ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. วิธีการย้อมสีแกรมแบคทีเรีย

1.1 หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ ประมาณ 1 หยด

1.2 ใช้ลูป (loop) แตะเชื้อจาก MRS agar slant มาเกลี่ย (smear) บนแผ่สไลด์ให้กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ แล้วปล่อยให้แห้งในอากาศ

1.3 นำสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อทิ้งไว้จนแห้งแล้วไปผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง เพื่อเป็นการตรึงเชื้อ (heat fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์ ซึ่งจะทำให้เชื้อไม่หลุดออกขณะย้อมสี

1.4 หยดสีคริสตอลไวโอเลต (crystal violet) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเททิ้งจากนั้นล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น

1.5 หยดสารละลายไอโอดีน (iodine) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อให้ท่วมทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง สารละลายไอโอดีนจะทำหน้าที่เป็นมอแดนท์ (mordant) ช่วยให้เซลล์ติดสีย้อมได้ดีขึ้นจากนั้นล้างสีออกด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

1.6 ล้างสีออกด้วยแอลกอฮอล์ 95% บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที หรือจนกว่าสีม่วงของคริสตอลไวโอเลตจางลง แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น

1.7 หยดสีซาฟรานิน (safranine O) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ประมาณ 30 วินาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นซับให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูการติดสีด้วยกล้องจุลทรรศน์

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงของคริสตอลไวโอเลต เนื่องจากที่ผนังเซลล์มีชั้นของเปบทิโดไกลแคนหนามาก และไม่มีชั้นของ phospholipid ดังนั้นสีคริสตอลไวโอเลตจึงไม่ถูกล้างออกด้วยแอลกอฮอล์ 95%

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีแดงของซาฟรานิน เนื่องจากที่ผนังเซลล์มีชั้นของเปบทิโดไกลแคนที่บางมาก (ประมาณ 1 ใน 10) เมื่อเทียบกับแบคทีเรียแกรมบวก และมีชั้นของ phospholipid เป็นผนังชั้นนอกสุด ดังนั้นสีคริสตอลไวโอเลตจึงถูกล้างออกด้วยแอลกอฮอล์ 95%

2. **การวิเคราะห์หาโปรตีน** (Proximate analysis โดยวิธี Kjeldahl)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก (sulfuric acid; H_2SO_4) เข้มข้น 95-99%

2. สารเร่งปฏิกิริยา: คอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 10 กรัม กับโพแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate: K_2SO_4) 90 กรัม ผสมให้เข้ากัน

3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 40% (sodium hydroxide; NaOH): ละลาย NaOH จำนวน 400 กรัม ลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 20% (sodium hydroxide; NaOH): ละลาย NaOH จำนวน 200 กรัม ลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5. สารละลาย H_2SO_4 0.1 N: เติม H_2SO_4 2.8 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตร เป็น 500 มิลลิลิตร

6. กรดบอริค (boric acid; H_3BO_3) 4%: ต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ให้ร้อนแล้วใส่ H_3BO_3 จำนวน 4 กรัม ต้มจนละลายหมด แล้วทิ้งไว้จนสารละลายเย็นลงแล้วปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิลิตร

7. อินดิเคเตอร์: ละลายเมทธิลเรด (methyl red) 0.2 กรัม ในแอลกฮอล์ 95% แล้วปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิลิตร และละลายเมทธิลีนบลู (methylene blue) 0.2 กรัม ในแอลกฮอล์ 95% แล้วปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลายเมทธิลเรด 2 ส่วน กับสารละลายเมทธิลีนบลู 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน

วิธีทำ

การย่อยตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม ในกระดาษกรองที่ปราศจากสารไนโตรเจนแล้วใส่หลอดย่อยโปรตีน และพับกระดาษใส่ลงในหลอดย่อยเพื่อทำเป็น blank

2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 7 กรัม เพื่อเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อย

3. เติม กรดซัลฟูริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร

4. นำเข้าเครื่องย่อยโปรตีน (Gerhardt, Germany) จนกระทั่งสารละลายในหลอดย่อยเป็นสีเขียวใส แล้วทิ้งไว้ให้เย็น

กลั่นตัวอย่าง

1. เทกรดบอริคความเข้มข้น 4% ปริมาตร 25 มิลลิลิตรใส่ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. หยดอินดิเคเตอร์ลงในฟลาสก์กรดบอริค 2-3 หยด (สารละลายเป็นสีชมพูบานเย็น)

3. นำหลอดย่อยที่สารละลายเย็นแล้ว พร้อมทั้งฟลาสก์กรดบอริคที่เติมอินดิเคเตอร์เข้าเครื่องกลั่นไนโตรเจน (Gerhardt, Germany)

4. รอจนกระทั่งเครื่องกลั่นทำงานเสร็จ และสารสะลายเปลี่ยนกลับมาเป็นสีเขียวใส แล้วนำออกจากเครื่องกลั่น

