บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 จุลินทรีย์และวัตถุดิบ

3.1.1 จุลินทรีย์ : เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกมาตรฐานจากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จตุจักร กรุงเทพ ได้แก่ *Streptococcus thermophilus* TISTR 894, *Streptococcus thermophilu*s TISTR 458, *Lactobacillus delbuerkii* subsp. *Bulgaricus* TISTR 892, *Lactobacillus delbuerkii* subsp. *Bulgaricus* TISTR 326, *Lactobacillus delbuerkii* subsp. *bulgaricus* TISTR 895, *Lactobacillus delbuerkii* subsp. *Lactis* TISTR 785, *Lactobacillus salivarius* TISTR 1112, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034, *Enterococcus faecalis* TISTR 1482 และ *Enterococcus faecium* TISTR1283

3.1.2 วัตถุดิบ : จากแหล่งน้ำนมดิบของกลุ่มเกษตรกรผู้ผลิตนมดิบรายย่อยเชียงใหม่และเชียงราย 4 แห่ง คือ

- เกษตรกรผู้ผลิตนมดิบรายย่อย สมาชิกโรงงานนม อสค. ห้วยแก้ว รหัส 7010 รหัส 7021 และ รหัส 7009
- สหกรณ์โคนมแม่ลาว (มล) จังหวัดเชียงราย
- สหกรณ์โคนมแม่โจ้ (Mae Jo : MJ)
- สหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง (สต) จังหวัดเชียงใหม่

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1 อุปกรณ์

- กระดาษกรอง (What man Litmited Maidstone, England Japan)
- กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร (Pyrex, U.S.A.)
- กล้องจุลทรรศน์แบบสองตา (ยี่ห้อ โอลิมปัส)
- ขวดแก้วทนความร้อนสูงขนาด 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร (Schott Duran, Germany)

- ขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร (Nalgene, U.S.A.)
- ขวดสำหรับปรับปริมาตรขนาด 100 (Pyrex, U.S.A.)
- เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ Advanturer, Ohaus Corporation, U.S.A.)
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (BP110 Sartorius, Germany)
- เครื่องเซนตริฟิวส์ที่ปรับความเร็วรอบได้ 15,000 rpm (แบบควบคุม T, GS-15R, Beckman, Germany) (แหล่งเครื่องมือ : คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)
- เครื่องเซนตริฟิวส์ (Centrifuge Z 200 A ยี่ห้อ HERMLE)
- เครื่องเซนตริฟิวส์ (eppendrof, Minispin)
- เครื่องเซนตริฟิวส์ (PK110, ALC International Srl, EC) , (10,000 rpm ใช้ที่อุณหภูมิห้อง สกัด DNA)
- เครื่องเซนตริฟิวส์ (Sigmol 3-18K, Sartorius, USA) (15,000 g ใช้ตกตะกอนฟาจจาก MRS broth ที่มี PEG 8000 และ NaCl)
- เครื่องถ่ายภาพเจล (ยี่ห้อ Geldoc-Biorad, USA) (แหล่งเครื่องมือ : คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)
- เครื่องผสม (Heidolph, Germany)
- เครื่อง Electrophoresis (Biorad, USA) (แหล่งเครื่องมือ : คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)
- เครื่อง Sequencer (ABI 310, Gene System, USA) (แหล่งเครื่องมือ : คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)
- จานเลี้ยงเชื้อ (Pyrex, U.S.A.)
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (PTW, Thailand)
- ตู้บ่มเชื้อตั้งอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Thelco, Precision, England)
- ตู้บ่มเชื้อตั้งอุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส (Heraeus termaks)
- ตู้บ่มเชื้อตั้งอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (Memmert, Euroscan Co.Ltd Thailand)
- ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส (Memmert, Euroscan Co.Ltd Thailand)
- ตู้เย็น (Sharp, Japan)
- ตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ (Heal force, ไซแอนติฟิค โปรโมชั่น จำกัด)
- เตาไมโครเวฟ (Sharp, Japan)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- บีกเกอร์ขนาด 1,000, 250, และ 50 มิลลิลิตร (Pyrex, U.S.A.)
- ปิเปตขนาด 10, 5, และ1 มิลลิลิตร (Pyrex, U.S.A)
- ปิเปตอัตโนมัติ (autopipette) ขนาด 200-1,000 ไมโครลิตร (Gilson, France)
- โปรแกรม BLAST,GenBank databases สำหรับวิเคราะห์ gene sequences (Altschul et al., 1990) (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast, www.pubmed.com)
- แผ่นเยื่อกรองขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน (Whatman ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ไมครอน, Japan)
- แผ่นสไลด์ (Sail Brand, China)
- พาราฟิล์ม (Laboratory film, USA)
- ลูกยางสำหรับใช้ดูดสารละลาย
- หม้อนึ่งความดัน (Autoclave; ยี่ห้อ MT-Sterilizers Automatic 100, Chiang Mai Medtech system, Thailand)
- หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร (Centrifuge tubes 15 and 50 mL; ยี่ห้อ Neptune, CLP, U.S.A.)
- หลอดดักก๊าซ
- หลอดทดลองฝาธรรมดาขนาด 13 x 100, 16 x 150 มิลลิเมตร (Pyrex, U.S.A.)
- หลอดสำหรับทำ PCR (QSP, U.S.A.)
- หลอดเอปเพนดอร์ฟ (Eppendorff tube 1.5 mL; CLP, U.S.A)
- ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath; Model 84, Thelco, U.S.A.)
- Anaerobic jar (Oxoid, U.S.A.)
- API 20-Strep, และ API 50-CHL (Biomeriieux, France)
- Automatic pipette ขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร (ยี่ห้อ Labmate, High Tech Lab, Poland)
- Blue tip ขนาด 1,000 ไมโครลิตร (Corning Corporation, U.S.A)
- Cryogenic vial (Copan Diagnostic, lnc, U.S.A)
- Gas pack (Merck, Germany)
- Foreceps

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Heat box (HB-1, Wheatec Corp., Taiwan), (ใช้อุ่น DNA sequence product ที่ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที)
- Pasture pipette Blue tip ขนาด 1000 ไมโครลิตร (Corning Corporation, U.S.A)
- pH meter (รุ่น CG 842 Schott)
- Spreader
- Syringe filter (NIPRO, THAILAND)
- Yellow tip ขนาด 100 ไมโครลิตร (Corning Corporation, U.S.A)

3.2.2 สารเคมี

- คลอโรฟอร์มเข้มข้น 95% (Fluka, USA)
- นมผงขาดมันเนย (Mission- Hical)
- สารละลาย Hi-di Formadide (Gene System,USA)
- Agar (Difco, USA)
- Agarose gel (Vivantis, USA)
- Boric acid (molecular biology grade) (Vivantis, USA)
- Bromcresol green (Fluka, USA)
- Barium chloride (Merck, Germany)
- Calcium chloride; $CaCl_2$ (Merck, Germany)
- $CaCO_3$ (Merck, Germany)
- Citric acid (Fluka, Switzerland)
- D-Glucose (Merck, Germany)
- Dipotassium hydrogen phosphate; K_2HPO_4 (Merck, Germany)
- Disodium hydrogen phosphate; Na_2HPO_4 (Merck, Germany)
- DNase1 ขนาด 25 มิลลิกรัม (Vivantis, USA)
- EDTA for molecular (Vivantis, USA)
- Ethanol เข้มข้น 99.95% (Merck, Germany)
- Ethidium bromide (Vivantis, USA)
- Glucose (Merck, Germany)
- Glycerol เข้มข้น 87% (Merck, Germany)
- Gram stain reagent (อาร์ วี แอลซัพพลาย)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Histidine (Fluka, USA)
- H_2O_2 เข้มข้น 3% (บริษัท ศิริบัญชา จำกัด)
- Lactose (BHD, Germany)
- Liquid paraffin (ยูเนียนไซน์, Germany)
- Litmus (BHD, Germany)
- L-Naphthol (Merck, Germany)
- Lysine (Fluka, USA)
- Lysozyme solution (Microbiological grade, Vivantis, USA)
- Mannitol (Merck, Germany)
- $MgCl_2$ (Merck, Germany)
- Mitomycin C (Fluka, USA)
- MRS agar (Difco, USA)
- MRS broth (CRITERION)
- PCR marker (Vivantis,USA) ขนาด 100-3000 basepairs
- Peptone (Difco, USA)
- phenolphthalein (Fluka, USA)
- Potassium chloride (KCl) (Merck, Germany)
- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Merck, Germany)
- Potassium hydrogennophthalate; KHP (Merck, Germany)
- Potassium hydroxide; KOH (Merck, Germany)
- Potassium iodide; KI (Merck, Germany)
- Proteinase K (Promega Corp, USA)
- RNaseA ขนาด 50 มิลลิกรัม (Vivantis, USA)
- SDS solution (Vivantis, USA)
- SIM medium (Himediaief, India)
- Sodium acetate (Merck, Germany)
- Sulfuric acid (Merck, Germany)
- Sodium chloride; NaCL (Merck, Germany)
- Sodium hydroxide ; NaOH (Merck, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Tag enzyme (Vivantis, USA)
- Tris-base (Vivantis, USA)
- Tryptophan (Fluka, USA)
- Tyrosine (Fluka, USA)
- Universal primer : forward primer, reverse primer (Biolabs, USA): 5′CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3′ (nucleotides 518 to 537), 5′-ATCGG (C/T)TACCTTGTTACGACTTC-3′ (nucleotides 1513 to 1491)
- yeast extract (Labscan, Spain)
- β-Disodium glycerophosphate (Fluka, USA)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเพาะเลี้ยงและคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก จากน้ำนมดิบ (Vedamutha and Richter, 2001)

1) การเพาะเลี้ยงแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำนมดิบ

(1) นำตัวอย่างน้ำนมดิบจากแหล่งน้ำนมดิบของกลุ่มเกษตรกรผู้ผลิตนมดิบรายย่อยเชียงใหม่และเชียงราย 3 แห่ง ได้แก่ ตัวอย่างน้ำนมดิบจากสมาชิกโรงงานนม อสค. ห้วยแก้ว เชียงใหม่ 3 ราย คือ ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส 7009, ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส 7021 และผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส 7010 สหกรณ์โคนมแม่โจ้ สหกรณ์โคนมแม่ลาว และสหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วางซึ่งบรรจุในขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร และเก็บรักษาในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศา-เซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง

(2) ปิเปตน้ำนมดิบแต่ละตัวอย่างจากแต่ละขวด ซึ่งผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส มาจำนวน 1 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลองบรรจุสารละลาย phosphate buffer saline ความเข้มข้น 1 เท่าจำนวน 9 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางลงทีละ 10 เท่า (ten-fold dilution) จนถึงที่ระดับการเจือจาง 10^{-8} ภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ

(3) ปิเปตน้ำนมดิบแต่ละตัวอย่างที่ไม่ได้เจือจางและที่ถูกเจือจางเป็นอัตราส่วนต่าง ๆ จนถึง 10^{-8} ตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตรลงในจานเลี้ยงเชื้อ โดยแต่ละอัตราส่วนให้ทำ 2 จาน จากนั้นเท MRS agar ที่หลอมเหลวและผ่านการเติมสารละลาย Bromcresol green เข้มข้นร้อยละ 2 และมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเลี้ยงเชื้อ จานละประมาณ 12-15 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(4) รอจนกระทั่ง MRS agar ในจานเลี้ยงเชื้อแต่ละจานแห้งและแข็งตัวดีแล้ว จึงเท MRS agar ที่หลอมเหลวและผ่านการเติมสารละลาย Bromcresol green เข้มข้นร้อยละ 2 เพื่อเททับผิวหน้าอีกชั้นเป็นการทำ overlayer รอจน MRS agar ที่เททับผิวหน้าของจานเลี้ยงเชื้อทุกจานแห้งและแข็งตัวดีแล้ว จึงนำจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดนี้เข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง

(5) เมื่อครบ 72 ชั่วโมง นำจานเลี้ยงเชื้อแต่ละจานในข้อ (4) มาตรวจนับจำนวนเชื้อดังแสดงในภาคผนวก ก-1 และบันทึกคุณลักษณะของโคโลนีที่พบ เพื่อเลือกมาทำการศึกษาต่อไป

2) การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจากน้ำนมดิบ ดังนี้

(1) ทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีที่คัดเลือกไว้ในจานเลี้ยงเชื้อแต่ละจานของข้อ (5) ของหัวข้อ 1) มาลงเลี้ยงในหลอดทดลองบรรจุ Litmus milk โคโลนีละ 1 หลอด โดยทำในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ แล้วนำหลอดทดลองบรรจุ Litmus milk ที่ทำการถ่ายเชื้อดังกล่าวเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง

(2) บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของ Litmus milk และคัดเลือกเอาเฉพาะหลอดที่ Litmus milk เกิดการแข็งตัว (curd) มาทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีต่อไป

