บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. วัตถุดิบที่ใช้

1.1 อาหารหมักจากสัตว์ ได้แก่ ปลาส้ม กุ้งส้ม ไตปลา ปลาร้า หนาง แหนม กะปิ หอยดอง และน้ำเคย

1.2 อาหารหมักจากพืช ได้แก่ ผักเสี้ยนดอง ผักกาดดอง ข้าวหมาก สะตอดอง หัวไชโป๊ หน่อไม้ดอง กระเทียมดอง และกิมจิ

2. เชื้อจุลินทรีย์

2.1 เชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้คัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรียแลกติก

แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	ที่มา
Staphylococcus aureus	ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
Bacillus cereus	ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
Listeria monocytogenes	ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
Salmonella enterica serovar Typhi	ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
Escherichia coli	ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
Vibrio parahaemolyticus	ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

2.2 เชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ทดสอบ

แบคทีเรียแลกติก	ที่มา
JH1	กุ้งส้ม
JH4	กุ้งส้ม
JHa4	กุ้งส้ม
JOa1	สะตอดอง
JO6	สะตอดอง
JO16	สะตอดอง
JR21 (*Lactobacillus plantarum* JR21)	กะปิ
JB10	แหนม

3. สารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ และเอนไซม์

Chemical media and enzyme	Company/Grade/Country
1. De Man Rogosa Sharpe (MRS)	Himedia/Analytical/India
2. NaCl	Labscan/Analytical/Thailand
3. HCl	Labscan/Analytical/Thailand
4. NaOH	Merck/Analytical/Germany
5. yeast extract	Ajex Finechem/Analytical/Australia
6. nitrogen gas	Ajex Finechem/Analytical/Australia
7. peptone water	Ajex Finechem/Analytical/Australia
8. tween 80	Ajex Finechem/Analytical/Australia
9. bile salt (Oxgall)	Himedia/Analytical/India
10. cysteine-HCL	Himedia/Analytical/India
11. $NaHCO_3$	Fluka/Germany
12. $MgHO_4.7H_2O$	Ajex Finechem/Analytical/Australia
13. $CaCl_2.6H_2O$	Ajex Finechem/Analytical/Australia
14. KH_2PO_4	Ajex Finechem/Analytical/Australia
15. K_2HPO_4	Ajex Finechem /Analytical/Australia
16. beef extract	Himedia/Analytical/India
17. peptone	Himedia/Analytical/India
18. soytone	Merck/Analytical/Germany
19. tryptone	Himedia/Analytical/India
20. agar	Himedia/Analytical/India
21. proteinase K	Singma/Germany
22. α-chymotrypsin	Singma/Germany
23. pronase E	Singma/Germany
24. trypsin	Singma/Germany
25. catalase	Singma/Germany

4. อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์/เครื่องมือ	บริษัท/ประเทศผู้ผลิต
1. ตู้ถ่ายเชื้อ (biological safety cabinet ยี่ห้อ Hotpack รุ่น 527042, 41, 62, 61 class II type A)	Hotpack/USA
2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325	Tomy Seiko/Japan
3. ไมโครปิเปต (ขนาด 10-100 ไมโครลิตร)	Labmate/Poland
4. ไมโครปิเปต (ขนาด 1,000 ไมโครลิตร)	Gilson/UK
5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Metter Toledo 320	Mettier Toledo/USA
6. multichanels pipet (ขนาด 20-200 ไมโครลิตร)	Transferpette/USA
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น WB 14	Memmert/Germany
8. กระดาษกรอง (membrane filter) ขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร	Scheicher&Schuell/Germany
9. ถาด 96 หลุม (Microtiter plate 96 flat bottom WI)	NUNC™/Denmark
10. microplate reader รุ่น Powerwave X	Biotek/UK
11. vortex mixer	Scientific industries/USA
12. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น SPS402F	Scout™ Pro/USA
13. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น A210P	Satorius/USA
14. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ยี่ห้อ Technical cooperation รุ่น U-2000	Thermo electron cooperation/USA
15. stomacher รุ่น 400CIR	Seward/England
16. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ Eppendorf รุ่น 5415R	Eppendorf/Germany
17. ตู้อบ (hot air oven) ยี่ห้อ Sanyo รุ่น Mov212	Sanyo electric/Japan
18. หัวกรองเชื้อ (millipore filter)	Millipore coorperation/USA

วิธีการทดลอง

1. การคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารยับยั้งจากตัวอย่างอาหารหมัก

1.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างอาหารหมักที่บรรจุอยู่ในถุงพลาสติกมัดด้วยยาง สุ่มเก็บตัวอย่างโดยสอบถามจากแม่ค้าว่าอาหารหมักเหล่านั้นจะต้องมีอายุการหมักไม่เกิน 7 วัน และอาหารหมักจะต้องไม่มีลักษณะผิดปกติ เช่น มีราขึ้น มีกลิ่นเหม็น ในระหว่างการนำตัวอย่างอาหารหมักมาวิเคราะห์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียแลกติกในห้องปฏิบัติการ จะเก็บตัวอย่างอาหารหมักไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยจะเก็บไว้ไม่เกิน 3 วัน

สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารหมักพื้นบ้านจากตลาดสดและตลาดนัดในจังหวัดสุราษฎร์ธานี ประกอบด้วย

1.1.1 อาหารหมักพื้นบ้านที่ทำจากสัตว์ได้แก่ ปลาส้ม ไตปลา ปลาร้า กุ้งส้ม หนาง แหนม กะปิ หอยดอง และน้ำเคย

1.1.2 อาหารหมักพื้นบ้านที่ทำจากพืชได้แก่ ผักเสี้ยนดอง ผักกาดดอง สะตอดอง หัวไชโป๊ หน่อไม้ดอง กระเทียมดอง ข้าวหมาก และกิมจิ

1.2 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus*

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักไปพร้อมกับการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีกิจกรรมยับยั้ง *S. aureus* ดังต่อไปนี้

1.2.1 การเตรียมแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

ทำการเตรียมเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบ *S. aureus* โดยเขี่ยเชื้อจากอาหารวุ้นแข็งเอียงที่เก็บใน stock มา 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB จำนวน 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่บ่มไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB จำนวน 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB เพื่อให้ได้เชื้อประมาณ 6.2×10^{6} CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีอาหาร NA soft agar (วุ้นร้อยละ 0.85) จำนวน 9 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 6.2×10^{5} CFU ต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคทีเรียแลกติก เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

1.2.2 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลกติก

คัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งโดยวิธีการ Sandwich test (ดัดแปลงจาก Bromberg *et al.*, 2004) โดยทำการชั่งตัวอย่างอาหารหมักมา 25 กรัม ใส่ใน stomacher bag จากนั้นจึงเท normal saline solution (เกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.85) 225 มิลลิลิตร ลงไปแล้วนำไปใส่

ในเครื่อง stomacher ใช้ความเร็วรอบปานกลางเป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางส่วนผสมจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม แล้วนำเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวปริมาตร 1 มิลลิลิตร ของแต่ละความเจือจางมาทำการ pour plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ หลังจากนั้นทำการเทอาหาร soft nutrient agar (NA) ที่มีวุ้นร้อยละ 0.85 ทับโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS โดยในอาหาร soft nutrient agar (NA) ดังกล่าวมีแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (แบคทีเรียอินดิเคเตอร์) คือ *S. aureus* ที่มีปริมาณเชื้อ 6.2×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียมจากข้อ 1.2.1 จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เททับด้วย *S. aureus* ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการตรวจสอบว่าโคโลนีใดของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งได้ สังเกตจากการที่ *S. aureus* ไม่สามารถเจริญรอบโคโลนีนั้นๆคือเกิดวงใสของการยับยั้งรอบโคโลนี หลังจากนั้นทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกให้บริสุทธิ์และทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็นแบคทีเรียแลกติก โดยการย้อมสีแบบแกรม (Gram stain) เพื่อตรวจดูการติดสี รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ถ้าเป็นแบคทีเรียแลกติกจะติดสีแกรมบวก เซลล์ไม่มีการเคลื่อนที่ และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ไว้ในสารละลายกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 30 ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

2.1 คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ด้วยวิธี Broth microdilution assay (ดัดแปลงจาก Khouiti and Simon, 1997; Kang and Lee, 2005) โดยนำน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ไม่เจือจางและเจือจางครั้งละ 1 เท่า ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS มาวัดค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อมิลลิลิตรของส่วนใสในถาดหลุมแบบ 96 หลุม ด้วยวิธี Broth microdilution assay โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แล้วเจือจางให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.2×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB นำส่วนใสแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของถาดหลุมแบบ 96 หลุม ที่มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่จะทดสอบ (6.2×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร) จำนวน 100 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ทดสอบปริมาณ 100 ไมโครลิตร แต่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ลงไปแทน นำไปบ่ม

ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นของการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ทำการหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารยับยั้งที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ 24 ชั่วโมง โดยรายงานในหน่วย Arbitary Unit ต่อมิลลิลิตร (AU ต่อมิลลิลิตร) ซึ่งคำนวณจากการนำค่าความเจือจางสูงสุดที่มองไม่เห็นความขุ่นของการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (Dilution factor) คูณกับ 1,000 ไมโครลิตร หารด้วยปริมาตรส่วนใสที่เติมลงไปทดสอบ (ดัดแปลงจาก Pilasombut *et al.*, 2006)

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง (AU ต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{1,000 ไมโครลิตร x Dilution factor}}{\text{100 ไมโครลิตร}}$$

2.2 คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้สูง

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการยับยั้งได้สูงด้วยวิธี Broth microdilution assay โดยนำน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสที่ได้มาปรับค่าพีเอชเป็น 6.5 หยดเอนไซม์คะตะเลส (100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ก่อนจะปรับค่าพีเอชของส่วนใสให้มีค่าเท่ากับ 5.0 ด้วย 5N HCl กรองส่วนใสผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ในสภาวะปลอดเชื้อ หลังจากนั้นนำส่วนใสที่ไม่เจือจางและเจือจางครั้งละ 1 เท่า ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS มาวัดค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อมิลลิลิตรของส่วนใสในถาดหลุมแบบ 96 หลุม ด้วยวิธี Broth microdilution assay ทำการเลี้ยงแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* ในอาหาร Tryptic Soy Broth, *Escherichia coli* ในอาหาร Luria-Bertani Broth และ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหาร Tryptic Soy Broth (3% NaCl) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเจือจางให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับประมาณ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหารที่เหมาะสมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แต่ละสายพันธุ์ แล้วนำส่วนใสแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของถาดหลุมแบบ 96 หลุม ที่มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่จะทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยให้มีปริมาณแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในปริมาตรสุดท้าย (200 ไมโครลิตร) เท่ากับประมาณ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS แทนการใช้ส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลกติก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง

microplate reader ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ทำการหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารยับยั้งที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ 24 ชั่วโมง รายงานในหน่วย Arbitary Unit ต่อมิลลิลิตร (AU ต่อมิลลิลิตร)

3. การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

3.1 ทดสอบทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแบบแกรม การตรวจดูรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์

นำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวๆมา smear ลงในหยดน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อบนแผ่นสไลด์ ใช้ loop เขี่ยเชื้อให้แผ่เป็นแผ่นฟิล์มบางๆ โดยวนไปในทิศทางเดียวกัน ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปผ่านเปลวไฟ 4-5 ครั้ง ตั้งไว้ให้เย็นก่อนนำมาย้อมสีแบบแกรมโดยหยด crystal violet ให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างน้ำและเทน้ำออกให้หมด หยด Gram iodine ทิ้งไว้ 1 นาที ก่อนล้างน้ำและหยดด้วย alcohol ความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยเอียงสไลด์ไปมาประมาณ 5-10 วินาที ล้างน้ำและหยด safranin ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างน้ำและซับให้แห้งก่อนตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.2 ทดสอบทางชีวเคมี ตามวิธีการของ Bergey's manual determinative bacteriology volume 2 (Kandler and Weiss, 1986) และ Lactic acid bacteria (Salminen and Wright, 1993) ซึ่งเป็นการเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกในระดับจีนัส

3.2.1 ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีการเติม bromocresol purple ร้อยละ 0.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญจากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS จากสีม่วงเป็นสีเหลือง

3.2.2 ทดสอบการเจริญในเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 6.5 และ 18

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 และ 18 และมีการเติม bromocresol purple ร้อยละ 0.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญจากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS จากสีม่วงเป็นสีเหลือง

3.2.3 ทดสอบการเจริญที่พีเอช 4.4 และ 9.6

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีการปรับค่าพีเอชเป็น 4.4 และ 9.6 ด้วย 5N NaOH หรือ 5N HCl และมีการเติม bromocresol purple ร้อยละ 0.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของแบคทีเรียแลกติกได้จากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS จากสีม่วงเป็นสีเหลือง

3.2.4 ตรวจสอบการจัดเรียงตัวของเซลล์ (tetrad formation)

สังเกตการเรียงตัวของแบคทีเรียแลกติกจากข้อ 2.2 ที่มี 4 เซลล์เรียงติดกันโดยการย้อมสีแบบแกรม

3.2.5 ทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล hexose และ pentose

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคส และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีน้ำตาลไรโบสเป็นส่วนประกอบในอัตราร้อยละ 2.0 และเติม bromocresol purple ร้อยละ 0.2 โดยภายในหลอดทดลองบรรจุหลอด Durham tube เพื่อดักเก็บก๊าซ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตความสามารถในการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียแลกติก โดยดูจากการเปลี่ยนสีของ bromocresol purple จากสีม่วงเป็นสีเหลืองและการเกิดฟองก๊าซ บันทึกผลโดยการแบ่งเชื้อแบคทีเรียแลกติกออกเป็น 3 กลุ่มหลัก คือ

ก. Obligately homofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาล hexose ได้ แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาล pentose แต่ไม่เกิดก๊าซ

ข. Facultative heterofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาล hexose และน้ำตาล pentose ได้ แต่ไม่เกิดก๊าซ

ค. Obligately heterofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้สามารถหมักได้ทั้งน้ำตาล hexose และน้ำตาล pentose และเกิดก๊าซ

3.3 ทดสอบทางชีววิทยาโมเลกุล

3.3.1 สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลกติก (วิธี Boiling method ดัดแปลงจาก Yamada *et al.*, 2002)

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งเก็บรักษาในหลอดอาหารเอียง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปิเปตเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตส่วนใสออก ล้างเซลล์ด้วย TE buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ละลายกลับด้วย TE buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที สลับกับการแช่น้ำแข็ง 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำไปวิเคราะห์ด้วย Agarose gel electrophoresis จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.3.2 ทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rDNA (ดัดแปลงจากวิธีการของ Lee *et al.*, 2003)

primer ที่นำมาใช้ในขั้นตอนนี้ได้แก่ UFUL (5'-GCCTAACACATGCAAGTCGA-3') และ URUL (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Nilsson *et al.*, 2003) เติมสารสำหรับทำ PCR ดังนี้ 10xPCR buffer 5 ไมโครลิตร สารประกอบ dNTPs ความเข้มข้นชนิดละ 0.2 มิลลิโมลาร์ primer ทั้งสองชนิดๆละ 2 ไมโครโมลาร์ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้ 20 นาโนกรัม เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 2.5 Units และน้ำปราศจากอิออนที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ทำการ denaturation ครั้งแรกที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำ PCR 25 รอบ (อุณหภูมิที่ใช้ต่อรอบ: 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 50 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 2 นาที) ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์โดย Agarose gel electrophoresis เพื่อวิเคราะห์หาขนาดของ16S rDNA โดยเปรียบเทียบกับ DNA marker

3.3.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนแล้วมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit (QIAGEN) ก่อนส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง DNA sequencer ตามด้วยการเทียบเคียงข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลใน GenBank (BLAST search ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

4. การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ คือ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง วัดการเจริญของ

660 นาโนเมตร (Ogunbanwo *et al.*, 2003) พร้อมทั้งวัดค่าพีเอช และคำนวณหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของน้ำหมักที่มีต่อ *Staphylococcus aureus* ตามวิธีการในข้อ 2.2

5. การเจริญและการผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในสภาวะต่างๆ

5.1 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชต่างๆคือ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาการเจริญโดยวัดความขุ่นของเซลล์จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และคำนวณหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของน้ำหมักที่มีต่อ *S. aureus* ตามวิธีการในข้อ 2.2

5.2 ผลของความเข้มข้นเกลือ

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมตามการทดลองข้อที่ 5.1 เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ให้มีระดับค่าความเข้มข้นที่ร้อยละ 0-7 จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาการเจริญโดยวัดความขุ่นของเซลล์จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*S. aureus*) โดยวิธี Broth microdilution assay ตามวิธีการในข้อ 2.2 เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ซึ่งเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ให้มีระดับค่าความเข้มข้นร้อยละ 0-7 แทนการใช้ส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติก

6. สมบัติบางประการของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

6.1 ผลของอุณหภูมิต่อการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของสารยับยั้ง

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ซึ่งมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ และปรับค่าพีเอชที่เหมาะสมตามการทดลองข้อที่ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น 24 ชั่วโมง เหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ให้ความร้อนส่วนใสที่

อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสมาปรับค่าพีเอชเป็น 6.5 เพื่อหยุดเอนไซม์คะตะเลส (100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ก่อนจะปรับค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 กรองส่วนใสผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ในสภาวะปลอดเชื้อ จากนั้นบ่มส่วนใสที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5, 10, 15, 30 และ 60 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*S. aureus*) โดยวิธี Broth microdilution assay ตามวิธีในข้อ 2.2 เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุมที่ใช้ส่วนใสซึ่งไม่ผ่านการให้ความร้อน

6.2 ผลของค่าพีเอชต่อการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของสารยับยั้ง

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ซึ่งมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ และปรับค่าพีเอชที่เหมาะสมตามการทดลองข้อที่ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ให้ความร้อนส่วนใสที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการปรับค่าพีเอชของส่วนใสที่ได้เป็น 2.0-10.0 ด้วย 5 M NaOH หรือ 5 M HCl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปรับค่าพีเอชในทุกตัวอย่างเป็น 6.5 เพื่อหยุดเอนไซม์คะตะเลส (100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ก่อนจะปรับค่าพีเอชมาอยู่ที่ 5.0 กรองส่วนใสผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ในสภาวะปลอดเชื้อจากนั้นทดสอบกิจกรรมการยับยั้งโดยใช้ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ด้วยวิธี Broth microdilution assay ตามวิธีการในข้อ 2.2 และเปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุมที่ใช้ส่วนใสซึ่งผ่านการปรับค่า พีเอชเป็น 5.0

6.3 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของสารยับยั้ง

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ซึ่งมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ และปรับค่าพีเอชที่เหมาะสมตามการทดลองข้อที่ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ให้ความร้อนส่วนใสที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสมาปรับค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนแต่ละชนิดที่นำมาทดสอบ นำส่วนใสมาบ่มกับเอนไซม์ proteinase K (pH 7.0), α-chymotrypsin (pH 7.0), pronase E (pH 7.0) และ trypsin (pH 7.0) กำหนดให้มีค่า

ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์ย่อยโปรตีนแต่ละชนิดเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำให้เอนไซม์ที่ใช้ทดสอบสูญเสียสภาพโดยบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำส่วนใสหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนมาปรับค่าพีเอชเป็น 6.5 เพื่อหยุดเอนไซม์คะตะเลส (100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ก่อนจะปรับค่าพีเอชเป็น 5.0 กรองส่วนใสผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ในสภาวะปลอดเชื้อ จากนั้นทดสอบกิจกรรมการยับยั้งโดยใช้ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ด้วยวิธี Broth microdilution assay ตามวิธีการในข้อ 2.2 และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่ผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่นำมาทดสอบและปรับค่าพีเอชเป็น 5.0

7. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก

7.1 ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 มาทดสอบคุณสมบัติการทนต่อเกลือน้ำดี โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง แบบปลอดเชื้อด้วย normal saline solution (ร้อยละ 0.85 NaCl) ก่อนนำไปทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15 และ 0.30 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ละลายตะกอนเซลล์ ตามลำดับ และถ่ายเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15 และ 0.30 ปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่มีการเติมเกลือน้ำดี จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของเชื้อ (log CFU ต่อมิลลิลิตร) โดยวิธีการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Erkkila and Petaja., 2000)

7.2 ทดสอบการทนต่อกรด

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 มาทดสอบคุณสมบัติการทนต่อกรด โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง แบบปลอดเชื้อด้วย normal saline solution (ร้อยละ 0.85 NaCl) ก่อนนำไปทดสอบการทนต่อกรดโดยละลายตะกอนเซลล์ด้วย

สารละลาย phosphate-buffer saline ที่มีค่าพีเอช 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่ใช้สารละลาย phosphate-buffer saline พีเอช 6.0 ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของเชื้อ (log CFU ต่อมิลลิลิตร) โดยวิธีการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.3 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธีการเลี้ยงร่วมกัน

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS และนำแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ประกอบด้วย *S. aureus, E. coli* และ *Sal. enterica* ser. Typhi มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB, LB และ TSB ตามลำดับ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นโดยการปรับความเข้มข้นของเซลล์ที่มีชีวิต (CFU ต่อมิลลิลิตร) ทั้งของเชื้อแบคทีเรียแลกติกและเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหาร minimal medium (Fooks *et al.*, 2003) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไม่มีอากาศ เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจดูปริมาณเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดโดยวิธีการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS สำหรับแบคทีเรียแลกติกและอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA สำหรับ *S. aureus, E. coli* และ *Sal. enterica* ser. Typhi ทำการนับเชื้อแบคทีเรียแลกติกและแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่รอดชีวิต (log CFU ต่อมิลลิลิตร) (ดัดแปลงจาก Drago *et al.*, 1997; Gonzalez *et al.*, 1993; Xanthopoulos *et al.*, 2000) เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ได้มีการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างแบคทีเรียแลกติกและแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แต่ละสายพันธุ์ คำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้ง (% Inhibition) โดยใช้สูตรดังแสดง

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{CFU/ml in control}) - (\text{CFU/ml in associate cultures}) \times 100}{}$$