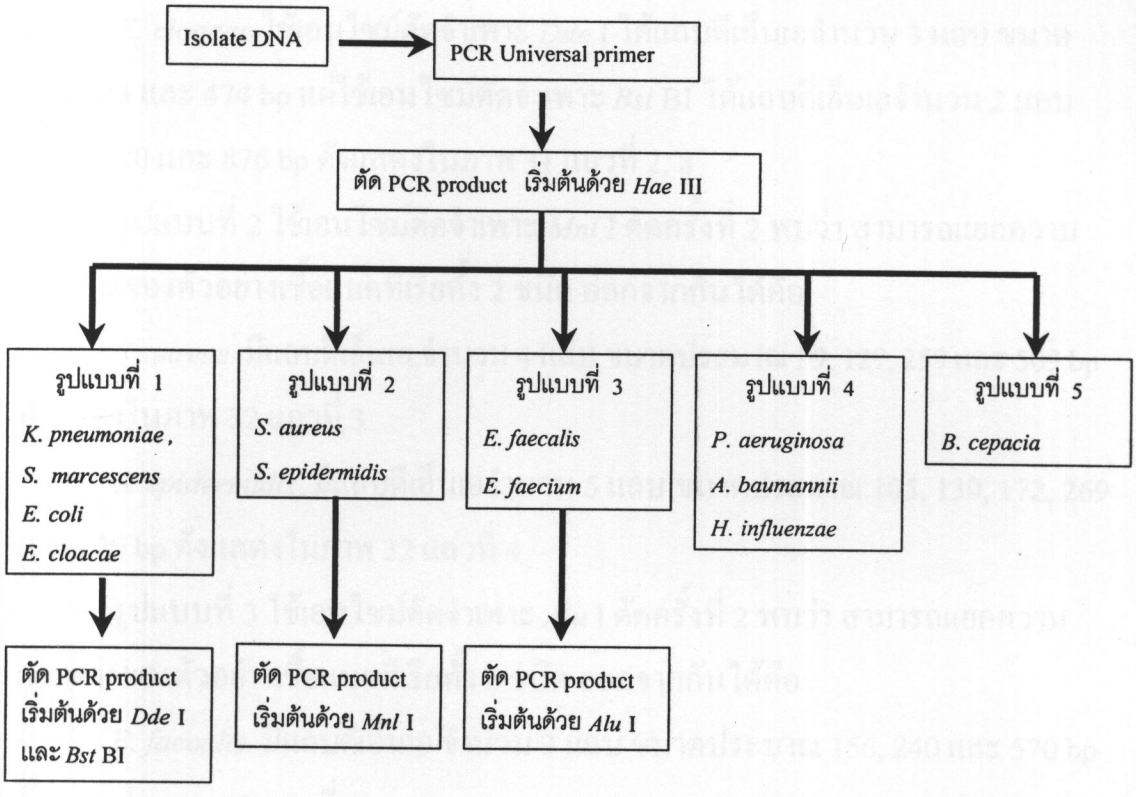


แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-18 หมายถึง รูปแบบดีเอ็นเอ รูปแบบที่ 5 ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอ 4 รูปแบบ คือ แบบที่ 5.1 แบบที่ 5.2 แบบที่ 5.3 แบบที่ 5.4 ในเชื้อชนิดเดียวกัน คือ *B. cepacia*

ภาพ 29 รูปแบบแถบดีเอ็นเอรูปแบบที่ 5 ที่พบในตัวอย่างแบคทีเรียเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III ตัด PCR product

จากข้อมูลเบื้องต้นในการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III ตัด PCR product แล้วได้รูปแบบดีเอ็นเอ 5 รูปแบบ จากนั้นได้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะอื่นอีก 4 ชนิดคือ *Dde* I, *Bst BI*, *Mnl* I และ *Alu* I เพื่อใช้ช่วยแยกความแตกต่างของรูปแบบที่ 1, 2 และ 3 ดังแสดงในภาพ 30 ทำให้สามารถแยกชนิดของแบคทีเรียจากรูปแบบดังกล่าวได้ดังนี้



ภาพ 30 แผนภูมิการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

รูปแบบที่ 1 ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I และ*Bst BI* ตัดครั้งที่ 2 และ 3 ตามลำดับ โดยตัดทีละครั้ง ครั้งละ 1 เอนไซม์ พบว่า สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ออกจากกันได้ คือ

K. pneumoniae ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ ขนาด 239 และ 757 bp แต่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst BI* ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ ขนาด 120 และ 876 bp ดังแสดงในภาพ 31 แถวที่ 3, 5

E. coli ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ ขนาด 239 และ 757 bp แต่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst BI* ไม่สามารถตัดได้ ดังแสดงในภาพ 31 แถวที่ 1, 6

S. marcescens ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 3 แถบ ขนาด 239, 283 และ 474 bp แต่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst* BI ไม่สามารถตัดได้ ดังแสดงในภาพ 31 แถวที่ 4, 7

E. cloacae ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 3 แถบ ขนาด 239, 283 และ 474 bp แต่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst* BI ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ ขนาด 120 และ 876 bp ดังแสดงในภาพ 31 แถวที่ 2, 8

รูปแบบที่ 2 ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mnl* I ตัดครั้งที่ 2 พบว่า สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ออกจากกันได้คือ

