บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. อาหารหมักที่ใช้แยกแบคทีเรียแลกติกจำนวน 23 ชนิด ซึ่งเก็บตัวอย่างจากตลาดสดหรือตลาดนัดในอ. หาดใหญ่ จ. สงขลา เพื่อใช้ในการแยกแบคทีเรียแลกติก ดังตาราง 5

ตาราง 5 อาหารหมักของไทยที่เก็บตัวอย่างจากตลาดสดหรือตลาดนัดในอ. หาดใหญ่ จ. สงขลา

ชนิดของอาหารหมัก	จำนวนตัวอย่างอาหารหมักที่ใช้แยกเชื้อในแต่ละพื้นที่					
	พลาซ่าส์	คลองเรียน	หัวรั้ว	เกาะหมี	เกาะเสือ	รวม
อาหารหมักจากสัตว์ บูดู	1	1	2	1	0	5
ปลาแป้งแดง	2	2	10	2	1	17
จิ้งจัง	2	0	11	3	1	17
ไตปลา	7	2	12	3	4	28
ปลาร้า	4	2	12	2	2	22
กุ้งส้ม	2	2	9	2	1	16
หนาง	0	0	2	1	0	3
น้ำเคย	1	0	1	1	0	3
ไส้กรอกเปรี้ยว	3	0	0	0	0	3
ปลาส้มฟัก	3	0	0	0	0	3

ตาราง 5 (ต่อ)

ชนิดของอาหารหมัก	จำนวนตัวอย่างอาหารหมักที่ใช้แยกเชื้อในแต่ละพื้นที่					
	พลาซ่าส์	คลองเรียน	หัวรั้ว	เกาะหมี	เกาะเสือ	รวม
แหนม	3	0	3	1	2	9
กะปี	1	0	1	1	0	3
รวม	29	9	63	17	11	129
อาหารหมักจากพืช ผักกาดดอง	4	2	4	1	3	14
ผักเสี้ยนดอง	2	1	0	0	0	3
สะตอดอง	2	0	0	0	0	2
ขนมจีน	1	2	1	0	0	4
ซีเซ็กฉ่าย	2	0	0	0	0	2
หัวไชโป้	3	0	4	2	0	9
หน่อไม้ดอง	1	1	3	1	1	7
กระเทียมดอง	2	1	2	0	0	5
บัวหิมะ	1	0	0	0	0	1
ตั้งฉ่าย	1	0	0	0	0	1
ข้าวหมาก	3	0	0	0	0	3
รวม	22	7	14	4	4	51
รวมทั้งหมด	51	16	77	21	15	180

2. **แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 13 สายพันธุ์ ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบการยับยั้งของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก** ดังแสดงใน (ตาราง 6)

ตาราง 6 แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบการยับยั้งของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก

ชื่อแบคทีเรีย	แหล่งที่มา
แบคทีเรียแกรมบวก	
Bacillus cereus	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มอ.[1]
Staphylococcus aureus ATCC 25923	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มอ.
แบคทีเรียแกรมลบ	
Enterobacter aerogenes	รศ. ดร. วราภรณ์ วุฒฑะกุล
Enterobacter cloacae	รศ. ดร. วราภรณ์ วุฒฑะกุล
Escherichia coli ATCC 25922	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มอ.
Escherichia coli O157 : H7	รศ. ดร. วราภรณ์ วุฒฑะกุล
Proteus rettgeri	รศ. ดร. วราภรณ์ วุฒฑะกุล
Proteus vulgaris	รศ. ดร. วราภรณ์ วุฒฑะกุล
Salmonella typhi	รศ. ดร. วราภรณ์ วุฒฑะกุล
Salmonella typhimurium	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มอ.
Shigella flexneri	รศ. ดร. วราภรณ์ วุฒฑะกุล
Shigella sonnei	รศ. ดร. วราภรณ์ วุฒฑะกุล
Vibrio parahaemolyticus	รศ. ดร. วราภรณ์ วุฒฑะกุล

[1] มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Brain heart infusion (BHI) soft agar
- MacConkey agar (MCA)
- Mannitol egg-yolk polymyxin agar (MYP)
- Mannitol salt agar (MSA)
- De, Man Rogosa and Sharpe (MRS)
- Milk agar
- Nutrient agar
- Salmonella-Shigella agar (SS agar)
- Starch agar
- Thiocitrate bile salt sucrose agar (TCBS)
- Tributyrin agar
- Tryptic soy agar (TSA)
- Vitamin B12 assay

4. สารเคมี

- สารเคมีสำหรับย้อมสีแกรม
- Hydrogenperoxide (ร้อยละ 3 H_2O_2)
- 1N HCl, 1N NaOH
- Iodine solution ร้อยละ 30
- Normal saline solution ร้อยละ 0.85

5. ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics)

- Aminoglycosides ได้แก่ gentamicin (GM), kanamycin (K), streptomycin (S)

- Cephalothins ได้แก่ cephalothin (CF), ceftazidime (CAZ), cefoperazone(CEP), vancomycin (VA) และ bacitracin (B)
- Macrolide ได้แก่ erythromycin (E)
- Penicillins ได้แก่ penicillin G (P) และ ampicillin (AM)
- Polymyxin ได้แก่ polymyxin B (PB)
- Quinolone ได้แก่ norfloxacin (NOR)
- Single antibiotic ได้แก่ chloramphenicol (C)
- Tetracycline ได้แก่ tetracyclin (TE)

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- เครื่องผสม (vortex mixer) รุ่น 232 (Fisher Scientific, USA)
- เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (shaker), Labline instrument, Inc USA
- เครื่องชั่งสาร (balance)
- เครื่องตีปั่นอาหาร (stomacher)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-1201V (Shimadzu, Japan)
- เครื่องวัด pH meter (Metrohm, Switzerland)
- เครื่องทำความสะอาดโดยระบบคลื่นเสียง (Ultrasonic cleaner รุ่น 2200 E3 Branson, Germany)
- จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate)
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow Cabinet), International Scientific Supply Co., Ltd, Thailand

- เตาแม่เหล็ก (hot plate) & stirrer (Fisher Scientific, USA)
- โถไร้ออกซิเจน (anaerobic jar)
- ทิป (tip)
- ปากคีบ (forceps)
- ปิเปต (pipette) & ออโต้ปิเปต (autopipette)
- ไม้พันสำลี (cotton swab)
- เวอร์เนียร์ คาร์ลิปเปอร์ (vernier caliper)
- สไลด์ (slide)
- หม้อไอน้ำฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน (autoclave)
- หลอดทดลอง (test tube)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น 1235 (Sheldon Manufacturing, Inc USA)
- หลอดเอฟเพนดอป (effpendorf tube)

วิธีการทดลอง

1. การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกในอาหารหมักของไทย

นำตัวอย่างอาหารหมักของไทยมา 10 g หรือ 10 ml ใส่นในถุงพลาสติกแล้วเติมลงในร้อยละ 0.85 normal saline solution 90 ml แล้วทำการเจือจางลงอย่างเป็นลำดับละ 10 ml ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกด้วยวิธี pour plate โดยใช้ MRS agar ที่เติม bromocresol purple ร้อยละ 0.2ทำ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. นับจำนวนแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด (Conway *et al.*, 1987)

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกให้เป็นเชื้อที่บริสุทธิ์

เก็บโคโลนีเชื้อที่รอบโคโลนีเป็นสีเหลือง และมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันจากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติม bromocresol purple ร้อยละ 0.2 มาทำให้บริสุทธิ์ (streak plate technique) บนอาหาร MRS agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. โดยการย้อมสีแกรม ดูการติดสี รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ (Murray *et al.*, 1999) และดูความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตาเลส ถ้าเป็นแบคทีเรียแลกติกจะให้ผลลบ (Axelsson, 1993) จากนั้นเก็บเชื้อแบบ stab ใน MRS agar บ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. แล้วเก็บเชื้อไว้ที่ 4 °C และ subculture ทุกๆ 2 สัปดาห์

3. การทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบในขั้นตอนนี้ใช้เชื้อโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกจากนมเปรี้ยวที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด (*Lactobacillus casei*) เป็นตัวเปรียบเทียบ โดยแยกตามวิธีการในข้อ 1 และข้อ 2

3.1 การทนต่อเกลือน้ำดี

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 ที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 24 ชม. นำมา streak ลงบน MRS agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15 และ 0.30 โดย streak plate ละ 4 เชื้อ ทำ 2 ซ้ำ แล้วนำเชื้อมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. แล้วตรวจดูการเจริญของเชื้อบนผิวหน้าอาหาร (Conway *et al.*, 1987)

3.2 การทนต่อกรด

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 ที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 24 ชม. ถ่ายลงใน MRS broth ปริมาตร 6 ml ที่มีการปรับ pH ด้วย 1N HCl ให้ได้ 1, 2, 3, 4 และ 5 โดยที่ pH 5 ใช้เป็น control ทำ 2 ซ้ำ นำเชื้อมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24

ชม. ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่นแสง 660 nm (Conway *et al.*, 1987)

3.3 การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง

3.3.1 การทดสอบการย่อยโปรตีน

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 24 ชม. มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Milk agar ทำ 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48-72 ชม. ถ้ามีการย่อยโปรตีนจะเกิดวงใสรอบๆโคโลนีของเชื้อ (Michael and Pelezar, 1995)

3.3.2 การทดสอบการย่อยไขมัน

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 24 ชม. มาstreak บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมร้อยละ 1 Tributyrin ทำ 2 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48-72 ชม. ถ้ามีการใช้ไขมันจะเกิดวงใสรอบๆโคโลนี (Michael and Pelezar, 1995)

3.3.3 การทดสอบการย่อยแป้ง

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 24 ชม. มา streak บนอาหาร Starch agar ทำ 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48-72 ชม. ทดสอบการย่อยโดยหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีการย่อยแป้งสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน (Michael and Pelezar, 1995)

3.4 การทดสอบการเจริญในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 ที่เลี้ยงใน MRS broth ปริมาตร 3 ml จนมีอายุ 24 ชม. ลงใน MRS broth เชื้อละ 4 หลอดๆละ 3 ml แบ่งเชื้อเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 เก็บใน anaerobic jar แล้วนำไปบ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. ชุดที่ 2 นำไปบ่มที่ 35 °C ภายใต้สภาวะที่มีอากาศเป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่นแสง 660 nm และเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อในการเจริญทั้ง 2 สภาวะโดยวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Duncan 's New Multiple Range Test

3.5 การทดสอบการเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามิน B12

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 ที่เลี้ยงใน MRS broth ปริมาตร 3 ml จนมีอายุ 24 ชม. ถ่ายลงใน vitamin B12 assay medium ของ Difco ปริมาตร 3 ml ทำ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่นแสง 660 nm โดยใช้ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* เป็นตัวเปรียบเทียบ

3.6 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญโดยยาปฏิชีวนะ

ใช้ cotton swab ถ่ายแบคทีเรียแลกติกจากข้อ 3.5 ที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 18 ชม. แล้วทำการปรับให้มีความขุ่นเป็น 0.5 McFarland ให้มีจำนวน 10^8 CFU/ml นำไปป้าย (swab)ให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร MRS agar แล้วปล่อยให้แห้ง 3-5 นาที จากนั้นวาง antibiotic discs จำนวน 15 ชนิด ได้แก่ penicillin G (10μg), ampicillin (10μg), cephalothin (30μg), ceftazidime (30μg), cefoperazone (75μg), vancomycin (30μg), bacitracin (10μg), gentamicin (10μg), kanamycin (30μg), streptomycin (10μg), tetracycline (30μg), chloramphenicol (30μg), erythromycin (15μg), norfloxacin (10μg) และ polymyxin B (300μg) วางลงบนบริเวณที่ป้ายเชื้อไว้ทำ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C

เป็นเวลา 24 ชม. รายงานผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อดูว่าเชื้อดังกล่าว ไว (sensitive) หรือ ไม่มีผล (intermediate) หรือ ต้านทาน (resistant) ต่อยาปฏิชีวนะนั้นๆ (ตารางภาคผนวก ค.12) (ดัดแปลงจาก Charteris *et al.*, 1998)

3.7 การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียแลกติกในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

3.7.1 ทดสอบการยับยั้งบนอาหารแข็ง (agar spot) ในสภาวะที่ไม่จำกัดกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ทดสอบการยับยั้งโดย agar spot method ใช้แบคทีเรียแลกติกจากข้อ 3.6 ที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 18 ชม. แล้วทำการปรับให้มีความขุ่นเป็น 0.5 McFarland ให้มีจำนวนประมาณ 10^8 CFU/ml จากนั้นเจือจางลงอย่างเป็นลำดับให้มีจำนวนเชื้อ 10^7 CFU/ml หยดลงบนอาหาร MRS agar เชื้อละ 5 ไมโครลิตร แต่ละเชื้อห่างกัน 3 ซม. จานละ 4 เชื้อ โดยทำเชื้อละ 4 จาน หลังจากนั้นนำมาเททับด้วย BHI soft agar มีวุ้นร้อยละ 0.7 ปริมาตร 7 ml ซึ่งและมีแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 3 ชม. แล้วทำการปรับให้มีความขุ่นเป็น 0.5 McFarland ให้มีจำนวนประมาณ 10^8 CFU/ml จากนั้นเจือจางลงอย่างเป็นลำดับให้มีจำนวนเชื้อ 10^6 CFU/ml แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้มีจำนวน 13 สายพันธุ์ (แบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *B. cereus* และ *S. aureus* ATCC 25923) และแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *S. typhimurium, S. typhi, E. coli* ATCC 25922, *S. sonei, P. rettgeri, E. coli* O157 : H7, *V. parahemolyticus, E. cloacae, E. aerogenes, P.vulgari* และ *S. flexneri*) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจผลการยับยั้งโดยดูจากวงใสของการยับยั้ง (inhibition zone) จากขอบแบคทีเรียแลกติกจนสุดขอบวงใส (Spelhaug and Harlander, 1989) รายงานว่าเกิดการยับยั้งถ้า inhibition zone ดังกล่าวมีขนาดมากกว่า 10 มม.

3.7.2 ทดสอบการยับยั้งบนอาหารแข็ง (agar spot) ในสภาวะที่ไม่จำกัดกรดอินทรีย์ แต่จำกัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.7.1 คือ มี inhibition zone มากกว่า 10 มม. และสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 13 สายพันธุ์ มาทดสอบในสภาพที่ไม่จำกัดกรดอินทรีย์โดยการใช้ MRS agar ที่มีกลูโคสร้อยละ 2 แต่จำกัดผลการยับยั้งที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใส่ใน anaerobic jar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. (Spelhaug and Harlander, 1989) ตรวจผลการยับยั้งโดยดูจาก inhibition zone

3.7.3 ทดสอบการยับยั้งบนอาหารแข็ง (agar spot) ในสภาวะที่จำกัดกรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.7.1 คือ มี inhibition zone มากกว่า 10 มม. และสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 13 สายพันธุ์ มาทดสอบในสภาพที่จำกัดผลการยับยั้งที่เกิดจากกรดอินทรีย์โดยการใช้ MRS agar ที่มีกลูโคสร้อยละ 0.2 และจำกัดผลการยับยั้งที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใส่ใน anaerobic jar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. (Fleming *et al.*, 1975; Schillinger and Lucke, 1996) ตรวจผลการยับยั้งโดยดูจาก inhibition zone

3.7.4 การทดสอบการยับยั้งโดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน

ทดสอบโดยใช้วิธีของ Gonzalez *et al.*, 1993 นำแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 3 ชม. แล้วทำการปรับให้มีความขุ่นเป็น 0.5 McFarland ให้มีจำนวนประมาณ 10^8 CFU/ml จากนั้นเจือจางลงอย่างเป็นลำดับให้มีจำนวนเชื้อ 10^4 CFU/ml และนำแบคทีเรียแลกติกที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 18 ชม. แล้วทำการปรับให้มีความขุ่นเป็น 0.5 McFarland ให้มีจำนวนประมาณ 10^8 CFU/ml จากนั้นเจือจางลงอย่างเป็นลำดับให้มีจำนวนเชื้อ 10^7 CFU/ml นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มๆละ 2 ml มาเพาะเลี้ยงร่วมกัน ส่วนชุดควบคุมจะไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียแลกติก โดยทำการทดลองละ 2 ซ้ำ หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 6 ชม. นำชุดการทดสอบ มาตรวจนับ

จำนวนแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ด้วยวิธี pour plate ความเจือจางละ 2 ซ้ำ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ดังต่อไปนี้

- MacConkey agar (MCA) สำหรับ *E. coli* O157 : H7, *E. coli* ATCC 25922, *E. cloacae, E. aerogenes, P. vulgaris* และ *P. rettgeri*
- Salmonella-Shigella agar (SS) สำหรับ *S. typhimurium, S.typhi, S. flexneri* และ *S. sonnei*
- Thiosulfate Citrate Bile Salt agar (TCBS) สำหรับ *V. parahaemolyticus*
- Mannitol Egg-Yolk Polymyxin agar (MYP) สำหรับ *B. cereus*
- Mannitol Salt agar (MSA) สำหรับ *S. aureus* ATCC 25923

หาร้อยละการยับยั้งโดยใช้สูตร

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

3.8 การทดสอบการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียแลกติกในระดับ pH 2, 3 และ 4

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.7.1 ที่เลี้ยงใน MRS broth (pH 6) จนมีอายุ 24 ชม. แล้วถ่ายเชื้อลงใน MRS broth ที่มีค่า pH 2, 3 และ 4 ทำ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชม. ตรวจนับเชื้อก่อนและหลังบ่มโดยวิธี pour plate ด้วย MRS agar

3.9 การทดสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติกในอาหารที่ปราศจากเนื้อสัตว์

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.8 ที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 18 ชม. แล้วทำการปรับให้มีความขุ่นเป็น 0.5 McFarland ให้มีจำนวนประมาณ 10^8 CFU/ml จากนั้นเจือจางลงอย่างเป็นลำดับให้มีจำนวนเชื้อ 10^4 CFU/ml แล้วถ่ายเชื้อลงใน MRS broth และ SPY2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 36 ชม. เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 6, 12, 24 และ 36 ชม. มาวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่มี

ความยาวคลื่นแสง 660 nm และนับจำนวนเชื้อโดยวิธี spread plate ด้วย MRS agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48 ชม. (ดัดแปลงจาก Heenan *et al.*, 2002) และเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อในการเจริญใน MRS broth และ SPY2 โดยวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Duncan 's New Multiple Range Test

4. การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

4.1 การเตรียม inoculum ของแบคทีเรียแลกติก

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.9 ที่มีอายุ 24 ชม. จำนวน 0.1 ml ถ่ายลงใน MRS broth ปริมาตร 10 ml นำไปบ่มใน shaker ที่มีอุณหภูมิ 35 °C เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 24 ชม. วัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่นแสง 660 nm ทำการเจือจางจนได้ค่า optical density (O.D.) 0.5 ใช้เป็น inoculum (Meynell and Meynell, 1970)

4.2 การหาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติก

ถ่าย inoculum จากข้อ 4.1 จำนวน 1% ลงใน MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นระยะเวลา 28 ชม. เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ คือ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 และ 28 ชม. มาวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่นแสง 660 nm โดยใช้อาหารชนิดเดียวกันเป็น blank ถ้าค่า O.D. มากกว่า 1 ทำการเจือจางให้ได้ค่าน้อยกว่า 1 เขียนกราฟการเจริญโดยใช้ค่าเฉลี่ย O.D. 2 ซ้ำ และเวลาโดยใช้แกนตั้งเป็นค่า O.D. และแกนนอนเป็นค่าเวลา หาค่า generation time และ specific growth rate (Meynell and Meynell, 1970)

5. การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

5.1 การเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกในระดับจีนัส แบ่งเป็น

5.1.1 การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 °C

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2 ซึ่งมีอายุ 24 ชม.ลงใน MRS broth ที่มีการเติม bromocresol purple ร้อยละ 0.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 10 °C และ 45 °C เป็นเวลา 24 ชม. สังเกตการเจริญจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง (Salminen and Wright, 1993)

5.1.2 การทดสอบการเจริญใน ร้อยละ 6.5 และ 18 NaCl

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากข้อ 4.2 ซึ่งมีอายุ 24 ชม.ลงใน MRS broth ที่มีความเข้มข้นของ NaCl ร้อยละ 6.5 และ 18 และมีการเติม bromocresol purple บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. สังเกตการเจริญจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง (Salminen and Wright, 1993)

5.1.3 การทดสอบการเจริญที่ pH 4.4 และ 9.6

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากข้อ 4.2 ซึ่งมีอายุ 24 ชม.ลงใน MRS broth ที่มีการปรับ pH เป็น 4.4 ด้วย 1N HCl และ 9.6 ด้วย 1N NaOH บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูการเจริญของแบคทีเรียโดยสังเกตความขุ่น โดยเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม ที่มี pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 (Salminen and Wright, 1993)

5.1.4 การตรวจสอบการจัดเรียงตัวของเซลล์ (tetrad formation)

สังเกตการเรียงตัวของแบคทีเรียแลกติกจากข้อ 4.2 ที่มี 4 เซลล์เรียงติดกันโดยการย้อมสีแกรม (Salminen and Wright, 1993)

5.1.5 การทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล hexose และ pentose

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากข้อ 4.2 ซึ่งมีอายุ 24 ชม.ลงใน MRS broth ที่มีน้ำตาลกลูโคส และอาหาร MRS broth ที่มีน้ำตาลไรโบสเป็นส่วนประกอบ ร้อยละ 2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. สังเกตการหมักน้ำตาลโดยดูจากการเปลี่ยนสีของ bromocresol purple จากสีม่วงเป็นสีเหลือง และการเกิดฟองก๊าซนำไปบันทึกผลโดยการแบ่งเชื้อออกเป็น 3 กลุ่มหลัก (Kandler and Weiss, 1986) คือ

ก. Obligately homofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาล hexose ได้ แต่ไม่หมักน้ำตาล pentose แต่ไม่เกิดก๊าซ

ข. Facultative heterofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาล hexose และน้ำตาล pentose ได้ แต่ไม่เกิดก๊าซ

ค. Obligately heterofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาล hexose และน้ำตาล pentose ได้ และเกิดก๊าซ

5.2 การเทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียแลกติกในระดับสปีชีส์ แบ่งเป็น

5.2.1 การทดสอบความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรต

ถ่ายแบคทีเรียแลกติกจำนวน 1 loop ลงใน MRS broth ที่มีคาร์โบไฮเดรตในปริมาณร้อยละ 2 จำนวน 16 ชนิด ได้แก่ amygdalin, arabinose, cellobiose, esculin, fructose, galactose, lactose, maltose, mannitol, raffinose, rhamnose, sorbitol, sucrose, glucose, ribose และ trehalose บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. สังเกตการใช้คาร์โบไฮเดรตโดยดูจากการเปลี่ยนสีของ bromocresol purple ในอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง และตรวจดูการเกิดก๊าซ (Kandler and Weiss, 1986)

5.2.2 การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 35, 40 และ 50 °C

ถ่ายแบคทีเรียแลกติกซึ่งคัดเลือกได้ ซึ่งมีอายุ 24 ชม.ลงใน MRS broth ที่มีการเติม bromocresol purple ร้อยละ 0.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C, 40 °C และ 50 °C เป็นเวลา 24 ชม. สังเกตการเจริญจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง (Kandler and Weiss, 1986)

5.2.3 การทดสอบการเจริญที่มีความเข้มข้น NaCl ร้อยละ 4

ถ่ายแบคทีเรียแลกติกซึ่งคัดเลือกได้ ซึ่งมีอายุ 24 ชม. ลงใน MRS broth ที่มีความเข้มข้นของ NaCl เป็นร้อยละ 4 และมีการเติม bromocresol purple บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. สังเกตการเจริญจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง (Kandler and Weiss, 1986)

5.2.4 การทดสอบการเจริญที่ pH 4.2, 7.5 และ 8.5

ถ่ายแบคทีเรียแลกติกซึ่งคัดเลือกได้ ซึ่งมีอายุ 24 ชม. 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)

นำผลการศึกษาที่ได้มาเทียบเคียงชนิดตาม Bergey 's Manual Determinative Bacteriology Volume 2 (Kandler and Weiss, 1986) และ Lactic acid bacteria (Salminen and Wright, 1993) ดังแสดงใน (ภาคผนวก ค)