บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

อาหารหมักที่ใช้ในการทดลอง

อาหารหมักที่ใช้ในการทดลองได้แก่ แหนม โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากร้านค้าในอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (indicator organism)

Escherichia coli O157:H7, *Listeria monocytogenes* DMS 20600, *Streptococcus pneumoniae* DMS 5851, *Streptococcus pyogenes* ATCC 12384 และ *Salmonella typhi* ATCC 5784 เพาะเลี้ยงในอาหาร brain heart infusion (BHI) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Bacillus cereus ATCC 11778, *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736, *Pseudomonas aeroginosa* ATCC 27853 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Leuconostoc mesenteroides TISTR 473 เพาะเลี้ยงในอาหาร 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างแหนมเพาะเลี้ยงในอาหาร 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.1 การคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก

การคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินทำโดยใช้วิธี agar spot assay (Spelhaug and Harlander, 1989) ซึ่งมีวิธีการดังนี้ ชั่งตัวอย่างแหนม 1 กรัม ใส่ในถุงปลอดเชื้อที่มีสารละลาย phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำให้ตัวอย่างอาหารหมักกระจายตัวดีขึ้นด้วยเครื่องตีป่น (Seward stomacher 400) เป็นเวลา 5 นาที นำตัวอย่างมา cross streak บนอาหารแข็ง 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose MRS agar และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเทอาหารกึ่งแข็ง 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose MRS soft agar (0.7 เปอร์เซ็นต์ agar) ที่มีเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 ที่บ่มข้ามคืนทับบน

ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแลคติคแอสิดแบคทีเรียเจริญอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซิน โดยสังเกตจากบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นรอบๆโคโลนี เลือกโคโลนีดังกล่าวไปเก็บในอาหาร 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose MRS broth ที่มี glycerol 30 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การเตรียม culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียในอาหาร 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพไร้อากาศ นำเชื้อที่เจริญไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส (culture supernatant) ไว้ใช้ในการทดสอบต่อไป

3.3 การทดสอบความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี swab– paper disc

นำเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิดมาป้าย (swab) บนจานเลี้ยงเชื้อซึ่งบรรจุอาหารชนิดเดียวกันกับที่ใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบชนิดนั้น นำแผ่น paper disc ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร วางลงบนผิวหน้าอาหาร หยด culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น paper disc ปลอดเชื้อ นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นรอบๆ แผ่น paper disc

3.4 การศึกษาผลของแบคเทอริโอซินที่ทดสอบความทนต่อสภาวะต่างๆ ต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

3.4.1 การทนต่อเอนไซม์

นำ culture supernatant มาผสมกับเอนไซม์ชนิดต่างๆ โดยปรับให้เอนไซม์ proteinase K, trypsin, lysozyme, α-amylase, pepsin และ RNase มีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี swab-paper disc

3.4.2 การทนต่อความร้อน

นำ culture supernatant ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40, 60, 80, 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 30, 60 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี swab-paper disc

3.4.3 การทนต่อ pH

นำ culture supernatant มาปรับ pH ให้เท่ากับ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ด้วยสารละลาย NaOH หรือ HCl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี swab-paper disc

3.4.4 การทนต่อสารเคมีต่างๆ

นำ culture supernatant มาทดสอบด้วยการเติม toluene, acetone, acetic acid, 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol, isopropanol, chloroform, EDTA และ sodium dodecyl sulphate (SDS) โดยปรับให้สารเคมีต่างๆ มีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี swab-paper disc

3.5 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียในอาหาร 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose MRS broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 3 มิลลิลิตร แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกซึ่งมีปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปวัดค่า optical density (OD_{600}) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในขณะที่ส่วนที่สองซึ่งมีปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส (culture supernatant) ที่ได้ไปทำการเจือจางด้วย 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose MRS broth ในอัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 ตามลำดับ แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี swab-paper disc จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณค่า bacteriocin activity ในหน่วย AU/มิลลิลิตร

3.6 การทดสอบการเจริญของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียในสภาวะต่างๆ

3.6.1 การทนต่อสภาวะคล้ายกรดในกระเพาะอาหาร (artificial gastric juice)

เตรียม 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose MRS broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 2.5 นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแบ่งใส่ flask จำนวน 2 ขวด ปริมาตรขวดละ 50 มิลลิลิตร ขวดแรกเติม pepsin โดยปรับให้ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) เท่ากับ 1,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร อีกขวดใช้เป็น control (ไม่ต้องเติม pepsin) นำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่บ่มข้ามคืน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมลงในแต่ละ flask นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่า optical density (OD_{600}) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.6.2 การทนต่อสารละลายน้ำดี (bile acid)

เตรียม 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose MRS broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แบ่งใส่ flask จำนวน 2 ขวด ปริมาตรขวดละ 50 มิลลิลิตร ขวดแรกเติม bile acid ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) เท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ อีกขวดใช้เป็น control (ไม่ต้องเติม bile acid) นำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่บ่มข้ามคืน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมลงในแต่ละขวด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง นำไปวัดค่า optical density (OD_{600}) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.7 การศึกษาเซลล์ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscopy : SEM)

นำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่บ่มข้ามคืนเกลี่ยลงบนแผ่น nitrocellulose ทิ้งให้แห้ง นำตัวอย่างไปแช่ใน 4 เปอร์เซ็นต์ glutaraldehyde เป็นเวลา 3 ชั่วโมง dehydrate ด้วย 25, 30, 50, 75, 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol ครั้งละ 30 นาที และ 100 เปอร์เซ็นต์ ethanol อีก 2 ครั้งๆ ละ 30 นาที นำไปผ่านกระบวนการทำให้ตัวอย่างแห้ง (critical point drying : CPD) ด้วย liquid CO_2 ที่สภาวะ 313 องศาเซลเซียส 1,073 Ibs/In^2 ติดตัวอย่างลงบน stub แล้วนำไปผ่านกระบวนการ coating ด้วยทองคำ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด

3.8 การศึกษากลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (mode of action)

นำ culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 ที่บ่มข้ามคืนปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในช่วงเวลา 0, 60 และ 120 นาที ไปวัดค่า optical density (OD_{600}) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี plate count method

3.9 การตรวจหาตำแหน่งยีนที่สร้างแบคเทอริโอซิน

3.9.1 การสกัด plasmid (Anderson and Mckay, 1983)

นำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่บ่มข้ามคืนใส่ลงหลอดปั่นเหวี่ยงจำนวน 2 หลอด หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้ง supernatant และเติมสารละลายที่ 1 ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ลงในทั้ง 2 หลอด นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้ง supernatant และเติมสารละลายที่ 1 อีกครั้งปริมาตร 379 ไมโครลิตร ลงในหลอดแรก ผสมให้เข้ากันและดูดมาใส่อีกหลอด เติมสารละลาย lysozyme (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายที่ 2) ปริมาตร 97 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันพลิกหลอดกลับไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นเติมสารละลายที่ 3 ปริมาตร 48.2 ไมโครลิตร สารละลาย SDS (ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรในสารละลายที่ 4) ปริมาตร 27.6 ไมโครลิตร และสารละลาย RNase ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันพลิกหลอดกลับไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม NaOH ความเข้มข้น 3 M ปริมาตร 27.6 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ เป็นเวลา 9 นาที เติมสารละลายที่ 5 ปริมาตร 49.6 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ เป็นเวลา 3 นาที เติมสารละลายที่ 6 ปริมาตร 71.7 ไมโครลิตร แล้วเติม phenol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บ supernatant ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงใหม่ที่มี phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บ supernatant ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้ง supernatant และล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้ง supernatant และทำให้ตะกอนแห้งด้วยการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

จากนั้นเติมสารละลายที่ 7 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บสารละลาย DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หรือนำสารละลาย DNA ที่ได้มาศึกษาโดยวิธี agarose gel electrophoresis

3.9.2 Plasmid curing (Ruiz-Barba *et al.*, 1991)

นำเชื้อที่บ่มข้ามคืนของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose MRS broth และ ethidium bromide 3 หลอด โดยให้แต่ละหลอดมีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ของ ethidium bromide เท่ากับ 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง มา spread plate จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำ replica plate และนำ original plate มาเททับด้วย 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose MRS soft agar (0.7 เปอร์เซ็นต์ agar) ที่มีเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบและเก็บโคโลนีที่สูญเสียความสามารถในการยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเพื่อนำไปสกัด plasmid

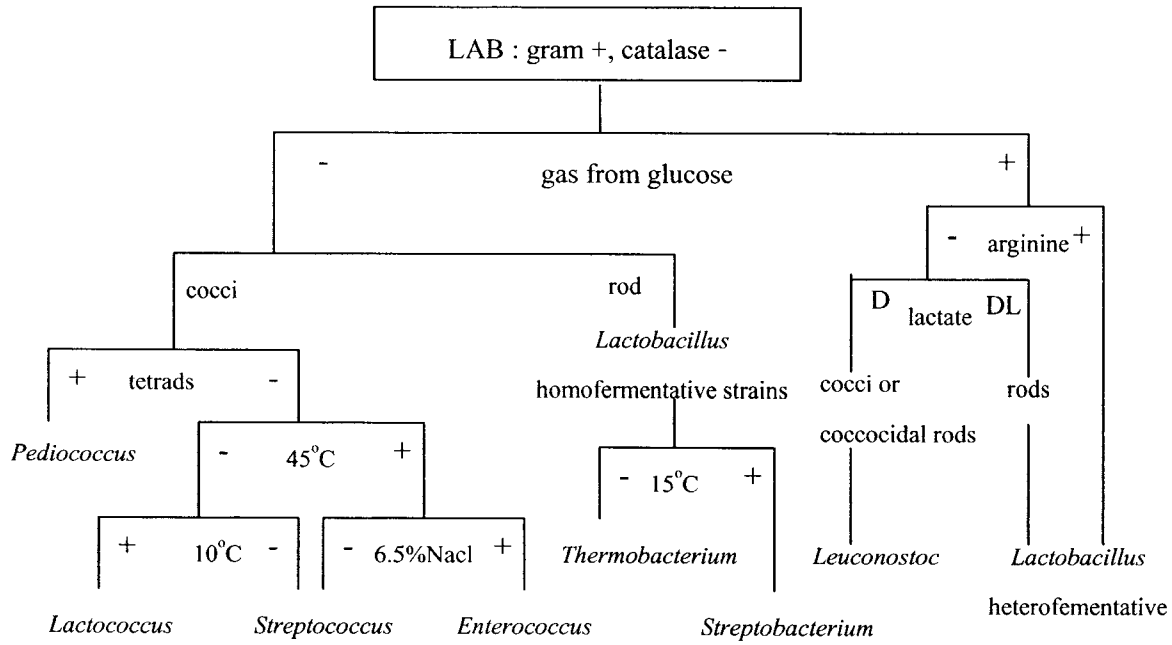
3.10 การทำให้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ (Yang *et al.*, 1992)

เลี้ยงเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียในอาหาร 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose MRS broth ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7 เพื่อทำให้แบคเทอริโอซินของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวสามารถจับกับ receptor บนผิวเซลล์ของตัวเองได้ จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไปล้างด้วย 5 mM sodium phosphate pH 6.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไปละลายด้วย 100 mM NaCl pH 2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมสารละลายโดยใช้ magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บ supernatant ที่มีแบคเทอริโอซินละลายอยู่และนำแบคเทอริโอซินไปเพิ่มความเข้มข้นโดยเครื่อง speed vac จากนั้นนำตัวอย่างไปหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินโดยวิธี Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Tricine-SDS-PAGE) เตรียม separating gel ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ stacking gel ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ รอจนกระทั่ง gel แข็งตัว นำตัวอย่างสารละลายแบคเทอริโอซินที่บริสุทธิ์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 2X loading buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึง

นำไปหยอดลงในช่องบนแผ่น polyacrylamide gel ที่เตรียมไว้ และปล่อยให้แบคเทอริโอซินวิ่งผ่าน polyacrylamide gel ในสภาวะที่มีค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ 200 โวลท์ เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำแผ่น polyacrylamide gel ไปย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue R-250 และล้างสีส่วนที่เกินออกด้วย destaining solution ทำการเปรียบเทียบระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบแบคเทอริโอซินกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (protein marker) เพื่อคาดคะเนน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซิน

3.11 การตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 ในระดับสกุล

นำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 มาศึกษาลักษณะต่างๆ เพื่อจัดจำแนกชนิดในระดับสกุล ซึ่งมีวิธีการทดสอบดังนี้ การย้อมสีแกรม รูปร่างลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์ การสร้างก๊าซจากกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส การสร้างเอนไซม์คะตะเลส การเจริญที่อุณหภูมิ 10, 15 และ 45 องศาเซลเซียส การเจริญในอาหารที่มีส่วนผสมของ NaCl 6.5 เปอร์เซ็นต์ และการทดสอบ arginine hydrolysis จากนั้นนำผลที่ได้ไปเทียบเคียงชนิดของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียตามวิธีการของ Schillinger and Lucke. (1989)



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการระบุสายพันธุ์ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

ที่มา : Schillinger and Lucke (1989)