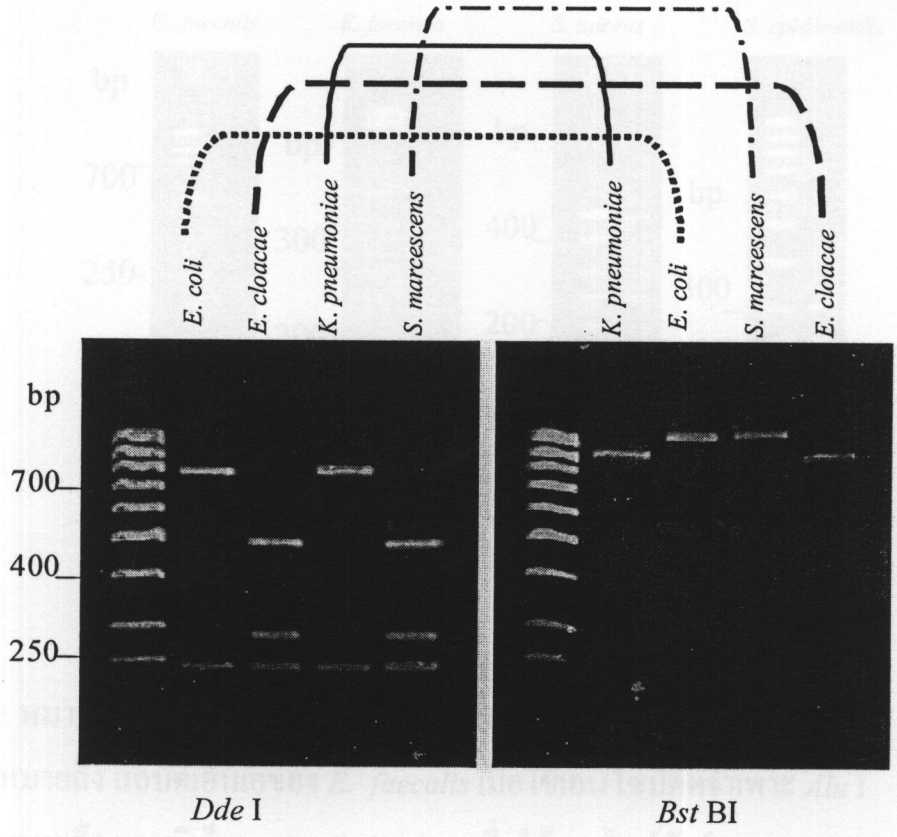
S. aureus มีแถบดีเอ็นเอ จำนวน 4 แถบ ขนาดประมาณ 99, 129, 259 และ 509 bp ดังแสดงในภาพ 32 แถวที่ 3

S. epidermidis มีแถบดีเอ็นเอจำนวน 5 แถบ ขนาดประมาณ 105, 130, 172, 269 และ 320 bp ดังแสดงในภาพ 32 แถวที่ 4

รูปแบบที่ 3 ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I ตัดครั้งที่ 2 พบว่า สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ออกจากกันได้คือ

E. faecalis มีแถบดีเอ็นเอ จำนวน 3 แถบ ขนาดประมาณ 156, 240 และ 570 bp ดังแสดงในภาพ 32 แถวที่ 1

E. faecium มีแถบดีเอ็นเอ จำนวน 4 แถบ ขนาดประมาณ 156, 230, 240 และ 370 bp ดังแสดงในภาพ 32 แถวที่ 2



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)

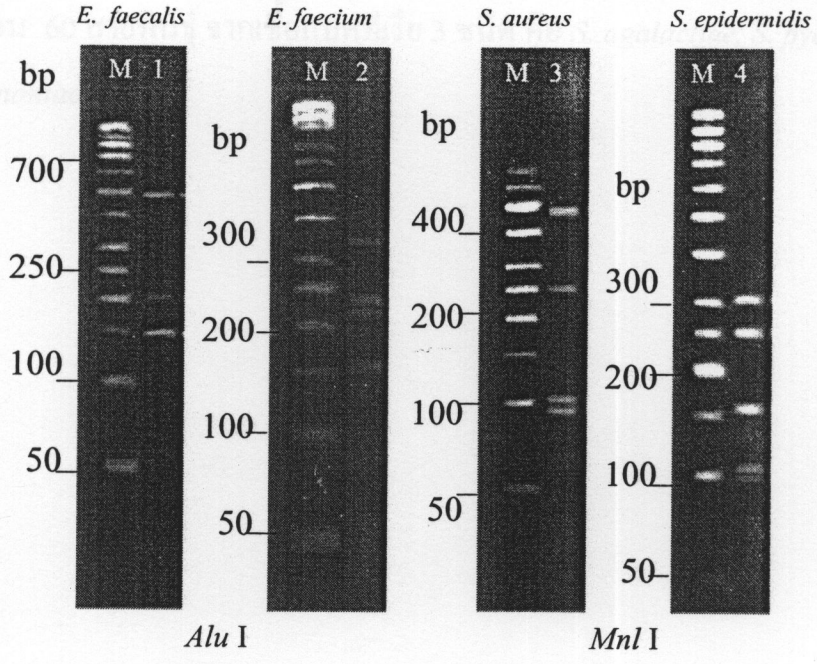
แถวที่ 1, 6 หมายถึงแถบดีเอ็นเอของ *E. coli* เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I และ *Bst* BI

แถวที่ 2, 8 หมายถึงแถบดีเอ็นเอของ *E. cloacae* เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I และ *Bst* BI

แถวที่ 3, 5 หมายถึงแถบดีเอ็นเอของ *K. pneumoniae* เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I และ *Bst* BI

แถวที่ 4, 7 หมายถึงแถบดีเอ็นเอของ *S. marcescens* เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I และ *Bst* BI

ภาพ 31 รูปแบบแถบดีเอ็นเอหลังใช้เอนไซม์ *Dde* I และ *Bst* BI ตัด



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder)
แถวที่ 1 หมายถึง แถบดีเอ็นเอของ *E. faecalis* เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I
แถวที่ 2 หมายถึง แถบดีเอ็นเอของ *E. faecium* เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I
แถวที่ 3 หมายถึง แถบดีเอ็นเอของ *S. aureus* เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mnl* I
แถวที่ 4 หมายถึง แถบดีเอ็นเอของ *S. epidermidis* เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mnl* I
ภาพ 32 รูปแบบแถบดีเอ็นเอหลังใช้เอนไซม์ *Alu* I และ*Mnl* I ตัด

จากการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้ universal primers ขยายยีนส่วน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 15 ชนิดหลังจัดเก็บไว้แล้วช่วงเวลา 2-12 ปี นั้น สามารถใช้เทคนิคนี้ขยายยีนได้ขนาด 996 bp และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด (*Hae* III, *Mnl* I, *Alu* I, *Dde* I, *Bst* BI) ช่วยแยกชนิดได้จำนวน 238 สายพันธุ์ จากแบคทีเรีย 12 ชนิด คือ *S. aureus* (20 สายพันธุ์), *S. epidermidis* (20 สายพันธุ์), *E. faecalis* (20 สายพันธุ์), *E. faecium* (20 สายพันธุ์), *K. pneumoniae* (20 สายพันธุ์), *E. coli* (20 สายพันธุ์), *E. cloacae* (20 สายพันธุ์), *S. marcescens* (20 สายพันธุ์), *P. aeruginosa* (20 สายพันธุ์), *A. baumannii* (20 สายพันธุ์), *B. cepacia* (18 สายพันธุ์), และ *H. influenzae* (20 สายพันธุ์) และยังไม่สามารถใช้เทคนิคนี้ขยายยีน

ดังกล่าวจำนวน 60 สายพันธุ์ จากเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *S. agalactiae, S. pyogenes,* และ *S. pneumoniae*

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาคุณภาพของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียทั้ง 15 ชนิด ได้แก่ *S. aureus, S. epidermidis, E. faecalis, E. faecium, A. baumannii, P. aeruginosa, E. cloacae, K. pneumoniae, E. coli, S. macescens, B. cepacia S. pneumoniae, S. pyogenes, S. agalactiae, H. influenzae* ที่เก็บรักษาไว้แล้วด้วยวิธีแช่แข็งอุณหภูมิ -70°ซ. เป็นเวลา 2-12 ปี สรุปได้ว่า

1. การศึกษาความมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างแต่ละชนิดเมื่อนำมาคำนวณให้เป็นค่า log ฐาน 10 จะมีค่าความมีชีวิต อยู่ในช่วงต่าง ๆ กัน ดังนี้

ช่วง 8-11 $\log_{10}$CFU/ml ได้แก่ *K. pneumoniae, E. coli, E. cloacae, S. marcescens, S. aureus, E. faecalis, E. faecium, S. epidermidis* และ*A. baumannii*

ช่วง 7-10 $\log_{10}$CFU/ml ได้แก่ *P. aeruginosa, B. cepacia*

ช่วง 6-9 $\log_{10}$CFU/ml ได้แก่ *S. pyogenes, S. agalactiae*

ช่วง 5-8 $\log_{10}$CFU/ml คือ *H. influenzae*

ช่วง 5-7 $\log_{10}$CFU/ml คือ *S. pneumoniae*

อย่างไรก็ตามค่าที่ได้จะไม่แตกต่างกันมากนักทั้งในชนิดของเชื้อ จำนวนปีที่จัดเก็บ และจำนวนเชื้อที่นำมาทดสอบ ชนิดละ 20 สายพันธุ์ ยกเว้น *S. pneumoniae* ทั้ง 20 สายพันธุ์ มีค่าความมีชีวิตน้อยกว่า 8 $\log_{10}$CFU/ml ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เริ่มเก็บ ควรให้มีปริมาณมากกว่าหรือเท่ากับ 8-10 $\log_{10}$CFU/ml ตามที่ Perry (1995, p. 27) แนะนำไว้ ซึ่งเป็นค่าความมีชีวิตที่ยอมรับได้ของการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วยวิธีการแช่แข็ง

2. การศึกษาความบริสุทธิ์ ด้วยการเพาะเชื้อบน Enrichment media แล้วตรวจดูด้วยสายตาพบว่าเชื้อทุกตัวมีความบริสุทธิ์

3. การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ จากลักษณะโคโลนี เซลล์จากการย้อมสี และคุณสมบัติทางเคมีและชีวเคมี พบว่ามีความถูกต้องตามสายพันธุ์ทุกสายพันธุ์

4. การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ ด้วยการใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนยีนส่วน 16S rRNA โดยใช้ universal primer นอกจากจะได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 996 bp แล้ว ในบางกลุ่มเชื้อโดยเฉพาะพวก gram positive จะพบ nonspecific amplification ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 150-bp ด้วย และเมื่อนำ PCR product ที่ได้มาตัดด้วย restriction endonuclease 5 ชนิด คือ *Hae* III, *Dde* I, *Bst* BI, *Mnl* I และ *Alu* I นำมาเปรียบเทียบกัน สามารถสรุปได้ว่า

PCR product ของ *K. pneumoniae*, *E. coli* , *E. cloacae* และ *S. marcescens* ชนิดละ 20 สายพันธุ์ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III จะได้แถบดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งหมด แต่เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I หรือ *Bst* BI จะให้แถบดีเอ็นเอต่างกันในแต่ละสปีชีส์ และเหมือนกันในสปีชีส์เดียวกัน

Staphylococcus aureus และ *Staphylococcus epidermidis* ชนิดละ 20 สายพันธุ์ ไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III แต่เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Mnl* I จะให้แถบ DNA ต่างกันในแต่ละสปีชีส์ และเหมือนกันในสปีชีส์เดียวกัน

Enterococcus faecalis และ *Enterococcus faecium* ชนิดละ 20 สายพันธุ์ ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกันเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III แต่เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I จะให้แถบดีเอ็นเอต่างกันในแต่ละสปีชีส์ และเหมือนกันในสปีชีส์เดียวกัน

Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii และ *Haemophilus influenzae* ชนิดละ 20 สายพันธุ์ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III ให้แถบดีเอ็นเอต่างกันในแต่ละสปีชีส์ และเหมือนกันในสปีชีส์เดียวกัน

Bukholderia cepacia จำนวน 18 สายพันธุ์ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III ให้แถบดีเอ็นเอเป็น 4 แบบในสปีชีส์เดียวกัน

สรุปได้ว่า การตรวจสอบคุณภาพของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีค่าความมีชีวิตอยู่ในเกณฑ์ที่ต้องการ คือมากกว่าหรือเท่ากับ 8 $\log_{10}$CFU/ml คิดเป็น

ร้อยละ 83 และไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ต้องการคิดเป็นร้อยละ 17 มีความบริสุทธิ์คิดเป็นร้อยละ 100 มีลักษณะทางฟีโนไทป์เป็นที่ยอมรับได้ สามารถนำแบคทีเรียตัวอย่างนี้ไปใช้ในการศึกษาและงานวิชาการอื่น ๆ ได้ ส่วนลักษณะทางพันธุกรรมนั้นควรทำการทดสอบเพิ่มเติมในเชื้อบางชนิดก่อนนำไปใช้ในงานที่ต้องการลักษณะทางพันธุกรรมเฉพาะสำหรับเชื้อแต่ละชนิด

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาคุณภาพสายพันธุ์แบคทีเรียทางการแพทย์หลังจัดเก็บด้วยวิธีการแช่แข็งมาแล้ว จากช่วงเวลา 2-12 ปี ตามสมมติฐานการศึกษาที่ว่า วิธีเก็บรักษาแบคทีเรียด้วยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°ซ. และมี Cryoprotectants ที่เหมาะสม สามารถ ใช้เก็บรักษาแบคทีเรียแบบระยะยาวได้หลายชนิด และมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนความมีชีวิต ความบริสุทธิ์ และความคงคุณลักษณะทั้งด้านฟีโนไทป์ และจีโนไทป์ เป็นที่ยอมรับได้ และสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการเก็บรักษาแบคทีเรีย ได้ดี

จากข้อมูลที่ได้ ทำให้ทราบว่าการใช้วิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°ซ. สำหรับเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียในระยะยาวนั้น สามารถใช้เก็บรักษาแบคทีเรียกลุ่มตัวอย่างให้มีชีวิตรอดอยู่ได้มากกว่า 10 ปี และส่วนมากมีจำนวนความมีชีวิตอยู่ในเกณฑ์ที่ต้องการคือ 8-10 $\log_{10}$CFU/ml โดยเป็นค่าเริ่มต้นที่ควรเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย ตามที่ Perry (1995, p. 27) เสนอ จึงสอดคล้องกับรายงานของ Kirsop (1985, pp. 287-314) และ Feltham et al., (1978, pp. 313-316) ที่แนะนำไว้ว่า การเก็บรักษาเชื้อโดยการแช่แข็ง ถือเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะยาว สามารถเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด รวมทั้งให้ผลการเก็บรักษาครอบคลุม 100% นอกจากนี้ มีเซลล์หลายชนิดที่ต้องการอัตราการแช่แข็ง ที่เหมาะสมเพื่อรักษาความมีชีวิตไว้ (Mazur, 1977, pp. 251-272) แต่แบคทีเรียหลายชนิดไม่จำเป็นต้องควบคุมอัตราการแช่แข็ง ถ้ามีการใช้ glycerol ละลายกับตัวเชื้อแล้วจะช่วยรักษาความมีชีวิตไว้ได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อต้องเก็บรักษาเซลล์ที่มีข้อมูลว่าตายง่ายควรมีการใช้เครื่องมือควบคุมอัตราการแช่แข็งเพื่อป้องกันความเสียหายกับเซลล์ตลอดการแช่แข็งด้วย (Perry, 1995, pp. 29-30) ดังนั้นถ้าต้องการ

พัฒนาการเก็บรักษาทรัพยากรชีวภาพหลาย ๆ ชนิดให้ได้มาตรฐานนั้นควรมีการวางแผนก่อนการเก็บรักษา สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือ ระยะเวลา ชนิดและจำนวนของเซลล์ ที่ต้องการจัดเก็บ ดังเช่นในการทดลองครั้งนี้ เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียในช่วงเวลา 2-12 ปี แล้ว ไม่สามารถเลือกชนิดของเชื้อให้ครอบคลุมในทุก ๆ ปีที่ต้องการได้ เพราะการเก็บรักษาเชื้อไว้ก่อนหน้านั้น เป็นแบบสุ่มไม่ได้เลือกชนิดและนับจำนวนก่อนเก็บรักษา ทำให้ในบางปีจะไม่มีการเก็บรักษาเชื้อบางชนิดไว้เลย และไม่มีข้อมูลความมีชีวิตเริ่มต้นเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจึงไม่ครอบคลุมทุกเชื้อที่ต้องการ และไม่มีข้อมูลความมีชีวิตเริ่มต้น

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วยการเพาะเชื้อบน Enrich media แล้วตรวจดูด้วยสายตา ซึ่งใช้เป็นวิธีประจำวันในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยานั้น มีข้อเสียคือ บางครั้งผลที่ได้อาจไม่ถูกต้อง เนื่องจากเกิดความผิดพลาดขึ้นได้ง่าย เนื่องจากมีเชื้อบางชนิดที่ไม่สามารถตรวจสอบด้วยสายตา เช่น *Mycoplasma* เป็นเชื้อขนาดเล็กมาก ปัญหาจากการปนเปื้อนในการเพาะเชื้อ และการที่เชื้อที่ต่างชนิดกันบางกลุ่มมีลักษณะโคโลนีคล้ายกันมากจนไม่สามารถใช้สายตาแยกได้ นอกจากนี้เชื้อบางสปีชีส์ให้ลักษณะโคโลนีหลากหลาย จนทำให้เข้าใจผิดได้ว่าเป็นเชื้อปนเปื้อน จึงควรใช้ความชำนาญและวิธีการตรวจสอบอื่น ๆ เพิ่มเติมด้วย จากการศึกษาของ Nakagawa (1998, p. 15) ได้รายงานว่า การกลายพันธุ์จะปรากฏเป็นความแตกต่างกันของโคโลนี แต่โคโลนีที่แตกต่างกันอาจคือตัวปนเปื้อนซึ่งถูกรวมอยู่ในหลอดระหว่างการจัดเก็บ ในการพิสูจน์ความแตกต่างของชนิดโคโลนี ว่าเป็นลักษณะโคโลนีหลากหลาย หรือการปนเปื้อน สามารถใช้วิธี DNA-DNA relatedness และรูปร่างทางสัณฐานวิทยา ทางสรีรวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีได้ แต่วิธีทั้งหมดนี้มีความยุ่งยากและใช้เวลานาน อีกทั้งยังไม่สามารถรับรองการแยกชนิดของสายพันธุ์ในเชื้อ สปีชีส์เดียวกันได้ด้วย จึงได้ใช้เทคนิค RAPD ศึกษาความแตกต่างของลักษณะโคโลนีในเชื้อชนิดเดียวกันแต่ให้ลักษณะโคโลนีต่างกัน พบว่า เชื้อชนิดเดียวกันที่ให้โคโลนีหลากหลายมีค่า DNA-DNA homology เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และการทดลองนี้เป็นการตรวจสอบคุณภาพเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นเพื่อยืนยันว่า ยังเป็นเชื้อสปีชีส์เดียวกันเท่านั้น

จากการทดลองตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์โดยดูลักษณะโคโลนี และเซลล์จากการย้อมสีของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า เชื้อในสปีชีส์เดียวกันจะมีลักษณะเหมือนกัน และต่างสปีชีส์กันอาจมีลักษณะใกล้เคียงกันมาก ซึ่งสามารถนำมาใช้ประกอบการแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นจนถึงระดับจีนัส หรือสปีชีส์ได้ และเมื่อใช้การทดสอบลักษณะทางเคมี และชีวเคมีอื่น ๆ ประกอบด้วย จะสามารถช่วยให้แยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียจนถึงระดับสปีชีส์ แต่ยังไม่สามารถรับรองการแยกชนิดของสายพันธุ์ในเชื้อสปีชีส์เดียวกันได้ การทดสอบทางเคมี และชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างนี้ ถ้าเชื้อต่างจีนัส หรือต่างสปีชีส์กันต้องวิเคราะห์ด้วยสารเคมี และอาหารรูปแบบที่แตกต่างกัน เช่น กลุ่ม Gram positive cocci เชื้อ *Streptococcus sp.* ใช้ปฏิกิริยา oxidation/fermentation medium ของคาร์โบไฮเดรต เชื้อ *S. agalactiae* ใช้ปฏิกิริยา fermentation ของ cystine tryptic agar เติม carbohydrate กลุ่ม Enterobacteriaceae ใช้ปฏิกิริยา fermentation ของ carbohydrate ชนิดต่าง ๆ และกลุ่ม non-carbohydrate ferment ใช้ปฏิกิริยา oxidation fermentation ของ carbohydrate ถ้าเชื้อในสปีชีส์ใกล้เคียงกันผลการทดสอบการใช้อาหารอาจคล้ายคลึงกันมาก เป็นการยากในการจะแยกชนิด และทำให้มีโอกาสผิดพลาดได้ง่าย เช่น *E. faecium* กับ *E. faecalis* เป็นต้น

จากการทดลองตรวจสอบลักษณะทางจีโนไทป์โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP เป็นการศึกษาการผันแปรของดีเอ็นเอส่วนที่สนใจโดยนำมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้วตัดดีเอ็นเอนั้นด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดเป็นแบบแผนที่จำเพาะและมีความแตกต่างในระหว่างกลุ่ม หรือสายพันธุ์นั้น ๆ มาช่วยตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียตัวอย่างที่คัดเลือกมาและจากการทดลองพบข้อสังเกตดังนี้

1. การสกัดแยก Chromosomal DNA จากเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี boiling lysis method จากการทดลองพบว่า เป็นวิธีที่สะดวก ใช้วัสดุอุปกรณ์น้อย และมีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ช่วยประหยัดเวลา และสารเคมีได้ดี สามารถใช้สกัดแยกดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างเห็นแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้อย่างชัดเจนโดยเฉพาะเชื้อกลุ่ม Gram-negative แต่บางครั้งไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้ หรือสกัดได้ปริมาณน้อยมาก เช่น เชื้อกลุ่ม Gram-positive โดยเฉพาะ *S. pneumoniae, S. pyogenes* และ *S. agalactiae* ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lu et al. (2000, p. 2080) พบว่า universal PCR จะมีความ

ไวต่ำในเชื้อกลุ่ม Gram-positive เนื่องจากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีนี้ไม่สามารถทำให้เซลล์แตกได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากเชื้อกลุ่มนี้มีผนังเซลล์แข็งแรงมากกว่าเชื้อกลุ่ม gram-negative จึงควรทำการปรับเปลี่ยนวิธีการสกัดดีเอ็นเอให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอมากขึ้น เช่น การใช้ lysozyme มาช่วยย่อยผนังเซลล์ หรือใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอสำหรับพวกผนังเซลล์หนาอื่น ๆ โดยเฉพาะ ซึ่งจะนำไปใช้ในการทดลองครั้งต่อไป

2. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนที่ใช้วิเคราะห์ชนิดเชื้อโดยวิธี PCR เป็นการใช้ universal PCR เพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง conserved regions ของแบคทีเรียหลายๆ ชนิด สำหรับการหาลำดับเบส หรือการเตรียม probe เพื่อใช้แยกลักษณะของแบคทีเรีย (Bottger, 1989, p. 171) (Lane et al., 1985, p. 6955) (Radstrom et al., 1994, p. 2738) (Wilson, Blitchington, & Greene, 1990, p. 1942) ในปี ค.ศ. 1989 Bottger เป็นคนแรกที่แสดงให้เห็นว่าสามารถขยายส่วน portion ของยีน 16S rRNA โดยใช้ universal primer 1 คู่ ของเชื้อแบคทีเรีย *L. pneumophila, E. coli,* และ *M. tuberculosis* หลังจากนั้นนำไปหาลำดับเบสเพื่อแยกชนิดแบคทีเรียนั้น ๆ Greisen et al. (1994, pp. 335-351) ทดลองใช้ universal primer 2 คู่ เพื่อใช้ตรวจหาแบคทีเรีย พบว่า primers ชุดที่ 1 สามารถขยายยีนของ DNA ตัวอย่าง 90 ชนิด จากแบคทีเรีย 102 สปีชีส์ primers ชุดที่ 2 สามารถขยายยีนจากตัวอย่างได้ 12 ตัวอย่าง Radstrom et al. (1994, pp. 2738-2744) ใช้วิธีกึ่ง PCR เพื่อตรวจหา และแยกลักษณะของเชื้อ *H. influenzae, N. meningitidis, S. pneumoniae, S. agalactiae* และแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ อีก 24 สปีชีส์ โดยใช้ genus-หรือ species-specific primers ทั้งหมดนี้ส่วนใหญ่เป็นการใช้ primers หลายแบบเพื่อตรวจหาหรือแยกชนิดของแบคทีเรีย แต่ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ใช้การตรวจสอบชนิดแบคทีเรียทางด้านชีวโมเลกุลด้วย PCR primers 1 ชุด แล้วใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะมาช่วยวิเคราะห์แทนการใช้ species-specific probes หรือการหาลำดับเบส และจากการทดลองในส่วนของการขยายยีนพบว่าเชื้อทั้งหมดได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 996 bp เหมือนกันทุกสายพันธุ์ และมีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นที่ประมาณ 150 bp ด้วย คาดว่าอาจเกิดจาก nonspecific amplifications ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lu et al. (2000, p. 2077) ที่พบ nonspecific band ด้วย แต่ไม่มีผลต่อการนำ PCR product ที่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ

3. การวิเคราะห์ส่วนของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ ด้วยวิธี restriction endonuclease โดยใช้เอนไซม์ 5 ชนิด คือ *Hae* III, *Dde* I, *Bst* BI, *Mnl* I และ *Alu* I พบว่า universal PCR products จากแบคทีเรียต่างชนิดกัน จะมีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างกัน แต่ PCR products จากแบคทีเรียบางชนิดที่ต่างกันจะมีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเหมือนกัน เช่น การใช้เอนไซม์ *Hae* III สามารถใช้แยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ (1) กลุ่ม Enterobacericeae (*K. pneumoniae, E. coli , E. cloacae* และ *S. marcescens*) มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน (2) กลุ่ม Gram positive cocci (*S. aureus* และ *S. epidermidis*)ไม่สามารถตัดได้ (*E. faecalis* และ *E. faecium*) มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกันแต่ต่างจากกลุ่มแรก (3) กลุ่ม Non fermenter (*P. aeruginosa, A. baumannii* และ *B. cepacia*) มีแถบดีเอ็นเอต่างกันทั้งหมด (4) *H. influenzae* มีแถบดีเอ็นเอต่างจากทุกกลุ่ม เป็นต้น ผลการทดลองที่ได้นี้ใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการแยกชนิดของแบคทีเรียบางชนิดได้ แต่จากการศึกษาครั้งนี้เมื่อใช้เอนไซม์ *Hae* III ตัด PCR product ของเชื้อกลุ่ม *K. pneumoniae, E. coli , E. cloacae* และ *S. marcescens* เห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 5 แถบ ขนาดประมาณ 68, 126, 161, 180 และ 210 bp ซึ่งไม่สอดคล้องกับการทดลองของ Lu et al. (2000, p. 2079) รายงานว่าพบแถบดีเอ็นเอ 7 แถบ ขนาด 217, 210, 180, 161, 126, 68 และ 34 bp การทดลองนี้จึงไม่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอ อีก 2 แถบ คือ แถบขนาด 217 และ 34 bp ได้ เนื่องจาก ดีเอ็นเอขนาด 217 bpใกล้เคียงกับขนาด 210 bp มาก อาจอยู่ใกล้ชิดกันจนไม่สามารถเห็นได้ และดีเอ็นเอขนาด 34 bp มีขนาดเล็กมากจึงสังเกตเห็นได้ยากหรือวิ่งผ่านแผ่นเจลไประหว่างการแยกด้วย electrophoresis นอกจากนี้เมื่อใช้เอนไซม์ตัด PCR product ของเชื้อ *A. baumannii* เห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 4 แถบ ขนาดประมาณ 70, 125, 180, และ 310 bp ไม่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอที่เหลือซึ่งมีขนาด 311 bp เพราะมีขนาดใกล้เคียงกับขนาด 310 bp มาก นอกจากนี้เมื่อใช้เอนไซม์ *Alu* I ตัด PCR product ของเชื้อ *E. faecalis* เห็นแถบดีเอ็นเอเพียง 3 แถบขนาดประมาณ 156, 240 และ 570 bp ไม่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอที่เหลือซึ่งมีขนาด 30 bp เพราะมีขนาดเล็กมาก สาเหตุสำคัญอาจเนื่องมาจากการทดลองครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ restriction product ที่ได้จากการตัด PCR product ออกเป็นชิ้นส่วนย่อยโดยการตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis ใช้ 3% Nusieve 3 ส่วนต่อ agarose gel 1 ส่วน แต่จากการ

