บทที่ 3

การทดสอบลักษณะต่างๆ และการวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์

กลุ่มลักษณะที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยลักษณะต่างๆ ทั้งทาง morphological, physiological และ biochemical รวม 35 กลุ่มลักษณะรวมลักษณะทั้งสิ้น 120 ลักษณะ แสดงไว้ในตารางที่ 6 โดยมีการเตรียมสารละลายแขวนตะกอนของเชื้อ (inoculum) ที่จะใช้ในการทดสอบต่างๆซึ่งเตรียมโดยใช้ขดลวดวงกลมที่ปลาย (loop) ปลาตินัมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ขูดโคโลนีของเชื้อแต่ละสายพันธุ์จากผิวอาหารในขวดเลี้ยงเชื้อให้เต็มวงใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ซึ่งมีน้ำเกลือปราศจากเชื้อความเข้มข้น 0.9 % 2-3 หยดกับลูกแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1/8 นิ้ว (3 มม.) จำนวน 6 ลูก ละเลงเชื้อที่ขูดได้เข้ากับด้านในของหลอดแก้วบริเวณก้นหลอดจนเชื้อทั้งหมดกระจายตัวดี จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าผสม(vortex mixer) เพื่อให้ลูกแก้วเล็กๆนั้นตีเชื้อให้กระจายตัวดีขึ้นอีกจึงเติมน้ำเกลือปราศจากเชื้อ ความเข้มข้น 0.9 % ลงไปจนกระทั่งการแขวนตะกอนของเชื้อกระจายตัวในน้ำเกลืออย่างสม่ำเสมอ เทียบความขุ่นได้เท่ากับความขุ่นสม่ำเสมอของมาตฐาน Mcfarland เบอร์ 5(Difco) เพื่อให้ได้ความขุ่นมาก ๆ และใช้ปริมาณ 2 หยด ในทุกการทดสอบที่ไม่ใช้โคโลนีของเชื้อโดยตรง ยกเว้นการทดสอบดูอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อเท่านั้น จึงจะใช้เทียบกับความขุ่นมาตฐาน Mcfarland เบอร์ 1(Difco) และใช้ปริมาณ 2 หยดเท่ากัน ส่วนการอบเชื้อโดยทั่วไปทุกการทดสอบจะใช้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 14 วัน ยกเว้นในการทดสอบบางอย่าง ซึ่งจะได้กล่าวไว้ต่างหากต่อไป รายละเอียดของการทดสอบแต่ละลักษณะมีดังนี้ คือ

- Acid fastness (60)

ลำดับการทดสอบที่ 1-2

โดยใช้วิธี Ziehl Neelsen ดูการติดสีของเซลล์ที่เขี่ยมาบางส่วนจากโคโลนีของเชื้อ แล้วละเลงลงบนกระจกสไลด์ ย้อมสีด้วย carbol fuchsin ฟอกสีด้วย acid alcohol 3 % แล้วย้อมทับด้วยสี methylene blue ล้างน้ำ ทำให้แห้งดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ รายงานผลการติดสี acid fast ว่า complete acid fast เมื่อ 90-100 % ของเซลล์

ติดสีแดง หรือ partial acid fast เมื่อ น้อยกว่า 90 % ของเซลล์ติดสีแดง

ลำดับที่ 1 เมื่อเซลล์เป็น complete acid fast

ลำดับที่ 2 เมื่อเซลล์เป็น partial acid fast

- Cell morphology (61)

ลำดับการทดสอบที่ 3-6

ดูรูปร่างของเซลล์หลังจากย้อมสีแล้วโดยใช้อัตราส่วนระหว่างความกว้างและความยาวเป็นหลักพิจารณาคือ Long rod เมื่ออัตราส่วนเป็น 1 : > 3 , Short rod เมื่ออัตราส่วนเป็น 1 : >1-3 , coccoid (coccobacillus) เมื่ออัตราส่วนเป็น 1 : 1 และเป็น Pleomorphism ถ้ามีการผสมกันของ 2 ลักษณะขึ้นไป

ลำดับที่ 3 เมื่อรูปร่างของเซลล์เป็น long rod

ลำดับที่ 4 เมื่อรูปร่างของเซลล์เป็น short rod

ลำดับที่ 5 เมื่อรูปร่างของเซลล์เป็น coccoid(coccobacillus)

ลำดับที่ 6 เมื่อรูปร่างของเซลล์เป็น pleomorphism

- Colony morphology (61)

ลำดับการทดสอบที่ 7-8

ดูผิวของโคโลนีของเชื้อว่าผิวเรียบ (Smooth) หรือผิวขรุขระ (Rough)

ลำดับที่ 7 เมื่อผิวของโคโลนีเรียบ

ลำดับที่ 8 เมื่อผิวของโคโลนีขรุขระ

- pigmentation (62)

ลำดับการทดสอบที่ 9-12

ดูการเกิดสีของโคโลนีของเชื้อในที่มืด ที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein - Jensen ที่เก็บอบบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส

ลำดับที่ 9 เมื่อโคโลนีเป็นสีขาว (white)

ลำดับที่ 10 เมื่อโคโลนีเป็นสีเหลือง (yellow)

ลำดับที่ 11 เมื่อโลโลนีเป็นสีเหลืองอ่อน (slightly yellow)

ลำดับที่ 12 เมื่อโคโลนีเป็นสีชมพูอ่อน (faint pink)

-Photochramogenicity(62)

ลำดับการทดสอบที่ 13

โดยใช้สารละลายแขวนตะกอนของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ที่มีความขุ่นเทียบเท่าความขุ่นมาตรฐานเบอร์ 1 Mcfarland(Difco) หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ขวดๆละ 2 หยด จากนั้นนำขวดที่ 1 และ 2 มาหุ้มด้วยกระดาษทึบแสงเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อที่จะเจริญเติบโตขึ้นมาสัมผัสกับแสงใดๆเลย นำขวดทั้ง 3 เข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นสังเกตุดูในขวดที่ 3 ที่ไม่ได้หุ้มกระดาษทึบแสงจนกระทั่งมีโคโลนีปรากฏให้เห็น แล้วนำไปเปรียบเทียบกับขวดที่หุ้มกระดาษขวดที่ 1 ถ้าขวดทั้งคู่มีสีเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อสายพันธุ์นั้นสร้างสีได้ทั้งในที่มืดและที่สว่าง จัดเป็นกลุ่ม II Scotochromogens แต่ถ้าขวดทั้งคู่ไม่มีสีเลยให้นำขวดที่ 1 นั้นมาสัมผัสกับแสงสว่างโดยใช้หลอดไฟฟ้าขนาด 60 วัตต์ ส่องอยู่เหนือขวดเลี้ยงเชื้อห่างประมาณ 30 เซนติเมตร ให้เชื้อสัมผัสถูกแสงมากที่สุดเป็นเวลานาน 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำขวดที่ 1 นั้นหุ้มด้วยกระดาษทึบแสงไว้อย่างเดิม นำไปเก็บต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระหว่างที่ให้เชื้อสัมผัสกับแสงสว่างต้องคลายฝาขวดเลี้ยงเชื้อให้หลวม วันรุ่งขึ้นนำขวดที่ 1 และที่ 2 มาตรวจสอบถ้าขวดที่ 1 มีสีเกิดขึ้นในขณะที่ขวดที่ 2 ไม่มีสีเลยแสดงว่า เชื้อสายพันธุ์นั้นสร้างสีได้เมื่อสัมผัสกับแสงสว่างจัดเป็นกลุ่ม I Photochromogens แต่ถ้าขวดทั้งสองไม่มีสีเลยแสดงว่าเชื้อสายพันธุ์นั้นไม่มีการสร้างสีทั้งในที่มืด และเมื่อสัมผัสกับแสงสว่างจัดเป็นกลุ่ม III non-photochromogens

- Pigment after exposed contineuous light (62)

(ลำดับการทดสอบที่ 14-17)

โดยดูสีของโคโลนีที่ผ่านการสัมผัสกับแสงสว่างแล้วจากขบวนการ Photochromogenicity

ลำดับที่ 14 เมื่อโคโลนีเป็นสีขาว (white)

ลำดับที่ 15 เมื่อโคโลนีเป็นสีเหลือง (yellow)

ลำดับที่ 16 เมื่อโคโลนีเป็นสีเหลืองอ่อน (slightly yellow)

ลำดับที่ 17 เมื่อโคโลนีเป็นสีชมพูอ่อน (faint pink)

- Growth rate (62)

(ลำดับการทดสอบที่ 18-19)

ดูอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละสายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein Jensen ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายแขวนตะกอนของเชื้อที่เทียบได้เท่ากับมาตฐานความขุ่น Mcfarland เบอร์ 1 จะอ่านผลทุกวันในอาทิตย์แรกและทุกอาทิตย์จนครบ 1 เดือน การศึกษาจะใช้ช่วงเวลา 7 วัน เป็นช่วงตัดสินคือการเจริญที่น้อยกว่า 7 วัน จัดเป็นกลุ่มเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่เจริญเร็ว (rapid grower) และมากกว่า 7 วันเป็นกลุ่มมัยโค-แบคทีเรียที่เจริญช้า(slow grower) ซึ่งในกลุ่มของ rapid grower ยังแบ่งย่อยออกเป็นการเจริญเติบโตที่น้อยกว่า 4 วัน และมากกว่า 4 วัน แต่ไม่เกิน 7 วัน

ลำดับที่ 18 เมื่อการเจริญของเชื้อน้อยกว่า 4 วัน

ลำดับที่ 19 เมื่อการเจริญของเชื้อมากกว่า 4 วัน

- Texture of colony (61)

(ลำดับการทดสอบที่ 20-21)

ดูลักษณะเนื้อของโคโลนีว่าเป็นแบบเม็ดๆ(granula)หรือเป็นเนื้อเละ(butyrous) โดยใช้ขดลวดวงกลมที่ปลาย(Loop) เขี่ยโคโลนีของเชื้อมาบดดูกับกระจกสไลด์ แล้วรายงานตามผลที่มองเห็น

ลำดับที่ 20 เมื่อลักษณะเนื้อของโคโลนีเป็นแบบ granula

ลำดับที่ 21 เมื่อลักษณะเนื้อของโคโลนีเป็นแบบ butyrous

- Emulsibility of culture (61)

(ลำดับการทดสอบที่ 22-23)

ดูการแขวนลอยในน้ำกลั่นของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ว่าง่ายหรือยาก โดยหยดน้ำกลั่น 1 หยดบนกระจกสไลด์ แล้วเขี่ยเชื้อมาเล็กน้อย แตะลงไปในหยดน้ำนั้น ถ้าหยดน้ำนั้นขุ่นแสดงว่าเชื้อนั้นแขวนลอยง่ายแต่ถ้ายังมองเห็นเป็นก้อนเชื้ออยู่แสดงว่าแขวนลอยยาก

ลำดับที่ 22 การแขวนลอยของเชื้อยาก (difficult)

ลำดับที่ 23 การแขวนลอยของเชื้อง่าย (easy)

- Edge of colony (61)

(ลำดับการทดสอบที่ 24-25)

ดูลักษณะขอบของโคโลนีของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ว่า ขอบเรียบ(entire) หรือเป็นหยัก(undulate)

ลำดับที่ 24 ขอบโคโลนีเรียบ

ลำดับที่ 25 ขอบโคโลนีหยัก

- Adhesion of colony to the medium (61)

ลำดับการทดสอบที่ 26

ดูลักษณะการยึดเกาะของโคโลนีของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ว่ามีคุณสมบัติในการยึดเกาะบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อหรือไม่

- Ability for growth at different temperature (63-64)

(ลำดับการทดสอบที่ 27-30)

ดูความสามารถของเชื้อในการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein Jensens เมื่อเก็บบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25°, 37, 42 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยใช้ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ขวด หยดสารละลายแขวนตะกอนของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่เทียบความขุ่นเท่ากับมาตฐานความขุ่น Mcfarland เบอร์ 1 ขวดละ 2 หยด แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิที่กำหนด โดยที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะใช้ low temperature incubator ที่ 42 และ 45 องศาเซลเซียส จะใช้หม้ออุ่นน้ำ (Water bath) และที่ 37 องศาเซลเซียส ใช้ตู้อบบ่มเชื้อธรรมดาที่ใช้กันทั่วไป ดูการเจริญจนครบ 1 เดือน

ลำดับที่ 27 การเจริญที่ 25 องศาเซลเซียส

ลำดับที่ 28 การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส

ลำดับที่ 29 การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส

ลำดับที่ 30 การเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส

- Niacin test (65-67)

(ลำดับการทดสอบที่ 31)

เชื้อมัยโคแบคทีเรียส่วนใหญ่มีเอนไซม์ nicotinamidase ซึ่งนำ niacin ที่เป็นผลจากการ metabolism ของเซลล์ไปใช้ต่อได้ แต่เชื้อวัณโรค (M. tuberculosis) และบางสายพันธุ์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียไม่มีเอนไซม์ดังกล่าว จึงมีการสะสมสาร niacin นี้ไว้และถูกปล่อยออกจากตัวเซลล์สะสมอยู่รอบ ๆ โคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ซึ่งสามารถทดสอบได้โดยใช้ความร้อนสกัดสารนี้ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วมาทำปฏิกิริยากับสาร cyanogen bromide และ aromatic amine คือ 3 % benzidine ใน 95 % แอลกอฮอล์ ถ้ามี niacin อยู่ผลการทดสอบจะให้ตะกอนสีชมพูจนถึงสีแดงเกิดขึ้น

การทดสอบ หลังจากที่เพาะเลี้ยงเชื้อมัยโคแบคทีเรียทุกสายพันธุ์จนมีปริมาณของเชื้อในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมากพอ ประมาณ 3/4 ของพื้นที่ผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีอายุของการเพาะเลี้ยงเชื้อมากกว่า 3 สัปดาห์ จึงนำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมาเข้าหม้อนึ่ง ความดันไอน้ำ (autoclave) แต่ก่อนที่จะนำเข้าหม้อนึ่ง ต้องสังเกตดูว่ามีน้ำใสๆที่ก้นขวดเลี้ยงเชื้อหรือไม่ ถ้าไม่มีให้เติมน้ำกลั่นลงไป 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ความร้อนจากหม้อนึ่งสกัดเอาสาร niacin ออกมาปนอยู่กับน้ำใสที่ก้นขวด จากนั้นดูดน้ำใสนี้มา 0.25 มิลลิลิตร ใส่หลอดแก้วขนาดเล็กมาทำปฏิกิริยากับ 10 % cyanogen bromide และ 3 % benzidine อย่างละ 1 หยด ตามลำดับ เขย่าแรงๆ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จึงอ่านผลถ้ามีสาร niacin อยู่จะเกิดเป็นตะกอนสีชมพูจนถึงสีแดง ให้ผลการทดสอบเป็นบวก ถ้าไม่มีสาร niacin อยู่จะเกิดตะกอนที่ไม่มีสีหรือสีเทา ให้ผลการทดสอบเป็นลบ

ลำดับที่ 31 niacin test

- Nitrate reduction test (68-69)

(ลำดับการทดสอบที่ 32)

เพื่อดูความสามารถในการเปลี่ยนสารประกอบ nitrate เป็น nitrite โดยใช้เอนไซม์ nitrate reductase ซึ่งตรวจสอบได้ด้วยการเติมสาร sulfanilamide และ N-naphthylethylenediamine dihydrochloride ในสภาพที่เป็นกรดจะได้สารละลายสีแดง

การทดสอบใช้ขดลวดวงกลมที่ปลาย (loop) ขูดโคโลนีของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ใส่ลงในหลอดแก้วที่มีสารที่จะใช้ทดสอบบรรจุอยู่ คือ M/100 sodium nitrate ละลายใน M/45 phosphate buffer pH 7.0 (ดูวิธีเตรียมในภาคผนวก ค.) หลอดละ 2 มิลลิลิตร จากนั้น

นำเข้าตู้อบ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำหลอดแก้วนั้นมาเติมสารละลาย hydrochloric acid มีความเข้มข้นเจือจาง 1:1 ในปริมาณ 1 หยด เติม 0.2 % sulfanilamide และ 0.1 % N-naphthylethylenediamine dihydrochloride ในปริมาณอย่างละ 2 หยด เขย่าทิ้งไว้ ถ้ามีการเปลี่ยนสารประกอบ nitrate เป็น nitrite จะได้สารละลายสีแดงให้ผลบวก ในรายที่ไม่มีสีแดงเกิดขึ้น ให้เติมผงสังกะสี (Zinc powder) ลงไปเล็กน้อย เขย่า ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นแสดงว่าไม่มีการเปลี่ยนเป็น nitrite ให้ผลลบ

ลำดับที่ 32 nitrate reduction

- Semi - quantitative catalase test (70)

(ลำดับการทดสอบที่ 33-34)

เพื่อดูคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ catalase ของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย ซึ่งทดสอบได้โดยใช้ 30 % hydrogen peroxide ใน 10 % Tween 80 ถ้ามีเอนไซม์นี้จะเกิดฟองฟู่ของออกซิเจน ซึ่งเกิดจากการย่อยสลาย hydrogen peroxide โดยวัดปริมาณความสูงของฟองว่าสูงหรือต่ำกว่า 45 มิลลิเมตร

การทดสอบโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein - Jensen ในสภาพตั้งตรงให้มีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร โดยใช้หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 13x150 มิลลิเมตร หลังจากทำอาหารให้แข็งแล้วใส่สารละลายแขวนตะกอนของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ลงไปบนผิวของอาหารนั้น 2 หยด นำเข้าตู้อบเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน ในสัปดาห์แรกของการอบเชื้อให้คลายฝาเกลียวออกเล็กน้อย จากนั้นจึงปิดฝาให้แน่น เมื่อครบกำหนดนำหลอดแก้วนั้นมาใส่สารผสมระหว่าง 10% Tween 80 กับ 30% hydrogen peroxide ในอัตราส่วนเท่าๆ กันหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที แล้ววัดความสูงของฟองที่เกิดขึ้น

ลำดับที่ 33 เมื่อความสูงของฟองสูงกว่า 45 มิลลิเมตร

ลำดับที่ 34 เมื่อความสูงของฟองต่ำกว่า 45 มิลลิเมตร

- Catalase tolerance at 68 องศาเซลเซียส (71.)

(ลำดับการทดสอบที่ 35)

เพื่อดูคุณภาพของเอนไซม์ catalase ที่เชื้อมัยโคแบคทีเรียสร้างขึ้นว่าถูกทำลายที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หรือไม่

การทดสอบจะใช้สารละลายที่เตรียมขึ้น คือ M/15 phosphate buffer pH 7.0 (ดูวิธีเตรียมในภาคผนวก ค.) ใส่หลอดแก้วฝาเกลียว ขนาด 10x100 มิลลิเมตร หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ขดลวดวงกลมที่ปลายขูดโคโลนีของเชื้อที่เพาะเลี้ยงขึ้นใหม่ๆ ลงไปแล้วนำไปแช่ในหม้อน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนดนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องจึงใส่ส่วนผสมระหว่าง 10 % Tween 80 กับ 30 % hydrogen peroxide (ในอัตราส่วนเท่าๆ กัน) หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ห้ามเขย่าหลอด สังเกตดูฟองอากาศที่ออกมาจากก้อนโคโลนี และที่ผิวของสารละลายในหลอดว่ามีหรือไม่ ถ้ามีฟองเกิดขึ้นแสดงว่าเอนไซม์ catalase นั้นสามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ได้ให้ผลเป็นบวก

- Arylsulfatase test (72)

(ลำดับการทดสอบที่ 36-37)

เพื่อดูการย่อยสลายสารซัลเฟต จาก tripotassium phenolphthalein disulfate โดยใช้เอนไซม์ arylsulfatase ที่เชื้อมัยโคแบคทีเรียสร้างขึ้น จะได้ free phenolphthalein ซึ่งตรวจสอบได้โดยเติม sodium carbonate ลงไปจะเกิดสีบานเย็น (ชมพูแดง)

การทดสอบใช้อาหารเหลว middlebrooke's 7H9 (difco) ที่มี ADC เป็น enrichment จากนั้นใส่สารละลายของ tripotassium phenolphthalein disulfate ลงไปให้มีความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ (วิธีเตรียมในภาคผนวก ค.) แล้วแบ่งใส่หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 13x100 มิลลิเมตร หลอดละ 2 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ขดลวดวงกลมที่ปลายเขี่ยเชื้อที่เจริญเติบโตดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 1 วงใส่ลงในหลอดทดลอง ตีโคโลนีให้แตกเขย่าเล็กน้อย นำเข้าตู้อบเพาะเชื้อ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน เมื่อครบกำหนดนำมาตรวจหา free phenolphthalein โดยการหยด 2 นอร์มัล sodium carbonate ลงไปประมาณ 2 หยดเขย่า ถ้ามีสีชมพูแดงเกิดขึ้นให้รายงานเป็นบวก ทำนองเดียวกันหากต้องการทดสอบเวลาของการเข้าตู้อบเพาะเชื้อเป็น 14 วัน ก็ปฏิบัติเช่นเดียวกับที่ใช้เวลา 3 วัน แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของ tripotassium phenolphthalein disulfate จาก 0.001 เป็น 0.003 โมลาร์

ลำดับที่ 36 การทดสอบอ่านผลเมื่อเก็บไว้ในตู้อบนาน 3 วัน

ลำดับที่ 37 การทดสอบอ่านผลเมื่อเก็บไว้ในตู้อบนาน 14 วัน

- Tween 80 hydrolysis test (73-74)

(ลำดับการทดสอบที่ 38-39)

ดูความสามารถของเอนไซม์ lipase ที่เชื้อมัยโคแบคทีเรียสร้างขึ้นในการย่อยสลายสาร Tween 80 (polyoxythelene sorbiltan monooleate) ให้เป็น oleic acid และ polyoxythelate sorbitol ตรวจสอบโดยดูการเปลี่ยนสีของสารที่ใช้ทดสอบจากสีเหลืองอำพัน (amber) เป็นสีแดง (red)

เตรียมสารผสมที่จะใช้ทดสอบคือ M/15 phosphate buffer, Tween 80 และ neutral red แบ่งใส่หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 13x100 มิลลิเมตร หลอดละ 2 มิลลิลิตร (ดูวิธีเตรียมในภาคผนวก ค.) จากนั้นเขี่ยโคโลนีของเชื้อลงไป นำไปเก็บในตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อ่านผลเป็นบวกเมื่อมีการเปลี่ยนสีของสารละลายในหลอดทดลองจากสีเหลืองอำพันเป็นสีแดง หลังจากอบไว้เป็นเวลา 3 และ 14 วัน ตามลำดับ

ลำดับที่ 38 ทดสอบหลังจากอบเชื้อไว้ 3 วัน

ลำดับที่ 39 ทดสอบหลังจากอบเชื้อไว้ 14 วัน

- Tellurite reduction test (75)

(ลำดับการทดสอบที่ 40-41)

เพื่อดูความสามารถของเชื้อมัยโคแบคทีเรียในการย่อยสลายสาร potassium tellurite ซึ่งเป็นสารไม่มีสีกลายเป็น metallic tellurite ซึ่งมีสีดำ

การทดสอบใช้อาหารเหลว middlebrook's 7H9 (Difco) ที่มี ADC เป็น enrichment แบ่งใส่หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 13x100 มิลลิเมตร หลอดละ 2 มิลลิลิตร จากนั้นเขี่ยเชื้อที่จะทดสอบจากขวดอาหารเลี้ยงเชื้อลงไป 1 ขดลวดวงกลม ปิดฝาให้แน่นนำเข้าตู้อบบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ครบกำหนดนำมาเติม 0.2 % potassium tellurite 2 หยด เขย่าแรงๆนำไปเก็บต่อที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อ่านผลในวันที่ 3 และ 14 โดยสังเกตตะกอนสีดำที่ก้นหลอดให้เป็นบวก เวลาอ่านผลห้ามเขย่าหลอด

ลำดับที่ 40 อ่านผลเมื่อใส่สาร potassium tellurite ลงไปแล้ว 3 วัน

ลำดับที่ 41 อ่านผลเมื่อใส่สาร potassium tellurite ลงไปแล้ว 14 วัน

- β-galactosidase activity test (76)

(ลำดับการทดสอบที่ 42)

เพื่อดูความสามารถของเอนไซม์ β-galactosidase ในการทำปฏิกิริยาเปลี่ยนสีของสารที่ใช้ทดสอบจากไม่มีสีเป็นสีเหลือง

การศึกษาใช้อาหารเหลว modified dubos broth (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข.) ทำให้ปราศจากเชื้อ แล้วเติมสาร 2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (BDH Chemical) ให้มีความเข้มข้น 0.1 % จากนั้นใส่ albumin fraction V ลงไปให้ได้ความเข้มข้น 4 % นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร แล้วแบ่งใส่หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 16x160 มิลลิเมตร หลอดละ 4 มิลลิลิตร จึงขูดเชื้อจากผิวอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 1 ขดลวดวงกลมใส่ลงในหลอดทดลองนั้น นำเข้าตู้อบบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน อ่านผลถ้ามีสีเหลืองเกิดขึ้น ให้ผลเป็นบวก

ลำดับที่ 42 β-galactosidase

- Absorption of malachite green on L-J. medium (61)

(ลำดับการทดสอบที่ 43)

ดูการดูดสี malachite green ของโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein-Jensens โดยหยดสารละลายแขวนตะกอนของเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อขวดละ 2 หยด นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนมีโคโลนีปรากฏให้เห็นจากนั้นสังเกตดูว่ามีสีเขียวของ malachite green หรือไม่ ถ้าไม่มีให้นำขวดเพาะเชื้อนั้นเข้าตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ จึงนำออกมาอ่านผลอีกครั้งหนึ่งถ้ามีสีเขียวให้ผลเป็นบวก

ลำดับที่ 43 absorp matachite green

- Sodium chloride tolerance test (76)

(ลำดับการทดสอบที่ 44)

ดูความทนทานของเชื้อมัยโคแบคทีเรียต่อความเข้มข้นของเกลือ sodium chloride

5 % ที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein Jensens โดยผสมเกลือลงไปก่อน เขย่าให้เข้ากันแล้วแบ่งใส่หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 16x160 มิลลิเมตร ทำให้อาหารแข็งในสภาพเอียง จากนั้นหยดเชื้อลงไป 2 หยด เก็บอบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน ถ้ามีโคโลนีปรากฏให้เห็นแสดงว่าเชื้อสายพันธุ์นั้นมีความทนทานต่อ 5 % sodium chloride ให้ผลเป็นบวก

ลำดับที่ 44 tolerance to 5% NaCl

- Ferric ammonium citrate reduction test หรือ Iron uptake (77)
(ลำดับการทดสอบที่ 45)

เพื่อดูความสามารถของเชื้อในการดูดซึมเหล็กจากอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าไปในเซลล์ โดยผสมสาร ferric ammonium citrate ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein-Jensens ให้มีความเข้มข้น 2 % ก่อนทำให้อาหารแข็ง แบ่งใส่หลอดแก้วฝาเกลียว ขนาด 16x160 มิลลิเมตร หลอดละ 4 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้อาหารสุกในสภาพเอียง แล้วหยดเชื้อลงไป 2 หยด นำเข้าตู้อบ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีโคโลนีปรากฏให้เห็น สังเกตดูจากสีของโคโลนีถ้าสีของโคโลนีเป็นสีสนิมเหล็ก แสดงว่ามีการดูดซึมเหล็กเข้าไปในเซลล์ให้ผลเป็นบวก

ลำดับที่ 45 Iron uptake

- Thiophene - 2 - carboxylic acid hydrazide susceptibility test (78-79)
(ลำดับการทดสอบที่ 46-47)

ดูความสามารถของเชื้อในการเจริญบนอาหารที่ผสมสาร thiophene - 2 - carboxylic acid hydrazide (TCH) (Sigma) โดยการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein - Jensen ให้มีความเข้มข้นของ TCH เป็น 1 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 16x160 มิลลิเมตร หลอดละ 4 มิลลิลิตร ทำให้อาหารสุกในสภาพเอียงหยดเชื้อที่จะทดสอบลงไป อบไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน ให้ผลบวกเมื่อมีโคโลนีปรากฏให้เห็น

ลำดับที่ 46 การเจริญบน L-J ที่ผสม TCH ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ลำดับที่ 47 การเจริญบน L-J ที่ผสม TCH ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

- Hydroxylamine susceptibility test (78, 80)

(ลำดับการทดลอบที่ 48-50)

ดูความทนทานของเชื้อต่อสาร hydroxylamine hydrochloride ($NH_2OH.HCl$) ที่ความเข้มข้น 125,250 และ500 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร โดยผสมในอาหาร Lowenstein - Jensen ก่อนทำให้อาหารแข็ง และให้ผลบวกเมื่อมีโคโลนีปรากฏให้เห็น

ลำดับที่ 48 การเจริญบน L-J ที่ผสม $NH_2OH.HCl$ ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ลำดับที่ 49 การเจริญบน L-J ที่ผสม $NH_2OH.HCl$ ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ลำดับที่ 50 การเจริญบน L-J ที่ผสม $NH_2OH.HCl$ ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

- P - nitrobenzoic acid susceptibility test (78, 81)

(ลำดับการทดสอบที่ 51)

ดูความสามารถของเชื้อที่ทนทานต่อสาร p-nitrobenzoic acid ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ที่ผสมลงในอาหาร Lowenstein - Jensen ปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดสอบที่ 46-50 ให้ผลบวกเมื่อมีโคโลนีปรากฏให้เห็น

- Growth on sauton agar medium (82)

(ลำดับการทดสอบที่ 52)

ดูความสามารถของเชื้อในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ sauton agar (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข.) โดยเตรียมอาหารนี้แบ่งใส่หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 16x160 มิลลิเมตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร ปล่อยให้แข็งในสภาพเอียง จากนั้นหยดสารละลายแขวนตะกอนของเชื้อที่จะใช้ทดสอบลงไป 2 หยด อบบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 เดือน ให้ผลบวกเมื่อมีโคโลนีปรากฏให้เห็น

- Picric acid sauton agar medium test (82)

(ลำดับการทดสอบที่ 53-54)

ดูความทนทานของเชื้อต่อสาร Picric acid ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2% ทดสอบโดยเตรียม sauton agar ที่ผสม Picric acid. ในความเข้มข้นดังกล่าว ทำให้

ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำจากนั้นแบ่งใส่หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 16x160 มิลลิเมตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร ปล่อยให้แข็งในสภาพเอียง หยดเชื้อที่จะทดสอบลงไป 2 หยด และอบบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน ให้ผลบวกเมื่อมีโคโลนีปรากฏให้เห็น

ลำดับที่ 53 ดูการเจริญของเชื้อบน sauton agar ที่ผสม 0.1 % picric acid

ลำดับที่ 54 ดูการเจริญของเชื้อบน sauton agar ที่ผสม 0.2 % picric acid

- Sodium nitrite sauton agar medium test (83)

(ลำดับการทดสอบที่ 55-56)

ดูความทนทานของเชื้อต่อสาร sodium nitrite ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 % การทดสอบปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดสอบที่ 53-54 แต่เตรียม sauton agar ที่ผสม sodium nitrite ให้มีความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 % ตามลำดับ

ลำดับที่ 55 ดูการเจริญของเชื้อบน sauton agar ที่ผสม 0.1 % sodium nitrite

ลำดับที่ 56 ดูการเจริญของเชื้อบน sauton agar ที่ผสม 0.2 % sodium nitrite

- Acid phosphatase test (84)

(ลำดับการทดสอบที่ 57)

ดูความสามารถของเชื้อในการสร้างเอนไซม์ acid phosphatase มาย่อยสลายสารที่ใช้ทดสอบซึ่งตรวจสอบได้ โดยดูการเปลี่ยนสีของสารนั้น การศึกษาทำได้โดยเตรียม buffer substrate (ดูวิธีเตรียมในภาคผนวก ค.) ใส่หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 13x100 มิลลิเมตร หลอดละ 2 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายแขวนตะกอนของเชื้อที่เพาะขึ้นใหม่ๆ ใส่ลงไปในหลอดปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำเข้าตู้อบเชื้อ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาตรวจสอบโดยหยดสารละลายของ 20 % Sodium bicarbonate ($NaCO_3$) และสาร dilute phenol reagent อย่างละ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที อ่านผลโดยถ้ามีการเปลี่ยนสีของสารละลายจากเขียวอ่อนเป็นสีน้ำเงินให้ผลเป็นบวก

- Acid production from carbohydrate (85)

(ลำดับการทดสอบที่ 58-78)

ดูความสามารถของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย ในการผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบ-ไฮเดรตซึ่งจะเปลี่ยนสีของ indicator คือ Bromcresol Purple จากสีม่วงเป็นสีเหลือง ทดสอบได้โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ผสม indicator และสารประกอบคาร์โบไฮเดรตในความเข้มข้น 1 % (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข.) สารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่ใช้มี 21 ชนิด คือ glucose, mannose, fructose, galactose, sucrose, maltose, manitol, starch, glycerol, arabinose, xylose, rhamnose, lactose, melibiose, raffinose, inositol, ducitol, adonitol, sorbose, sorbitol, และ trehalose จากนั้นหยดเชื้อที่จะทดสอบลงไป 2 หยด เก็บในตู้อบเชื้อ 37 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน จึงนำออกมาอ่านผล ให้บวกเมื่อมีการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

ลำดับที่ 58 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด glucose

ลำดับที่ 59 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด mannose

ลำดับที่ 60 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด fructose

ลำดับที่ 61 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด galactose

ลำดับที่ 62 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด sucrose

ลำดับที่ 63 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด maltose

ลำดับที่ 64 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด manitol

ลำดับที่ 65 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด starch

ลำดับที่ 66 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด glycerol

ลำดับที่ 67 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด arabinose

ลำดับที่ 68 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด xylose

ลำดับที่ 69 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด rhamnose

ลำดับที่ 70 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด lactose

ลำดับที่ 71 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด melibiose

ลำดับที่ 72 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด raffinose

ลำดับที่ 73 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด inositol

ลำดับที่ 74 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด ducitol

ลำดับที่ 75 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด adonitol

ลำดับที่ 76 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด sorbose

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับที่ 77 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด sorbitol

ลำดับที่ 78 ผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด trehalose

- Utilization of organic acids as the sole carbon source (85)

(ลำดับการทดสอบที่79-92)

ดูความสามารถของเชื้อในการใช้สารพวกเกลือของกรดอินทรีย์ (organic acid) เป็นแหล่งของคาร์บอนได้ โดยเตรียมอาหารแข็งที่ผสมเกลือของกรดอินทรีย์ และสารประกอบคาร์โบไฮเดรตให้มีความเข้มข้น 0.2 % (วิธีทำในภาคผนวก ข.) เกลือของกรดอินทรีย์และสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่ใช้มี 14 ตัวคือ sodium citrate, sodium pyruvate, sodium succinate, sodium benzoate, sodium tartrate, sodium acetate, sodiium oxalate, sodium malate, galactose, mannose, arabinose, xylose, melibiose และ rhamnose โดยมี phenol red เป็น indicator จากนั้นหยดเชื้อที่จะทดสอบลงไป 2 หยด นำเข้าตู้อบ 37 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน การอ่านผลจะให้บวกเมื่อมีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีส้มเป็นสีบานเย็น

ลำดับที่ 79 การใช้ Carbon source จากสารประกอบ sodium citrate

ลำดับที่ 80 การใช้ Carbon source จากสารประกอบ sodium pyruvate

ลำดับที่ 81 การใช้ Carbon source จากสารประกอบ sodium succinate

ลำดับที่ 82 การใช้ Carbon source จากสารประกอบ sodium benzoate

ลำดับที่ 83 การใช้ Carbon source จากสารประกอบ sodium tartrate

ลำดับที่ 84 การใช้ Carbon source จากสารประกอบ sodium acetate

ลำดับที่ 85 การใช้ Carbon source จากสารประกอบ sodium oxalate

ลำดับที่ 86 การใช้ Carbon source จากสารประกอบ sodium malate

ลำดับที่ 87 การใช้ Carbon source จากสารประกอบ galactose

ลำดับที่ 88 การใช้ Carbon source จากสารประกอบ mannose

ลำดับที่ 89 การใช้ Carbon source จากสารประกอบ arabinose

ลำดับที่ 90 การใช้ Carbon source จากสารประกอบ xylose

ลำดับที่ 91 การใช้ Carbon source จากสารประกอบ melibiose

ลำดับที่ 92 การใช้ Carbon source จากสารประกอบ rhamnose

- Amidase test (86)

(ลำดับการทดสอบที่ 93-102)

ดูความสามารถของเชื้อในการผลิตเอนไซม์ amidase ไปทำปฏิกิริยา hydrolysis กับสารประกอบ amide และปล่อยแอมโมเนียอิสระออกมา ซึ่งสามารถตรวจสอบได้

การทดสอบจะทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Lowenstein - Jensen นำเข้าตู้อบ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีโคโลนีของเชื้อเกิดขึ้น จึงคลายฝาเกลียวของขวดอาหารเลี้ยงเชื้อออก เพื่อให้เกิดการถ่ายเทอากาศนาน 1 วัน จากนั้นขูดเชื้อออกมาใส่หลอดปั่น ระวังอย่าให้มีเศษ อาหารเลี้ยงเชื้อติดออกมาด้วย แล้วชั่งน้ำหนักของเชื้อประมาณ 60 มิลลิกรัม ทำโคโลนีให้แตก ปั่นล้างด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อความเข้มข้น 0.9 % ที่ความเร็ว 3000 รอบ เป็นเวลา 30 นาที เอาตะกอนมาละลายด้วย M/15 phosphate buffer pH 7.2 ในปริมาณ 10 มิลลิกรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร ของ buffer จากนั้นขูดสารละลายแขวนตะกอนของเชื้อใน buffer มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 10x100 มิลลิเมตร ที่มีสารละลายของสารประกอบ amide อยู่ 0.5 มิลลิลิตร ในความเข้มข้น 0.00164 โมลาร์ (วิธีเตรียมดูในภาคผนวก ค.) และสารประกอบ amide ที่ใช้ทดสอบมี 10 ชนิดคือ acetamide, benzamide, urea, isonicotinamide, nicotinamide pyrazinamide, salicylamide, allantoin, succinamide, และ malonamide จากนั้นเขย่าให้เข้ากันเก็บในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส นาน 22 ชั่วโมง ครบกำหนดนำออกมาเติม 0.1 มิลลิลิตร ของสารละลาย Manganese sulfate ($MnSO_4$) 1 มิลลิลิตร ของ phenol reagent และ 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย 10 % (v/v) sodium hypochlorite solution ตามลำดับ (วิธีเตรียมในภาคผนวก ค.) เขย่าให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ถ้ามีแอมโมเนียอิสระอยู่จะให้สารละลายสีน้ำเงิน ให้ผลเป็นบวก

ลำดับที่ 93 การทดสอบ Acetamidase

ลำดับที่ 94 การทดสอบ Benzamidase

ลำดับที่ 95 การทดสอบ Urease

ลำดับที่ 96 การทดสอบ Isonicotinamidase

ลำดับที่ 97 การทดสอบ Nicotinamidase

ลำดับที่ 98 การทดสอบ Pyrazinamidase

ลำดับที่ 99 การทดสอบ Sallicylamidase

ลำดับที่ 100 การทดสอบ Allantoinase

ลำดับที่ 101 การทดสอบ Succinamidase

ลำดับที่ 102 การทดสอบ Malonamidase

- Utilization of nitrogen compound as the sole of nitrogen (84,87) (ลำดับการทดสอบที่ 103-114)

