

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Brain heart infusion (BHI) soft agar (ร้อยละ 0.7)

Calf brain, infusion form	200.0	กรัม
Beef heart, infusion form	250.0	กรัม
Disodium phosphate	2.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Bacto proteose peptone	10.0	กรัม
Bacto dextrose	2.0	กรัม
Agar	0.11	กรัม
Distilled water	1,000	
มิลลิลิตร		
pH 7.4		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี
 นิ่งนำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 MRS (de, Man Rogosa and Sharpe) broth

Bacto peptone	10.0	กรัม
Bacto beef extract	10.0	กรัม
Bacto yeast extract	5.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Sorbitan monooleate complex	1.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม

Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Potassium phosphate, dibasic	2.0	กรัม
Distilled water	1,000.0	มิลลิลิตร
pH 6.0		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 MRS (de, Man Rogosa and Sharpe) agar

Bacto peptone	10.0	กรัม
Bacto beef extract	10.0	กรัม
Bacto yeast extract	5.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Sorbitan monoleate complex	1.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Potassium phosphate, dibasic	2.0	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000.0	มิลลิลิตร
pH 6.0		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4 NA (Nutrient Agar)

Bacto beef extract	3.0	กรัม
Bacto peptone	5.0	กรัม
Bacto agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.5 Carbohydrate fermentation broth

ใช้อาหาร MRS broth ที่ไม่มีกลูโคส และเติมคาร์โบไฮเดรตลงไปร้อยละ 2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 °C ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

1.6 MacConkey agar (MCA)

Peptone	17.0	กรัม
Proteose peptone	3.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Bile salt NO ₃	1.5	กรัม
Neutral red	0.03	กรัม
Crystal violet	0.001	กรัม
Agar	13.5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.1

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.1 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.7 Milk agar

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Sterilized milk	30.0	มิลลิลิตร
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
pH 6.8		

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้น sterilized milk ด้วยน้ำกลั่น และนำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อน pour plate เติม sterilized milk ลงไป

1.8 Starch agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
Soluble starch	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
pH 7.2		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.9 Tributyrin agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Tributyrin	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.4

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้น tributyrin ด้วยน้ำกลั่น และนำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี แล้วทำให้เย็นลงประมาณ 50 °C ปรับ pH เป็น 7.4 แล้วใส่ tributyrin ปั่นใน blender 10 นาที นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.10 Vitamin B 12 assay medium

Vitamin Assay Casamino Acid	12.0	กรัม
Dextrose	40.0	กรัม
Sodium Acetate	20.0	กรัม
L-Cystine	0.2	กรัม
DL-Tryptophan	0.2	กรัม
Adenine	20.0	มิลลิกรัม
Guanine	20.0	มิลลิกรัม
Uracil	20.0	มิลลิกรัม
Xanthine	1.0	มิลลิกรัม
Thiamine Hydrochloride	2.0	มิลลิกรัม
Riboflavin	2.0	มิลลิกรัม
Niacin	2.0	มิลลิกรัม
Calcium Pantothenate	200.0	ไมโครกรัม
Pyridoxine Hydrochloride	4.0	มิลลิกรัม
<i>p</i> -Aminobenzoic Acid	200.0	ไมโครกรัม
Biotin	10.0	ไมโครกรัม
Folic acid	100.0	ไมโครกรัม
Polysobate 80	2.0	กรัม
Dipotassium Phosphate	1.0	กรัม
Monopotassium Phosphate	1.0	กรัม
Magnesium Sulfate	0.4	กรัม
Sodium Chloride	20.0	ไมโครกรัม

Ferous Sulfate	20.0	ไมโครกรัม
Maganese Sulfate	20.0	ไมโครกรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

pH 6.0

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น และนำไปตั้งไฟอ่อน ๆ ประมาณ 2-3 นาที
นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 5 นาที

1.11 Blood agar

beef heart digest	10.0	กรัม
pancreatic digest of casein	8.0	กรัม
proteose peptone	2.0	กรัม
sodium chloride	5.0	กรัม
agar	15.0	กรัม

pH 6.8

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากัน
ดี แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็นลง
จนอุณหภูมิประมาณ 15 °C เติม defibrination blood 5% จึงเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.12 Muller Hinton medium

Beef, infusion from	300.0	กรัม
Bacto-casamino acids, technical	17.5	กรัม
Starch	15.0	กรัม
Bacto-Agar	17.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากัน
ดี แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สีย้อมและน้ำยาทดสอบ

2.1 น้ำยาทดสอบอะตาเลส (ร้อยละ 3 H_2O_2)

ร้อยละ 35 H_2O_2	8.6	มิลลิลิตร
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

เมื่อเตรียมเสร็จแล้วเก็บไว้ในขวดสีชาแล้วแช่ตู้เย็น

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีแกรม

2.2.1 Crystal violet

- สารละลาย A : ละลาย Crystal violet 2.0 g ในร้อยละ 95 ethanol ปริมาตร 20 ml
 - สารละลาย B : ละลาย ammonium oxalate 0.8 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 ml
- ผสมสารละลาย A และสารละลาย B ในเข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 24 ชม. กรองผ่านกระดาษกรองได้เป็น Crystal violet staining reagent

2.2.2 ร้อยละ 95 ethyl alcohol

- decolorizing solvent : ใช้แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 9.5 มล. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล.

2.2.3 Gram iodine (mordant)

- mordant : บดไอโอดีน 1.0 g และ potassium iodide 2.0 g เข้าด้วยกันค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นลงไปบดผสม จนกระทั่งไอโอดีนละลาย ใช้ น้ำกลั่นปริมาตร 300 ml เก็บไว้ในขวดสีชา

2.2.4 Safranin (counterstain)

- counterstain : ละลาย safranin O ร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในร้อยละ 95 ethyl alcohol ปริมาตร 10 ml แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml

3. สารละลายไอโอดีน

iodine	1.0	กรัม
potassium iodide	20.0	กรัม
distilled water	100.0	มิลลิลิตร

ใช้น้ำเพียงเล็กน้อยละลายไอโอดีน และ potassium iodide จนหมดจึงเติมน้ำที่เหลือลงไป

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 15 ผลการยับยั้งเชื้อ *E. coli* 240/2 ของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติก โดยวิธี agar spot

isolates	วงใสการยับยั้ง (มม.)	
	aerobe	anaerobe
L64	5.88	4.13
L65	2.28	1.53
L73	5.45	5.33
L74	5.93	5.68
L124	5.45	4.85
L125	6.95	4.90
L134	8.25	6.18
L142	6.35	5.35
L144	6.80	5.95
L164	6.53	5.40
L169	6.20	4.88
L209	6.00	4.18
L213	6.05	5.25
L217	7.48	4.25
L219	6.55	4.75
L224	6.33	5.30
L226	7.28	5.40
L233	6.68	3.73
L237	4.28	3.13
L281	6.13	4.73

ตารางที่ 16 ผลการยับยั้งเชื้อ *E. coli* 240/2, *E. coli* K88 และ *E. coli* K99 ของโปรไบโอติก
แบบที่เรียแลกติกที่คัดเลือกได้โดยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกัน

isolates	ร้อยละการยับยั้ง (%)		
	<i>E. coli</i> 240/2	<i>E. coli</i> K88	<i>E. coli</i> K99
L64	63	66	66
L65	66	74	77
L73	58	64	64
L74	93	90	94
L124	100	99	100
L125	96	93	93
L134	100	96	96
L142	90	86	86
L144	86	80	86
L164	99	98	99
L169	90	88	93
L209	73	77	80
L213	90	84	93
L217	70	72	75
L219	70	75	76
L224	65	65	70
L226	76	86	92
L233	73	76	76
L237	70	72	76
L281	98	94	96