ทดลองของ Lu et al. (2000, p. 2079) จะใช้ 6% polyacrylamide gel ซึ่งจากการทดลองของ Nakagawa (1998, p. 19) ได้ทำการเปรียบเทียบการทดสอบวิธี gel electrophoresis ด้วยการใช้ 2% agarose gel กับ polyacrylamide gel พบว่า การใช้ polyacrylamide gel จะให้รายละเอียดได้มากกว่าการใช้ agarose gel แต่การใช้ agarose gel มีราคาถูก และทำได้รวดเร็วกว่า และสามารถให้ข้อมูลเพียงพอสำหรับการควบคุมคุณภาพ ส่วนการใช้ polyacrylamide gel เหมาะสมสำหรับใช้ในการเปรียบเทียบชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกันมาก ๆ

ข้อเสนอแนะ

1. การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียให้มีชีวิตอยู่ได้นาน ๆ นั้น ควรพิจารณาถึงสิ่งต่อไปนี้คือ

1.1 ลักษณะทางชีวภาพของตัวเชื้อที่ต้องการเก็บ

1.2 วิธีที่ใช้ในการเก็บรักษา

1.3 Cryoprotectants ที่เหมาะสมกับวิธีและตัวเชื้อแบคทีเรียนั้น ๆ

1.4 บุคลากรที่ทำหน้าที่เก็บรักษาควรได้รับการฝึกอบรมที่ถูกต้อง

1.5 จำนวนเชื้อเริ่มต้นและระยะการเจริญเติบโตของเชื้อที่จะทำการเก็บรักษา

2. การใช้เทคนิคและตู้ปลอดเชื้อจะช่วยให้การเก็บรักษาเชื้อมีความบริสุทธิ์เหมาะสมกับการนำไปใช้งานอื่น ๆ ได้ดี

3. ควรทำการหาลำดับเบสด้วย ในกรณีที่ต้องการความละเอียดและสมบูรณ์แบบของข้อมูล เพื่อใช้เป็นแหล่งข้อมูลอ้างอิง

บรรณานุกรม

กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม, สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. (2546). *รายงานประจำปี พ.ศ. 2544-2545 ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ*. กรุงเทพฯ: ผู้แต่ง.

กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2536). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่เย็น*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชวนพิศ ดีเอกนามกุล และวัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. (2545). *จุลชีววิทยาทั่วไป*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยมหิดล.

โชติชนะ วิลัยลักษณคณา, พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์ และวิภาวดี แมนมนตรี (บรรณาธิการ). (2543). *แบคทีเรียวิทยาคลินิกพื้นฐาน*. ขอนแก่น: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์, นเรศวร สุขเจริญ, อภิวัฒน์ มุทิรางกูร และยง ภู่วรวรรณ (บรรณาธิการ). (2541). *อณูชีววิทยาทางการแพทย์*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์เท็กซ์-แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2541). *จุลชีววิทยาทั่วไป*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วันเชิญ โพธาเจริญ. (2532). *วิธีเก็บรักษาจุลินทรีย์*. กรุงเทพฯ: สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, ศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์แห่ง-ภาคพื้นเอเชียอาคเนย์.

วันเชิญ โพธาเจริญ. (2543, พฤศจิกายน). *การเก็บรักษาจุลินทรีย์*. เอกสารนำเสนอในการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเทคนิคการเก็บรักษาและจัดจำแนกสายพันธุ์รา, กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม, สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.

วันเชิญ โพธาเจริญ และมรกต ตันติเจริญ. (2542). การจัดตั้งศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์เฉพาะทาง ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. ใน *การประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT: ครั้งที่ 3. ผลการวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย.* (หน้า 874-879). สงขลา: โรงพิมพ์ Work Press Printing.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. (2539). *เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์.* กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรางค์ เดชศิริเลิศ. (2543). *คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป: การวินิจฉัยเชื้อกลุ่ม Non-Fermentative Gram-Negative Bacilli.* กรุงเทพฯ: กองโรงพยาบาลภูมิภาค.

สุวณี สุดเวชย์ และมาลัย วรจิตร. (2536). *แบคทีเรียพื้นฐาน.* กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ศิริยอด.

Beall, P. T. (1983). States of water in biological systems. *Cryobiology, 20,* 324-334.

Bergeron, T., & Findeisen, W. (1930). *The ice-crystal process.* Retrieved September 7, 2004, from http://meted.ucar.edu/norlat/snow/micro_ice/1.1.crystal_growth.htm#02

Bottger, E. C. (1989). Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiology Letters, 65,* 171-176.

Feltham, R. K. A., Power, A. K., Pell, P. A., & Sneath, P. H. A. (1978). A simple method for storage of bacteria at -76°C. *Journal of Applied Bacteriology, 44,* 313-316.

Greisen, K., Loeffelholz, M., Purohit, A., & Leong, D. (1994). PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria including bacteria found in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology, 32*(2), 335-351.

Griffiths, J. B. (1978). Effect of hypertonic stress on mammalion cell lines and its relevance to freeze-thaw injury. *Cryobiology, 15*, 517-529.

Grout, B. W. W., & Morris, G. J. (1987). *The effects of low temperatures on biological systems*. London: Edward Arnold.

Heckly, R. J. (1978). Preservation of micro organisms. *Advances in Applied Microbiology, 3*, 1-76.

Hew, C. L., & Yang, D. S. C. (1992). Protein interaction with ice. *European Journal of Biochemistry, 203*, 33-42.

Holt, G. J., Krieg, R. N., Sneath, H. A. P., Staley, T. J., & Williams, T. S. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.). North Andover, MA: Williams & Wilkins Press.