ดูความสามารถของเชื้อในการใช้สารประกอบไนโตรเจนเป็นแหล่งของไนโตรเจนทดสอบโดยเตรียมอาหารที่จะใช้ทดสอบ ผสมสารประกอบไนโตรเจนให้มีความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข.) สารประกอบไนโตรเจนที่ใช้มี 12 ชนิดคือ sodium L-glutamate, L-serine, benzamide, pyrazinamide, isonicotinamide, sodium nitrate, sodium nitrite, L-methionine, acetamide urea, nicotinamide และ succinamide แบ่งอาหารนั้นใส่หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 16x150 มิลลิเมตร ทำให้แข็งในสภาพเอียง จากนั้นหยดเชื้อที่จะทดสอบลงไป 2 หยดเก็บไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน อ่านผลโดยดูการเจริญของเชื้อบนผิวอาหารนั้น ถ้ามีการเจริญให้ผลเป็นบวก

ลำดับที่ 103 การใช้ nitrogen จากสารประกอบ sodium L-glutamate

ลำดับที่ 104 การใช้ nitrogen จากสารประกอบ L-serine

ลำดับที่ 105 การใช้ nitrogen จากสารประกอบ benzamide

ลำดับที่ 106 การใช้ nitrogen จากสารประกอบ pyrazinamide

ลำดับที่ 107 การใช้ nitrogen จากสารประกอบ isonicotinamide

ลำดับที่ 108 การใช้ nitrogen จากสารประกอบ sodium nitrate

ลำดับที่ 109 การใช้ nitrogen จากสารประกอบ sodium nitrite

ลำดับที่ 110 การใช้ nitrogen จากสารประกอบ L-methionine

ลำดับที่ 111 การใช้ nitrogen จากสารประกอบ acetamide

ลำดับที่ 112 การใช้ nitrogen จากสารประกอบ urea

ลำดับที่ 113 การใช้ nitrogen จากสารประกอบ nicotinamide

ลำดับที่ 114 การใช้ nitrogen จากสารประกอบ succinamide

- Utilization of nitrogen compound as simultaneous nitrogen and carbon source (84,88)

(ลำดับการทดสอบที่ 115-120)

ดูความสามารถของเชื้อในการใช้สารประกอบไนโตรเจนเป็นแหล่งของไนโตรเจนและคาร์บอนพร้อมกัน ทดสอบโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารประกอบไนโตรเจนซึ่งมีอยู่ 2 ประเภท คือสารประกอบไนโตรเจนที่เป็น amide และสารประกอบไนโตรเจนที่เป็น amine อย่างใดอย่างหนึ่ง ให้มีความเข้มข้น 0.02 และ 0.1 โมลาร์ ตามลำดับ (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข.) สารประกอบไนโตรเจนที่เป็นสารประกอบ amide คือ sodium L-glutamate, L-serine, acetamide และ benzamide ส่วนสารประกอบไนโตรเจนที่เป็นสารประกอบ amine คือ D-glucosamine hydrochloride และ ethanolamine รวมสารประกอบไนโตรเจนทั้งสิ้น 6 ชนิด จากนั้นหยดเชื้อที่ใช้ทดสอบลงไป 2 หยด เก็บอบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน อ่านผลโดยดูการเจริญของเชื้อบนผิวอาหารนั้น ถ้ามีการเจริญของเชื้อให้ผลเป็นบวก

ลำดับที่ 115 ใช้สารประกอบ sodium L-glutamate

ลำดับที่ 116 ใช้สารประกอบ L-serine

ลำดับที่ 117 ใช้สารประกอบ acetamide

ลำดับที่ 118 ใช้สารประกอบ benzamide

ลำดับที่ 119 ใช้สารประกอบ D-glucosamine

ลำดับที่ 120 ใช้สารประกอบ ethanolamine

ตารางที่ 7 กลุ่มลักษณะ, ลักษณะ, จำนวนลักษณะที่ใช้ทดสอบและลำดับการใช้ทดสอบ

กลุ่มลักษณะ	ลักษณะ	จำนวนลักษณะที่ใช้ทดสอบ	ลำดับการทดสอบ
1.	Acid-fastness	2	1. complete acid fast
			2. partial acid fast
2.	Cell morphology	4	3. long rod
			4. short rod
			5. coccoid
			6. pleomorphism
3.	Colony morphology	2	7. smooth
			8. rough
4.	Pigment in the dark	4	9. white
			10. yellow
			11. slightly yellow
			12. faint pink
5.	Photochromogenicity	1	13. photochromogenicity
6.	Pigment after exposed continuous light	4	14. white
			15. yellow
			16. slightly yellow
			17. faint pink
7.	Growth rate	2	18. < 4 days
			19. > 4 days
8.	Texture of culture	2	20. granular
			21. butyrous
9.	Emulsification of culture	2	22. difficult
			23. easy
10.	Edge of colony	2	24. entire
			25. undulate

ตารางที่ 7 (ต่อ)

กลุ่มลักษณะ	ลักษณะ	จำนวนลักษณะที่ใช้ทดสอบ	ลำดับการทดสอบ
11.	Adhesive to the medium	1	26. adhesive to medium
12.	Growth at different temperature	4	27. 25°C
			28. 37°C
			29. 42°C
			30. 45°C
13.	Niacin test	1	31. niacin
14.	Nitrate redution test 2 hours	1	32. nitrate reduction
15.	Semi-Quantitative catalase test	2	33. foam height > 45 mm.
			34. foam height < 45 mm.
16.	Catalase tolerance at 68°C,20 mins.	1	35. catalase 68°C
17.	Arylsulfatase test	2	36. 3 days test
			37. 14 days test
18.	Tween 80 hydrolysis test	2	38. 3 days test
			39. 14 days test
19.	Tellurite reduction test	2	40. 3 days test
			41. 14 days test
20.	β-galactosidase test	1	42. β-galactosidase
21.	Absorption of malachite green	1	43. absorp malachite green
22.	Resistance to 5% NaCl	1	44. 5 % NaCl
23.	Iron uptake	1	45. iron uptake
24.	Resistance of TCH in L-J medium	2	46. TCH 1 µg/ml
			47. TCH 10 µg/ml

ตารางที่ 7 (ต่อ)

กลุ่มลักษณะ	ลักษณะ	จำนวนลักษณะที่ใช้ทดสอบ	ลำดับการทดสอบ
25.	Resistance of $NH_2OH.HCl$ on L-J medium	3	48. $NH_2OH.HCl$ 125 µg/ml
			49. $NH_2OH.HCl$ 250 µg/ml
			50. $NH_2OH.HCl$ 500 µg/ml
26.	Resistance to PNB in L-J medium	1	51. PNB 500 µg/ml
27.	Growth on Sauton Agar	1	52. growth on sauton agar
28.	Tolerance to Picric acid	2	53. 0.1 % picric acid
			54. 0.2 % picric acid
29.	Tolerance to $NaNO_2$	2	55. 0.1 % $NaNO_2$
			56. 0.2 % $NaNO_2$
30.	Acid phosphatase test	1	57. acid phosphatase
31.	Acid production from carbohydrate	21	58. glucose
			59. mannose
			60. fructose
			61. galactose
			62. sucrose
			63. maltose
			64. manitol
			65. starch
			66. glycerol
			67. arabinose
			68. xylose
			69. rhamnose
			70. lactose
			71. melibiose

ตารางที่ 7 (ต่อ)

กลุ่มลักษณะ	ลักษณะ	จำนวนลักษณะที่ใช้ทดสอบ	ลำดับการทดสอบ
32.	Sole source of carbon	14	72. raffinose 73. inositol 74. ducitol 75. adonitol 76. sorbose 77. sorbitol 78. trehalose 79. sodium citrate 80. sodium pyruvate 81. sodium succinate 82. sodium benzoate 83. sodium tartrate 84. sodium acetate 85. sodium oxalate 86. sodium malate 87. galactose 88. mannose 89. arabinose 90. xylose 91. melibiose 92. rhamnose
33.	Amidase test 22 hours	10	93. acetamidase 94. benzamidase 95. urease 96. isonictinamidase 97. nicotinamidase 98. pyrazinamidase

ตารางที่ 7 (ต่อ)

กลุ่มลักษณะ	ลักษณะ	จำนวนลักษณะที่ใช้ทดสอบ	ลำดับการทดสอบ
34.	Sole source of nitrogen	12	99. salicylamidase 100. allantoinase 101. succinamidase 102. malonamidase 103 sodium L-glutamate 104. L-serine 105. benzamide 106. pyrazinamide 107. isonicotinamide 108. sodium nitrate 109. sodium nitrite 110. L-methionine 111. acetamide 112. urea 113. nicotinamide 114. succinamide
35.	Sole source of carbon & nitrogen	6	115. sodium L-glutamate 116. L-serine 117. acetamide 118. benzamide 119. D-glucosamine hydrochloride 120. ethanolamine
	Total	120	

การวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์

ขั้นตอนการศึกษา Numerical Taxonomy

เชื้อที่ใช้ศึกษา ต้องมาจากหลายๆแหล่งต่างๆกัน พร้อมกับต้องมีเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) รวมอยู่ในกลุ่มของเชื้อที่จะใช้ศึกษาด้วย

การทดสอบ ต้องประกอบด้วยลักษณะต่างๆทั้งทางสัณฐานวิทยา (morphological) สรีรวิทยา (physiological) และชีวเคมี (biochemical) รวมกันแล้วไม่น้อยกว่า 50 ลักษณะคือให้อยู่ในช่วง > 50–200 ลักษณะหรือมากกว่า และต้องกำหนดให้ ลักษณะทั้งหมดมีความสำคัญเท่าเทียมกัน

ผลการทดสอบ จะมีเพียง บวก หรือ ลบ เท่านั้น

การคำนวนค่าเปอร์เซนต์ความคล้ายคลึง

เชื้อ 113 สายพันธุ์หลังจากทำการทดสอบจนครบทุกลักษณะแล้ว ก่อนจะนำเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อมาคำนวณค่าเปอร์เซนต์ความคล้ายคลึง ต้องมีการเปลี่ยนเครื่องหมายบวกและลบเป็นสัญญลักษณ์ตัวเลข 1 และ 0 ตามลำดับ แบบ Two state coding (89) การคำนวณจะมี 2 แบบคือ

1. ใช้สูตรของ Sokal และ Michesner ในปี 1958 (90) โดยการคำนวณ % ความคล้ายคลึง แบบ matching coefficient (S_{sm}) ซึ่งมีสูตรคำนวณดังนี้คือ

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

เมื่อ a = จำนวนของการทดสอบระหว่างเชื้อ 2 สายพันธุ์ที่เป็นบวกทั้งคู่และเป็นลบทั้งคู่

d = จำนวนของการทดสอบระหว่างเชื้อ 2 สายพันธุ์ที่เป็นบวก และเป็นลบ

2. การคำนวณ % ความคล้ายคลึงโดยใช้ coefficient แบบ Jaccard เรียกว่า Jaccard coefficient (S_J) (13) ซึ่งการคำนวณจะเหมือนกับ matching coefficient แต่ต่างกันตรงที่ไม่เอาจำนวนที่ผลการทดสอบเป็นลบทั้งคู่ มาคิดคำนวณด้วย สูตรคำนวณจึงเป็น

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

เมื่อ a = จำนวนของการทดสอบระหว่างเชื้อ 2 สายพันธุ์ที่เป็นบวกทั้งคู่

d = จำนวนของการทดสอบระหว่างเชื้อ 2 สายพันธุ์ที่เป็นลบทั้งคู่

all = จำนวนของการทดสอบทั้งหมด

การคำนวณค่าเปอร์เซนต์ความคล้ายคลึงตลอดจนถึงการจัดแบ่งกลุ่มนั้น เนื่องจากเป็นข้อมูลขนาดใหญ่จึงจำเป็นต้องใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ช่วยในการคำนวณ ซึ่งในปัจจุบันได้มีโปรแกรมสำเร็จรูปเพื่อให้คำนวณค่าเปอร์เซนต์ความคล้ายคลึง และการจัดแบ่งกลุ่มโดยวิธี Unweight pair Group Method with Arithmetic Average linkage technigue (UPGMA) ซึ่งจะแสดงการจัดแบ่งกลุ่มออกมาในรูปตารางเดนโดรแกรม (Dendrogram) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปที่ชื่อว่า The Numerical Taxonomy Program (PC-TAXAN) Version 1.2 ได้รับจาก Prof R.R. Colwell,Maryland,U.S.A. โดยใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ยี่ห้อ NEC รุ่น APC IV (advance personel computer)

เมื่อได้ตารางเดนโดรแกรมมาแล้วขั้นตอนต่อไปคือการเลือกค่าเปอร์เซนต์ความคล้ายคลึงที่สูงที่สุดมาเป็นแนวตัดแบ่งกลุ่มให้ได้จำนวนกลุ่มมากที่สุด จากนั้นคำนวนค่าเปอร์เซนต์ของแต่ละกลุ่มที่แสดงปฏิกิริยาบวกต่อการทดสอบลักษณะทั้ง 120 ลักษณะ แล้วนำค่าเปอร์เซนต์ที่ได้นี้ไปใช้ในการหาลักษณะสำคัญที่ใช้แยกความแตกต่างของกลุ่มต่างๆโดยมีหลักเกณฑ์ว่าผลการทดสอบลักษณะใดที่อยู่ในช่วง 0 - 16 % ที่แสดงปฏิกิริยาบวกของแต่ละกลุ่มให้ลักษณะนั้นเป็น "-"สำหรับกลุ่มนั้นๆ และเป็น "$\mp$" ."$\pm$" และ"+" เมื่ออยู่ในช่วง 17-50 %, 51-84 %, และ 85-100 % ตามลำดับ