ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. De Man Rogosa Sharpe (MRS) ประกอบด้วย

Proteose peptone	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นให้เข้ากันดี เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Nutrient Agar (NA) ประกอบด้วย

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นให้เข้ากันดีเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Nutrient Soft Agar ประกอบด้วย

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Agar	8.5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นให้เข้ากันดีเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Nutrient Broth

สูตรและวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2 แต่ไม่เติมผงวุ้น

5. Tryptic Soy Agar ประกอบด้วย

Tryptone	5.0	กรัม
Soytone	5.0	กรัม
Sodium chloride	15.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นให้เข้ากันดีเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Tryptic Soy Broth

สูตรและวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 5 แต่ไม่เติมวุ้น

7. Tryptic Soy Agar (ร้อยละ 3.0 NaCl) ประกอบด้วย

Tryptone	5.0	กรัม
Soytone	5.0	กรัม
Sodium chloride	30.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นให้เข้ากันดีเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. Tryptic Soy Broth (ร้อยละ 3.0 NaCl)

สูตรและวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 7 แต่ไม่เติมผงวุ้น

9. Luria-Bertani Agar ประกอบด้วย

Tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Sodium chloride	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นให้เข้ากันดีเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. Luria-Bertani Broth

สูตรและวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 9 แต่ไม่เติมผงวุ้น

11. Minimal Medium

Peptone water	2.0	กรัม
Yeast extract	2.0	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
K_2HPO_4	0.04	กรัม
KH_2PO_4	0.04	กรัม
$CaCl_2.6H_2O$	0.01	กรัม
$NaHCO_3$	2.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
Bile salts (Oxgall)	0.5	กรัม
Tween 80	2.0	มิลลิลิตร
Hemin	0.05	กรัม
Cysteine-HCl	0.5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ชั่งสารเคมีตามอัตราส่วนที่ระบุไว้ข้างต้นละลายในน้ำกลั่นแล้วต้มให้เดือด หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเติม Cysteine-HCl 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.9 ดูดอาหารใส่ขวด นำไปพ่นด้วยก๊าซไนโตรเจนและปิดด้วย septum และนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
สารเคมีและวิธีการเตรียม

1. น้ำยาทดสอบเอนไซม์คะตะเลส (ร้อยละ 3 H_2O_2)

H_2O_2 (ร้อยละ 35)	8.6	มิลลิลิตร
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

เมื่อเตรียมเสร็จให้นำไปใส่ไว้ในขวดสีชาแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีแบบแกรม

2.1 Crystal violet

- สารละลาย A: ละลาย crystal violet 2.0 กรัม ใน ethyl alcohol ความเข้มข้น ร้อยละ 95 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

- สารละลาย B: ละลาย ammonium oxalate 0.8 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกันตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรอง ได้เป็น Crystal violet staining reagent

2.2 Ethyl alcohol ร้อยละ 95

2.3 สารละลายไอโอดีน

Iodine	1	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร
Potassium iodide	20	กรัม

ใช้น้ำเพียงเล็กน้อยละลายไอโอดีนและ potassium iodide จนหมดจึงเติมน้ำที่เหลือลงไปแล้วละลายให้เข้ากันดี

2.4 Safranin (counterstain)

- counterstain : ละลาย safranin O ร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ใน ethyl alcohol ความเข้มข้น ร้อยละ 95 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร

2.5 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	9.0	กรัม
$Na_2HPO_4.2H_2O$	9.0	กรัม
KH_2PO_4	1.5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นให้เข้ากันดี คนให้ส่วนผสมทั้งหมดเข้ากันด้วย magnetic stirrer จากนั้นปรับค่าพีเอชเป็น 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 ด้วย 5 M HCl นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 10 คุณลักษณะที่แตกต่างของเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลกติก

Table 10. Differential Characteristics of lactic acid bacteria.

Character	Rods		Cocci							
	Carnob.	*Lactob.*	*Aeroc.*	*Enteroc.*	*Lactoc.* *Vagoc.*	*Leucon.*	*Pedioc.*	*Streptoc.*	*Tetrageno.*	*Weissella*[a]
Tetrad formation	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO_2 from glucose[b]	-	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Growth at 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Growth at 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Growth in 6.5% NaCl	ND[d]	±	+	+	-	±	±	-	+	±
Growth in 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Growth at pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
Growth at pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Lactic acid[e]	L	D, L, DL[f]	L	L	L	D	L, DL[f]	L	L	L, DL[f]

+, positive; -, negative; ±, response varies beween species; ND, not determined.

[a] *Weissella* strains may also be rod-shaped

[b] Test for homo- or heterofermentation of glucose; negative and positive denotes homofermentative and heterofermentative, respectively.

[c] Small amount of Co_2 can be produced, depending on media.

[d] No growth in 8% NaCl has been reported.

[e] Configuration of lactic acid produced from glucose.

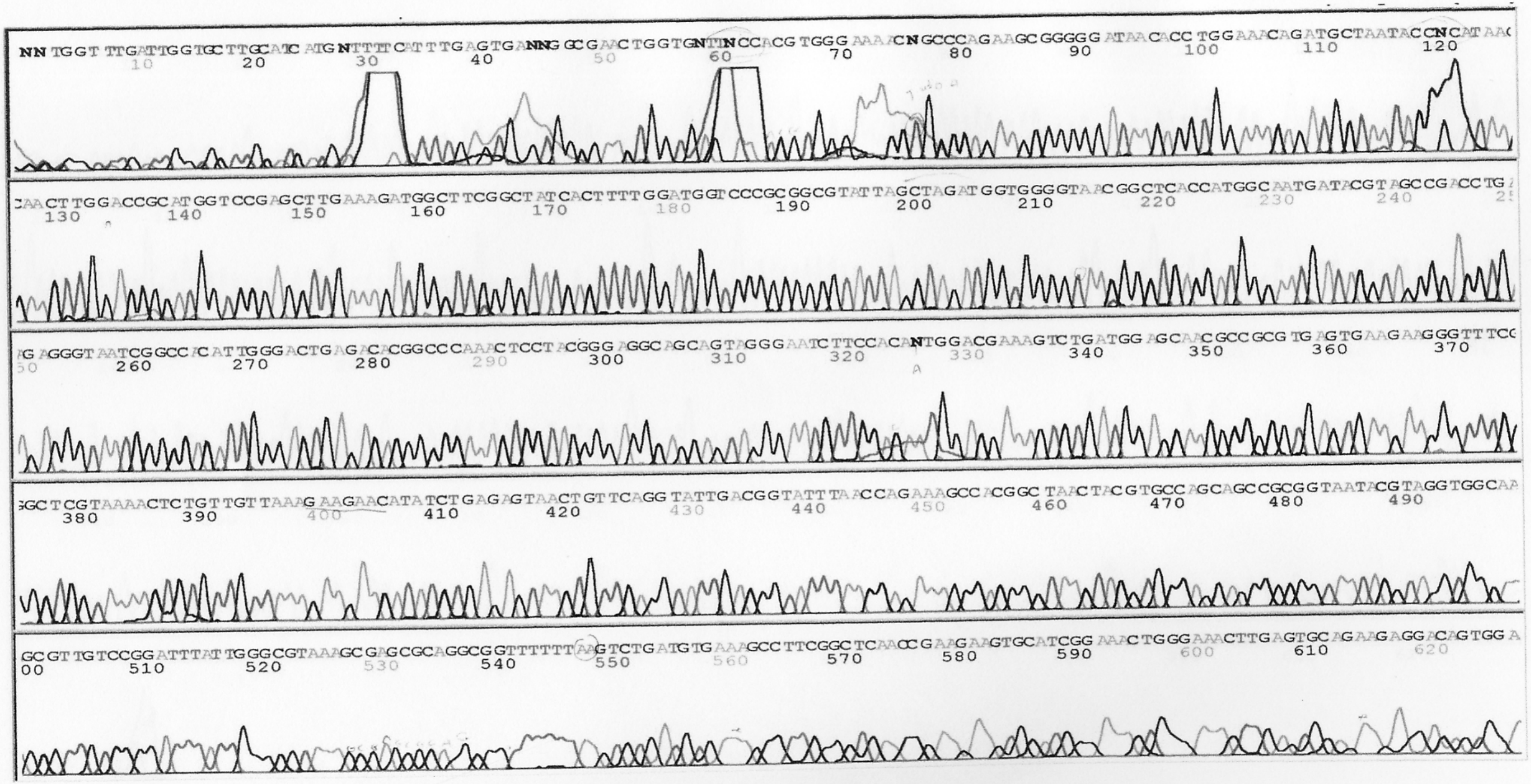
[f] Production of D-, L-, or DL- lactic acid varies between species.

ที่มา : (Salmimnen and Wright, 1993)

TTGTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACG
AACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAG
TGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGA
TAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCAT
GGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCG
CGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATA
CGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG
CCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACG
AAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCG
TAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGG
TATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTA
AAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTC
AACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGA
CAGTGGAA

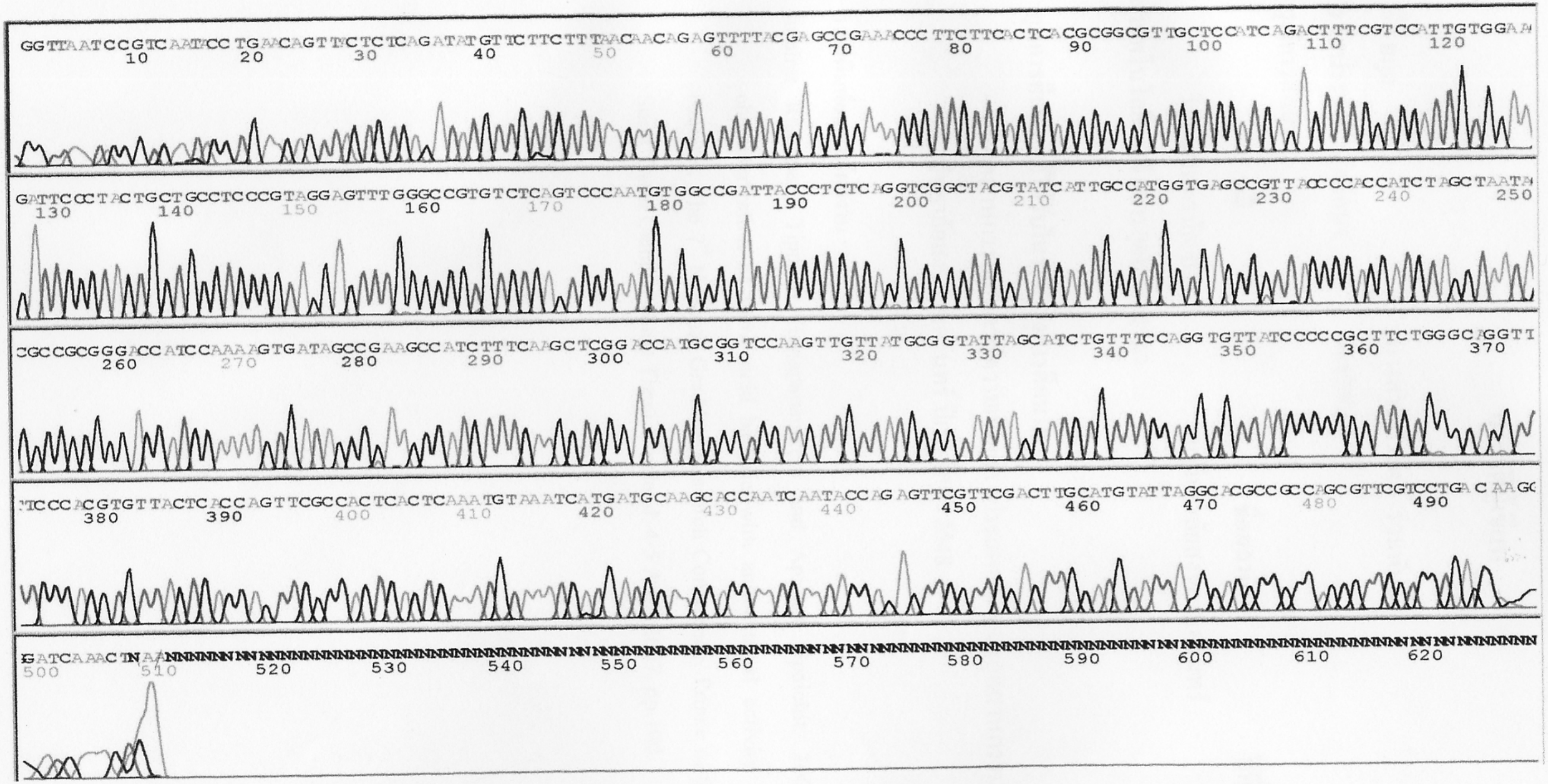
ภาพที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จากแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ JR21

Figure 13. The nucleotide sequence of 16S rDNA from the strain JR21.



ภาพที่14 โครมาโทแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน forward ของ16s rDNA จากเชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ JR21

Figure 14. Chromatogram of forward nucleotide sequence of 16S rDNA from the strain JR21.



ภาพที่ 15 โครมาโทแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน reverse ของ16s rDNA จากเชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ JR21

Figure 15. Chromatogram of reverse nucleotide sequence of 16S rDNA from the strain JR21.