Kirsop, B. (1985). The current status of culture collections and their contributions to biotechnology. *Critical Reviews Biotechnology, 2*, 287-314.

Kirsop, B. E., & Doyle, A. (1991). *Maintenance of microorganisms and culture cells: A manual of laboratory methods* (2nd ed.). London: Academic Press.

Klausegger, A., Hell, M., Berger, A., Zinober, K., Baier, S., Jones et al. (1999). Gram type-specific broad-rang PCR amplification for rapid detection of 62 pathogenic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology, 37*(2), 464-466.

Landdgraf, A., & Wolfes, H. (1993). *Taq* polymerase. In B. M. Michael (Ed.), *Enzymes of molecular biology* (pp. 35-42). Totowa, NJ: Humana Press.

Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 82*, 6955-6959.

Lapage, S. P., & Shelton, J. E. (1970). Culture collections and preservation of bacteria. In J. R. Norris & D. W. Ribbons (Eds.), *Methods in microbiology volumes 3A* (pp. 169-178). London: Academic Press.

Lu, J. J., Perng, C. L., Lee, S. Y., & Wan, C. C. (2000). Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestiona for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology, 38*(6), 2076-2080.

Mazur, P. (1977). The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology, 14*, 251-272.

Metzler, D. E. (2003). *Biochemistry: The chemical reactions of living cells* (2nd ed.). Millbrae, CA: Academic Press.

Morris, G. J., Coulson, G. E., & Clarke, K. J. (1988). Freezing injury in *Saccharomyces cerevisiae*: The effect of growth condition. *Cryobiology, 25*, 471-482.

Murray, R. P., Baron, J. E., Pfaller, A. M., Tenover, C. F., & Yolken H. R. (1995). *Manual of clinical microbiology* (8th ed.). Washington, DC: ASM Press.

Nakagawa, Y., Kawasaki, H., Nishii, T., Sakane T., Yokoto, A., & Hatano, K. (1998). Utilization of RAPD for quality control of bacterial cultures preserved in culture collection. *Microbiology in Culture Collection, 14*, 15-21.

Nakase, T. (1996). Quality control system of microbial cultures in Japan collection of microorganisms (JCM). In R. A. Samson, J. A. Stapers, D. van der Mei, & A. H. Stouthamer (Eds.), *Culture collections to improve the quality of life: Proceedings of the Eighth International Congress for Culture Collections* (pp. 144-147). Wageningen, The Netherlands: Ponsen & Looyen.

Packer, P., & Doyle, A. (1996). The CAMR bacterial culture collection (CBCC): The establishment of a new culture collection according to WFCC guidelines. In R. A. Samson, J. A. Stapers, D. van der Mei, & A. H. Stouthamer (Eds.), *Culture collections to improve the quality of life: Proceedings of the Eighth International Congress for Culture Collections* (pp. 147-150). Wageningen, The Netherlands: Ponsen & Looyen.

Perry, S. F. (1995). Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. In J. G. Day & M. R. McLellan (Eds.), *Methods in molecular biology, vol. 38: Cryopreservation and freeze-drying protocols* (pp. 23, 29-30). Totowa, NJ: Humana Press.

Pinggoud, A., Alves, J., & Geiger, R. (1993). Restriction enzymes. In M. M. Burrell (Ed.), *Methods in molecular biology, vol. 16: Enzymes of molecular biology* (pp. 107-200). Totowa, NJ: Humana Press.

Radstrom, P., Backman, A., Qian, N., Kragsbjerg, P., Pahlson, C., & Olcen, P. (1994). Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and Streptococci using a seminested PCR strategy. *Journal of Clinical Microbiology*, *32*(11), 2738-2744.

Ramos, J. L., Gallegos, M. T., Marques, S., Ramos-Gonzales, M. I., Espinopsa-Urgel, M., & Segura, A. (2001). Responses of gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Current Opinion in Microbiology*, *4*, 166-171.

Rudolph, A. S., & Crowe, J. H. (1985). Membrane stabilization during freezing: The role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology*, *22*, 367-377.

Sly, L. I. (1996). WFCC: Aims and achievements revisited. In R. A. Samson, J. A. Stapers, D. van der Mei, & A. H. Stouthamer (Eds.), *Culture collections to improve the quality of life: Proceedings of the Eighth International Congress for Culture Collections* (pp. 3-16). Wageningen, The Netherlands: Ponsen & Looyen.

Smith, D. (1996). Quality systems for management of microbial collections. In R. A. Samson, J. A. Stapers, D. van der Mei, & A. H. Stouthamer (Eds.), *Culture collections to improve the quality of life: Proceedings of the Eighth International Congress for Culture Collections* (pp. 137-143). Wageningen, The Netherlands: Ponsen & Looyen.

Snell, J. J. S. (1991). General introduction to maintenance methods. In B. E. Kirsop & A. Doyle (Eds.), *Maintenance of microorganisms and cultured cells: A manual of laboratory methods* (2nd ed., pp. 21-30). London: Academic Press.

Sugawara, H., Ma, J., Miyazaki, S., Shimura, J., & Takishima, Y. (Eds.). (1993). *World directory of collections of cultures of microorganisms* (4th ed.). Saitama, Japan: WFCC World Data Center on Micro-organisms.

Wilson, K. H., Blitchington, R. B., & Greene, R. C. (1990). Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, *28*(9), 1942-1946.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวศิริพร จันทน์โรจน์
วัน เดือน ปี เกิด	29 พฤษภาคม 2509
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับประกาศนียบัตรวิชาเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์-การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีการศึกษา 2529 สำเร็จปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีการศึกษา 2537
ตำแหน่งหน้าที่การทำงานปัจจุบัน	นักเทคนิคการแพทย์ ระดับ 5 สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รักษาการหัวหน้าฝ่ายตรวจวินิจฉัยแบคทีเรียทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์