(3) ทำการเท MRS agar ที่หลอมเหลวและผ่านการเติมสารละลาย Bromcresol green เข้มข้นร้อยละ 2 ลงในจานเลี้ยงเชื้อภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ จานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร รอกระทั่ง MRS agar ในจานเลี้ยงเชื้อแต่ละจานแห้งและแข็งตัวดีแล้ว จึงนำเอาหลอดทดลองบรรจุ Litmus milk ที่ทำการถ่ายเชื้อและมีการแข็งตัวในข้อ (2) มาทำการถ่ายเชื้อต่อลงในจานเลี้ยงเชื้อดังกล่าวด้วยวิธีการ streak plate หลอดละ 1 จาน จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อที่ทำการ streak plate แล้วทั้งหมดนี้ เข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง

(4) นำจานเลี้ยงเชื้อแต่ละจานในข้อ (3) มาทำการตรวจสอบโคโลนีและคัดเลือกเอาโคโลนีเดี่ยวจากแต่ละจาน มาทำการ streak plate ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มี MRS agar ซึ่งผ่านการเติมสารละลาย Bromcresol green เข้มข้นร้อยละ 2 จานใหม่ โคโลนีละ 1 จาน ภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อที่ทำการ streak plate แล้วทั้งหมดนี้ เข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง ทั้งนี้เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวที่มีเชื้อบริสุทธิ์

(5) นำจานเลี้ยงเชื้อแต่ละจานในข้อ (4) มาตรวจสอบความ สามารถในการย่อยสลาย H_2O_2 (การสร้างเอนไซม์ catalase) ภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อโดยเตรียมหยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อบนแผ่นสไลด์แก้วแผ่นละ 1 หยด แล้วใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว เขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่ขึ้นในจานเลี้ยงเชื้อ มาเกลี่ยลงในหยดน้ำกลั่นบนแผ่นสไลด์แก้วตัวอย่างเชื้อละ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1 แผ่น จากนั้นหยดสารละลาย H_2O_2 เข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนแผ่นสไลด์แก้วตรงตำแหน่งของหยดน้ำกลั่นที่มีเชื้อ แผ่นละ 2-3 หยด บันทึกผลการเกิดฟองก๊าซ (อ่านผลเป็น +) หรือไม่เกิดฟองก๊าซ (อ่านผลเป็น -) สำหรับโคโลนีเดี่ยวที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase จะถูกคัดทิ้ง

(6) ถ่ายเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวในแต่ละจานซึ่งให้ผลลบต่อการทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase ในข้อ (5) ลงเลี้ยงในหลอดทดลองที่ทำเป็น slant ของ MRS agar ที่มี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 2 โคโลนีละ 3 หลอดภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ เสร็จแล้วนำหลอดทดลองบรรจุ MRS agar ที่มี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 2 ถ่ายเชื้อแล้วทั้งหมด เข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง

(7) นำหลอดทดลองบรรจุ MRS agar ที่มี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 2 ที่ถ่ายเชื้อแต่ละตัวอย่างในข้อ (6) มาใช้ในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตัวอย่างเชื้อละ 1 หลอด ส่วนอีก 2 หลอดที่เหลือให้เก็บรักษาไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับเป็นเชื้อตั้งต้น (stock culture) ไว้ใช้งานต่อไป

3.3.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก (Holt et al., 1994; Madera et al., 2003) มีดังนี้

1) การทดสอบความสามารถเจริญใน Litmus milk โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่ขึ้นบน slant ของ MRS agar ที่มี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 2 มาเติมลงในหลอดทดลองบรรจุ Litmus milk ตัวอย่างเชื้อละ 1 หลอด เสร็จแล้วนำหลอดทดลองบรรจุ Litmus milk ถ่ายเชื้อแล้วเหล่านี้ เข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกผลการแข็งตัว (curd) ของ Litmus milk

2) การทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 10, 37, 44 และ 55 องศาเซลเซียส โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่ขึ้นบน slant ของ MRS agar ที่มี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 2 มาเติมลงในหลอดทดลองบรรจุ MRS broth ซึ่งมี Bromcresol green เข้มข้นร้อยละ 2 เป็นอินดิเคเตอร์และมีหลอดดักก๊าซ ตัวอย่างเชื้อละ 4 หลอด เสร็จแล้วนำหลอดทดลองบรรจุเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth เหล่านี้ เข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 10, 37, 44 และ 55 องศาเซลเซียส ตัวอย่างเชื้อละ 1 หลอด เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงสีของ MRS broth และการเกิดฟองก๊าซในหลอดดักก๊าซ

3) การทดสอบความสามารถทนเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 2, 4 และ 6.5 โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่ขึ้นบน slant ของ MRS agar ที่มี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 2 มาเติมลงในหลอดทดลองบรรจุ MRS broth ที่มี NaCl เข้มข้นร้อยละ 2, 4 และ 6.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตัวอย่างเชื้อละ 1 หลอด เสร็จแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกผลการขุ่นและตกตะกอนของ MRS broth

4) การทดสอบ Voges-Proskauer (การทดสอบการสร้าง acetoacetyl หรือ diacetyl carbinol) โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่ขึ้นบน slant ของ MRS agar ที่มี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 2 มาเติมลงในหลอดทดลองบรรจุ Glucose phosphate broth ตัวอย่างเชื้อละ 1 หลอด แล้วนำหลอดทดลองบรรจุเชื้อแบคทีเรียใน Glucose phosphate broth เหล่านี้ เข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย L-Naphthol เข้มข้นร้อยละ 6 และสารละลาย KOH เข้มข้นร้อยละ 16 ลงในเชื้อแบคทีเรียใน Glucose phosphate broth แต่ละหลอด สารละลายละ 3 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ เพื่อให้สารละลายผสมเข้ากัน บันทึกผลการเกิดสีแดงในหลอดทดลองบรรจุเชื้อแบคทีเรียใน Glucose phosphate broth แต่ละหลอด โดยผลบวกจะเกิดสีแดงภายในระยะเวลา 15 นาที ถึง 2 ชั่วโมง โดยผลลบจะยังคงมีสีน้ำตาลเข้มอมเหลืองตามเดิม

5) การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล glucose, lactose, และ mannitol ในสภาวะที่มีและไม่มีก๊าซออกซิเจน (oxidized and fermented glucose, lactose, and mannitol) โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อจากหลอดทดลองบรรจุเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ซึ่งบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมงในข้อ 2) มาเติมลงในหลอดทดลองบรรจุ Hugh & Leifson medium ที่มี glucose, lactose, และ mannitol ตัวอย่างเชื้อละ 2 หลอดต่อการทดสอบการใช้น้ำตาล 1 ชนิด จากนั้นดูด liquid parafin ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มาเติมลงในหลอดทดลองบรรจุ Hugh & Leifson medium ที่มี glucose, lactose, และ mannitol ถ่ายเชื้อแล้วหลอดละ 2 มิลลิลิตร เป็นการทดสอบการใช้น้ำตาลในสภาวะที่ไม่มีก๊าซออกซิเจน ตัวอย่างเชื้อละ 1 หลอดต่อการทดสอบน้ำตาล 1 ชนิด สำหรับหลอดทดลองบรรจุ Hugh & Leifson medium ที่มี glucose, lactose, และ mannitol ถ่ายเชื้อแล้วซึ่งไม่ได้เติม liquid parafin จะใช้เป็นการทดสอบการใช้น้ำตาลในสภาวะที่มีก๊าซออกซิเจน เสร็จแล้วนำหลอดทดลองบรรจุ Hugh & Leifson medium ที่มี glucose, lactose, และmannitol ซึ่งถ่ายเชื้อแล้วทั้งหมดนี้ เข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงสีและการเกิดฟองก๊าซใน Hugh & Leifson medium

6) การทดสอบความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยทำการเท MRS agar หลอมเหลวซึ่งเติมสารละลาย Bromcresol green เข้มข้นร้อยละ 2 ลงในจานเลี้ยงเชื้อ จานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ รอจนกว่า MRS agar ในจานเลี้ยงเชื้อแต่ละจานแห้งและแข็งตัว ให้นำหลอดทดลองบรรจุเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ทุกตัวอย่างในข้อ 2) ซึ่งบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง มาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ห่วงถ่ายเชื้อถ่ายเชื้อจากหลอดบรรจุสารละลายเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth เหล่านี้ มาทำการ streak plate ในจานเลี้ยงเชื้อที่เติม MRS agar ข้างต้น ตัวอย่างเชื้อละ 1 จาน เสร็จแล้วนำจานเลี้ยงเชื้อที่ถ่ายเชื้อแล้วเหล่านี้ เข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกผลการเจริญของเชื้อตามแนวการ streak plate

7) การตรวจสอบรูปร่างลักษณะของเชื้อแบคทีเรียแต่ละตัวอย่าง จากการย้อมสีแกรม โดยเตรียมหยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อบนแผ่นสไลด์แก้วแผ่นละ 1 หยดเล็ก ๆ แล้วใช้ห่วงถ่ายเชื้อถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่ขึ้นในจานเลี้ยงเชื้อ มาทำการเกลี่ยลงในหยดน้ำกลั่นบนแผ่นสไลด์แก้วตัวอย่างเชื้อละ 1 แผ่น ให้ทำการเกลี่ยจนหยดน้ำกลั่นแห้ง แล้วนำแผ่นสไลด์แก้วแต่ละแผ่นมาทำการลนผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้งเป็นการทำ heat fixed จากนั้นหยดสารละลาย crystal violet ให้ท่วมรอยเกลี่ยบนแผ่นสไลด์แก้วแต่ละแผ่น เป็นเวลานาน 30 วินาที เทสารละลายทิ้งแล้วล้างออกเบา ๆ ด้วยน้ำสะอาด หยดสารละลาย gram iodine ให้ท่วมรอยเกลี่ยบนแผ่นสไลด์แก้วแต่ละแผ่น เป็นเวลานาน 30 วินาที เทสารละลายทิ้งแล้วล้างออกเบา ๆ ด้วยน้ำสะอาด ต่อจากนั้นหยด ethanol เข้มข้นร้อยละ 95 (เป็น decolorizer) ให้ท่วมรอยเกลี่ยบนแผ่นสไลด์แก้วแต่ละแผ่น แล้วรีบล้างออกเบา ๆ ด้วยน้ำสะอาด สุดท้ายหยดสารละลาย safranin ให้ท่วมรอยเกลี่ยบนแผ่นสไลด์แก้วแต่ละแผ่น เป็นเวลานาน 10 วินาที เทสารละลายทิ้งแล้วล้างออกเบา ๆ ด้วยน้ำสะอาด ซับน้ำออกจากแผ่นสไลด์แก้วด้วยกระดาษทิชชู่ นำแผ่นสไลด์แก้วแต่ละแผ่นไปทำการตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างธรรมดา บันทึกลักษณะการติดสีแกรมและรูปร่างลักษณะของเซลล์

จากผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีทั้งหมดข้างต้น ให้ทำการระบุว่าเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างใดเป็นเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก โดยเน้นที่ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 37 และ 44 องศาเซลเซียส ความสามารถเจริญได้ใน Litmus milk ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ catalase และลักษณะการติดสีแกรมและรูปร่างที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ เป็นหลัก

ทำการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียทุกตัวอย่าง โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่ขึ้นบน MRS agar ที่มี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 2 ภายในหลอดทดลองที่บรรจุจากข้อ 6) มาเติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์บรรจุนมขาดมันเนย เข้มข้นร้อยละ 10 จำนวน 7 มิลลิลิตร ซึ่งมี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 0.5 ตัวอย่างเชื้อละ 1 หลอดภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ นำหลอดบรรจุเชื้อแบคทีเรียในนมขาดมันเนยทั้งหมดนี้ เข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48-72 ชั่วโมง เมื่อพบว่านมขาดมันเนยมีการแข็งตัวเกิดขึ้น ให้เติม glycerol หลอดละ 2.1 มิลลิลิตร ก่อนนำเข้าเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และทำการเก็บแบคทีเรียใน plastic beads โดยเลือกลักษณะเชื้อที่บริสุทธิ์จากการ streak plate นำมาทำเป็น suspension ลงใน Cryogenic vial ที่บรรจุ plastic beads จนได้ความขุ่นเทียบเท่ากับ MacFarland No. 3 หรือ 4 โดยมีปริมาณเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประมาณ 9×10^8 ถึง 12×10^8 ต่อมิลลิลิตร เขย่าหลอดเพื่อให้เชื้อเกาะติดกับ plastic beads หลังจากนั้นใช้ pasteur pipette ที่ปราศจากเชื้อดูด suspension ออกให้มากที่สุด ปิดฝาให้สนิทพันทับด้วยพาราฟิล์ม นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.3 การคัดแยกแบคทีริโอฟาจจากเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก และการทำให้แบคทีริโอฟาจมีความบริสุทธิ์ (Quiberonia et al., 2003) การคัดแยกและนับจำนวนแบคทีริโอฟาจจากเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก โดยวิธี double layer -soft agar technique โดยนำเชื้อที่แยกได้จากน้ำนมดิบจากผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส B7021 ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส L7021 สหกรณ์โคนมสันป่าตอง – แม่วาง รหัส C สหกรณ์โคนมสันป่าตอง – แม่วาง รหัส B และสหกรณ์โคนมแม่โจ้ รหัส G ซึ่งบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส มาทำการคัดแยกแบคทีริโอฟาจ

3.3.3.1 การคัดแยกแบคทีริโอฟาจ จากเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

1) ใช้ห่วงถ่ายเชื้อถ่ายเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่แยกได้จากน้ำนมดิบจากผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส B7021 และ จากผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส L7021 ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส B7009 สหกรณ์โคนมสันป่าตอง – แม่วาง รหัส C สหกรณ์โคนมสันป่าตอง – แม่วาง รหัส B และสหกรณ์โคนมแม่โจ้ รหัส G จากโคโลนีที่ขึ้นบน slant ในหลอดทดลอง MRS agar ที่มี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 2 ซึ่งเก็บรักษามาไม่นานเกิน 3 เดือน เติมลงในหลอดทดลองบรรจุ MRS broth จำนวน 3 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้แล้วตัวอย่างเชื้อละ 1 หลอดภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ เสร็จแล้วนำหลอดทดลองบรรจุสารละลายเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth เข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

2) ทำการถ่ายเชื้อจากหลอดทดลองบรรจุเชื้อแบคทีเรีย MRS broth ในข้อ 1) จำนวน 400 ไมโครลิตร (ร้อยละ 2) มาเติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุ MRS broth จำนวน 20 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้แล้วภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ ตัวอย่างเชื้อละ 2 หลอดซึ่งแต่ละหลอดนี้จะถูกใช้เป็นชุดควบคุม และ ชุดทดลอง ตามลำดับ จากนั้นนำหลอดเซนตริฟิวจ์บรรจุเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ทั้งสองหลอดนี้ เข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 ชั่วโมง

3) หลอดเซนตริฟิวจ์บรรจุเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth จากข้อ 2) ที่ใช้เป็นชุดควบคุม จะถูกเติมน้ำกลั่นซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 40 ไมโครลิตรต่อหลอด ส่วนหลอดเซนตริฟิวจ์บรรจุเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ที่ใช้เป็นชุดทดลอง จะถูกเติมสารละลาย Mitomycin C เข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 40 ไมโครลิตรต่อหลอด เพื่อทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ Mitomycin C ภายในหลอดเซนตริฟิวจ์ดังกล่าวเท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลายในหลอดเซนตริฟิวจ์แต่ละหลอดให้เข้ากัน โดยการดูด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขึ้น-ลง 5-6 ครั้ง แล้วดูดสารละลายผสมที่มีเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ในชุดควบคุมและชุดทดลองของเชื้อ มาอย่างละ 1.5 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชุดละ 1 หลอด เสร็จแล้วนำหลอดเอปเพนดอร์ฟเหล่านี้เข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4) เมื่อครบ 3 ชั่วโมงนำสารละลายผสมที่มีเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ซึ่งบรรจุในหลอดเอปเพนดอร์ฟในชุดควบคุม (เติมน้ำกลั่น) และ ชุดทดลอง (เติม Mitomycin C) ซึ่งบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส ในข้อ 3) มาทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนสารละลายใส (supernatant) จากหลอดเอปเพนดอร์ฟแต่ละหลอดมาทำการกรองด้วย syringe filter ที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน ภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ ส่วนที่กรองได้นี้เรียกว่า phage lysate ซึ่งมีแบคทีริโอฟาจที่แยกได้จากแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ (host) นำไปเตรียม double layer soft agar technique เพื่อแยกแบคทีริโอฟาจต่อไป

5) ทำการเท MRS-C agar (bottom layer) เตรียมโดยเท MRS agar ที่ผสม $CaCl_2$ ซึ่งมีความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิโมลาร์ ในจานเลี้ยงเชื้อ จานละ 10 มิลลิลิตร ภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ แล้วรอให้ MRS-C agar ในจานเลี้ยงเชื้อแข็งตัว

6) ทำการคัดแยกแบคทีริโอฟาจของเชื้อ ภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ โดยแบ่งเป็น 2 วิธีการคือ

ก. ในชุดควบคุม (เติมน้ำกลั่น) ทดลองแบ่งเป็น 2 กลุ่มตามอัตราส่วนของสารละลายแบคทีเรีย (host) : สารละลายใส (phage lysate) จากชุดเติมน้ำกลั่นคือ

กลุ่มที่ 1 ใช้เชื้อแบคทีเรีย (host) 100 ไมโครลิตร + สารละลายใส (phage lysate) ที่เป็นพวกชุดเติมน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 2 ใช้เชื้อแบคทีเรีย (host) 100 ไมโครลิตร + สารละลายใส (phage lysate) ที่เป็นพวกชุดเติมน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร

ดยดูดเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ในชุดควบคุมที่เหลืออยู่จากข้อ 3) และสารละลายใสที่มีฟาจของชุดควบคุมซึ่งเป็นของเชื้อตัวอย่างเดียวกัน จากข้อ 4) เติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์บรรจุ MRS agar ซึ่งมี agar เข้มข้นร้อยละ 0.6 และ $CaCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จำนวน 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการหลอมเหลวแล้ว ตัวอย่างเชื้อละ 1 หลอด ผสมให้เข้ากัน เพื่อใช้เป็น top agar โดยการดูดขึ้น-ลง 5-6 ครั้ง แล้วรีบเทลงบนผิวหน้าของ MRS-C agar ในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 5) ตัวอย่างเชื้อละ 1 จาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. ทำเช่นเดียวกับข้อ ก. แต่ใช้เชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ในชุดทดลองแทนชุดควบคุม (เติมสารละลาย Mitomocin C) โดยทดลอง 4 กลุ่ม ตามอัตราส่วนของสารละลายแบคทีเรีย (host) : สารละลายใส (phage lysate) จากชุดเติม Mitomocin C คือ

กลุ่มที่ 3 ใช้เชื้อแบคทีเรีย (host) 100 ไมโครลิตร+ สารละลายใส (phage lysate) ที่เป็นพวกชุดเติม Mitomycin C 10 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 4 ใช้เชื้อแบคทีเรีย (host) 100 ไมโครลิตร+ สารละลายใส (phage lysate) ที่เป็นพวกชุดเติม Mitomycin C 100 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 5 ใช้เชื้อแบคทีเรีย (host) 100 ไมโครลิตร+ สารละลายใส (phage lysate) ที่เป็นพวกชุดเติม Mitomycin C 200 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 6 ใช้เชื้อแบคทีเรีย (host) 10 ไมโครลิตร+ สารละลายใส (phage lysate) ที่เป็นพวกชุดเติม Mitomycin C 100 ไมโครลิตร

7) ให้รอจนกระทั่ง MRS agar ซึ่งมี $CaCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และมีส่วนผสมของเชื้อแบคทีเรียและสารละลายใสที่มีฟาจ ซึ่งเททับลงไปบนผิวหน้าของ MRS-C agar ในจานเลี้ยงเชื้อแต่ละจานแห้งและแข็งตัวดีแล้ว จึงนำจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดนี้เข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อแต่ละจานมาตรวจดูลักษณะของ plaque (บริเวณใสที่มีแบคทีริโอฟาจ) ที่เกิดขึ้นและคัดเลือก plaque ที่เป็นลักษณะเฉพาะ

3.3.3.2 การทำให้แบคทีริโอฟาจมีความบริสุทธิ์

1) ในการทำให้ฟาจมีความบริสุทธิ์ครั้งที่ 1 ดูดเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ของเชื้อที่เป็นชุดควบคุม มาตัวอย่างเชื้อละ 40 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์บรรจุ MRS broth ซึ่งมี $CaCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ β-Disodium glycerophosphate เข้มข้นร้อยละ 0.95 จำนวน 3 มิลลิลิตร สำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีริโอฟาจก่อนทำให้มีความบริสุทธิ์ ภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ โดย plaque ซึ่งมีแบคทีริโอฟาจ 1 อัน จะถูกเลี้ยงใน MRS broth ดังกล่าว 1 หลอด และแบคทีริโอฟาจซึ่งแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกเชื้อใด จะต้องถูกเลี้ยงใน MRS broth ที่มีเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกเดียวกันเท่านั้น ทั้งนี้ให้เตรียมเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ดังกล่าวให้มีจำนวนเท่ากับ plaque ที่ได้ทำการคัดเลือกไว้แล้ว

2) ดูดเชื้อแบคทีเรียที่เป็นชุดควบคุมมา 200 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ซึ่งมี MRS broth จำนวน 10 มิลลิลิตร

3) นำเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth สำหรับใช้เลี้ยงแบคทีริโอฟาจ และเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ในข้อ 2 ทั้งหมด เข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส นาน 7 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4) ใช้ห่วงถ่ายเชื้อทำการตัดแยก plaque จากจานเลี้ยงเชื้อจากข้อ 7) ของหัวข้อ 3.3.3.1 ภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ แล้วถ่าย plaque ดังกล่าวมาเติมลงในเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth plaque ละหนึ่งหลอด ตามเงื่อนไขในข้อ 1)

5) นำหลอดเซนตริฟิวจ์ที่บรรจุเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ซึ่งได้เติม plaque แล้วเข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง

6) ดูดสารละลายผสมที่มีฟาจใน MRS broth จากข้อ 5) เติมลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตรตัวอย่างสารละลายละ 2 หลอดภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ แล้วนำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นระยะเวลา 10 นาที

7) ดูดสารละลายใสที่มีฟาจ จากข้อ 6) มาทำการกรองด้วย syringe filter ที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอนภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ เก็บสารละลายใสที่ผ่านการกรองแล้วของหลอดเอปเพนดอร์ฟแต่ละหลอดลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดใหม่

8) ดูดสารละลายใสที่มีฟาจจากข้อ 7) มาทำการเจือจางในหลอดทดลองบรรจุ MRS agar ซึ่งมี agar เข้มข้นร้อยละ 0.6 และ $CaCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จำนวน 9.9 มิลลิลิตร ซึ่งได้ผ่านการหลอมเหลวมาแล้ว โดยทำการเจือจางลงทีละ 100 เท่าภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ เริ่มจากดูดเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ที่จะใช้เลี้ยงฟาจจากข้อ 3) เติมลงในหลอดทดลองบรรจุ MRS agar ข้างต้นจำนวน 4 หลอด หลอดละ 200 ไมโครลิตร แล้วดูดสารละลายใสที่มีฟาจของเชื้อแบคทีเรียนั้นมา 100 ไมโครลิตร มาเติมลงใน MRS agar ดังกล่าว หลอดที่ 1 (ได้เป็นระดับการเจือจาง 10^{-2}) ทำการปั่นผสมให้ส่วนผสมทั้งหมดเข้ากันดูดมา 100 ไมโครลิตร แล้วเติมลงใน MRS agar หลอดที่ 2 ทำการผสมและปฏิบัติอย่างเดียวกันกับ MRS agar หลอดที่ 3 และ 4 (ได้เป็นระดับการเจือจาง 10^{-4}, 10^{-6} และ 10^{-8} ตามลำดับ) จากนั้นเท MRS agar ในแต่ละหลอดลงในจานเลี้ยงเชื้อซึ่งมี MRS agar ที่มี $CaCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ หลอดละ 1 จาน รอจนกระทั่งส่วนผสมที่เทลงไปในจานเลี้ยงเชื้อทุกจานแห้งและแข็งตัว จึงนำจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดเข้าบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง

9) นำจานเลี้ยงเชื้อมาตรวจนับปริมาณ plaque ของฟาจแต่ละตัวอย่างในแต่ละระดับการเจือจาง

10) ทำการให้ฟาจมีความบริสุทธิ์ครั้งที่ 2 โดยเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ซึ่งมี $CaCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์และ β-Disodium glycerophosphate เข้มข้นร้อยละ 0.95 จำนวน 3 มิลลิลิตร สำหรับใช้เลี้ยงฟาจ ตามวิธีการในข้อ 1) ให้มีจำนวนเท่ากับฟาจที่ได้ทำการคัดเลือกไว้แล้วบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส นาน 7 ชั่วโมง แล้วใช้ห่วงถ่ายเชื้อทำการตัดแยก plaque ของฟาจแต่ละชนิดจากจานเลี้ยงเชื้อในข้อ 9) มาเติมลงใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อแบคทีเรียใน MRS broth plaque ละหนึ่งหลอด แล้วนำเข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง

11) ดูดสารละลายที่มีฟาจจากข้อ 10) มากรองตามวิธีการ ในข้อ 6) และ 7) ดูดสารละลายใสที่มีฟาจนี้ มาเติมลงในหลอดทดลองบรรจุ MRS agar ซึ่งมี agar เข้มข้นร้อยละ 0.6 และ $CaCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จำนวน 9.9 มิลลิลิตรซึ่งได้ผ่านการหลอมเหลวมาแล้วภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ สารละลายใสที่มีฟาจละ 1 หลอด โดยก่อนเติมสารละลายที่มีฟาจดังกล่าวให้เติมเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth จำนวน 200 ไมโครลิตรลงไปก่อน แล้วจึงเติมสารละลายใสที่มีฟาจดังกล่าวจำนวน 40 ไมโครลิตรตามลงไป ทำการปั่นผสมให้เข้ากัน แล้วเทส่วนผสมที่มีฟาจนี้ลงในจานเลี้ยงเชื้อซึ่งมี MRS agar ที่มี $CaCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ หลอดละ 1 จาน ทั้งนี้ให้ปฏิบัติอย่างเดียวกับสารละลายใสที่มีฟาจทุกตัวอย่างชนิด รอจนกระทั่งส่วนผสมที่เทลงไปในจานเลี้ยงเชื้อทุกจานแห้งและแข็งตัว จึงนำจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดเข้าบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง

12) นำจานเลี้ยงเชื้อที่มี plaque ของฟาจแต่ละตัวอย่างชนิดจากข้อ 11) มาทำการคัดเลือก plaque ที่มีรูปร่างเหมือนกับ plaque เริ่มต้น แล้วทำให้ฟาจมีความบริสุทธิ์ครั้งที่ 3 โดยวิธีการเดียวกับในข้อ 10) และ 11)

13) เมื่อได้ plaque ของฟาจแต่ละตัวอย่างชนิดในจานเลี้ยงเชื้อให้นำ plaque ดังกล่าวมาทำการเลี้ยงในสารละลายเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ซึ่งมี $CaCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์และ β-Disodium glycerophosphate เข้มข้นร้อยละ 0.95 จำนวน 3 มิลลิลิตร แล้วนำ MRS broth ดังกล่าวเข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง

14) ทำการเก็บรักษาฟาจแต่ละตัวอย่างที่ได้ทำการคัดเลือกไว้โดยนำสารละลายที่มีฟาจในข้อ 13) มาทำการปั่นเหวี่ยงตามวิธีการในข้อ 6) แล้วกรองด้วย syringe filter ที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอนภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ เก็บสารละลายใสที่ผ่านการกรองแล้วของหลอดเอปเพนดอร์ฟแต่ละหลอดลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดใหม่ จากนั้นเติมคลอโรฟอร์มเข้มข้นร้อยละ 95 ลงไปในหลอดเอปเพนดอร์ฟแต่ละหลอด ให้มีปริมาณเท่ากับร้อยละ 10 ของสารละลายใสที่บรรจุอยู่ก่อน จากนั้นนำหลอดเอปเพนดอร์ฟบรรจุสารละลายใสที่มีฟาจทั้งหมดเข้าเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.4 การทดสอบความต้านทานต่อแบคทีริโอฟาจ (Hebert et al., 2000)

การทดสอบความต้านทานของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกต่อแบคทีริโอฟาจโดยวิธี spot test ให้ปิเปต phage lysate ที่เตรียมจากแบคทีริโอฟาจบริสุทธิ์ที่แยกได้ จำนวน 10 ไมโครลิตร นำไปหยดลงบน top agar ในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมตามวิธี double layer soft agar technique แต่

ใน top agar นี้ เติมเฉพาะแบคทีเรียที่ต้องการนำมาทดสอบความต้านทานต่อฟาจเท่านั้นโดยไม่ได้ผสม phage lysate บ่มที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง สังเกตว่าเกิด plaque หรือ halo (บริเวณวงแหวนใสที่มีความขุ่นภายใน) ถ้าปรากฏ plaqueหรือ halo แสดงว่าแบคทีเรียไม่มีความต้านทานต่อฟาจ แต่ถ้าไม่ปรากฏ plaque หรือ halo แสดงว่าแบคทีเรียนั้นมีความต้านทานต่อฟาจ

3.3.4.1 การคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความทนต่อแบคทีริโอฟาจ

1) นำจานเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทำให้ฟาจมีความบริสุทธิ์ครั้งที่ 3 ซึ่งมีฟาจทุกตัวอย่างที่ได้คัดเลือกไว้แล้ว ใช้ห่วงถ่ายเชื้อตัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญโดยมีลักษณะขุ่นอยู่ภายในมีขอบใสล้อมรอบ (halo) ถ่ายเชื้อดังกล่าวลงในหลอดทดลองบรรจุ MRS broth จำนวน 3 มิลลิลิตร ตัวอย่างเชื้อละ 1 หลอด นำหลอดบรรจุเชื้อแบคทีเรีย ใน MRS broth เหล่านี้เข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

2) ใช้ห่วงถ่ายเชื้อจากหลอดบรรจุเชื้อใน MRS broth ในข้อ 1) มาทำการ streak plate ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มี MRS agar (ไม่มีการเติมสารละลาย bromcresol green เข้มข้นร้อยละ 2) ภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดเข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง

3) ใช้ห่วงถ่ายเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวจากจานเลี้ยงเชื้อในข้อ 2) มาเติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์บรรจุนมขาดมันเนยเข้มข้นร้อยละ 10 จำนวน 7 มิลลิลิตร หลอดทดลองบรรจุ slant ของ MRS agar ซึ่งมี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 0.5 และหลอดทดลองบรรจุ Litmus milk ตัวอย่างเชื้อละ 1 หลอดตามลำดับภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ นำหลอดทั้งหมดนี้ เข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48-72 ชั่วโมง เมื่อพบว่าเชื้อแบคทีเรียในนมผงขาดมันเนยมีการแข็งตัวเกิดขึ้น ให้เติม glycerol หลอดละ 2.1 มิลลิลิตร ก่อนนำเข้าเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับหลอดทดลองบรรจุ MRS agar ซึ่งมี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 0.5 ที่มีโคโลนีเกิดขึ้นตามแนวการทำ streak plate และหลอดบรรจุเชื้อแบคทีเรียใน Litmus milk ที่มีการแข็งตัวและเปลี่ยนจากสีม่วงอ่อนเป็นสีชมพูอ่อน ให้เก็บรักษาไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.4.2 การทดสอบความทนต่อแบคทีริโอฟาจ ของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

1) เชื้อแบคทีเรียที่จะใช้ในการทดสอบ คือ B7009 (44), B7021 (44), L7021 (44), C MJ (44), IMJ (44), G MJ (44), B สต (44), C สต (44), h สต (44), *Lb. bulgaricus* TISTR 895, และ *S. thermophilus* TISTR 894 และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนต่อแบคทีริโอฟาจคือ clone B7009 (44) 1.4 [เป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ของเชื้อ B7009 (44) ซึ่งทนต่อฟาจ 1.4 (เป็นฟาจตัวที่ 4 ซึ่งมาจากชุดไม่เติม Mitomycin C)], clone L7021(44) 2.8 [เป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ของเชื้อ L7021 (44) ซึ่งทนต่อฟาจ 2.8 (เป็นฟาจตัวที่ 8 ซึ่งมาจากชุดเติม MC)], clone B สต (44) 1.6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และ 2.10 [เป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ของเชื้อ B สต (44) ซึ่งทนต่อฟาจ 1.6 และ 2.10 (เป็นฟาจตัวที่ 6 ซึ่งมาจากชุดไม่เติม MC และฟาจตัวที่ 10 ซึ่งมาจากชุดเติม MC) ตามลำดับ], clone C สต (44) 2.9 [เป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ของเชื้อ C สต (44) ซึ่งทนต่อฟาจ 2.9 (เป็นฟาจตัวที่ 9 ซึ่งมาจากชุดเติม MC)], clone B7021 (44) 1.3, clone B7021 (44) 2.4, clone B7021 (44) 2.8, และ clone B7021 (44) 2.10 [เป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ของเชื้อ B7021 (44) ซึ่งทนต่อฟาจ 1.3, 2.4, 2.8, และ 2.10 (เป็นฟาจตัวที่ 3 ของชุดไม่เติม MC ที่ 1, ฟาจตัวที่ 4, 8 และ 10 ของชุดไม่เติม MC ที่ 2 ตามลำดับ)

2) การเตรียมสารละลายใสที่มีแบคทีริโอฟาจใน MRS broth (phage lysate)

ก. ใช้ห่วงถ่ายเชื้อถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่จะใช้งานทั้งหมดข้างต้น และเชื้อแบคทีเรียที่จะใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงฟาจ (เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ของฟาจ) จากโคโลนีที่ขึ้นบน slant ของ MRS agar ที่มี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 0.5 ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์บรรจุ MRS broth จำนวน 3 มิลลิลิตรภายในตู้ลามินาร์-โฟล์ปลอดเชื้อ นำหลอดเซนตริฟิวจ์บรรจุเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ดังกล่าวบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง

ข. ดูดเชื้อแบคทีเรียแต่ละตัวอย่างใน MRS broth ในข้อ ก. มาจำนวน 140 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์บรรจุ MRS broth จำนวน 10 มิลลิลิตรภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ สำหรับใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียตั้งต้น นำหลอดเซนตริฟิวจ์บรรจุเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ดังกล่าวบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 ชั่วโมง

ค. ดูดเชื้อแบคทีเรียแต่ละตัวอย่างใน MRS broth ของข้อ ข. ที่จะใช้เลี้ยงฟาจมาจำนวน 40 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์บรรจุ MRS broth ซึ่งมี $CaCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์และ β-Disodium glycerophosphate เข้มข้นร้อยละ 0.95 จำนวน 3 มิลลิลิตรตัวอย่างเชื้อละ 2 หลอด นำหลอดเซนตริฟิวจ์บรรจุเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ดังกล่าวบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 ชั่วโมง จากนั้นให้เก็บหลอดเซนตริฟิวจ์บรรจุเชื้อแบคทีเรียแต่ละตัวอย่างใน MRS broth ดังกล่าวหลอดที่ 2 ไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ง. ดูดสารละลายใสที่มีฟาจซึ่งผ่านการเติม chloroform แล้วและเก็บรักษาไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์บรรจุเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ของฟาจนั้น ๆ ใน MRS broth หลอดที่ 1 จากข้อ ค. ภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ แล้วนำหลอดเซนตริฟิวจ์บรรจุสารละลายผสมที่มีฟาจทั้งหมดนี้ ไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง

จ. ทำการกรองสารละลายผสมที่มีฟาจแต่ละตัวอย่างในข้อ ง. นี้ด้วย syringe filter ซึ่งมีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน จากนั้นดูดสารละลายใสที่มีฟาจใน MRS broth ซึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผ่านการกรองนี้มา 40 ไมโครลิตร เติมลงในเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth หลอดที่ 2 จากข้อ ค. ภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ แล้วบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลายผสมที่มีฟาจแต่ละตัวอย่างข้างต้น มาทำการกรองด้วย syringe filter ซึ่งมีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอนอีกครั้ง บรรจุสารละลายใสที่มีฟาจแต่ละตัวอย่างลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 2 หลอด

3) การทดสอบการทนต่อแบคทีริโอฟาจของเชื้อแบคทีเรีย

ก. ดูดเชื้อแบคทีเรียตั้งต้นใน MRS broth ที่จะใช้ทดสอบคือ เชื้อ B7009 (44), B7021 (44), L7021 (44), C MJ (44), G MJ (44), B สต (44), C สต(44), h สต (44), clone B7009 (44) 1.4, clone L7021 (44) 2.8, clone B สต (44) 1.6 และ 2.10, clone C สต (44) 2.9, clone B7021 (44) 1.3, clone B7021 (44) 2.4, clone B7021 (44) 2.8, และ clone B7021 (44) 2.10 มาเติมลงในหลอดทดลองบรรจุ MRS agar ซึ่งมี agar เข้มข้นร้อยละ 0.6 และ $CaCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ที่ผ่านการหลอมเหลวแล้วเชื้อละ 15 หลอดหลอดละ 200 ไมโครลิตร ภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ ทำการปั่นผสมให้ส่วนผสมทั้งหมดในแต่ละหลอดเข้ากัน แล้วเทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มี MRS agar (ไม่ต้องเติมสารละลาย bromcresol green เข้มข้นร้อยละ 2) ซึ่งมี $CaCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่เตรียมไว้แล้วหลอดละ 1 จาน เสร็จแล้วรอให้ MRS agar ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียที่เติมลงในจานเลี้ยงเชื้อแต่ละจานแห้งและแข็งตัว

ข. ทำการแบ่งพื้นที่ในจานเลี้ยงเชื้อในข้อ ก. ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละตัวอย่าง จานเลี้ยงเชื้อละ 4 ส่วนสำหรับใช้หยดสารละลายใสที่มีฟาจ ส่วนละ 1 ตัวอย่าง โดยจานเลี้ยงเชื้อ 1 จานของเชื้อแบคทีเรียแต่ละตัวอย่าง จะใช้เป็น negative control สำหรับให้มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว โดยที่ไม่ใช้หยดสารละลายใสที่มีฟาจ

ค. ดูดสารละลายใสที่มีฟาจแต่ละตัวอย่าง จากข้อ จ. ของหัวข้อ 2) จำนวน 10 ไมโครลิตร มาหยดลงบนผิวหน้าของ MRS agar ในจานเลี้ยงเชื้อของเชื้อแบคทีเรียทุกตัวอย่างตามที่กำหนดพื้นที่ไว้ รอจนกระทั่งสารละลายใสที่มีฟาจซึ่งได้หยดลงบนผิวหน้าของ MRS agar แห้งสนิท จึงนำจานเลี้ยงเชื้อทุกจานเข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

ง. สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงในตำแหน่งที่หยดสารละลายใสที่มีฟาจแต่ละตัวอย่างในจานเลี้ยงเชื้อทุกจานของเชื้อแบคทีเรียทุกตัวอย่างว่า เกิดเป็นบริเวณใส (clear zone) เกิดเป็น plaque ขนาดเล็กหรือ plaque ที่มีรูปร่างไม่ชัดเจน เกิดเป็นลักษณะที่มีขอบใสและภายในมีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียนั้น ๆ (halo) หรือมีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียนั้น ๆ ปกคลุมจนหมด และบันทึกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.5 การวินิจฉัย (identify) เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

3.3.5.1 การ identify เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกโดยการทำ sequence ของยีน 16S rRNA (Pruksakoun et al., 2000; Khemaleelakul et al., 2002)

1) การสกัด DNA ของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

ก. นำเชื้อจาก stock culture ซึ่งเจริญบน slant ของ MRS agar ที่มี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 2 ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาทำการถ่ายเชื้อลงในหลอดทดลองบรรจุ MRS broth 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงเมื่อ MRS broth ที่มีเชื้อแต่ละตัวอย่างมีการขุ่นและตกตะกอนจึงนำไปทำการ streak plate บนจานเลี้ยงเชื้อที่มี MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ตามลักษณะการเจริญของเชื้อแต่ละตัวอย่าง

ข. นำโคโลนีเดี่ยวจากจานเลี้ยงเชื้อในข้อ ก. มาถ่ายลงในหลอดบรรจุ MRS broth จำนวน 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ตามลักษณะการเจริญของเชื้อแต่ละตัวอย่าง เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ

ค. นำหลอดบรรจุ MRS broth ที่มีเชื้อในข้อ ข. ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วดูดสารละลายใสส่วนบน (supernatant) ทิ้งไปจนเหลือแต่เชื้อที่ตกตะกอนอยู่ก้นหลอด นำตะกอนดังกล่าวมาล้าง 3 ครั้งด้วยสารละลาย Phosphate buffer saline ที่มีค่า pH 7.0 จำนวน 10 มิลลิลิตร แล้วทำการละลายตะกอนดังกล่าวอีกครั้ง (resuspend) ด้วย lysozyme solution (ซึ่งมีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 200-300 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับปริมาณตะกอนของเชื้อที่ได้ ดูดสารละลายเชื้อดังกล่าวเติมลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ง. เติม SDS solution เข้มข้นร้อยละ 20 จำนวน 20 ไมโครลิตร และสารละลาย proteinase K เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตรลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟมีเชื้อในข้อ ค. ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

จ. เติมสารละลาย NaCl อิ่มตัว (มีความเข้มข้น 6 โมลาร์) ลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟที่มีเชื้อในข้อ ง. เป็นจำนวน 1/3 ของสารละลายทั้งหมดภายในหลอดเอปเพนดอร์ฟดังกล่าว ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ฉ. นำสารละลายในหลอดเอปเพนดอร์ฟในข้อ จ. มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน แล้วดูดสารละลายใสส่วนบนทั้งหมดเติมลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดใหม่ เติม ethanol เข้มข้นร้อยละ 95 ที่แช่เย็นจัดไว้เป็นจำนวน 3 เท่าของสารละลายใส เพื่อตกตะกอน DNA ของเชื้อออกจากสารละลายใส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ช. เอียงหลอดเอปเพนดอร์ฟในข้อ ฉ. ไปมาเบา ๆ จน DNA ของเชื้อตกตะกอนเป็นก้อนสีขาวขุ่น แล้วนำหลอดเอปเพนดอร์ฟนี้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่สภาวะเดียวกับในข้อ ฉ. เพื่อทำให้ DNA ตกตะกอนแยกออกมา ดูดสารละลายใสทิ้งไปจนเหลือแต่ DNA ที่ก้นหลอด นำ DNA ที่ได้ไปปั่นล้างด้วย ethanol เข้มข้นร้อยละ 70 ที่เย็นจัด 2 ครั้ง ครั้งละ 1,000 ไมโครลิตร ที่สภาวะเดียวกับในข้อ ฉ. จากนั้นดูด ethanol ทิ้งให้หมดจนเหลือแต่ DNA ของเชื้อที่ตกตะกอนอยู่ก้นหลอด ปล่อยให้ DNA แห้งที่อุณหภูมิห้อง

ซ. ทำการละลาย DNA ของเชื้อในข้อ ช. ด้วยสารละลาย Tris-EDTA buffer ที่มีค่า pH 8.0 จำนวน 70-120 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับปริมาณ DNA ที่ได้ของเชื้อ แล้วเก็บรักษาหลอดเอปเพนดอร์ฟบรรจุสารละลาย DNA ของเชื้อนี้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

2) การตรวจสอบปริมาณ DNA ที่ได้

ก. เตรียมสารละลาย agarose gel เข้มข้นร้อยละ 1 โดยนำ agarose gel 0.4 กรัม มาละลายในสารละลาย Tris-Boric acid-EDTA (TBE) ความเข้มข้น 0.5 เท่าจำนวน 40 มิลลิลิตร ให้ความร้อนไปเรื่อย ๆ จนกว่า agarose gel จะละลายหมด แล้วเทสารละลาย agarose gel ที่ได้นี้ลงในถาดติด comb (เพื่อทำให้เกิดหลุมบนแผ่น agarose gel) ที่เตรียมไว้แล้ว ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าแผ่น agarose gel จะแข็งตัว

ข. ถอดส่วน comb ออกจากแผ่น agarose gel แล้วนำแผ่น agarose gel วางในกล่องสำหรับทำ electrophoresis แล้วเติมสารละลาย TBE เข้มข้น 0.5 เท่าจนพอท่วมแผ่น agarose gel ต่อสายไฟแต่ละขั้วของเครื่องกำเนิดไฟฟ้าเข้ากับกล่องสำหรับทำ electrophoresis นี้

ค. ดูดสารละลาย DNA ของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจากข้อ ซ. ของหัวข้อ 1) ซึ่งผ่านการตั้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้องมา 1 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม (loading dye) จำนวน 4 ไมโครลิตรจนเข้ากัน ดูดส่วนผสมดังกล่าวเติมลงในหลุมของแผ่น agarose gel ตัวอย่างละ 1 หลุม จากนั้นเปิดเดินเครื่องกำเนิดไฟฟ้าในข้อ ข. โดยตั้งความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 42 นาที

ง. นำแผ่น agarose gel ที่ผ่านการทำ electrophoresis ในข้อ ค. มาทำการย้อมสีกับสารละลาย ethidium bromide เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจำนวน 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างเอา ethidium bromide ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นจำนวน 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 นาที

จ. นำแผ่น agarose gel ในข้อ ง. ไปทำการถ่ายรูปเพื่อดูลักษณะ band ของ DNA ที่ได้ โดยส่องภายใต้แสง U.V. ที่ความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร เมื่อพบว่าลักษณะ band ของ DNA ของเชื้อที่ได้มีความคมชัดและมีปริมาณมากเพียงพอ ก็สามารถนำไปทำ PCR ต่อไปได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3) การนำ DNA ของเชื้อมาทำ PCR (Polymerase Chain Reaction) technique

ก. นำหลอดเอปเพนดอร์ฟบรรจุ Tag enzyme, น้ำปลอดอิออนที่ปราศจากเอนไซม์ endonuclease, สารละลาย $MgCl_2$ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, forward primer, reverse primer และหลอดเอปเพนดอร์ฟบรรจุสารละลาย DNA ของเชื้อที่เก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง

ข. เตรียมหลอดสำหรับทำ PCR (PCR tube) แช่ลงในกล่องทำความเย็น (ice box) เพื่อรักษาให้อุณหภูมิอยู่ในระดับต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยาของ PCR ขึ้นก่อนกำหนด

ค. ดูด Tag enzyme (ใช้ master mix พร้อมใช้งานเพื่อ run PCR, Vivantis Co), สารละลาย $MgCl_2$ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, forward primer, และ reverse primer จำนวน 25, 1.5, 0.5 และ 0.5 ไมโครลิตรตามลำดับ เติมลงในหลอดสำหรับทำ PCR ในข้อ ข. จากนั้นดูดสารละลาย DNA ของเชื้อเติมตามลงไป โดยใช้สารละลาย DNA จำนวน 1, 2, หรือ 3 ไมโครลิตร ถ้าปริมาณ DNA ของเชื้อมีมาก ปานกลาง หรือน้อยตามลำดับ

ง. ดูดน้ำปลอดอิออนที่ปราศจากเอนไซม์ endonuclease ในจำนวนที่ทำให้ปริมาณสารละลายทั้งหมดในหลอดสำหรับทำ PCR เท่ากับ 50 ไมโครลิตร แล้วผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน

จ. นำหลอดสำหรับทำ PCR ไปเข้าเครื่องสำหรับเร่งปฏิกิริยา PCR ซึ่งมีรายละเอียดการทำให้เกิดปฏิกิริยาดังนี้

- ขั้นตอนการทำให้สาย DNA ของเชื้อเกิดการเสียสภาพคงตัว และสามารถแยกออกจากกันได้ (denaturation) โดยใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

- ขั้นตอนการทำให้เกิดปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ (cycle) ซึ่งแต่ละรอบประกอบด้วย (1) การทำให้สาย DNA ของเชื้อแยกออกจากกันโดยใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (2) forward และ reverse primer เข้าจับที่ส่วนปลายของ DNA แต่ละสายที่แยกตัวออกจากกัน โดยใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที (3) การสังเคราะห์ส่วนของ DNA สายใหม่ที่เป็นคู่สมกับ DNA สายเดิม โดยใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที

- ขั้นตอนการทำให้ส่วนของสาย DNA ที่ยังสังเคราะห์ได้ไม่สมบูรณ์จากในรอบที่ 30 มีการสังเคราะห์ให้สมบูรณ์ขึ้นโดยใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบการทำให้เกิดปฏิกิริยา PCR ทั้ง 3 ขั้นตอนดังกล่าวแล้วเครื่องสำหรับเร่งปฏิกิริยา PCR จะทำการลดอุณหภูมิของหลอดสำหรับทำ PCR ของเชื้อลงให้อยู่ที่ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฉ. นำหลอดสำหรับทำ PCR ของเชื้อแช่ลงในกล่องทำความเย็น จากนั้นนำ PCR product ที่ได้นี้ไปทำ electrophoresis บน agarose gel ตามขั้นตอนในข้อ ก.- ข. ของหัวข้อ 2) จากนั้นดูด PCR product ของเชื้อมา 3 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อมจำนวน 4 ไมโครลิตรจนเข้ากัน ดูดส่วนผสมดังกล่าวเติมลงในหลุมของแผ่น agarose gel ตัวอย่างละ 1 หลุม ดูด PCR marker (มีขนาด 100-3,000 base pairs) ที่นำมาละลายที่อุณหภูมิห้องจำนวน 1.5 ไมโครลิตรผสมกับสีย้อมจำนวน 4 ไมโครลิตรเช่นกัน แล้วดูดเติมลงในหลุมหลุมหนึ่งของแผ่น agarose gel จากนั้นเปิดเดินเครื่องกำเนิดไฟฟ้าเพื่อทำ electrophoresis โดยตั้งความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 42 นาที

ช. นำแผ่น agarose gel ที่ผ่านการทำ electrophoresis แล้วในข้อ ฉ. ไปทำการย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และนำไปถ่ายรูปภายใต้แสง U.V.ตามขั้นตอนในข้อ ง. และ จ. ของหัวข้อ 2) เพื่อดูลักษณะ band ของ PCR product ที่ได้ของเชื้อ และเปรียบเทียบกับ band ของ PCR marker ว่าขนาดของ PCR product ที่ได้ของเชื้อ อยู่ที่ประมาณ 1,000-1,200 base pairs สามารถเก็บรักษา PCR product ที่ได้ของเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4) การนำ PCR product ที่ได้ของเชื้อมาทำให้มีความบริสุทธิ์

ก. นำหลอดที่บรรจุ PCR product ของเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในข้อ ช. ของหัวข้อ 3) มาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วดูด PCR product ของตัวอย่างเชื้อมาจำนวน 40 ไมโครลิตรเติมลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟ จากนั้นเติมสารละลาย Sodium acetate เข้มข้น 3 โมลาร์จำนวน 4 ไมโครลิตรตามลงไป

ข. เติม ethanol เข้มข้นร้อยละ 95 ที่เย็นจัดลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟในข้อ ก. ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

ค. เทส่วนที่เป็นสารละลายใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนของ PCR product ที่ก้นหลอด ซึ่งจะเห็นเป็นตะกอนจาง ๆ ขนาดเล็กเท่านั้น แล้วปั่นล้างด้วย ethanol เข้มข้นร้อยละ 70 ที่เย็นจัด จำนวน 200 ไมโครลิตรที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 ครั้ง

ง. หลังจากปั่นล้าง PCR product ของเชื้อครั้งสุดท้ายในข้อ ค. แล้วให้ดูด ethanol ทิ้งไป ทำให้ PCR product แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลาย PCR product ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วนี้ด้วยสารละลาย Tris-EDTA (TE) buffer ที่มีค่า pH 8.0 จำนวน 10 ไมโครลิตร

จ. นำ PCR product ที่ผ่านการทำให้มีความบริสุทธิ์ในข้อ ง. ได้นี้ไปทำ electrophoresis บน agarose gel ตามขั้นตอนในข้อ ก. – ข. ของหัวข้อ 2) จากนั้นดูด PCR product ในข้อ ง. มา 1 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อมจำนวน 4 ไมโครลิตรจนเข้ากัน ดูดส่วนผสมดังกล่าวเติมลงในหลุมของแผ่น agarose gel ตัวอย่างละ 1 หลุม ดูด PCR marker ที่ผ่านการละลายที่อุณหภูมิห้องแล้วจำนวน 1.5 ไมโครลิตรผสมกับสีย้อมจำนวน 4 ไมโครลิตรเช่นกัน แล้วดูดเติมลงในหลุมหลุมหนึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของแผ่น agarose gel จากนั้นเปิดเดินเครื่องกำเนิดไฟฟ้าเพื่อทำ electrophoresis โดยตั้งความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 42 นาที

ฉ. นำแผ่น agarose gel ที่ผ่านการทำ electrophoresis แล้วในข้อ จ. ไปทำการย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และนำไปถ่ายรูปภายใต้แสง U.V. ตามขั้นตอนในข้อ ง. และ จ. ของหัวข้อ 2) เพื่อดูลักษณะ band ของ PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วของเชื้อ และเปรียบเทียบกับ band ของ PCR marker ว่าขนาดของ PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วของเชื้ออยู่ที่ประมาณ 1,000-1,200 base pairs และลักษณะ band ของ PCR product ดังกล่าว เพื่อกำหนดจำนวนเป็นไมโครลิตรของ PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วตามความเข้มของ band ซึ่งจะใช้ในการทำ Sequencing technique สามารถเก็บรักษา PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วของเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5) การนำ PCR product ของเชื้อมาทำ Sequencing technique

ก. นำหลอดบรรจุสารละลาย PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วของเชื้อหลอดบรรจุ Big Dye reagent, Buffer, หลอดบรรจุสารละลาย forward primer ที่ผ่านการเจือจาง 10 เท่า และน้ำปลอดอิออนที่ปราศจากเอนไซม์ endonuclease ที่เก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศา-เซลเซียส มาทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง

ข. เตรียมหลอดสำหรับทำ PCR (PCR tube) แช่ลงในกล่องทำความเย็น (ice box) เพื่อรักษาให้อุณหภูมิอยู่ในระดับต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยาของ PCR ขึ้นก่อนกำหนด

ค. ดูด Big Dye reagent, Buffer, และสารละลาย forward primer ที่ผ่านการเจือจาง 10 เท่ามาจำนวน 6, 2, และ 1 ไมโครลิตรตามลำดับ เติมลงในหลอดสำหรับทำ PCR ในข้อ ข. จากนั้นดูดสารละลาย PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วของเชื้อเติมตามลงไป โดยใช้สารละลาย PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วจำนวน 1, 2 หรือ 3 ไมโครลิตร ถ้าปริมาณ PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วมีมาก ปานกลาง หรือน้อยตามลำดับ ซึ่งดูจากความเข้มของ band ของ PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วดังกล่าวในข้อ ฉ. ของหัวข้อ 4)

ง. ดูดน้ำปลอดอิออนที่ปราศจากเอนไซม์ endonuclease ในจำนวนที่ทำให้ปริมาณสารละลายทั้งหมดในหลอดสำหรับทำ PCR เท่ากับ 20 ไมโครลิตร แล้วผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน

จ. นำหลอดสำหรับทำ PCR ในข้อ ง. ไปเข้าเครื่องสำหรับเร่งปฏิกิริยา PCR โดยเลือกใช้โปรแกรม Sequence ซึ่งมีรายละเอียดการทำให้เกิดปฏิกิริยาดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ขั้นตอนการทำให้เกิดปฏิกิริยา PCR จำนวน 25 รอบ (cycle) ซึ่งแต่ละรอบประกอบด้วย (1). การทำให้สาย DNA ใน PCR product ของเชื้อแยกออกจากกันโดยใช้อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (2). forward primer เข้าจับที่ส่วนปลายของ DNA แต่ละสายที่แยกตัวออกจากกัน โดยใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที (3). การสังเคราะห์ส่วนของ DNA สายใหม่ที่เป็นคู่สมกับ DNA สายเดิม โดยใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที

เมื่อเลือกใช้โปรแกรม Sequence แล้วจึงเปิดเดินเครื่อง เมื่อครบการทำให้เกิดปฏิกิริยา PCR-Sequence ทั้ง 25 รอบดังกล่าวแล้ว เครื่องสำหรับเร่งปฏิกิริยา PCR จะทำการลดอุณหภูมิของหลอดสำหรับทำ PCR ของเชื้อลงให้อยู่ที่ 4 องศาเซลเซียส

ฉ. นำหลอดสำหรับทำ PCR ที่มี Sequencing product ของเชื้อแช่ลงในกล่องทำความเย็น แล้วนำ Sequencing product ของเชื้อนี้ไปทำให้มีความบริสุทธิ์ดังนี้

(1) ดูดสารละลาย Sodium acetate เข้มข้น 3 โมลาร์จำนวน 2 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟ แล้วเติม ethanol เข้มข้นร้อยละ 95 ที่เย็นจัดจำนวน 50 ไมโครลิตร ตามลงไปผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม Sequencing product ของเชื้อลงไปทั้งหมด ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(2) นำหลอดเอปเพนดอร์ฟบรรจุสารละลายในข้อ (1) ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังการปั่นเหวี่ยงจะแทบสังเกตไม่เห็นตะกอนของ Sequencing product อยู่ที่ก้นหลอด แล้วล้าง Sequencing product ด้วย ethanol เข้มข้นร้อยละ 70 ที่แช่เย็นจัดแล้วจำนวน 200 ไมโครลิตร 2 ครั้ง (โดยแต่ละครั้งให้ค่อย ๆ เติม ethanol ลงไป แล้วค่อย ๆ ดูดออกอย่าให้โดนก้นหลอด) จากนั้นทำให้ Sequencing product ที่บริสุทธิ์แล้วของเชื้อแห้งสนิทที่อุณหภูมิห้อง

(3) เติมสารละลาย Hi-di Formamide จำนวน 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟในข้อ (2) เพื่อทำการละลาย Sequencing product ที่บริสุทธิ์แล้วของเชื้อ แล้วเก็บรักษาสารละลาย Sequencing product ที่บริสุทธิ์แล้วนี้ของเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ช. นำหลอดเอปเพนดอร์ฟบรรจุสารละลาย Sequencing product ที่บริสุทธิ์แล้วของเชื้อในข้อ (3) มาตั้งให้ละลายในตู้มืดที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปให้ความร้อนใน heat box ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงดูดสารละลาย Sequencing product ของเชื้อนี้เติมลงในหลอดพิเศษ เพื่อนำเข้าเครื่อง Sequencer ต่อไป

ซ. หลังจากเครื่อง Sequencer ทำการอ่านพีคที่แสดงถึงลำดับเบสของเชื้อจนหมดแล้ว และสั่งพิมพ์ออกมาทางเครื่องพิมพ์ ให้ทำการบันทึกข้อมูลแสดงถึงลำดับเบสของเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลงแผ่น diskette จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปใส่ในโปรแกรม Blast ในเว็บไซต์ www.pubmed.com เพื่อระบุว่าเชื้อตัวอย่างที่นำมาทำ PCR และทำ Sequencing เป็นเชื้อตัวใดต่อไป

3.3.5.2 การวินิจฉัยยืนยันของเชื้อที่มีรูปร่างเป็น cocci ว่าเป็น *E. faecium*, *E. duran* หรือ *E. faecalis*

ให้นำเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกซึ่งแยกเชื้อได้ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส ซึ่งเจริญบน slant ของ MRS agar ที่มี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 2 ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทุกตัวอย่าง มาทำการถ่ายเชื้อลงในหลอดทดลองบรรจุ MRS broth 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงก่อนนำไปทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

1) การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล arabinose, mannitol และ sorbitol ในสภาวะที่มีและไม่มีก๊าซออกซิเจน (oxidized and fermented arabinose, mannitol, and sorbitol) โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อจากหลอดทดลองบรรจุสารละลายเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ข้างต้น มาเติมลงในหลอดทดลองบรรจุ Hugh & Leifson medium ที่มี arabinose, mannitol, และ sorbitol ตัวอย่างเชื้อละ 2 หลอดต่อการทดสอบการใช้น้ำตาล 1 ชนิด จากนั้นดูด liquid parafin ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มาเติมลงในหลอดทดลองบรรจุ Hugh & Leifson medium ที่มี arabinose, mannitol, และ sorbitol ถ่ายเชื้อแล้วหลอดละ 2 มิลลิลิตร เป็นการทดสอบการใช้น้ำตาลในสภาวะที่ไม่มีก๊าซออกซิเจน ตัวอย่างเชื้อละ 1 หลอดต่อการทดสอบน้ำตาล 1 ชนิด สำหรับหลอดทดลองบรรจุ Hugh & Leifson medium ที่มี arabinose, mannitol, และ sorbitol ถ่ายเชื้อแล้วซึ่งไม่ได้เติม liquid parafin จะใช้เป็นการทดสอบการใช้น้ำตาลในสภาวะที่มีก๊าซออกซิเจน เสร็จแล้วนำหลอดทดลองบรรจุ Hugh & Leifson medium ที่มี arabinose, mannitol, และ sorbitol ซึ่งถ่ายเชื้อแล้ว ทั้งหมดนี้เข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงสีใน Hugh & Leifson medium

2) การทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย Arginine (Arginine Hydrolysis) ในอาหาร Thorney's Semi-solid Arginine medium (TSSA)โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อจากหลอดทดลองบรรจุสารละลายเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth ข้างต้น มาเติมลงในหลอดทดลองบรรจุ TSSA ตัวอย่างเชื้อละ 2 หลอด จากนั้นดูด liquid parafin ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มาเติมลงในหลอดทดลองบรรจุ TSSA ถ่ายเชื้อแล้วหลอดละ 1 มิลลิลิตร เป็นการทดสอบการย่อยสลาย Arginine ในสภาวะที่ไม่มีก๊าซออกซิเจน ตัวอย่างเชื้อละ 1 หลอด สำหรับหลอดทดลองบรรจุ TSSA ถ่ายเชื้อซึ่งไม่ได้เติม liquid parafin จะใช้เป็นการทดสอบการย่อยสลาย Arginine ในสภาวะที่มีก๊าซออกซิเจน เสร็จแล้วนำหลอดทดลองบรรจุ TSSA ซึ่งถ่ายเชื้อแล้วทั้งหมดนี้ เข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-6 วัน บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงสีใน TSSA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.5.3 การยืนยันเชื้อ *Streptococcus* โดยใช้ชุดทดสอบ API 20 Strep

1) ให้นำเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่มีลักษณะรูปร่างเป็นรูปกลมหรือรูปไข่ จากตัวอย่างน้ำนมดิบที่แยกได้จากผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) 7021 รหัส B สหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง รหัส B สหกรณ์โคนมแม่โจ้ รหัส I ซึ่งแยกเชื้อได้ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) 7010 รหัส F และเชื้อมาตรฐาน *S. thermophilus* ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเจริญบน slant ของ MRS agar ที่มี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 2 ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทุกตัวอย่าง มาทำการถ่ายเชื้อลงในหลอดทดลองบรรจุ MRS broth 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงก่อนนำไป streak บนจานเลี้ยงเชื้อที่มี MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงโดยโคโลนีเชื้อให้เตรียมเป็นลักษณะเชื้อโคโลนีเดี่ยวบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และไม่ควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเฉพาะกับเชื้อสูง และไม่ควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลสูง

2) เตรียมกล่องสำหรับ incubate (ถาดล่างและฝาปิด) โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 5 มิลลิลิตร ลงในหลุมทุกหลุมของถาดล่าง เพื่อให้มีความชื้น

3) บันทึก No. หรือ reference ของเชื้อบริเวณพลาสติกที่ยื่นออกมา (ไม่ควรบันทึกไว้ที่ฝาปิดของกล่อง เพราะอาจเกิดการสับสนได้)

4) นำแถบของ Strip API 20 Strep มาวางในกล่องสำหรับ incubate

5) เตรียมน้ำกลั่นปราศจากสารเจือปน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใช้สำลี swab เชื้อจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ มาละลายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อมากกว่า McFarland No. 4 Suspension ของเชื้อที่เตรียมขึ้นจะต้องนำไปใช้ทดสอบทันที

6) แถบ Strip จะแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกประกอบด้วย การทดสอบ VP ถึง <u>ADH</u> เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดฟองอากาศ ให้วางกล่อง incubate ที่มี Strip ในลักษณะเอียงตั้งขึ้นและวางปลายของปิเปต ตรงด้านข้างของหลุมทดสอบ

(6.1) ช่อง VP ถึง LAB หยด suspension ของเชื้อประมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในช่องแต่ละช่อง

(6.2) สำหรับช่อง <u>ADH</u> หยดหรือเติมไม่เต็มช่องคือ เติมเฉพาะถึงส่วนโค้งของช่องเท่านั้น ประมาณ 50ไมโครลิตร

7) ส่วนที่ 2 ของแถบ Strip (<u>RIB</u> ถึง <u>GLYG</u>)

(7.1) เปิดฝาขวด Ampoule API GP medium ตามรายละเอียดใน "คำเตือนและข้อควรระวัง" ดูด suspension ของเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 5) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงใน GP medium เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(7.2) ดูด suspension ของเชื้อ (จาก GP medium) เติมลงในช่อง RIB ถึง GLYG โดยเติมไม่เต็มช่อง เติมเฉพาะส่วนโค้งของช่อง ประมาณ 50 ไมโครลิตร

8) หยด Mineral Oil ลงไปในช่อง ADH ถึง GLYG ให้เต็มช่อง

9) ปิดฝากล่องสำหรับ incubate นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมีออกซิเจน เป็นเวลา 4-4.5 ชั่วโมง สำหรับการอ่านผลครั้งแรก และ 24 ชั่วโมง (± 2 ชั่วโมง) สำหรับการอ่านผลครั้งที่ 2 (กรณีที่จำเป็น)

3.3.5.4 การยืนยันเชื้อ *Lactobacillus* โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB

1) เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะมีรูปท่อนหรือทรงรี จากตัวอย่างน้ำนมดิบที่แยกได้จากสหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง รหัส C ผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) 7021 รหัส L ซึ่งแยกเชื้อได้ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เชื้อมาตรฐาน *Lb. salivarius* TISTR 1112 และ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เตรียมเชื้อตามข้อ ก. ของหัวข้อ 3.3.5.3

2) เตรียมกล่องสำหรับ incubate โดยเติมน้ำกลั่น (ปริมาตร ~ 10 มิลลิลิตร) ลงในหลุมทุกหลุมของถาดล่างของกล่อง incubate

3) นำแถบ strip 2 แถบใหญ่คือ 0-19 และ 20-39 ออกจากที่บรรจุ หลังจากนั้นแบ่งแถบ strip ออกเป็น 4 ส่วนเล็ก ๆ นั่นคือแถบ 0-9, 10-19, 20-29 และ 30-39 นำมาวางในถาดล่างของกล่อง incubate ซึ่งเติมน้ำไว้แล้ว นำ strip อีกส่วนที่เหลือ ได้แก่แถบ 40-49 ออกมาวางในถาด incubation จนเต็ม

4) เปิดขวดที่บรรจุ NaCl 0.85% (1 ไมโครลิตร) เขี่ยเชื้อจากอาหารลงในหลอด NaCl 0.85% ให้มีความเข้มข้นสูงเปิดขวดที่บรรจุ NaCl 0.85% Sterile (5 ไมโครลิตร) เติม Suspension จากขวดที่บรรจุ NaCl 0.85% (1 ไมโครลิตร) ข้างต้นลงไปให้มีความขุ่นเท่ากับ 2 McFarland บันทึกจำนวนหยดของ Suspension ที่เติมลงไป (n)

5) เติม Suspension เป็นจำนวน 2 เท่าของจำนวนหยด (2 n) ในข้อ 4) ลงใน ampoule ของ API 50 CHB medium ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

6) เติม API 50 CHB medium ลงในหลุม (ไม่ต้องเต็ม) การเติม Mineral oil จะช่วยให้แยกผลการทดสอบว่าเป็น Positive หรือ Negative ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หรือ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ทำการอ่านผล 2 ครั้งอ่านหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 24 และ 48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.6 การศึกษาความสามารถในการใช้ Amino acid ความสามารถในการสร้างกรดในหางนมเข้มข้นร้อยละ 10 และความสามารถในการสร้างสารประกอบพวก acetyl-methyl carbinol ในหางนมเข้มข้นร้อยละ 10

3.3.6.1 การศึกษาความสามารถในการใช้ Amino acid ในอาหาร MRS agar

นำตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบน slant ของ MRS agar ที่มี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 0.5 ซึ่งเก็บรักษามานานไม่เกิน 3 เดือน มาถ่ายเชื้อลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ตัวอย่างเชื้อละ 1 หลอด แล้วนำไปบ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-72 ชั่วโมง เมื่อ MRS broth มีการขุ่นและตกตะกอนให้นำมาถ่ายเชื้อลงใน slant ของ MRS agar เชื้อละ 1 หลอด แล้วนำไปบ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-72 ชั่วโมง เมื่อมีโคโลนีเจริญบน slant ของ MRS agar แล้ว ให้ทำการถ่ายเชื้อจากโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบน slant ของ MRS agar ข้างต้นมาทำการ streak plate ลงในจานเลี้ยงเชื้อจำนวน 4 จาน ตัวอย่างเชื้อละ 1 จาน ประกอบด้วย

1) จานเลี้ยงเชื้อที่มี MRS agar ซึ่งมีกรดอะมิโน Histidine ผสมอยู่ด้วยร้อยละ 1
2) จานเลี้ยงเชื้อที่มี MRS agar ซึ่งมีกรดอะมิโน Tryptophan ผสมอยู่ด้วยร้อยละ 1
3) จานเลี้ยงเชื้อที่มี MRS agar ซึ่งมีกรดอะมิโน Lysine ผสมอยู่ด้วยร้อยละ 1
4) จานเลี้ยงเชื้อที่มี MRS agar ซึ่งมีกรดอะมิโน Tyrosine ผสมอยู่ด้วยร้อยละ 1

จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดเข้าบ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง โดยให้สังเกตการเกิด clear zone รอบ ๆ โคโลนีของเชื้อแต่ละตัวอย่างที่ขึ้นตามแนว streak plate

3.3.6.2 ความสามารถในการสร้างกรดในหางนมเข้มข้นร้อยละ 10

ใช้ห่วงถ่ายเชื้อทำการถ่ายเชื้อจากโคโลนีของเชื้อแต่ละตัวอย่างที่ขึ้นบน slant ของ MRS agar มาลงเลี้ยงใน MRS broth จำนวน 3 มิลลิลิตร เชื้อละ 1 หลอด แล้วนำหลอด MRS broth ที่มีเชื้อทุกตัวอย่างนี้ไปทำการบ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 8 ชั่วโมง แล้วนำ MRS broth ดังกล่าวที่มีการขุ่นมาเติมลงในหางนมเข้มข้นร้อยละ 10 จำนวน 38 มิลลิลิตร เชื้อละ 2 หลอดโดยเติมเชื้อหลอดละ 380 ไมโครลิตร ให้นำหางนมเข้มข้นร้อยละ 10 ที่มีเชื้อทุกตัวอย่างไปทำการบ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส โดยให้ดูดหางนมเข้มข้นร้อยละ 10 ที่มีเชื้อแต่ละตัวอย่างมา 5 มิลลิลิตร นำมาไทเตรตกับสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.1 M จำนวน 2 ซ้ำ และดูดหางนมเข้มข้นร้อยละ 10 ที่มีเชื้อแต่ละตัวอย่างมา 2 มิลลิลิตร มาวัดค่า pH จำนวน 2 ซ้ำ ที่ระยะเวลาการบ่มนาน 0, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.6.3 ความสามารถในการสร้างสารประกอบพวก acetyl-methyl carbinol ในหางนมเข้มข้นร้อยละ 10

นำหลอดบรรจุหางนมเข้มข้นร้อยละ 10 ที่มีเชื้อแต่ละตัวอย่าง ซึ่งเหลืออยู่หลังจากการทดสอบความสามารถในการสร้างกรดในหางนมเข้มข้นร้อยละ 10 ของหัวข้อ 3.3.6.2 ที่เวลาการบ่มนาน 24 ชั่วโมง ให้ดูดสารละลาย L-Naphthol เข้มข้นร้อยละ 6 และ KOH เข้มข้นร้อยละ 16 มาอย่างละ 1.5 มิลลิลิตร เติมลงไปในหลอดบรรจุหางนมเข้มข้นร้อยละ 10 ที่มีเชื้อแต่ละตัวอย่างทั้งสองหลอดที่เหลืออยู่ดังกล่าวข้างต้น ทำการผสมสารละลายรวมในแต่ละหลอดให้เข้ากัน สังเกตและบันทึกการเกิดวงแหวนสีแดงที่ชั้นบนของสารละลายรวมภายในหลอด ภายในเวลา 20 นาที และ 2 ชั่วโมงตามลำดับ

3.3.7 การศึกษาการหมักในนมของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

ประกอบด้วย 2 แผนการทดลอง คือ

3.3.7.1 การศึกษาการเจริญเติบโตและการสร้างกรดของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกในสภาวะที่ไม่มีฟาจ และ 3.3.7.2 การศึกษาการเจริญเติบโตและการสร้างกรดของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกในสภาวะที่มีฟาจ

3.3.7.1 การศึกษาการเจริญเติบโตและการสร้างกรดของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกในสภาวะที่ไม่มีฟาจ

สำหรับเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่จะใช้ในการศึกษาการเจริญเติบโตและการสร้างกรด คือ เชื้อ IMJ (44) และ h สต (44) ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบของสหกรณ์โคนมแม่โจ้และสหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง ซึ่งบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่มีความทนและไม่ทนต่อแบคทีเรียโอฟาจ ณ อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส ตามลำดับ *S. thermophilus* TISTR 894 และ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกมาตรฐาน ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยเชื้อทั้ง 4 ตัวอย่างนี้จะใช้ศึกษาการเจริญเติบโตและการสร้างกรดในสารละลายนมขาดมันเนยเข้มข้นร้อยละ 10

1) การเตรียมเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกใน MRS broth สำหรับใช้เป็นเชื้อตั้งต้น

ก. ทำการถ่ายเชื้อ *S. thermophilus* TISTR 894, *Lb. bulgaricus* TISTR 895, IMJ (44), และ h สต (44) ซึ่งเก็บรักษาไว้ใน glass beads ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำมาลงเลี้ยงใน MRS broth 3 มิลลิลิตร ตัวอย่างเชื้อละ 1 หลอดภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อ *S. thermophilus* TISTR 894 และ *Lb. bulgaricus* TISTR 895 สำหรับเชื้อ IMJ (44) และ h สต (44) บ่มที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

24-48 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ เมื่อพบว่าเชื้อแบคทีเรียใน MRS broth มีการขุ่นให้นำมา streak plate บน MRS agar ตัวอย่างเชื้อละ 1 จาน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศตามลำดับ

ข. ถ่ายเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวของ *S. thermophilus* TISTR 894, *Lb. bulgaricus* TISTR 895 , IMJ (44), และ h สต (44) ในแต่ละจานมาลงเลี้ยงในหลอดทดลองบรรจุ MRS agar ที่มี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 2 ที่เอียงเป็น slant ตัวอย่างเชื้อละ 2 หลอด แล้วนำหลอดบรรจุ MRS agar ดังกล่าวเข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส หรือ 44 องศาเซลเซียส ตามสภาวะการบ่มเชื้อแต่ละชนิดเป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง เมื่อพบการเจริญของโคโลนีเกิดขึ้นบน MRS agar ที่มี $CaCO_3$ แต่ละหลอดดังกล่าว ให้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ค. ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ *S. thermophilus* TISTR 894, *Lb. bulgaricus* TISTR 895, IMJ (44), และ h สต (44) จากโคโลนีที่ขึ้นบน slant ของ MRS agar ที่มี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 2 ซึ่งถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในข้อ ข. มาลงเลี้ยงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มี MRS broth จำนวน 3 มิลลิลิตรตัวอย่างเชื้อละ 1 หลอดเพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น สำหรับนำไปทำ subculture เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต และการสร้างกรดภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ โดยหลอดบรรจุเชื้อ *S. thermophilus* TISTR 894, *Lb. bulgaricus* TISTR 895, IMJ (44), และ h สต (44) ใน MRS broth ให้บ่มในสภาวะไร้อากาศภายในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมง

2) การศึกษาการเจริญเติบโตและการสร้างกรดของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกในนมขาดมันเนยเข้มข้นร้อยละ 10

ก. ดูดเชื้อ *S. thermophilus* TISTR 894, *Lb. bulgaricus* TISTR 895, I MJ (44), และ h สต (44) ใน MRS broth ในข้อ ค. ของข้อ 1) ในหัวข้อ 3.3.7.1 มาเติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่บรรจุนมขาดมันเนยเข้มข้นร้อยละ 10 (นมขาดมันเนยเข้มข้นร้อยละ 10 บรรจุอยู่ในหลอดเซนตริ-ฟิวจ์หลอดละ 40 มิลลิลิตร) เชื้อละ 9 หลอดเพื่อจัดให้เป็นซ้ำที่ 1, 2, และ 3 ซ้ำละ 3 หลอด ภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ โดยเติมเชื้อดังกล่าวจำนวน 400 ไมโครลิตรต่อสารละลายนมขาดมันเนย 1 หลอด แล้วบ่มเชื้อทุกตัวอย่างในนมขาดมันเนยร้อยละ 10 นี้ที่อุณหภูมิ 40 และ 44 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

ข. ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อด้วยวิธี drop plate ทุก 2 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-14 ชั่วโมง ดังรายละเอียดข้างล่างนี้

(1) ดูดเชื้อแต่ละตัวอย่างในนมขาดมันเนยร้อยละ 10 ของแต่ละซ้ำในข้อ ก. มาจำนวน 300 ไมโครลิตร มาเติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์บรรจุ Maximum Recovery diluents

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งมีวุ้นเข้มข้นร้อยละ 0.5 จำนวน 2.7 มิลลิลิตรซึ่งผ่านการทำให้หลอมเหลวมาแล้ว ทำการเจือจางลงทีละ 10 เท่า (ten-fold dilution) จนถึงที่ระดับการเจือจาง 10^{-17} หลังจากนั้นดูดเชื้อแต่ละตัวอย่างในนมขาดมันเนยร้อยละ 10 ของแต่ละซ้ำข้างต้นมาจำนวน 8 มิลลิลิตรเติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว นำหลอดเซนตริฟิวจ์เหล่านี้ไปเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการตรวจวัดค่า pH และปริมาณกรดต่อไป

(2) ทำการแบ่งพื้นที่ในจานเลี้ยงเชื้อที่มี MRS agar (ไม่มีการเติมสารละลาย bromcresol green เข้มข้นร้อยละ 2) ที่เตรียมไว้แล้ว สำหรับใช้หยดเชื้อแต่ละตัวอย่างที่ได้ทำการเจือจางใน Maximum Recovery diluents ซึ่งมีวุ้นเข้มข้นร้อยละ 0.5 ณ ระดับต่าง ๆ เชื้อละ 3 จานต่อ 1 ซ้ำ โดยจานที่ 1 ใช้สำหรับหยดเชื้อที่ระดับการเจือจาง 10^{-1}-10^{-6} จานที่ 2 ใช้สำหรับหยดเชื้อที่ระดับการเจือจาง 10^{-7}-10^{-12} และจานที่ 3 ใช้สำหรับหยดเชื้อที่ระดับการเจือจาง 10^{-13}-10^{-17}

(3) หยดเชื้อใน Maximum Recovery diluents ซึ่งมีวุ้นเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในข้อ (1) ระดับการเจือจางละ 50 ไมโครลิตรลงในจานเลี้ยงเชื้อในข้อ (2) โดยเริ่มจากเชื้อที่มีระดับการเจือจาง 10^{-17} ก่อนตามด้วยระดับการเจือจางที่ต่ำกว่าลงไปตามลำดับ

(4) รอให้เชื้อที่หยดลงไปในแต่ละตำแหน่งในข้อ (3) ในแต่ละจานเลี้ยงเชื้อแห้งดีแล้ว จึงนำจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 40 และ 44 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนนำมาตรวจนับปริมาณเชื้อในวันรุ่งขึ้นบันทึกปริมาณเชื้อที่ตรวจนับได้ในแต่ละระดับการเจือจางของแต่ละซ้ำ แล้วคำนวณเป็นค่า cfu/ml

หมายเหตุ การบ่มในสภาวะไร้อากาศทำโดยวิธีการบ่มใน anaerobic jar

ค. นำหลอดเซนตริฟิวจ์ที่บรรจุเชื้อแต่ละตัวอย่างในนมขาดมันเนยร้อยละ 10 ของแต่ละซ้ำ ซึ่งได้ทำการแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในข้อ (1) มาทำให้ละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดแบ่งเชื้อแต่ละตัวอย่างในแต่ละซ้ำดังกล่าวมาจำนวน 3 มิลลิลิตร ไปทำการวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter สำหรับเชื้อแต่ละตัวอย่างของแต่ละซ้ำที่เหลือจำนวน 5 มิลลิลิตรให้นำไปเจือจางกับน้ำกลั่นจำนวน 75 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ก่อนหยดสารละลาย phenolphthalein เข้มข้นร้อยละ 1 จำนวน 2 หยด แล้วเขย่าผสมให้เข้ากัน จึงทำการไทเตรตด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.1 โมลาร์ แล้วทำการนับปริมาณเชื้อบันทึกค่า pH และปริมาตรสารละลาย NaOH ที่ใช้ในการไทเตรตสารละลายเชื้อแต่ละตัวอย่างในแต่ละซ้ำ แล้วคำนวณเป็นปริมาณกรดดังแสดงในภาคผนวก ก-2

หมายเหตุ ทำการหาความเข้มข้นจริงของสารละลาย NaOH ที่ใช้ เริ่มจากเตรียมสารละลาย Potassium Hydrogennophthalate (KHP) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยชั่ง KHP 1.02623 กรัมละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำการปรับมาตรฐานสารละลาย NaOH

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้มข้น 0.1 โมลาร์ที่ใช้งานโดยใช้ volumetric pipette ขนาด 5 มิลลิลิตรดูดสารละลาย KHP เข้มข้น 0.1 โมลาร์มา 5 มิลลิลิตร ทำการเจือจางกับน้ำกลั่นจำนวน 75 มิลลิลิตร แล้วทำการไทเตรตกับสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.1 โมลาร์จำนวน 3 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยของปริมาตรสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.1 โมลาร์ที่ใช้ไทเตรตจากแต่ละซ้ำ แล้วนำมาหาความเข้มข้นจริงของสารละลาย NaOH ที่ใช้ ดังแสดงในภาคผนวก ก-3

3.3.7.2 การศึกษาการเจริญและการสร้างกรดของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกในสภาวะที่มีฟาจ

สำหรับฟาจที่จะใช้คือฟาจจากเชื้อ F7010 (40) ซึ่งมาจากตัวอย่างน้ำนมดิบของผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส 7010 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่จะใช้ในการศึกษาการเจริญและการสร้างกรด คือ เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก และเชื้อมาตรฐานตามการศึกษาการเจริญและการสร้างกรดของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกในสภาวะที่ไม่มีฟาจ

1) การเตรียมเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกใน MRS broth สำหรับใช้เป็นเชื้อตั้งต้น ทำตามวิธีการเดียวกับข้อ 1) ของหัวข้อ 3.3.7.1

2) การเตรียมฟาจ

ก. ทำการถ่ายเชื้อ F7010 (40) จากโคโลนีที่ขึ้นบน slant ของ MRS agar ซึ่งมี $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 2 ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มานานไม่เกิน 3 เดือนลงใน MRS broth 3 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

ข. ดูดเชื้อ F7010 (40) มา 30 ไมโครลิตร มาเติมลงใน MRS broth ซึ่งมี $CaCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์และ β-Disodium glycerophosphate เข้มข้นร้อยละ 0.95 จำนวน 3 มิลลิลิตร แล้วบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง เมื่อเชื้อขุ่นให้เติมฟาจ F7010 (40) 3.2 จำนวน 60 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 คืน

ค. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที แล้วนำมากรองด้วย syringe filter ที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอนภายในตู้ลามินาร์-โฟล์ปลอดเชื้อ เก็บสารละลายใสที่ผ่านการกรองแล้วในหลอดเอปเพนดอร์ฟ

ง. ทำให้ฟาจมีความบริสุทธิ์ครั้งที่ 2 โดยดูดเชื้อ F7010 (40) ในข้อ ก. มาจำนวน 60 ไมโครลิตร มาลงเลี้ยงใน MRS broth ซึ่งมี $CaCl_2$ เข้มข้น10 มิลลิโมลาร์ และ β-Disodium glycerophosphate เข้มข้นร้อยละ 0.95 จำนวน 6 มิลลิลิตร แล้วบ่มในตู้บ่มเชื้อที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง พอเชื้อขุ่นให้เติมฟาจ F7010 (40) 3.2 จากข้อ ค. ลงไป 120 ไมโครลิตร แล้วบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง

จ. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที แล้วนำมากรองด้วย syringe filter ที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอนภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ เก็บสารละลายใสที่ผ่านการกรองแล้วในหลอดเอปเพนดอร์ฟ

ฉ. ทำการทดสอบหาปริมาณฟาจตั้งแต่ 10^{-2} ถึงที่ 10^{-10} pfu/ml ดังนี้ (ตารางที่ 2)

(1) นำเชื้อแบคทีเรีย F7010 (40) ในข้อ ก. มาเติมลงในหลอดทดลองบรรจุ MRS agar ซึ่งมี agar เข้มข้นร้อยละ 0.6 และ $CaCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จำนวน 9.9 มิลลิลิตร ซึ่งได้ผ่านการหลอมเหลวและมีการเติมเชื้อแบคทีเรีย *S. thermophilus* TISTR 894 หรือ *Lb. bulgaricus* TISTR 895, IMJ(44) หรือ h สต (44) จำนวน 200 ไมโครลิตร จำนวน 5 หลอด หลอดละ 200 ไมโครลิตร แล้วจึงเติมสารละลายใสที่มีฟาจ F7010 (40) 3.2 จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 1 แล้วทำการปั่นผสมให้เข้ากัน แล้วดูดเชื้อแบคทีเรียที่ผสมกับฟาจแล้วจากหลอดที่ 1 นี้มา 100 ไมโครลิตร เติมในหลอดที่ 2 ซึ่งได้เติมแบคทีเรียแต่ละชนิดหลอดละ 200ไมโครลิตรไว้ก่อนแล้ว ทำการเจือจางทีละ 100 เท่า ในลักษณะเดียวกัน จนถึงหลอดที่ 5(หลอดที่2- 5ได้เติมแบคทีเรียแต่ละชนิดหลอดละ 200ไมโครลิตรไว้ก่อนแล้ว) หลังจากนั้นเทส่วนผสมที่มีเชื้อกับฟาจนี้ ลงในจานเลี้ยงเชื้อซึ่งมี MRS agar ที่มี $CaCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ หลอดละ 1 จาน รอจนกระทั่งส่วนผสมที่เทลงไปในจานเลี้ยงเชื้อทุกจานแห้งและแข็งตัว จึงนำจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดเข้าบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 แสดงผลการนับปริมาณฟาจ

diultion	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-10}
จำนวนฟาจ	TMTC	>300	287	93	15

TMTC = too many to be counted

จากการตรวจสอบดูปริมาณฟาจในจานเลี้ยงเชื้อทำให้เห็นว่าฟาจมีจำนวนที่นับได้ $2.87x10^8$ pfu/ml ซึ่งปริมาณฟาจที่นำมาใช้ศึกษาการหมักในนมควรมีปริมาณอย่างน้อย 10^4 pfu/ml แล้วจึงนำมาใช้งานต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3) การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกในนมขาดมันเนยร้อยละ 10 ในสภาวะที่มีฟาจ

ก. ทำการเติมฟาจที่บริสุทธิ์แล้วในข้อ จ. ของข้อ 2) ของหัวข้อ 3.3.7.2 ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่บรรจุนมขาดมันเนยเข้มข้นร้อยละ 10 (นมขาดมันเนยเข้มข้นร้อยละ 10 บรรจุอยู่ในหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดละ 40 มิลลิลิตร) จำนวน 200 ไมโครลิตร และทำการเติมเชื้อ *S. thermophilus* TISTR 894 หรือ *Lb. bulgaricus* TISTR 895, IMJ(44) หรือ h สต (44) ที่ทำการถ่ายเชื้อลงใน MRS broth แล้ว จำนวน 400 ไมโครลิตรต่อสารละลายนมขาดมันเนย 1 หลอด โดยปริมาณฟาจและปริมาณเชื้อแต่ละตัวจะถูกเติมลงไปในนมขาดมันเนยเข้มข้นร้อยละ 10 อย่างละ 9 หลอดเพื่อจัดให้เป็นซ้ำที่ 1, 2, และ 3 ซ้ำละ 3 หลอด ภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ แล้วบ่มเชื้อในสภาวะที่มีฟาจทุกตัวอย่างในนมขาดมันเนยร้อยละ 10 นี้ที่อุณหภูมิ 40 และ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ

ข. นำตัวอย่างนมขาดมันเนยเข้มข้นร้อยละ 10 ที่มีเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกแต่ละตัวในสภาวะที่มีฟาจ ในข้อ ก. มาทดสอบหาปริมาณฟาจโดยวิธีเดียวกับในข้อ ฉ. ของข้อ 2) ข้างบนนี้โดยเติมลงในหลอดทดลองบรรจุ MRS agar ซึ่งมี agar เข้มข้นร้อยละ 0.6 และ $CaCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จำนวน 9.9 มิลลิลิตรซึ่งได้ผ่านการหลอมเหลว จำนวน 5 หลอด หลอดละ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 1 แล้วทำการปั่นผสมให้เข้ากัน แล้วดูดเชื้อแบคทีเรียที่ผสมกับฟาจแล้วจากหลอดที่ 1 นี้มา 100 ไมโครลิตร เติมในหลอดที่ 2 (หลอดที่2- 5ได้เติมแบคทีเรียแต่ละชนิดหลอดละ 200ไมโครลิตรไว้ก่อนแล้ว) แล้วทำการเจือจางทีละ 100 เท่า ในลักษณะเดียวกัน จนถึงหลอดที่ 5 หลังจากนั้นเทส่วนผสมที่มีเชื้อกับฟาจนี้ ลงในจานเลี้ยงเชื้อซึ่งมี MRS agar ที่มี $CaCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ หลอดละ 1 จาน รอจนกระทั่งส่วนผสมที่เทลงไปในจานเลี้ยงเชื้อทุกจานแห้งและแข็งตัว จึงนำจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดเข้าบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 และ 44 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อมาตรวจนับปริมาณ plaque ของฟาจแต่ละตัวอย่างในแต่ละระดับการเจือจาง

ค. ดูดเชื้อในสภาวะที่มีฟาจแต่ละตัวอย่างในนมขาดมันเนยร้อยละ 10 ของแต่ละซ้ำมาทำการตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการ drop plate การวัด pH และหาปริมาณกรดตามวิธีการเดียวกับข้อ ข. และข้อ ค. ของข้อ 2) ของหัวข้อ 3.3.7.1

ง. นับปริมาณเชื้อ บันทึกค่า pH และปริมาตรสารละลาย NaOH ที่ใช้ในการไทเตรตสารละลายเชื้อแต่ละตัวอย่างในแต่ละซ้ำ แล้วคำนวณเป็นปริมาณกรดและทำการนับปริมาณ plaque ของฟาจ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved