บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุ

1. แบคทีเรียที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบผลการยับยั้งของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ β-hemolytic *E. coli* ที่แยกจากมูลสุกร, เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วงในสุกรสายพันธุ์เปรียบเทียบคือ *E. coli* K 88 และ *E. coli* K 99 จากงานวิจัยของ รศ. ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงในภาคผนวก)	บริษัทผู้ผลิต
- API 50 CHL	Biomerieux
- Blood agar	Difco
- Brain heart infusion (BHI) soft agar	Difco
- De Man Rogosa and Sharpe (MRS) medium	Difco
- MacConkey agar (MCA)	Difco
- Muller-Hinton agar (MHA)	Difco
- Milk agar (การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงในภาคผนวก)	
- Starch agar	Difco
- Tributyrin agar (การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงในภาคผนวก)	
- Vitamin B12 assay medium	Difco
3. สารเคมี	
- สารเคมีที่ใช้สำหรับย้อมสีแกรม	
- Bromocresol purple	Merck
- Hydrogenperoxide	BDH
- Hydrochloric acid	BDH
- Sodium hydroxide	BDH
- Iodine solution	BDH
- Sodium chloride	Lab-Scan

- เอนไซม์ protease, pepsin, catalase, α-amylase และ protenase K Sigma

4. ยาปฏิชีวนะ 14 ชนิด ได้แก่ BBL

- ampicillin (10 μg)
- amikacin (10 μg)
- amoxicillin (10 μg)
- chloramphenicol (30 μg)
- erythromicin (15 μg)
- gentamicin (10 μg)
- kanamycin (30 μg)
- nalidixic acid (10 μg)
- norfloxacin (10 μg)
- polymyxin B (10 μg)
- penicillin G (10 IU)
- streptomycin (10 μg)
- tetracycline (30 μg)
- vancomycin (10 μg)

อุปกรณ์

- เครื่องแก้ว รวมทั้งเข็ม (needle) และห่วงถ่ายเชื้อ (loop)	
- กล้องจุลทรรศน์ (microscope)	ยี่ห้อ Olympus Optical Co., Ltd.
- เครื่องกรองเชื้อ (millipore filter)	Millipore Cooperation, USA.
- เครื่องผสม (vortex mixer)	รุ่น 232 Fishery Sciencefic Industries,Inc.USA.
- เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (shaker)	Labline instruments, Inc. USA.
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)	รุ่น UV-1201 ของ Shimadsu, Japan
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)	รุ่น Sorvall RC 5C ของ Dupond Company, USA.
- เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	รุ่น 320 บริษัท Mettler Teledo, Co., Ltd.
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator)	Type B50 บริษัท Memmert Co.,Ltd.
- ตู้ปลอดเชื้อ (larminar air flow cabinet)	International Sciencefic supply Co., Ltd. Thailand
- ตู้อบอากาศร้อน (hot air oven)	Model 350 บริษัท Memmert
- หม้อไอน้ำฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน (autoclave)	Tomy Seiko Co. Ltd, Japan
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	รุ่น 1235 Sheldon Manufacturing, Inc, USA.
- เครื่องชั่ง (electronic balance)	Sartorius, Germany
- เตาแม่เหล็ก (hot plate)	Fishery Sciencefic Industries. Inc. USA.

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างที่ใช้แยกเชื้อแบคทีเรียแลกติก

เลือกเก็บตัวอย่างมูลสุกรที่สดใหม่จากลูกสุกรสุขภาพดีที่มีอายุระหว่าง 10-60 วัน ในแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ ฟาร์มสุกร จังหวัดตรัง จำนวน 100 ตัวอย่าง, คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 80 ตัวอย่าง และคณะเกษตรศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราช มงคล จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 70 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 250 ตัวอย่าง โดยใช้ไม้พันสำลี ปลอดเชื้อป้าย (swab) มูลสุกรจากก้นแล้วใส่หลอดปลอดเชื้อ นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกใน ห้องปฏิบัติการ

2. การแยกเชื้อ การเก็บเชื้อ

นำตัวอย่างมูลสุกรมา streak บนอาหาร MRS agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต และเกลือน้ำดี 0.2% จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 ° C เป็นเวลา 48 ชม. เลือก โคโลนีที่มีลักษณะ แตกต่างกัน 1 – 3 โคโลนีไปทำให้บริสุทธิ์ และเก็บในอาหาร MRS agar ที่ 4°C เพื่อไว้ศึกษา ต่อไป

3. การคัดเลือกเชื้อที่เป็นแบคทีเรียแลกติก

3.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา

ย้อมสีแกรม ดูการติดสี รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ (Murray *et al.*,. 1994)

3.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมี

ดูความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตาเลส โดยการทดสอบ catalase test ถ้าเป็น แบคทีเรียแลกติก catalase test จะให้ผลลบ (Axelson, 1993) จากนั้นเก็บเชื้อโดย streak ใน MRS agar แล้วเก็บไว้ที่ 4 ° C และ subculture ทุก 2 สัปดาห์

4. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ ตามลำดับดังนี้ โดยทุกการทดลองทำ 3 ซ้ำ

4.1 ความสามารถในการทนเกลือน้ำดี

นำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้มา streak ลงบน MRS agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.30% (w/v) oxgall (Difco) บ่มไว้ที่ 37 ° C เป็นเวลา 48 ชม. แล้วตรวจดูการเจริญของเชื้อบนผิวหน้าอาหาร (Toit *et al.*, 1998)

4.2 ความสามารถในการทนกรด

นำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการทนเกลือน้ำดี 0.30% มาเลี้ยงใน MRS broth ที่มีปริมาตร 6 ml ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 3, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ ด้วย 1N HCl บ่มเชื้อที่ 37 ° C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่นแสง 580 nm (Toit *et al.*, 1998)

4.3 การทดสอบการเจริญในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน

นำแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการทนกรดมาเลี้ยงใน MRS broth ปริมาตร 3 ml จนมีอายุครบ 18 ชม. ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงใน MRS broth เชื้อละ 6 หลอด แบ่งเชื้อเป็น 2 ชุด คือ

ชุดที่ 1 ใส่ใน anaerobic jar แล้วนำไปบ่มไว้ที่ 37 ° C เป็นเวลา 24 ชม.

ชุดที่ 2 นำไปบ่มไว้ใน incubator ที่ 37 ° C เป็นเวลา 24 ชม.

ดูการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่นแสง 580 nm และเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อในการเจริญทั้งสองสภาวะ

4.4 ความสามารถในการเจริญในอาหารที่ขาดวิตามินบี 12

นำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถเจริญในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน มาเลี้ยงใน MRS broth ที่มีปริมาตร 3 ml จนมีอายุ 18 ชม. แล้วถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติก 1 loop ลงในอาหาร Vitamin B12 assay medium (Difco) ที่มีปริมาตร 3 ml บ่มไว้ที่ 37° C เป็นเวลา 24 ชม. แล้วตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่นแสง 580 nm โดยใช้เชื้อมาตรฐาน *Lactobacillus delbruekii* เป็นตัวเปรียบเทียบ (negative control)

4.5 การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง

4.5.1 การทดสอบการย่อยโปรตีน

นำแบคทีเรียแลกติกที่สามารถเจริญในอาหารที่ขาดวิตามินบี 12 มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C จนมีอายุครบ 18 ชม. แล้ว streak บนอาหาร Milk agar นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48-72 ชม. ถ้ามีการย่อยโปรตีนจะเกิดวงใสรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ (Michael and Pelezar, 1995)

4.5.2 การทดสอบการย่อยไขมัน

นำแบคทีเรียแลกติกที่สามารถเจริญในอาหารที่ขาดวิตามินบี 12 มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C จนมีอายุ 18 ชม. แล้ว streak บนอาหาร 1% tributyrin นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48-72 ชม. ถ้ามีการใช้ไขมันจะเกิดวงใสรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ (Michael and Pelezar, 1995)

4.5.3 การทดสอบการย่อยแป้ง

นำแบคทีเรียแลกติกที่สามารถเจริญในอาหารที่ขาดวิตามินบี 12 มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C จนมีอายุ 18 ชม. แล้ว streak บนอาหาร Starch agar นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48-72 ชม. ทดสอบการย่อยแป้งโดยการหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีการย่อยแป้งสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน (Michael and Pelezar, 1995)

5. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli*

5.1 การทดสอบ β - hemolytic *E. coli*

นำเชื้อ *E. coli* จำนวน 60 สายพันธุ์ที่แยกจากมูลสุกรในงานวิจัยของรศ. ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตรมา streak บนอาหาร blood agar เพื่อดูการสร้าง β – hemolysin คัดเลือกเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่สร้าง β – hemolysin โดยดูวงใสรอบโคโลนีไว้ศึกษาผลการยับยั้งต่อไป

5.2 ทดสอบการยับยั้ง β - hemolytic *E. coli* โดยใช้วิธี agar spot

(Spellhaug and Harlander, 1989)

5.2.1 ในสภาพที่มีออกซิเจน โดยใช้แบคทีเรียแลกติกที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 18 ชม. แล้วปรับความขุ่นให้มีความขุ่น 0.5 McFarland ซึ่งมีจำนวนเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml จากนั้นเจือจางอย่างเป็นลำดับให้มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^7 CFU/ml หยดลงบนอาหาร MRS agar เชื้อละ 5 ไมโครลิตร แต่ละเชื้อห่างกัน 3 ซม. จานละ 4 เชื้อ โดยทำเชื้อละ 3 ซ้ำ บ่มไว้ที่ 37 ° C เป็นเวลา 24 ชม. หลังจากนั้นเททับด้วย BHI soft agar ที่มีวุ้นร้อยละ 0.7 ปริมาตร 7 ml ซึ่งมีเชื้อ *E. coli* จำนวนเชื้อประมาณ 10^6 CFU/ml ผสมอยู่ บ่มไว้ที่ 37 ° C เป็นเวลา 24 ชม. แล้วตรวจดูผลการยับยั้งโดยวัดขนาดวงใสการยับยั้ง

5.2.2 ในสภาพไร้ออกซิเจน ทำเหมือนการทดลองข้อ 5.2.1 แต่บ่มเชื้อใน anaerobic jar 37 ° C เป็นเวลา 24 ชม. แล้วตรวจดูผลการยับยั้งโดยวัดขนาดวงใสการยับยั้ง

5.3 การทดสอบการยับยั้ง β – hemolytic *E. coli* , *E. coli* K88 และ *E. coli* K99 โดยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกัน (Gonzalez *et al.*, 1993)

นำเชื้อ β – hemolytic *E. coli* และ *E. coli* สายพันธุ์ก่อโรคท้องร่วงในสุกรซึ่งเป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ คือ *E. coli* K88 และ *E. coli* K99 ที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 3 ชม. แล้วทำการปรับให้มีความขุ่นเป็น 0.5 McFarland โดยมีจำนวนเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml จากนั้นเจือจางลงเป็นลำดับให้มีจำนวนเชื้อ 10^4 CFU/ml และนำแบคทีเรียแลกติกจากข้อ 5.2 ที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 18 ชม. แล้วทำการปรับให้มีความขุ่นเป็น 0.5 McFarland ให้มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml จากนั้นเจือจางลงเป็นลำดับให้มีจำนวนเชื้อ 10^7 CFU/ml นำเชื้อแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม ๆ ละ 2 มล. มาเพาะเลี้ยงร่วมกัน ส่วนชุดควบคุมจะไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียแลกติก หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชม. นำชุดการทดสอบ มาตรวจนับจำนวน *E. coli* ด้วยวิธี pour plate ความเจือจางละ 2 ซ้ำ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar (MCA) หาร้อยละการยับยั้งโดยใช้สูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{CFU / ml in control}) - (\text{CFU / ml in associative culture})}{\text{CFU / ml in control}} \times 100$$

CFU / ml in control คือ จำนวนเชื้อ *E. coli* ในหลอดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียแลกติก

CFU / ml in associative culture คือ จำนวนเชื้อ *E. coli* ในหลอดที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียแลกติก

6. ศึกษาสมบัติสารยับยั้งที่สร้างโดยโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

เพื่อศึกษาดูว่าการยับยั้งการเจริญเกิดจากการที่แบคทีเรียแลกติก สร้างกรดแลคติก สร้างอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) หรือการสร้างแบคเทอริโอซิน (bacteriocin)

โดยการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ในอาหาร MRS broth จากนั้นนำมาปั่นแยกน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้ปรับพีเอชเป็น 6.5 ด้วย 1N NaOH กรองผ่านแผ่นเมมเบรน cellulose acetate ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนใสที่ได้ไปผสมกับเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เอนไซม์ catalase เพื่อศึกษาสารยับยั้งที่เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอนไซม์ amylase เพื่อศึกษาสารยับยั้งที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ pepsin, protease, protenase K เพื่อศึกษาสารยับยั้งที่เป็นโปรตีน โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เป็น 1 มก. ต่อ มล. โดยส่วนใสที่ผสมกับเอนไซม์ catalase, amylase และ pepsin และจะวางไว้ที่อุณหภูมิ 25°C และส่วนใสที่ผสมกับเอนไซม์ protease และ protenase K จะวางไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนใสที่ผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์ดังกล่าวมาทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี agar well diffusion (Schillinger and Lucke, 1989) โดยป้ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกในอาหาร MRS agar แล้วเจาะหลุมบนอาหารโดยให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มม. จากนั้นหยดส่วนใสที่ผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 4-6 ชั่วโมง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดวงใสการยับยั้งที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบผลการยับยั้งกับส่วนใสที่ไม่ได้ผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์

7. ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

ใช้ cotton swab ถ่ายเชื้อโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ มาเลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 18 ชม. แล้วทำการปรับให้มีความขุ่น 0.5 McFarland ให้มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml นำไปป้าย (swab) ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MHA แล้วปล่อยให้แห้ง 3-5 นาที จากนั้นวาง antibiotic disc จำนวน 14 ชนิด ได้แก่ ampicillim (10 µg), amikacin (10 µg), amoxicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromicin (15 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), nalidixic acid (10 µg), norfloxacin (10 µg), polymyxin B (10 µg), penicillin G (10 IU), streptomycin (10 µg), tetracycline (30 µg) และ vancomycin (10 µg) มาวางบริเวณที่ป้ายเชื้อไว้ บ่มไว้ที่ 37 ° C เป็นเวลา 24 ชม. รายงานผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อดูว่าเชื้อดังกล่าว sensitive หรือ intermediate หรือ resistant ต่อยาปฏิชีวนะนั้น ๆ (ดัดแปลงจาก Charteris *et al.*, 1998)

8. การศึกษาการเจริญของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

8.1 การเตรียม inoculum ของแบคทีเรียแลกติก

นำโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ที่มีอายุ 24 ชม. จำนวน 0.1 ml ถ่ายลงใน MRS broth ปริมาตร 10 มล. นำไปบ่มใน shaker ที่มีอุณหภูมิ 37 ° C เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 24 ชม. วัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่นแสง 580 nm ทำการเจือจางจนได้ค่า optical density (OD) 0.5 ใช้เป็น inoculum (Meynell and Meynell, 1970)

8.2 การหาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติก

ถ่าย inoculum จากข้อ 8.1 จำนวน 1 % ลงใน MRS broth ปริมาตร 150 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° C เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 28 ชม. เปรียบเทียบกับชุดที่ไม่มีการเขย่า เก็บตัวอย่างครั้งละ 3 มล. ที่ระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 และ 28 ชั่วโมง มาวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่นแสง 580 nm โดยใช้อาหารชนิดเดียวกันเป็น blank ถ้าค่า OD มากกว่า 1 ทำการเจือจางให้ได้ค่าน้อยกว่า 1 เขียนกราฟการเจริญโดยใช้ค่าเฉลี่ย OD 2 ซ้ำ และเวลาโดยใช้แกนตั้งเป็นค่า OD และแกนนอนเป็นค่าเวลา หาค่า generation time (Meynell and Meynell, 1970)

9. การเทียบเคียงชนิดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติค

นำเชื้อโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ มาศึกษาลักษณะต่าง ๆ เพื่อเทียบเคียงชนิดดังนี้ คือ

9.1 การเทียบเคียงในระดับจีนัส (Salminen and Wright, 1993)

9.1.1 ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 ° C

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ซึ่งมีอายุ 24 ชม.ลงใน MRS broth ที่มีการเติม bromocresol purple ร้อยละ 0.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 10 และ 45 ° C เป็นเวลา 24 ชม. สังเกตการเจริญจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

9.1.2 ทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล hexose และ pentose

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ซึ่งมีอายุ 24 ชม.ลงใน MRS broth ที่มีน้ำตาลกลูโคส และอาหาร MRS broth ที่มีน้ำตาล ribose เป็นส่วนประกอบร้อยละ 2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ° C เป็นเวลา 24 ชม. สังเกตการหมักน้ำตาลโดยดูการเปลี่ยนสีของ bromocresol purple จากสีม่วงเป็นสีเหลือง และการเกิดฟองแก๊ส

9.1.3 ทดสอบการเจริญใน 6.5% และ 18% NaCl

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ซึ่งมีอายุ 24 ชม.ลงใน MRS broth ที่มีความเข้มข้นของ NaCl ร้อยละ 6.5 และ 18 และมีการเติม bromocresol purple ร้อยละ 0.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ° C เป็นเวลา 24 ชม. สังเกตการเจริญจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

9.1.4 ทดสอบการเจริญที่ pH 4.4 และ 9.6

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ซึ่งมีอายุ 24 ชม.ลงใน MRS broth ที่มีการปรับ pH เป็น 4.4 ด้วย 1N HCl และ 9.6 ด้วย 1N NaOH บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ° C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูการเจริญของแบคทีเรียโดยสังเกตความขุ่น โดยเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม ที่มี pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0

9.1.5 ทดสอบ tetrad formation

สังเกตการเรียงตัวของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกที่มี 4 เซลล์เรียงติดกันโดยดูจากการย้อมสีแกรม

9.2 การเทียบเคียงในระดับสปีชีส์

9.2.1 การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 35, 40 และ 50 °C

ถ่ายแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ ซึ่งมีอายุ 24 ชม. จำนวน 1 loop ลงใน MRS brothที่มีการเติม bromocresol purple ร้อยละ 0.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35, 40 และ 50 ° C เป็นเวลา 24 ชม. สังเกตการเจริญจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง (Kandler and Weiss, 1986)

9.2.2 การทดสอบการเจริญที่ pH 4.2, 7.5 และ 8.5

ถ่ายแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ ซึ่งมีอายุ 24 ชม. จำนวน 1 loop ลงใน MRS broth ที่มีการปรับ pH เป็น 4.2, 7.5 และ 8.5 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35° C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูการเจริญของแบคทีเรียโดยสังเกตความขุ่น โดยเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม ที่มี pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 (Kandler and Weiss, 1986)

9.2.3 การทดสอบความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรต

API 50 CHL เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับชุดทดสอบ API 50 CH Strip ในการศึกษากระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ API 50 CHL ในการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย แล้วจึงถ่ายลงในแต่ละ microtubes บน strip ระหว่างการบ่มเชื้อจะหมักคาร์โบไฮเดรตได้เป็นผลิตภัณฑ์เป็นกรดมีผลให้พีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง โดยสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ ผลการทดสอบจะขึ้นอยู่กับรูปแบบของแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งวิธีการทดสอบทำได้โดยเขี่ยเชื้อ 2-3 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ API 50 CHL ปรับความขุ่นเท่ากับ 2 McFarland ถ่ายเชื้อที่เตรียมลงในหลอดบน API 50 Strip และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อ่านผลหลังการบ่มที่ 24 ชม. และ 48 ชม. ผลบวกเกิดจากการสร้างกรด (รูปที่ 4) นำผลที่ได้เทียบเคียงชนิดโดยใช้ program computer ของบริษัท Biomerieux (http://api.web.biomerieux.com)