การไตเตรท

1. นำสารละลายที่ได้จากการกลั่นไนโตรเจนมาไตเตรทด้วยกรดซัลฟูริค ความเข้มข้น 0.1 N จนถึงจุดยุติ (end point) สารละลายจะกลับมาเป็นสีชมพูบานเย็น

2. จดปริมาตรของกรดซัลฟูริคที่ใช้ไตเตรทเพื่อคำนวณต่อไป

การคำนวณ

$$\% \text{ ไนโตรเจน} = \frac{14.01 \times (V_1 - V_2) \times N}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)} \times 10}$$

เมื่อ 14.01 = น้ำหนักมวลโมเลกุลของไนโตรเจน

V_1 = ปริมาตรของกรดซัลฟูริคที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (ml)

V_2 = ปริมาตรของกรดซัลฟูริคที่ใช้ไตเตรท blank (ml)

N = ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ไตเตรท (N)

10 = ค่าคงที่ที่แปลงจากหน่วยกรัมเป็น %

$$\% \text{ Crude Protein} = \% \text{ ไนโตรเจน} \times 6.25$$

เมื่อ 6.25 = ค่าคงที่ในการเปลี่ยนค่าไนโตรเจนเป็นโปรตีน

3. **การวิเคราะห์หาไขมัน** (ดัดแปลงวิธีการจาก AOAC 2000)

สารเคมี: Petroleum ether จุดเดือด 35-60°C

วิธีทำ

1. ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ในกระดาษกรองแล้วห่อให้มิดชิด ใส่ลงใน timble

2. นำ timble ที่มีตัวอย่าง ไปอบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 105°C นาน 3 ชั่วโมง

3. อบถ้วยแก้วสำหรับวิเคราะห์ไขมันที่อุณหภูมิ 105°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำออกมาปล่อยให้เย็นในตู้ดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก

4. นำ timble ที่มีตัวอย่างใส่ในถ้วยแก้ว แล้วเติม Petroleum ether 150 มิลลิลิตร แล้ววางลงใน cup holders แล้วนำเข้าเครื่องสกัดไขมัน (Gerhardt, Germany)

5. เมื่อเครื่องสกัดน้ำมันทำงานเรียบร้อยแล้วนำถ้วยแก้วที่มีสารสกัดไปอบต่อที่อุณหภูมิ 105°C นาน 30 นาที แล้วนำออกมาทิ้งให้เย็นในตู้ดูดความชื้น แล้วจึงชั่งน้ำหนักถ้วยแก้ว

การคำนวณ

$$\% \text{ Crude fat} = \frac{(W_3 - W_2) \times 100}{W_1}$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักตัวอย่าง

W_2 = น้ำหนักถ้วยแก้ว

W_3 = น้ำหนักถ้วยแก้ว + น้ำหนักไขมัน

4. การวิเคราะห์หาเยื่อใย (ดัดแปลงวิธีการจาก AOAC 2000)

สารเคมี

1. สารละลายกรดซัลฟูริค ความเข้มข้น 1.25%

2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.25%

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างที่สกัดไขมันออกแล้ว 1 กรัม ใส่ลงในถุงไฟเบอร์

2. นำถุงไฟเบอร์ที่มีตัวอย่างเข้าเครื่องวิเคราะห์เยื่อใย

3. เมื่อเครื่องวิเคราะห์เยื่อใยทำงานเสร็จเรียบร้อย ชะตัวอย่างเยื่อใยในถุงไฟเบอร์ด้วยน้ำกลั่น ลงในถ้วยครูซิเบิ้ล (fritted glass crucible) ที่ต่ออยู่กับเครื่องปั๊มสุญญากาศ (เพื่อดูดน้ำกลั่นออกจากตัวอย่างภายในถ้วยครูซิเบิ้ล)

4. นำถ้วยครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 105°C จนกระทั่งตัวอย่างในถ้วยแห้ง แล้วนำออกมาปล่อยให้เย็นในตู้ดูดความชื้น แล้วบันทึกน้ำหนักถ้วยครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างเยื่อใย

5. นำถ้วยครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างเยื่อใยไปเข้าเตาเผาเถ้า ที่อุณหภูมิ 550°C นาน 3 ชั่วโมง

6. รอจนอุณหภูมิเตาลดลงเหลือประมาณ 150°C แล้วนำถ้วยครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างเยื่อใยปล่อยให้เย็นในตู้ดูดความชื้น แล้วบันทึกน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\% \text{ Crude fiber} = \frac{(W_2 - W_3) \times 100}{W_1}$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักตัวอย่าง

W_2 = น้ำหนักถ้วยครูซิเบิ้ล + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบที่อุณหภูมิ 105°C

W_3 = น้ำหนักถ้วยครูซิเบิ้ล + น้ำหนักตัวอย่างหลังเผาอุณหภูมิ 550°C

5. การวิเคราะห์หาไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) ในตัวอย่างอาหารและในมูล
(ดัดแปลงวิธีการของ Short et al., 1996)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก (sulfuric acid; H_2SO_4) เข้มข้น 95-98%

2. สารเร่งปฏิกิริยา: คอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 10 กรัม กับโพแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate: K_2SO_4) 90 กรัม ผสมให้เข้ากัน

3. 35% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; H_2O_2)

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่างโดยนำไปเผาที่อุณหภูมิ 580°C นาน 13 ชั่วโมง

2. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ลงในหลอดย่อยโปรตีน แล้วเติมสารเร่งปฏิกิริยา 7 กรัม และเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยด้วยเครื่องย่อยโปรตีน (ไม่ให้เดือด) ในตู้ดูดควัน จนสารละลายเป็นใส

3. นำสารละลายมาทิ้งไว้ให้อุ่น-เย็น แล้วนำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นประมาณ 100-200 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น พร้อมทั้งปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

4. นำสารละลายที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman no.1) ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติม 35% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

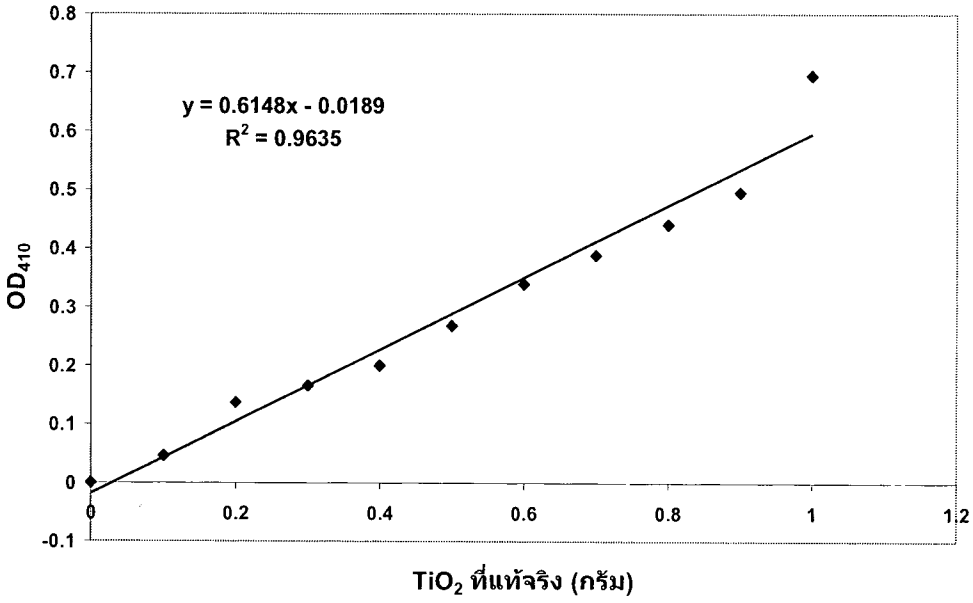
5. นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophometer ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

6. ทำสารละลายมาตรฐานตามวิธีเดียวกับตัวอย่าง และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปทำกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณ TiO_2 ในตัวอย่าง โดยใช้สมการ

$$y = 0.6148x - 0.0189$$

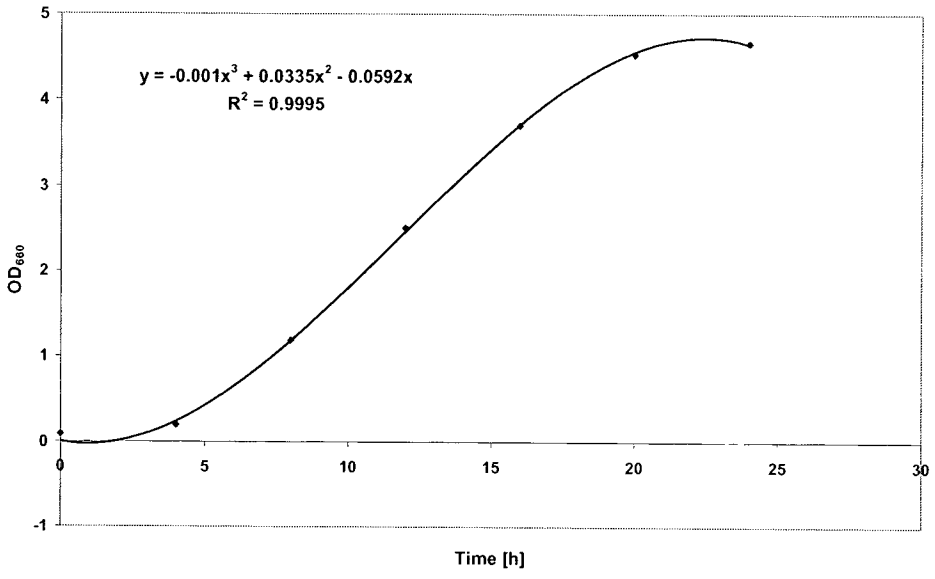
เมื่อ y = ค่าการดูดกลืนแสง

x = ปริมาณ TiO_2 ที่แท้จริง (กรัม)

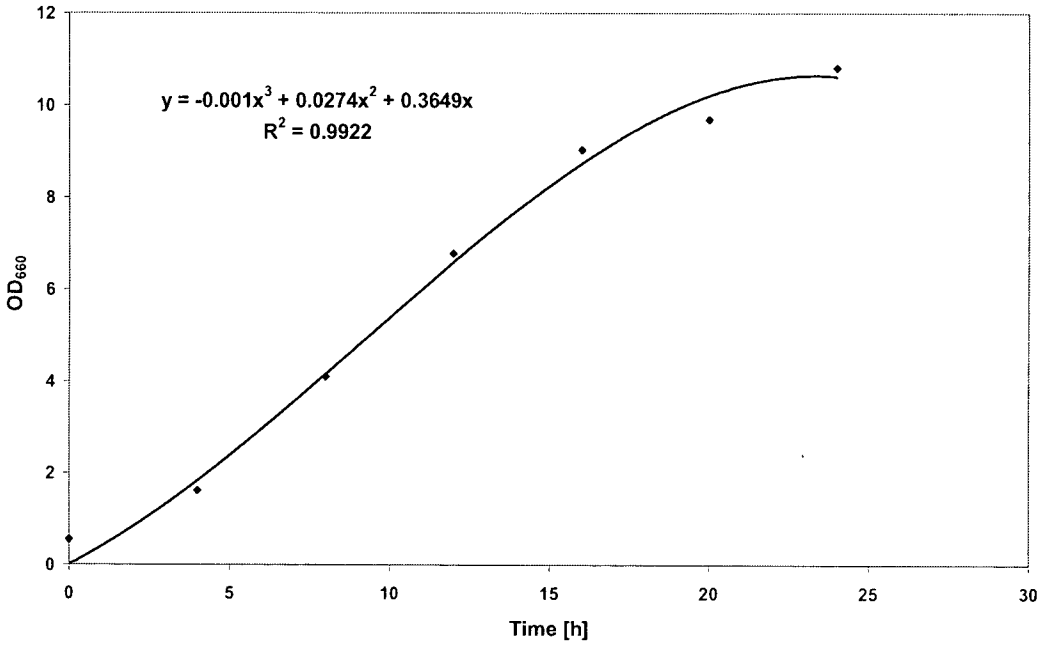


ภาพ 21 กราฟมาตรฐานและปริมาณของไทเทเนียมไดออกไซด์

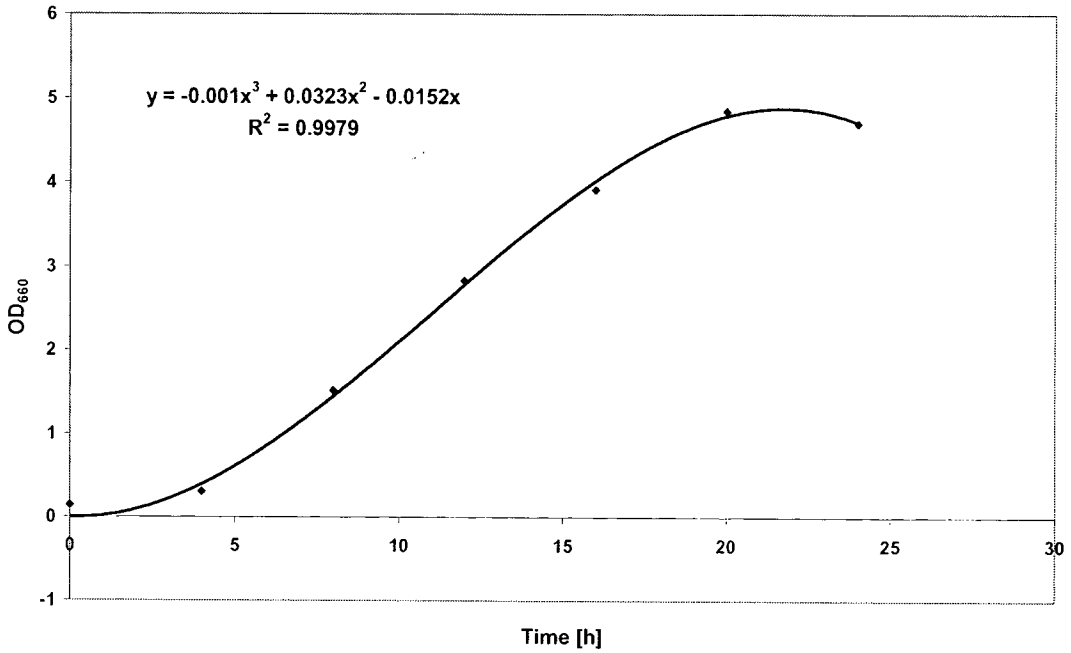
6. อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้ จากการวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร



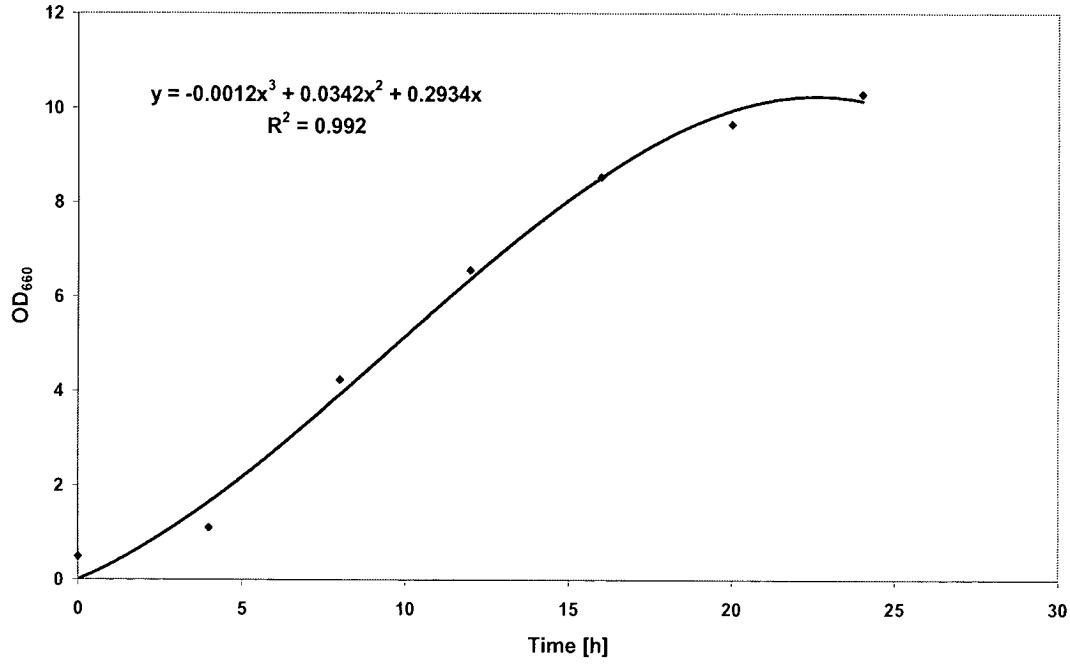
ภาพ 22 กราฟอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโปรไบโอติก *Bacilus subtilis* strain K21



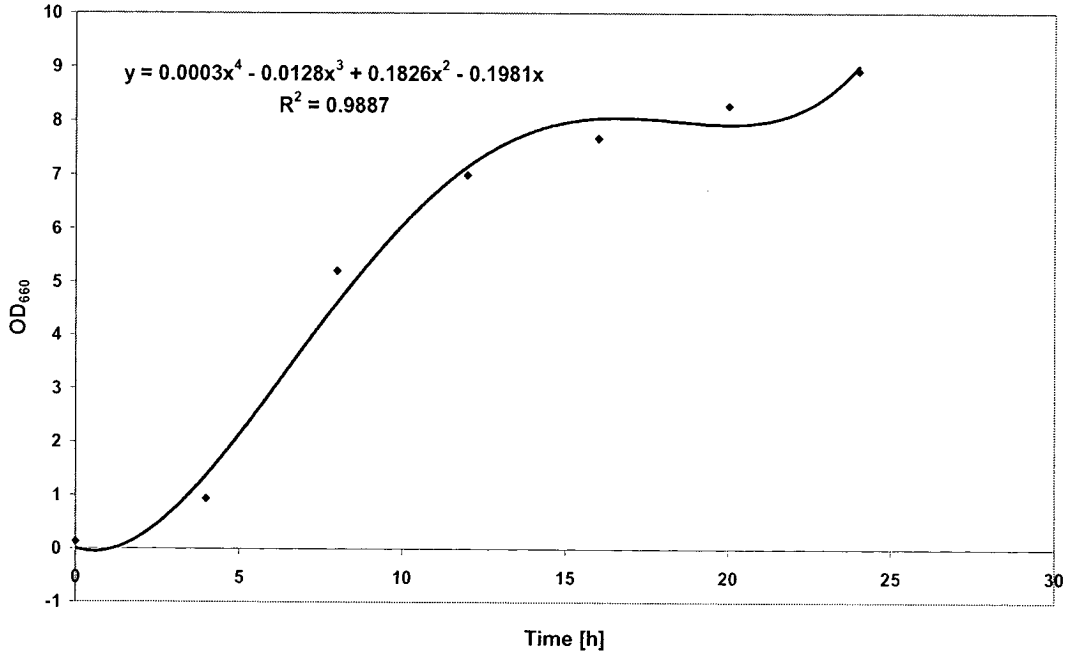
ภาพ 23 กราฟอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. licheniformis*



ภาพ 24 กราฟอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* strain KISR



ภาพ 25 กราฟอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* strain KL-007



ภาพ 26 กราฟอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโปรไบโอติก *Pediococcus pentosaceus*

ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

1. เส้นผ่าศูนย์กลางไมโครแคปซูลหลังกระบวนการตรึงเซลล์ด้วยโปรตีน-พอลิแซ็กคาไรด์คอมเพล็กซ์

ตาราง 29 ผลวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของเส้นผ่าศูนย์กลางไมโครแคปซูลที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05
		1
MPH + 0.25% (w/v) gellan gum	11	51.6873
MPH + 0.5% (w/v) xanthan gum	11	54.3082
MPH + 0.5% (w/v) xanthan gum + 0.25% (w/v) gellan gum	11	54.8318
Milk protein hydrolysate (MPH)	11	61.5527
Sig.		.112

2. การรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกหลังกระบวนการตรึงเซลล์ด้วยโปรตีน-พอลิแซ็คคาไรด์คอมเพล็กซ์

ตาราง 30 ผลวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการรอดชีวิตของเซลล์ภายหลังการตรึงเซลล์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
MPH + 0.5% (w/v) xanthan gum + 0.25% (w/v) gellan gum	3	95.7333	
Milk protein hydrolysate (MPH)	3	96.0333	
MPH + 0.25% (w/v) gellan gum	3	96.3000	
MPH + 0.5% (w/v) xanthan gum	3		99.0333
Sig.		.595	1.000

3. การรอดชีวิตของเซลล์ตรึงโปรไบโอติก *Pediococcus pentosaceus* ในระบบทางเดินอาหารจำลองของสุกร (*in vitro* model)

ตาราง 31 ผลวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติก *P. pentosaceus* ในระบบน้ำย่อยอาหารจำลองของสุกร 2 ชั่วโมง ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

Treatment	N	Subset for alpha = 0.01			
		1	2	3	4
Milk protein hydrolysate (MPH)	2	45.1000			
Free cell of *Pediococcus pentosaceus*	2		55.2500		
MPH + 0.5% (w/v) xanthan gum	2			76.1500	
MPH + 0.5% (w/v) xanthan gum + 0.25% (w/v) gellan gum	2			80.7500	
MPH + 0.25% (w/v) gellan gum	2				88.2500
Sig.		1.000	1.000	.031	1.000

ตาราง 32 ผลวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติก *P. pentosaceus* ในระบบน้ำย่อยอาหารจำลองของสุกร 4 ชั่วโมง ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

Treatment	N	Subset for alpha = 0.01				
		1	2	3	4	5
Free cell of *Pediococcus pentosaceus*	2	19.6000				
Milk protein hydrolysate (MPH)	2		94.0000			
MPH + 0.25% (w/v) gellan gum	2			129.3000		
MPH + 0.5% (w/v) xanthan gum	2				192.6000	
MPH + 0.5% (w/v) xanthan gum + 0.25% (w/v) gellan gum	2					226.8500
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ตาราง 33 ผลวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติก *P. pentosaceus* ในระบบน้ำย่อยอาหารจำลองของสุกร 6 ชั่วโมง ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

Treatment	N	Subset for alpha = 0.01			
		1	2	3	4
Free cell of *Pediococcus pentosaceus*	2	20.6500			
MPH + 0.25% (w/v) gellan gum	2		128.8500		
Milk protein hydrolysate (MPH)	2			167.5000	
MPH + 0.5% (w/v) xanthan gum	2				202.0500
MPH + 0.5% (w/v) xanthan gum + 0.25% (w/v) gellan gum	2				216.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	.045

4. การรอดชีวิตเซลล์ตรึงโปรไบโอติกหลายชนิดที่ถูกตรึงด้วย MPH + 0.5% (w/v) Xanthan gum + 0.25% (w/v) Gellan gum (1:0.5:0.5) ในระบบน้ำย่อยอาหารจำลองของสุกร (*in vitro* model)

ตาราง 34 ผลวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการรอดชีวิตของเซลล์ตรึงโปรไบโอติกหลายชนิดในระบบน้ำย่อยอาหารจำลองของสุกร 2 ชั่วโมง ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

Treatment	N	Subset for alpha = 0.01	
		1	2
Free cell of *Bacilluslicheniformis*	2	57.5000	
Free cell of *B. subtilis* KL-007	2	67.9000	
Free cell of *Pediococcus pentosaceus*	2	75.8000	75.8000
Encap cell of *P. pentosaceus*	2	107.3500	107.3500
Encap cell of *B. subtilis* KL-007	2	114.7000	114.7000
Encap cell of *B. licheniformis*	2		135.3000
Sig.		.014	.012

ตาราง 35 ผลวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการรอดชีวิตของเซลล์ตรึงโปรไบโอติกหลายชนิดในระบบน้ำย่อยอาหารจำลองของสุกร 4 ชั่วโมง ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

Treatment	N	Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
Free cell of *Bacilluslicheniformis*	2	61.7500		
Free cell of *Pediococcus pentosaceus*	2	62.8500		
Free cell of *B. subtilis* strain KL-007	2	65.6000		
Encap cell of *B. licheniformis*	2		112.0500	
Encap cell of *P. pentosaceus*	2		137.6500	137.6500
Encap cell of *B. subtilis* strain KL-007	2			168.0500
Sig.		.677	.024	.012

ตาราง 36 ผลวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการรอดชีวิตของเซลล์ตรึงโปรไบโอติกหลายชนิดในระบบน้ำย่อยอาหารจำลองของสุกร 6 ชั่วโมง ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

Treatment	N	Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
Free cell of *Bacillus subtilis* strain KL-007	2	61.1500		
Free cell of *Pediococcus pentosaceus*	2	64.6500		
Free cell of *B. licheniformis*	2	73.1500		
Encap cell of *B. licheniformis*	2	123.7000	123.7000	
Encap cell of *P. pentosaceus*	2		171.2500	171.2500
Encap cell of *B. subtilis* strain KL-007	2			217.0000
Sig.		.012	.029	.033

5. อัตราการเจริญเติบโต (Average Daily Gain; ADG) ของลูกสุกรหลังหย่านม

ตาราง 37 ผลวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติค่าอัตราการเจริญเติบโตของลูกสุกรหลังหย่านมที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Feed	N	Subset for alpha = 0.05
		1
Ground feed added probiotics	13	.2662
Ground feed added antibiotics (Control II)	20	.2710
Pellets feed added probiotics	15	.2720
Ground feed (Control I)	19	.2910
Sig.		.328

ภาคผนวก ค อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **สูตรอาหาร** De Man Rogosa Sharpe; MRS (Himedia, India)

1.1 Proteose peptone	10.00	กรัม
1.2 Beef extract	10.00	กรัม
1.3 Yeast extract	5.00	กรัม
1.4 Polysorbate 80	1.00	มิลลิลิตร
1.5 Dextrose	20.00	กรัม
1.6 Ammonium citrate	2.00	กรัม
1.7 Sodium acetate	5.00	กรัม
1.8 Magnesium sulfate	0.10	กรัม
1.9 Manganese sulfate	0.05	กรัม
1.10 Dipotassium phosphate	2.00	กรัม
1.11 Agar (สำหรับเตรียมอาหารแข็ง)	12.00	กรัม
1.12 Distilled water	1.00	ลิตร

ชั่งอาหาร MRS agar (Himedai, India) 67.15 กรัม ลงในน้ำกลั่นจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร (pH 6.5±0.2 ที่ 25°C) ต้มจนวุ้นละลายแล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

ชั่งอาหาร MRS broth (Himedai, India) 55.15 กรัม ลงในน้ำกลั่นจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร (pH 6.5±0.2 ที่ 25°C) ต้มจนวุ้นละลายแล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

2. **สูตรอาหาร** De Man Rogosa Sharpe; MRS (Merck, Germany)

2.1 Peptone from casein	10.00	กรัม
2.2 Meat extract	10.00	กรัม
2.3 Yeast extract	4.00	กรัม
2.4 D (+)-glucose	20.00	กรัม
2.5 Tween 80	1.00	มิลลิลิตร
2.6 Di-ammonium hydrogen citrate	2.00	กรัม
2.7 Sodium acetate	5.00	กรัม
2.8 Magnesium sulfate	0.20	กรัม
2.9 Manganese sulfate	0.04	กรัม
2.10 Di-potassium hydrogen phosphate	2.00	กรัม
2.11 Agar (สำหรับเตรียมอาหารแข็ง)	14.00	กรัม
2.12 Distilled water	1.00	ลิตร

ชั่งอาหาร MRS agar (Merck, Germany) 68.20 กรัม ลงในน้ำกลั่นจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร (pH 5.7±0.2 ที่ 25°C) ต้มจนวุ้นละลายแล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

ชั่งอาหาร MRS broth (Merck, Germany) 52.20 กรัม ลงในน้ำกลั่นจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร (pH 5.7±0.2 ที่ 25°C) ต้มจนวุ้นละลายแล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

3. **สูตรอาหาร** Eosin methylene Blue agar; EMB agar (Himedia, India)

3.1 Peptic digests of animal tissuue	10.00	กรัม
3.2 Di-potassium phosphate	2.00	กรัม
3.3 Lactose	10.00	กรัม
3.4 Eosin yellowish	0.40	กรัม
3.5 Methylene blue	0.065	กรัม
3.6 Agar	15.00	กรัม
3.7 Distilled water	1.00	ลิตร

ชั่งอาหาร EMB (Himedai, India) 37.46 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร (pH 7.1±0.2 ที่ 25°C) ต้มจนวุ้นละลายแล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

4. **สูตรอาหาร** Carboxy methyl cellulose agar; CMC agar (ดัดแปลงจาก ทิพวรรณ แตงสวน, 2553)

4.1 Carboxymethyl cellulose	5.00	กรัม
4.2 Yeast extract	0.10	กรัม
4.3 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.00	กรัม
4.4 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.20	กรัม
4.5 Agar	15.00	กรัม
4.6 Distilled water	1.00	ลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร ปรับค่า pH เป็น 6.8-7.0 ด้วย HCl และ NaOH แล้วจึงต้มจนวุ้นละลายและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

5. **สูตรอาหาร** Xylan agar (ดัดแปลงจาก สิรินันท์ ชมพูแสง, 2550)

5.1 Xylan from beechwood	5.00	กรัม
5.2 Yest extract	5.00	กรัม
5.3 Peptone	5.00	กรัม
5.4 K_2HPO_4	0.10	กรัม
5.5 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.20	กรัม
5.6 Agar	15.00	กรัม
5.7 Distilled water	1.00	ลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร ปรับค่า pH เป็น 6.8-7.0 ด้วย HCl และ NaOH แล้วจึงต้มจนวุ้นละลายและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

6. **สูตรอาหาร** Xylan + Rice bran agar (ดัดแปลงจาก มานิสา บุพตา, 2551)

6.1 Xylan from beechwood	5.00	กรัม
6.2 Rice bran	5.00	กรัม
6.3 Yest extract	5.00	กรัม
6.4 Peptone	5.00	กรัม
6.5 K_2HPO_4	0.10	กรัม
6.6 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.20	กรัม
6.7 Agar	15.00	กรัม
6.8 Distilled water	1.00	ลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร ปรับค่า pH เป็น 6.8-7.0 ด้วย HCl และ NaOH แล้วจึงต้มจนวุ้นละลายและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

7. **สูตรอาหาร** Nutrient Agar (NA)

7.1 Beef extract	3.00	กรัม
7.2 Peptone	5.00	กรัม
7.3 Agar	15.00	กรัม
7.4 Distilled water	1.00	ลิตร

ละลาย Beef extract 3 กรัม และ Peptone 5 กรัม ในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 1 ลิตร แล้วเติมผงวุ้น 15 กรัม ลงไป จากนั้นนำไปปรับค่า pH เป็น 6.8-7.0 ด้วย HCl และ NaOH แล้วจึงต้มจนวุ้นละลายและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที (หากต้องการเตรียม อาหาร Nutrient broth (NB) ก็ไม่ต้องเติมผงวุ้น)

8. **กลีเซอรอล** 25% (w/v) **สำหรับเก็บเชื้อแบคทีเรียที่** -20°C (ดัดแปลงจาก Guo, et al., 2010)

8.1 Glycerol	20.00	กรัม
8.2 MRS broth	80.00	มิลลิลิตร

เติม glycerol 20 กรัม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth 80 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ภาคผนวก ง สารเคมี

1. Phosphate buffer saline (PBS)

1.1 NaCl	80.00	กรัม
1.2 KCl	2.00	กรัม
1.3 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	14.40	กรัม
1.4 KH_2PO_4	2.40	กรัม
1.5 Distilled water	1.00	ลิตร

ละลาย PBS (Sigma, USA) 1 เม็ด ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที เก็บไว้ที่ตู้เย็น 4°C

2. **สีย้อม** Crystal violet

2.1 Crystal violet	20.00	กรัม
2.2 Ammonium oxalate	8.00	กรัม
2.3 95% Alcohol	200.00	มิลลิลิตร
2.4 Distilled water	800.00	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายแยกกัน ดังนี้

สารละลาย A เตรียมโดย ละลาย Crystal violet 20 กรัม ใน 95% Alcohol 200 มิลลิลิตร

สารละลาย B เตรียมโดย ละลาย Ammonium oxalate 8 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนจน Ammonium oxalate ละลายหมด

นำสารละลาย A และ B ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองใส่ในขวดสีชา เก็บไว้ที่ตู้เย็น 4°C

3. **สีย้อม** Safranine O

3.1 Safranine	2.50	กรัม
3.2 95% Alcohol	100.00	มิลลิลิตร
3.3 Distilled water	900.00	มิลลิลิตร

ละลาย Safranine 2.5 กรัม ใน 95% Alcohol 100 มิลลิลิตร ให้เข้ากันจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองใส่ในขวดสีชา เก็บไว้ที่ตู้เย็น 4°C

4. สีย้อม Iodine

4.1 Iodine	3.33	กรัม
4.2 Potassium iodine	6.66	กรัม
4.3 Distilled water	1.00	ลิตร

บด Iodine 3.33 กรัม และ Potassium iodine 6.66 กรัม ในโกร่งให้ละเอียด โดยในขณะที่บดค่อยๆ เติมน้ำกลั่นทีละน้อยจน Iodine ละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองใส่ในขวดสีชา เก็บไว้ที่ตู้เย็น 4°C

5. 0.85% NaCl

ละลาย NaCl 8.5 กรัม ในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

6. 0.2% NaCl

ละลาย NaCl 2 กรัม ในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

7. 10% $CaCl_2$

ละลาย $CaCl_2$ 100 กรัม ในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที