รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กองบริการชันสูตรสาธารณสุขภูมิภาค. วิธีทำ Sensitivity test (Kirby-Bauer Method). กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กระทรวงสาธารณสุข. (โรเนียว) (ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์).

เกรียงศักดิ์ พูนสุข. คู่มือโรคไก่สำหรับผู้เลี้ยง. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร:สำนักพิมพไทยวัฒนา พาณิชย์, 2531.

ขจร เจริญศิริ. แบคทีเรียพื้นฐาน. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์ศิริยอด, 2536.

จรัญ จันทลักขณา. สถิติวิธีวิเคราะห์และวางแผนงานวิจัย. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพาณิชย์, 2519.

นภา โล่ห์ทอง. เอกสารประกอบการบรรยายวิชาจุลชีววิทยาทางอาหาร.ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2522.

_____. 2535. กล้าแบคทีเรีย กล้าเชื้ออาหารหลักและเทคโนโลยีการผลิต พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์ ฟันนี่ พับลิชชิ่ง.

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์. การผลิตและการเก็บบักเตรีแลคติกที่ใช้เป็นอาหารเสริมสุกรในรูปเชื้อผง.วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2524.

มยุรีย์ พันธัย. จุลชีววิทยาปฏิบัติการและหลักเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์ภาพพิมพ์,2530.

มาลิน จุลศิริ. ยาต้านจุลชีพความรู้พื้นฐานและประยุกต์.พิมพ์ครั้งที่ 1กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์อักษรบัณฑิต,2532.

มาลินี ลิ้มโภคา และธงชัย อัศวศักดิ์สกุล. การศึกษายาปฏิชีวนะที่ตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร.วารสารสัตวแพทย์. 1(2) : 64-69,2533.

วิโรจน์ บทบาทของแบคทีเรียแลคติกต่อวงการเลี้ยงสัตว์. สุกรสาส์น, 2522.

_____. นภา โล่ห์ทอง และสุชีพ รัตรสาร. 2522. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกเพื่อเสริมในอาหารสัตว์.รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตร และชีววิทยาสาขาสัตว์ครั้งที่ 16. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรพิณ ภูมิภมร. เอกสารประกอบการสอนวิชา วทอ. 461 ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2524.

อาภัสรา กอบกัยกิจ. การแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตสารต่อต้านจุลชีพจากอาหารหมัก.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2537.

ภาษาอังกฤษ

Aharonowitz , Y. and A. L. Demain. 1979. Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. Can. J. Microbiol 25 : 61-67.

Albus, W.R. 1928. The effect of surface tension upon the growth of *Lactobacilli*. J. Bacteriol. 16 : 167-202.

Banks, J. G. , Broad, R. G., and N. H. C. Sparks. 1986. Natural antimicrobial systems and their potential in food preservation of the future. Biotech. Appl. Biochem. 8 : 103-147.

Barnes, E. M. ; C. S. Impey and D. M. Cooper. 1981. Manipulation of the crop and intestinal flora of the newly hatched chick. Am. J. Clin. Nutr. 33: 2426-2433.

Barrow, P. A. ; B. E. Brooker ; R. Fuller ; and M . T. Newport. 1980. The attachment of bacteria to the gastric epithelium of pig and its important in the microecology of the intestinal. J. Appl. Bacterial. 48 : 147-154.

Brownell, J. R; W. W. Sadler and M. J. Fanelli. 1969. Factors influencing the intestinal infectiion of chickens with *Salmonella typhimurium*. Avian Disease. 13 : 804

Brude, A. W.; B. F. Miller and D. H. Neil. 1982. In vivo inhibitory effects of *Lactobacillus acidophilus* against pathogenic *Escherichia Coli* in gnotobiotic chick. Poultry Sci. 61 : 1298-1308.

Buchanan, R. E. Gibbons, N. E. (eds.). 1974 Bergey's manual of Determinative Bacteriology 8th edition. Baltimore London. Williams and Wilkins.

Bu'Lock , J. D. 1961. Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. Adv. Appl. Microbiol. 3 : 293-342.

Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol. 43 : 164-167.

_____, M. C. Mckenny, and L . C . McDonald. 1990. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. Food Microbiol. 7 : 91-98.

Frazier, M. C. and D. C. Westhoff. 1979. Food Microbiology. 3rd ed., NEW Delhi. Tata Mcgraw-Hill Publ. Co., Ltd.

Fuller, R. and C. A. E. Briggs. 1962. Bacteriology of the alimentary tract of the pig. in Morgan, J. T. and D. Lewis. 1962. Nutrition of pigs and poultry. procuding of the university of Nothingham Eighth Easter school Agricultural Science. London. Butterworths.

_____ . and B. E. Brooker. 1974. Lactobacilli which attach to the crop epithelium of the fowl. Am. J. Clin. Nutr. 27 : 1305.

_____ .1989. Probiotics in man and animals J. Appl. Bacterial. 66 : 365-378.

Gilliland, S. E ; M. L. Speck ; and C.G. Morgan. 1975. Detection of *Lactobacillus acidophilus* in feces of humans ; pigs and chicken. Appl. Microbiol. 30 : 541-545.

_____ . and M. L. speck. 1977. Use of the minitek system for Characterizing Lactobacilli. Applied and Environ. Microbiol. June, 33(6) : 1289-1292.

_____ . 1979. Beneficial interrelationshios between certain microorganisms and humans : Candidate microorganism for use or dietary adjuncts. J. Food Prot. 42 : 164-167.

Gottieb, B. 1973. The production and roll of antibiotics in soil : J. Antibiot. 29 : 987-1000.

Gotz ; F., Sedewitz, B., and E. F Elster. 1980. Oxygen utilization by *Lactobacillus plantarum*. I. oxygen consuming reactions. Arch Microbiol. 125 : 209.

Harvath, D. J.; H. W. Seeley ; R. G. Warner : and J. K. LoosLi. 1958 Microflora of intestinal contents and feces of pigs feed different diets including pigs showing paraheratosis. J. Anim. sci. 17 : 714-722.

Hawley , H. B. ; P. A. Shepherd ; and D. M. Wheater. 1959. Factors affecting the implantation of lactobacilli in the intestine. J. Appl. Bacterial. 22 :360-367.

Ingram , M., F. J. H. ottowan and J. B. M. Coppock. 1956. The preservative action of acid substances in food. Chem. Ind. 42 :1154-1165.

Inoue, Y., M. Takano and I. Shibasaki. 1980. Antagonistic action of Lactic acid bacteria from Nham toward food-deteriorating bacteria. Microbiol utilization of Renewable Resources 1: 108-115.

Jay , J. M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. Appl. Environ. Microbiol. 44 : 525-532.

Jensen , H. 1975. Biological effect of feeding pigs with *Lactobacillus acidophilus*. Cited in Dairy Sci. Absts. 37(280) : 2096.

Katz , E. and A. L. Demain. 1979. The peptide antibiotics of Bacillus Chemistry, biogenesis, and possible functions. Bacterial. Rev. 41(2) : 449-474.

King , J. O. L. 1968. *Lactobacillus acidophilus* as a growth stimulant for pigs. Veternarian. 5 : 273-280.

Klaenhammer , T. R. 1988. Bacteriocin production by lactic acid bacteria Biochemie. 70 : 377-349.

Kurylowicz , w. 1976. Antibiotics : A critical Reveiw. Polish Medical Publishers. warsaw. 1047.

Lioyd , A. B., Cumming , R. B. and Kent, R. D. 1977 Prevention of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chicken and poults with Intestinal extracts. Austral. vet. J. 53, 82-87.

Liu , W. and J. N. Hanson. 1990. Some chemical and physical properties of Nisin , a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. microbiol. 58 : 2551-2558.

Maralidhara , K. S., G. G. Sheggery ; P. R. Elliker ; D. C. England ; and W. E. Sandine. 1977. Effect of feeding lactobacilli on the coliform and lactobacillus flora of intestinal tissue and feces from piglets. J. Food Prot. 40(5) : 288-295.

Morishita , Y.; T. Mitsuoka ; C. Kancuchi ; S. Yamamoto ; and m. Ogata. 1971. Specific establishment of lactobacilli in the digestive tract of germ-free chickens. J. of Food prot. 42 : 164-167.

Nikolic , B ; S. Zakula.; M. Teofanovic and M. Blaga. 1974. Prevention and treatment of diarrhoea in newborn calves by addition of *Lactobacillus acidophilus* to milk. cited in Dairy Sci. Abst. 36(476) : 4137.

Olson , T. 1969. Intestinal disorder in pigs : Prophylaxis and therapy with Lactobacillus cited in Dairy Sci. Abstr. 31(31) : 245.

Parker , R. B. 1974 Probiotics , the other half of the antibiotic story. Anim. Nutr. Health., 29 : 4-8.

Pasienyi , A. 1959. Use of acidophilus skim-milk for pig feeding. cited in Dairy Sci. Abst. 21(414) : 2307.

Pollmann , D. S. ; D. M. Danielson ; W. B. Wren; E. R. Peo, Jr. and K. M. Shahani. 1980. Influence of *Lactobacillus acidophilus* inoculum on gnotobiotic and conventional pigs. J. Anim. Sci. 51 : 629-637.

Premi , L. and Bottazzi, V. 1975. Use of Lactobacilli in the control of intestinal disturbances of pigs. Proc XLX Int. Dairy congr. 1 : 89.

Prescott , S. C. and C. G. Buggat. 1988. Industrial microbiology. 3rd edition., Kogakushi Co., Ltd., Tokyo.

Redmond , H. E. and R. W. Moor. 1966 Biologic effect of introducing *Lactobacillus acidophilus* into a large swine herd experiencing enteristic. Dairy Sci. Abstr. 28 : 2462.

Reiter , B. and B. G. Harnulv. 1984. Lactoperoxidase antimicrobial system : Nutural occurrence, biological functions and practical applications. J. Food Prot. 47 : 724.

Rettger , L. F. and Cheplin , H. A. 1921. A Treatise on the transformation of the intestinal flora with special reference to the implantation of *Lactobacillus acidophilus* , Yale university Press , New Haven , Connecticut.

Riis , P. M. and P. E. Jakobson. 1969. The physiology, biochemistry and microbiology of digestion and metabolism of nutrients in pigs. The science of Nutrition of Farm Liverstock. New York : Pergamose Press, Ltd.

Roger , L. A. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. J. Bacteriol. 16 : 311-316.

Robin , F. vaughan. and T. Nerad. 1982. Lactic acid inhibition of *Salmonella typhinmurium* in yogurt. J. Dairy sci. 65(2) : 197-203

Schleifer , K.H. 1986 Gram positive cocci. In sneath P.A. (ed.). Bergey 's Manual of Systematic Bacterialogy. vol 2. Baltimore London : Williams and Wilkins.

Sandine , W.E. 1979 Roles of lactobacillus in the intestinal tract. J. Food Prot. 42 : 259-262.-. 1988. New nomencalture of non-rod-shaped lactic acid Bacteria. Bio Chemic . 70 : 519-522.

_____. K.S. Muralidhara ; and D.C. England. 1992. Lactic acid Bacteria in food and health : A review with special reference to enteropathogenic

E. coli as well as contain enteric diseases and their treatment with antibiotics and lactobacilli.J. Milk Food Technal. 35 : 691-702.

Shirota , M. 1962. Lactobacillus in health and disease. Monograph published in Kyoto, Japan and obtained from the yakult Honsha co.Ltd., Tokyo.

Smith , J.L. and S.A. Palum bo. 1981. Microorganism as food additives. J. Food prot. 44 : 936-937.

Sorrels , K.M. and M.L. speck. 1970 Inhibition of *Salmonella gallinarum* by culture filtrates of *Leuconostoc citrovum* J. Dairy Sci. 53 : 239-240.

Sperber, W.H., and J. Swan. 1976. Hot loop test for the determination of carbon dioxide formation from glucose by Lactic Acid Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 31:990-991.

Stekar , J. 1975 Effect of a Supplement of Lactic acid Bacteria on growth of calves. cited in Nutrition Abstracts and Reveiws. 45 (4) 344 : 2614.

Tagg , J.R. Dajanii , A.S. and L.W. Namaker. 1976. Bacteriocins of gram positive bacteria. Bacteriol . Rev. 40 : 722-756.

Tamine , A.Y. 1981. Microbiology of starter culture, Dairy Microbiology. 2 : 133-156.

Tittsler , R. P. , C.S. Pederon , E.E. Snall , D. Handlin and C.F. Niven, Jr. 1952. Symposium on the lactic acid bacteria. Bact. Rev. 16 : 227-260.

Tortuero , F. 1973. Influence of implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on growth, feed conversion, malabsorption of fats Syndroms and intestinal flora. Poultry Sci. 52(1) : 197-203.

Upreti , G. C. and Hinsdill, R. D. 1973 Isolation and Characterization of a bacteriocin from a homofermentative Lactobacillus. Antimicrob. Agents Chemother. 4 : 489-494.

Waksman, S.A. 1961. The role of antibiotics in nature. Prespect Biol. Med. 4 : 271-278.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.

1. สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1.อาหารเอ็มอาร์เอส (MRS media)

โปรติโอสเปปโตน	10.0	กรัม
เนื้อวัวสกัด	10.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
เด็กซ์โตส	20.0	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
ทวีน 80	1.0	กรัม
โซเดียมอะซิเตท	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.58	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)	0.28	กรัม
บรอมเครเซิล เพอเพิล	0.4	กรัม
น้ำ	1,000	มล.

ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ด้วย 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ ถ้าต้องการอาหารแข็งให้เติมวุ้น 15 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว.121°เซลเซียส. เป็นเวลา 15 นาที)

1.2 อาหารบีเฮชไอ (BHI broth)

คาล์ฟ เบรน อินฟิวชั่น ฟอร์ม	23.0	กรัม
บีฟ ฮาร์ด อินฟิวชั่น ฟอร์ม	28.7	กรัม
เด็กซ์โตส	28.7	กรัม
โปรติโอสเปปโตน	1.15	กรัม
โซเดียมครอไรด์	0.58	กรัม

ไดโซเดียมฟอสเฟต	0.30	กรัม

ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 7.4 $\pm$ 0.2 ด้วย 1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก ถ้าต้องการ อาหารแข็งให้เติมวุ้น 15 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว.121°เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที)

1.3. อาหารนมพร่องมันเนย (Skim milk)

นมพร่องมันเนย	10.0	กรัม
น้ำ	100	มล.

นึ่งที่ความดัน 10 ปอนด์ / ตารางนิ้ว. 100 °เซลเซียส 10 นาที

1.4. Basal medium

เตรียมโดยใช้น้ำกลั่นเติม Peptone 1 เปอร์เซ็นต์ และ Yeast extract 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ดัด แปลงจาก MRS medium)

1.5. อาหารซิลิไนส์ เอฟ (Selenite F broth)

โซเดียม ไฮโดรเจน ซีลิไนส์	4.0	กรัม
โปรติโอสเปปโตน	5.0	กรัม
แมนนิทอล	4.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	10.0	กรัม
น้ำ	1,000	มล.

นึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 121°เซลเซียส 15 นาที

1.6 อาหารแข็งซาลโมเนลลา ชิกเจลลา (SS Agar)

โปรติโอสเปปโตน	5.0	กรัม
แลคโตส	10.0	กรัม
เกลือน้ำดี	5.5	กรัม
โซเดียมซิเตท	10.0	กรัม
โซเดียมไธโอซัลเฟต	8.5	กรัม
เฟอริก ซิเตท	1.0	กรัม
บิลเลียนกรีน	0.00033	กรัม
นิวทอลเรด	0.025	กรัม
วุ้นผง	12.0	กรัม
น้ำ	1,000	มล.

นึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 121°เซลเซียส 15 นาที

2. สูตรอาหารที่ใช้ในการจำแนกชนิดของ อ.อ.บ.

2.1 Carbohydrate fermentation medium (Modification of MRS broth) (Sharpe, 1968)

โปรติโอสเปปโตน	10.0	กรัม
สารสกัดยีสต์	5.0	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
ทวีน 80	1.0	กรัม
โซเดียมอะซิเตท	5.0	กรัม
ไตรแอมโมเนียมซิเตท	2.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.58	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)	0.28	กรัม
บรอมเครเซิล เพอเพิล	0.4	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.
pH	6.2 - 6.6	

เติมคาร์โบไฮเดรทที่ต้องการทดสอบลงไป 1 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน10 ปอนด์ / ตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข.

3. สีย้อมและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1 สารละลาย 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (3% Hydrogen peroxide solution)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 35%	8.6	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

3.2 สารละลายพาราไฮดรอกซี่ ไดฟีนิล (Para hydroxy diphenyl solution)

พาราไฮดรอกซี่ ไดฟีนิล	0.5	กรัม
อะซิโดน	100	มล.

เขย่าให้เข้ากัน ควรเตรียมน้ำยาก่อนใช้ทุกครั้ง

3.3 สารละลายคริสตอลไวโอเล็ต (Crystal Violet Solution)

คริสตอลไวโอเล็ต	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	400	มล.

3.4 สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram ' s Iodine Solution)

ไอโอดีนคริสตอล	10.0	กรัม
โปแตสเซียมไอโอดีน (KI)	0.5	กรัม
โซเดี่ยมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	50	มล.

ละลายโซเดี่ยมไฮดรอกไซด์ ในน้ำช้า ๆ แล้วจึงเติมไอโอดีนคริสตอลลงไป และเติมโปแตสเซียมไอโอไดด์เป็นลำดับสุดท้าย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 สารละลายแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Alcohol)

แอลกอฮอล์ บริสุทธิ์	9.5	มล.
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร	100	มล.

3.6 สารละลายสีซาฟรานิน (Safranin Staining Solution)

ซาฟรานิน	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	200.0	มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค.

4. การจำแนกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MRS Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°เซลเซียส 24 ชั่วโมง นำมาทดสอบสมบัติทางชีวเคมี ดังนี้

4.1 การตรวจสอบการติดสีแกรม

เขี่ยเชื้อบริสุทธ์ลงบนแผ่นสไลด์ นำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง ย้อมสีด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที เอียงสไลด์ เทสีทิ้งพร้อมทั้งหยดสารละลายไอโอดีนนาน 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง พร้อมทั้งหยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ล้างสีออกนาน 10-20 วินาทีล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงย้อมสีด้วยสารละลาย safranin O เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจดูลักษณะเซลล์ การจัดเรียงตัวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า

4.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ คาตาเลส

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่เลี้ยงไว้ 18 - 24 ชั่วโมง มาเขี่ยลงบนกระดาษกรองที่หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 3 เปอร์เซ็นต์ 2 - 3 หยด ถ้าพบโคโลนีที่เกิดฟองอากาศ แสดงว่าแบคทีเรียนั้นให้ผลบวก โดยใช้ *Bacillus subtilis* ที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นเชื้อควบคุมในการให้ผลการทดสอบคาตาเลสผลบวก ส่วนโคโลนีที่ไม่เปลี่ยนแปลงจะให้ผลลบ

4.3 การตรวจสอบการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°เซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง เผา Loop ให้ร้อนแดงจุ่มลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว แบคทีเรียกลุ่ม

Homofermentative bacteria จะไม่พบฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ถ้าเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Heterofermentative bacteria จะพบฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Sperber, 1976)

4.4 การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบลงในอาหาร carbohydrate fermentation(ภาคผนวก ก.หมายเลข 2.1) ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบคืออะมิคาลิน,อะราบิโนส,เซลโลไบโอส,ฟรุคโตส, กลูโคส, แลคโตส, มอลโตส, แมนนิทอล, แมนโนส, แรมโนส, ไรโบส และซอร์บิตอล ใช้ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยใช้ บรอมเครซิล เพอเพิล เป็นอินดิเคเตอร์ บ่มเชื้อที่ 37°เซลเซียส ตรวจผลทุกวันโดยดูการเจริญของเชื้อ ซึ่งจะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ จากสีม่วงเป็นสีเหลืองจนครบ 7 วัน

4.5 การทดสอบความสามารถในการทนเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

อบโซเดียมคลอไรด์ที่ 110°เซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง นำไปเติมลงในอาหารเหลว MRS ที่มี บรอมเครซิล เพอเพิล เป็นอินดิเคเตอร์ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 2.5, 5.0, 7.5, 10 และ 12.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) pH 6.5 - 6.8 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°เซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงตรวจผลการเจริญสังเกตุการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว MRS จากสีม่วงเป็นสีเหลือง

4.6 การทดสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นต่างๆ

โดยใช้เกลือน้ำดีผงสำเร็จของ Difco นำไปเติมลงในอาหารเหลว MRS ที่มี บรอมเครซิล เพอเพิล เป็นอินดิเคเตอร์ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5 และ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงตรวจผลการเจริญสังเกตุการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวMRS จากสีม่วงเป็นสีหลือง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7 การนับเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable cell count) โดยวิธี Spread plate

วิธีนี้เป็นการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตเท่านั้น โดยการนำตัวอย่างทดสอบที่ต้องการหาจำนวนของเชื้อมาทำให้เจือจางเป็นลำดับ (1:10) ในอาหารเหลวหรือ 0.85% NSS แล้วนำเชื้อในแต่ละหลอดที่มีความเจือจางต่างๆ จำนวน 0.1 มล. หยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมปาดให้กระจายทั่วไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้จนกว่าจะแห้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ดังนี้คือ

- การตรวจนับจำนวนเชื้อประจำถิ่นใช้ BHI Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 37 °เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่งโมง
- การตรวจนับจำนวน Lactobacillus ใช้ MRS Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 37°เซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่งโมง
- การตรวจนับจำนวน Salmonella ใช้ SS Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 37 °เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่งโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง.

5. การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วย SEM

5.1 วิธี SEM conventional technique

5.1.1 การเก็บและการดองรักษาตัวอย่าง

- นำตัวอย่างมาล้างในสารละลายไอโซโทนิค(isotonic solution) เช่น น้ำเกลือ หรือบัฟเฟอร์
- ทำการดองในน้ำยาประเภท อัลดีไฮด์ หรือ Primary fixative ชนิดอื่น (Primary fixation)
- หลังการดองล้างด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกับที่ใช้เป็นตัวทำละลายใน fixative
- ทำการดองในน้ำยาออสเมี่ยม (post fixation)

5.1.2 การขจัดน้ำออก (dehydration) และการทำให้แห้ง (drying)

- การขจัดน้ำใช้ เอธิล แอลกอฮอล์ หรืออะซิโตน จากความเข้มข้นขั้นต่ำ (30%) ไปจนถึงความเข้มข้นสูง (100%)
- การทำให้แห้ง ใช้วิธีทำให้แห้งในอากาศธรรมดา หรือ วิธี critical point drying (CPD)
- วางแผ่นตัวอย่าง บนแผ่นวางตัวอย่าง (specimen stub)

5.1.3 การฉาบผิวด้วยโลหะหนัก (metal coating)

- ตัวอย่างที่แห้งแล้ว ที่วางบน stub จะต้องใช้กาวเชื่อมผิวล่างของตัวอย่างให้ติดบน stub กาวที่ใช้จะเป็นโลหะผสม หรือสารที่เป็นตัวนำไฟฟ้า (conductive agent) เช่น ผงถ่าน เรียกว่า carbon colloidal adhesive การติดตัวอย่างบน stub นี้ เรียกว่า mounting

- หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปฉาบผิวด้วยโมเลกุลของโลหะหนัก (metal coating) เช่น ทองผสมพาลาเดียม ใน vacuum evaporator หรือ sputtering unit

5.2 การใช้กล้อง scanning eletron microscopes (SEM)

1. เปิดระบบไฟฟ้า และ เปิดสวิทช์ระบบสูญญากาศให้ได้สูญญากาศที่เหมาะสม
2. ตรวจสอบสภาพของเครื่อง โดยใช้ตัวอย่างเพื่อตรวจสอบคุณภาพ (control sample) วางบน stage ภายใน specimen chamber ตามข้อแนะนำเกี่ยวกับการใส่ตัวอย่างภายใน chamber
3. เลือก high voltage ที่เหมาะสมหลังจากได้ทำให้มีสูญญากาศที่เหมาะสม แล้วทำให้เกิด electron beam
4. ณ. กำลังขยาย 1,000-2,000 เท่า เริ่มทำการปรับลำแสง electron และ aperture ให้มีแนวเดียวกัน ขั้นตอนนี้ เรียกว่า beam alignment
5. แก้ไข astigmatism ณ.กำลังขยายสูง (ประมาณ 80,000-100,000 เท่า) จนเป็นที่พอใจโดยดูผลจากภาพที่เกิดขึ้นว่าชัด หรือคมเพียงพอตามความต้องการ
6. ปิด electron beam และ high voltage ตามลำดับ
7. เปลี่ยนตัวอย่างเพื่อตรวจสอบ
8. เปิด high voltage และ electron beam
9. ตรวจสอบตัวอย่างตามกำลังขยายที่ต้องการ
10. เลือกบริเวณตัวอย่างที่ต้องการศึกษา และ ถ่ายภาพ
11. เพิ่มกำลังขยายของภาพ ณ. บริเวณนั้น และทำการ focus ให้ภาพชัด
12. ลดกำลังขยายลงตามต้องการ เพื่อถ่ายภาพ
13. เมื่อเสร็จภาระกิจการศึกษาตัวอย่างแล้ว ลดกำลังขยายของกล้อง (1,000 เท่า) ปิด electron beam และ high voltage ปิดสวิทช์เครื่องเมื่อเสร็จการใช้งาน

ภาคผนวก จ.

6. อาหารที่ใช้เลี้ยงไก่กระทงของการทดลองครั้งนี้ แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะ 0-3 สัปดาห์ เลี้ยงลูกไก่ด้วยสูตรอาหารสูตรที่ 1 และในระยะ 3-6 สัปดาห์ หลังเลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 2 ส่วนประกอบของอาหาร สูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 มีดังนี้

ชนิดของอาหาร	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2
	%	%
รำละเอียด	35	35
ปลายข้าว	13	17
ข้าวโพด	14	16
ปลาป่น	8.5	8.5
กากถั่วเหลือง	12	8
กากถั่วลิสง	12	10
ใบกระถิน	4	4
เปลือกหอยป่น	1	1
เกลือ	0.5	0.5
เปอร์เซ็นต์โปรตีน	23.85	20.91

อาหารทั้งสองสูตรผสมแร่ธาตุ และไวตามินสำเร็จรูป ประกอบด้วย

ไวตามินเอ	500,000	หน่วยสากล
ไวตามิน ดี 3	50,000	หน่วยสากล
ไวตามิน บี 2	150	มิลลิกรัม
กรดนิโคตินนิก	900	มิลลิกรัม
กรดแพนโททินิก	300	มิลลิกรัม
ไวตามิน บี 12	1,000	ไมโครกรัม

นอกจากนี้ยังประกอบด้วยพวก Trace Mineral ซึ่งประกอบด้วย แมงกานีส เหล็ก ทองแดง โคบอลท์ และสังกะสี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. ในการเลี้ยงไก่ ค่าใช้จ่ายส่วนใหญ่ได้แก่ อาหารที่ไก่กินซึ่งเป็นค่าใช้จ่ายที่คงที่สำหรับการเลี้ยงไก่ทั่วๆไป ส่วนค่าใช้จ่ายอื่นๆนั้นไม่คงที่ ขึ้นกับการเลี้ยงดูของแต่ละคน ราคาอาหารไก่ของอาหารไก่น้ำหนักรวม 100 ก.ก. ของสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 มีดังนี้ คือ

ชนิดอาหาร	ราคาอาหารผสม สูตรที่ 1 (บาท)	ราคาอาหารผสม สูตรที่ 2 (บาท)
รำละเอียด	32.90	32.90
ปลายข้าว	16.25	21.25
ข้าวโพด	16.80	19.20
ปลาป่น	20.40	21.40
กากถั่วเหลือง	31.80	21.20
กากถั่วลิสง	27.00	22.50
ใบกระถิน	6.00	6.00
เปลือกหอย	0.17	0.17
เกลือ	0.125	0.125
รวม	151.445	144.745
ราคาอาหารผสม ต่อ ก.ก.	1.51	1.44

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ.

8.1 ตารางแสดงน้ำหนักตัวของไก่กลุ่มทดสอบ 3 ตลอด 6 สัปดาห์

กรงที่	น้ำหนักไก่ (กรัม)					
	สัปดาห์ 1	สัปดาห์ 2	สัปดาห์ 3	สัปดาห์ 4	สัปดาห์ 5	สัปดาห์ 6
1	1340 (7)	2980 (6)	4300 (5)	5240 (4)	5400 (3)	4300 (2)
2	1260 (5)	2800 (5)	4020 (5)	6000 (5)	7500 (5)	8100 (5)
3	1500 (7)	3120 (6)	4140 (5)	5160 (4)	5600 (3)	3700 (2)
4	1360 (7)	3160 (7)	5700 (7)	8700 (7)	13300 (7)	14500 (7)
5	1400 (7)	2960 (7)	5360 (7)	8800 (7)	11400 (7)	12800 (7)
6	1440 (7)	2540 (6)	3240 (4)	4800 (3)	3300 (2)	2250 (1)
7	1620 (8)	2680 (7)	5140 (7)	9500 (7)	11800 (7)	9700 (6)
8	1420 (7)	2820 (7)	5400 (7)	9400 (7)	10800 (7)	13600 (7)
	$\sum X = 11,340$ $N = 55$ $X = 206.18$	$\sum X = 23,060$ $N = 51$ $X = 452.1$	$\sum X = 37,300$ $N = 47$ $X = 793.61$	$\sum X = 57,600$ $N = 44$ $X = 1309$	$\sum X = 67,100$ $N = 41$ $X = 1636$	$\sum X = 68,900$ $N = 37$ $X = 1864$

หมายเหตุ : ตัวเลขในวงเล็บเท่ากับจำนวนไก่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ. (ต่อ)

8.2 ตารางแสดงน้ำหนักตัวของไก่กลุ่มควบคุมตลอด 6 สัปดาห์

กรงที่	น้ำหนักไก่ (กรัม)					
	สัปดาห์ 1	สัปดาห์ 2	สัปดาห์ 3	สัปดาห์ 4	สัปดาห์ 5	สัปดาห์ 6
1	1560 (8)	3420 (8)	6180 (6)	9160 (8)	11200 (8)	12400 (7)
2	1320 (8)	3500 (8)	6600 (8)	9900 (8)	11500 (8)	15500 (8)
3	1560 (8)	3180 (8)	5880 (8)	9000 (8)	10300 (7)	12500 (7)
4	1420 (7)	2580 (6)	4100 (5)	4900 (4)	4800 (3)	3900 (2)
5	1380 (7)	2480 (6)	4040 (5)	5100 (4)	4700 (3)	3500 (2)
6	1480 (7)	3040 (7)	5440 (7)	8600 (7)	10100 (7)	11600 (6)
7	1460 (7)	2580 (6)	3820 (5)	4700 (4)	4800 (3)	3900 (2)
8	1520 (8)	2580 (6)	4740 (6)	6900 (6)	8900 (6)	9900 (6)
	$\sum X = 11,700$ $N = 60$ $X = 195$	$\sum X = 23,360$ $N = 55$ $X = 424.7$	$\sum X = 40,800$ $N = 52$ $X = 784.61$	$\sum X = 58,260$ $N = 49$ $X = 1188.9$	$\sum X = 66,300$ $N = 45$ $X = 1473$	$\sum X = 72,200$ $N = 40$ $X = 1802$

หมายเหตุ : ตัวเลขในวงเล็บเท่ากับจำนวนไก่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ช.

9.1 ตารางแสดงปริมาณอาหารที่ไก่กลุ่มทดสอบ 3 และไก่กลุ่มควบคุมกินในช่วง 0 - 19 วัน

จำนวนไก่กลุ่มทดสอบ 3	ปริมาณอาหารที่ไก่กิน (กรัม)	จำนวนไก่กลุ่มควบคุม	ปริมาณอาหารที่ไก่กิน (กรัม)
5	3960	8	4660
5	2900	8	5060
5	3680	8	4360
7	4180	5	3560
7	3880	5	3380
4	3100	7	4160
7	4120	5	3540
7	4180	6	4040
N = 47	$\sum X$ = 33,300 gm. = 33.3 Kg.	N = 52	$\sum X$ = 32,760 gm. = 32.76 Kg.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ช. (ต่อ)

9.2 ตารางแสดงปริมาณอาหารที่ไก่กลุ่มทดสอบ 3 และไก่กลุ่มควบคุมกินในช่วง 20 - 42 วัน

จำนวนไก่กลุ่มทดสอบ 3	ปริมาณอาหารที่ไก่กิน (กรัม)	จำนวนไก่กลุ่มควบคุม	ปริมาณอาหารที่ไก่กิน (กรัม)
2	14500	7	18120
5	11020	8	21800
2	74600	7	17160
7	19820	2	8040
7	16840	2	7520
1	5300	6	17560
6	14420	2	8220
7	18400	6	14500
N = 37	$\sum X$ = 107,760 gm. = 107.76 Kg.	N = 40	$\sum X$ = 112,920 gm. = 112.92 Kg.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ซ.

แผนภูมิการทดลองใช้ *Lactobacillus* spp. เป็นโพรไบโอติกเสริมอาหารไก่

ลำไส้จากไก่ที่ได้จากตลาดสดแหล่งต่างๆ จำนวน 54 ตัวอย่าง

⇓ นำมาแยก *Lactobacillus* spp. ใน MRS broth 37°เซลเซียส 24 ชั่วโมง

ได้ *Lactobacillus* spp. ทั้งสิ้น 28 สายพันธุ์

⇓ นำส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยง *Lactobacillus* spp. แต่ละชนิดหลังปรับ pHให้เป็นกลางมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในไก่

สามารถคัดเลือก *Lactobacillus* spp. ทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ (CU 1-6)

⇓ นำมาทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรทชนิดต่างๆ

CU. 1 = *Lactobacillus acidophilus*

CU. 2 = *Lactobacillus bulgaricus*

CU. 3 = *Lactobacillus fermentum*

CU. 4 = *Lactobacillus acidophilus*

CU. 5 = *Lactobacillus casei subsp. tolerans*

CU. 6 = *Lactobacillus jensenii*

⇓ 1. นำไปทดสอบความสามารถในการทนเกลือแกงและเกลือน้ำดี

Lactobacillus spp. ทั้ง 6 สายพันธุ์ ทนต่อเกลือแกงและเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูงถึง 5 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ซ. (ต่อ)

⇓ นำไปทดสอบความสามารถ
ในการอยู่รอดในลำไส้ของไก่

คัดเลือก *Lactobacillus* spp. ได้ 5 สายพันธุ์ (ยกเว้น CU. 3)

⇓ นำไปทดสอบดูผลของโพรไบโอติก
ต่อการเจริญเติบโตของไก่

*ไก่กลุ่มที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสมมีน้ำหนักตัวดีกว่าไก่กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

* ไก่กลุ่มที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสมมีแนวโน้มการใช้อาหารดีกว่าไก่กลุ่มควบคุมแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

⇓ การทดสอบท้าทายด้วย
Salmonella typhimuriun

* ไก่กลุ่มที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. สามารถลดจำนวนของ *Salmonella typhimurium* ในระบบทางเดินอาหารได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นาย ฐิติพงศ์ ธนะรัชดิการนนท์ เกิดเมื่อวันที่ 28 เมษายน 2514 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์(เกียรตินิยมอันดับสอง) มหาวิทยาลัยรังสิต ปีการศึกษา 2535 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ในปีการศึกษา 2536

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย