

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารเคมี (reagents) ที่ใช้ในการทดสอบ

1. 3 % Hydrogen peroxide solution

H_2O_2	3.0 ml (คำนวณจากฉลากข้างขวด)
H_2O	100.0 ml

2. Kovac ' s solution

Para - dimethyl - amino benzaldchde	5.0 g
Amyl or butyl alcohol	75.0 ml
HCl , concentrate	25.0 ml

ผสม Para - dimethyl - amino benzaldchde กับ alcohol ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 - 60 °C เป็นเวลา 5 นาที ขณะปล่อยให้เย็น ริน HCl ลงไป เขย่าให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา ใส่ไว้ในตู้เย็น

3. Methyl red solution

Methyl red	0.8 g
Ethanol 95 %	300.0 ml
น้ำกลั่น	200.0 ml

ละลายสี methyl red ใน 95 % ethanol แล้วจึงเติมน้ำกลั่น

4. Lugol ' s iodine solution

Iodine	5.0 g
KI	10.0 g
น้ำกลั่น	100.0 ml

ละลาย KI ในน้ำจนหมด แล้วจึงค่อย ๆ เติมผลึกไอโอดีนลงไปจนละลายหมด

5. Nitrate test solution

Solution A :

Sulphanilic acid 0.8 g

5 N. acetic acid 100.0 ml

ละลาย sulphanilic acid ใน 5 N. acetic acid โดยใช้ความร้อนช่วย

Solution B :

N, N dimethyl - 1 - naphthylamin

6. Tetra - methyl - para - phenylene diamine hydrochloride solution

Tetra - methyl - p - phenylene diamine hydrochloride 10.0 g

น้ำกลั่น 100.0 ml

ละลาย Tetra - methyl - p - phenylene diamine hydrochloride ในน้ำกลั่น นำสารละลายใส่ขวดสีชา เก็บในตู้เย็น ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ใช้ในการทดสอบไม่ได้

7. Voges - Prokauer test solution

Solution A :

Alpha naphthol 10.0 g

Ethanol 95 % 100.0 ml

ละลาย alpha naphthol ใน 95% ethanol เก็บในขวดสีชา

Solution B :

KOH 20.0 g

น้ำกลั่น 100.0 ml

ละลาย KOH ในน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา

8. Bromthymol blue solution

Bromthymol blue 1.6 g

Ethyl alcohol 100.0 ml

ภาคผนวก ข

สูตรอาหารที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรีย

* อาหารทุกสูตรใช้ผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร

1. **Nutrient agar**

Beef extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Agar	15.0 g

2. **Potato dextrose agar**

มันฝรั่ง	200 g
Dextrose	20 g
Agar	15 g

3. **Motility test medium**

Tryptone	10.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Agar	5.0 g

4. **Hugh and Leifson's O.F. medium**

Basal medium ประกอบด้วย	
Peptone	2.0 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
NaCl	5.0 g
Agar	3.0 g
Bromthymol blue 0.2 % aq. sol	15.0 g

ละลายส่วนประกอบ basal medium แล้วปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.1 เติม bromthymol blue 1.6 % จำนวน 4 มิลลิลิตร ลงไปเป็น indicator เติม glucose 10 กรัม ผสมลงในอาหาร สีของอาหารจะเป็นสีเขียวแกมน้ำเงิน บรรจุใส่หลอดทดสอบประมาณ 6-7 มิลลิลิตร นำไปนั่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

5. Nitrate broth (Difco)

Bacto - Beef extract	3.0 g
Bacto - peptone	5.0 g
Potassium nitrate	1.0 g

6. Christensen ' s urea medium

Basal medium ประกอบด้วย	
Peptone	1.0 g
Glucose	1.0 g
KH_2PO_4	2.0 g
NaCl	5.0 g
Agar	20.0 g

ต้มส่วนผสมทั้งหมดจนละลาย ปรับ pH ให้เป็น 6.8-6.9 เติม 0.04 % phenolred 20 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นประมาณ 52 °C แล้วเติมสารละลายยูเรียที่มีความเข้มข้น 20 % ซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองแล้ว ลงไป 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วดูอาหารดังกล่าวใส่หลอดทดสอบและนำไปวางทำ slant

7. Nutrient gelatin medium

Beef extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Gelatin	120.0 g

8. Simmon ' s citrate agar (Difco)

MnSO_4	0.2 g
$(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$	1.0 g
K_2HPO_4	1.0 g
NaCl	5.0 g
Sodium citrate	2.0 g
Bacto - Bromthymol blue	0.08 g
Bacto - Agar	15.0 g
pH 6.8	

9. Tryptone broth

Tryptone	10.0 g
----------	--------

10. MR - VP medium (Difco)

Buffered Peptone	7.0 g
------------------	-------

Dipotassium Phosphate	5.0 g
-----------------------	-------

Bacto - Dextrose	5.0 g
------------------	-------

pH 6.9

11. Starch agar

Beef extract	3.0 g
--------------	-------

Peptone	5.0 g
---------	-------

Potato starch	10.0 g
---------------	--------

Agar	15.0 g
------	--------

12. Malonate broth (Difco)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0 g
------------------------------	-------

K_2HPO_4	0.6 g
--------------------------	-------

KH_2PO_4	0.4 g
--------------------------	-------

NaCl	2.0 g
------	-------

Sodium Malonate	3.0 g
-----------------	-------

Bacto - Bromthymol blue	0.025 g
-------------------------	---------

pH 6.7

13. TSI agar (Difco)

Bacto - Beef extract	3.0 g
----------------------	-------

Bacto - Yeast extract	3.0 g
-----------------------	-------

Bacto - Peptone	15.0 g
-----------------	--------

Proteose - Peptone	5.0 g
--------------------	-------

Bacto - Lactose	10.0 g
-----------------	--------

Saccharose	10.0 g
------------	--------

Bacto - Dextrose	1.0 g
------------------	-------

Ferrous sulfate	0.2 g
-----------------	-------

Sodium chloride	5.0 g
-----------------	-------

Sodium thiosulfate	0.3 g
Bacto - Phenol red	0.024 g
Bacto - Agar	12.0 g
pH 7.4	

14. Aesculin hydrolysis medium

Aesculin	10.0 g
Glucose	2.5 g
Ferric citrate	0.5 g
Beef extract	5.0 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.1 g
Agar	1.5 g
Yeast extract	5.0 g
Tween 80	1.0 ml

15. Fermentation Carbohydrate medium

Beef extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
น้ำตาล	10.0 g
Bromthymol blue 1.6 %	4.0 ml
pH 6.8-7.0	

การเตรียมน้ำตาลแต่ละชนิด ควรเตรียมหลอดทดสอบที่ใส่หลอดคักก๊าซไว้แล้วไปอบเชื้อที่อุณหภูมิ 180° C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงเตรียมน้ำตาลใส่หลอดละประมาณ 6 ml แล้วนำมาเชื้อด้วยความดันไอน้ำเพียง 10 ปอนด์ เป็นเวลา 10 นาที รีบยกออกมาแช่ในน้ำเย็น ทั้งนี้เพื่อป้องกันน้ำตาลแตกตัว เพราะจะเสียคุณสมบัติของน้ำตาลแต่ละชนิดไป

ภาคผนวก ก

การย้อมสีแบบกรัม (Gram's stain)

1. ทำความสะอาดสไลด์ และเช็ดให้แห้ง
2. เกลี่ยเชื้อบนสไลด์ที่เตรียมไว้ และตรึงเซลล์ด้วยความร้อน
3. หยดสี crystal violet ให้ทั่วรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ 1 นาที
4. ล้างสีออกด้วยน้ำสะอาด แล้วหยดสารละลายไอโอดีนให้ทั่วรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ 1 นาที
5. เทสารละลายไอโอดีนออก แล้วชะด้วย decolorized (สารละลายแอลกอฮอล์ 95% หรือ แอลกอฮอล์อะซีโตน) เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำสะอาดทันที และซับด้วยกระดาษซับ
6. ย้อมทับด้วยการหยดสี safranin O ให้ทั่วรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ 1 นาที (รูป 22)
7. ล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วซับด้วยกระดาษ วางทิ้งไว้ให้แห้ง
8. ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

Gram stain technique

Step	Microscopic Appearance of Cell		Chemical Reaction in Cell Wall (very magnified view)	
	Gram (+)	Gram (-)	Gram (+)	Gram (-)
1. Crystal violet				
2. Gram's iodine				
3. Alcohol				
4. Safranin (red dye)				

รูป 22 เทคนิคการย้อมสีแบบกรัม (ที่มา : Anonymous6, No date)

ภาคผนวก ง

วิธีการที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรีย

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โดยการสังเกตรูปร่างของแบคทีเรียจากกล้องจุลทรรศน์และจากการย้อมสี เพื่อดูรูปร่างของแบคทีเรียว่า กลม เป็นท่อน หรือเป็นเกลียว การจัดเรียงตัวของเซลล์และขนาด การติดสีกรัม ย้อมดูสปอร์ว่ามีหรือไม่ อยู่ที่ตำแหน่งใดของเซลล์ ขนาดและรูปร่างสปอร์ ตลอดจนสปอร์ทำให้เซลล์โป่งออกหรือไม่

2. การศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่

ตรวจสอบโดยการนำเชื้อแบคทีเรียอายุประมาณ 24 ชั่วโมง มา stab ลงในอาหาร motility test บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C หรือที่อุณหภูมิห้องนาน 24 - 48 ชั่วโมง ถ้าเชื้อกระจายไปจากแนวที่ stab ไว้ แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการเคลื่อนที่

3. การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ catalase

หยด 3% H_2O_2 ลงบนแผ่น slide ที่สะอาดและแห้ง เชื้อเชื้อที่จะทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง มา 2 loopful แต่ละลงในหยดของ H_2O_2 เชื้อผสมให้เข้ากัน ถ้าเกิดฟองแก๊สขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ catalase แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก (รูป 23)

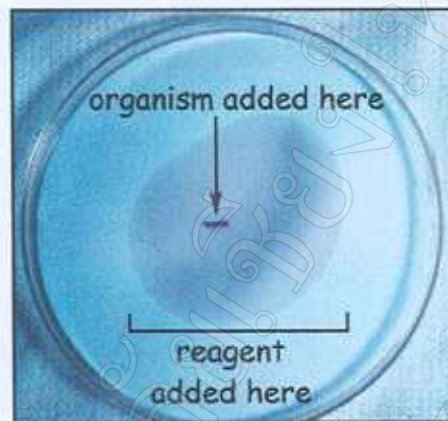


รูป 23 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ catalase

(ที่มา : Anonymous1, 1995)

4. การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ oxidase

หยด 1% tetramethyl paraphenylene diamine hydrochloride ลงบนกระดาษกรองให้ซึมพอหมาด ๆ ใช้แท่งแก้วแตะเชื้อจาก nutrient agar slant อายุ 24 ชั่วโมง ถากบนกระดาษกรองดังกล่าว ถ้ามีสีม่วงเข้มเกิดขึ้นตามรอยลากแสดงผลการทดสอบเป็นบวก คือ เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ oxidase (รูป 24)

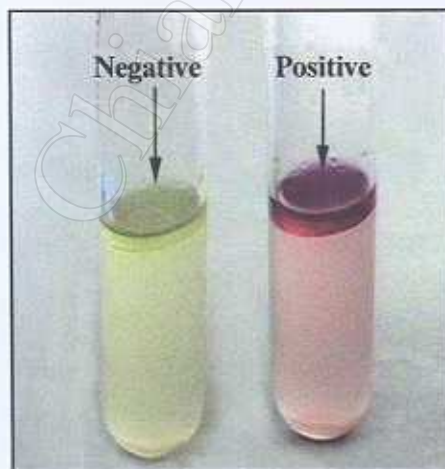


รูป 24 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ oxidase

(ที่มา : Roger and Bruce, 2001)

5. ทดสอบความสามารถในการสร้างอินโดล

นำเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบ ไปเลี้ยงใน tryptone broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง หยด kovac 's reagent ลงไป 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน ค้างทิ้งไว้ ถ้าเกิดชั้นสีแดงลอยอยู่ในชั้นแอลกอฮอล์ แสดงว่าแบคทีเรียชนิดนั้นสามารถสร้างอินโดลได้ (รูป 25)



รูป 25 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการสร้างอินโดล

(ที่มา : Anonymous3, 2000)

6. การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ urease

เชื้อเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง จาก nutrient agar slant ลงบน Christensen 's urea agar slant ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพูแสดงว่า เชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ urease แสดงผลการทดสอบเป็นบวก (รูป 26)



รูป 26 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ urease

(ที่มา : Neal and Betty Cox, 1997)

7. การทดสอบคุณสมบัติในการย่อยแป้ง

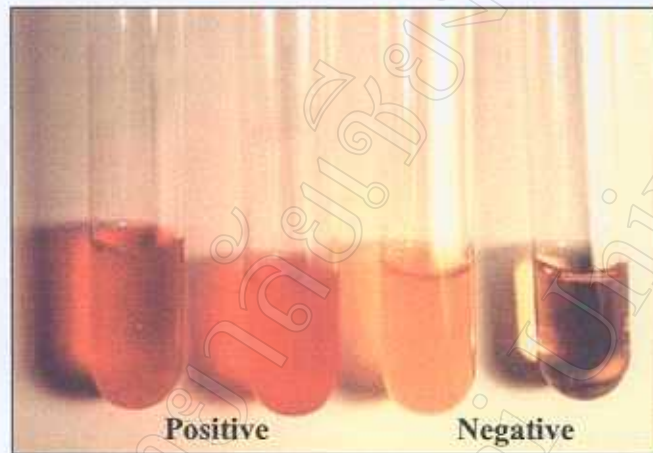
ใช้เชื้ออายุ 24 ชั่วโมง มาเลี้ยงในอาหารที่มี 0.2% soluble starch บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน หลังจากนั้นหยด Lugol 's iodine 2-3 หยด อ่านผลทันที ถ้าไม่มีการเปลี่ยนสีแสดงผลการทดสอบเป็นบวก คือเชื้อแบคทีเรียสามารถย่อยแป้งได้ ถ้าเป็นสีน้ำเงินแสดงว่าผลการทดสอบเป็นลบ

8. การทดสอบความสามารถในการผลิต H_2S

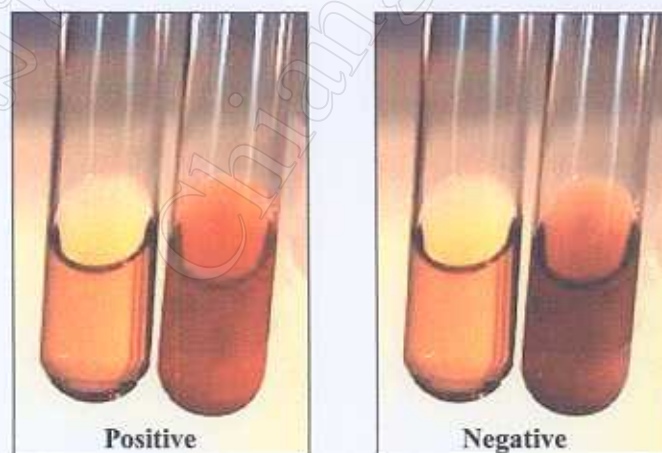
ถ่ายเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง เามาทดสอบโดย stab ลงในหลอดอาหาร TSI agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบทุกวันจนครบ 5 วัน โดยดูการเปลี่ยนสีของอาหาร ถ้าเกิดสีดำของเฟอร์รัสซัลไฟด์ตามรอยที่ stab แสดงผลการทดสอบเป็นบวก คือแบคทีเรียผลิต H_2S ได้

9. การทดสอบ methyl red และ acetoin (MR - VP)

เชื้อเชื้อลงในอาหาร MR - VP medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน ทดสอบโดยการหยด methyl red solution ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก ส่วนการทดสอบ acetoin ให้หยด 10% α -naphthol ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วเติม KOH 20% ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ ถ้ามีสีแดงหรือเกิดชั้นแสดงว่าผลเป็นบวก (รูป 27 และ 28)



รูป 27 แสดงผลการทดสอบ methyl red (ที่มา : Anonymous7, No date)



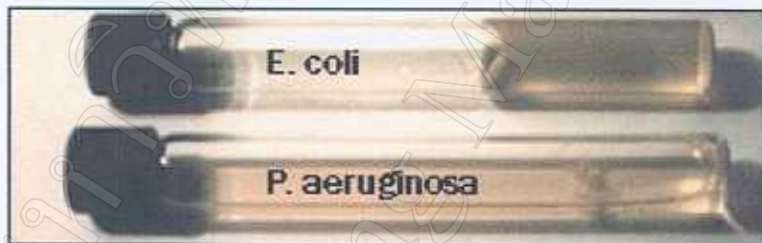
รูป 28 แสดงผลการทดสอบ Voges - Proskauer (ที่มา : Anonymous7, No date)

10. การทดสอบ oxidation - fermentation (O - F test)

นำเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบอายุประมาณ 24 ชั่วโมง มา stab ในอาหาร Hugh and Leifson 's O-F medium 2 หลอด หลอดหนึ่งทำให้อยู่ในสภาพขาดอากาศโดยเททับผิวหน้าอาหารด้วยพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้ว ให้หนาประมาณ 2 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง ส่วนอีกหลอดไม่ต้องเติมอะไร ตรวจสอบโดยดูว่าเกิดกรดในหลอดอาหารในสภาพที่มีอากาศหรือไม่มีอากาศหรือทั้งสองสภาพ ถ้าเกิดในหลอดที่เททับด้วยพาราฟินและไม่แสดงว่าเป็น fermentation แต่ถ้าเกิดเฉพาะในหลอดที่ไม่ได้เทพาราฟิน แสดงว่าเป็น oxidation การเกิดกรดแสดงให้เห็นทราบโดยการเปลี่ยนสีจากเขียวเป็นเหลือง

11. การทดสอบคุณสมบัติในการย่อยเจลาติน

เชื้อเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหาร nutrient gelatin บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นตรวจสอบการเหลว โดยเอาหลอดเลี้ยงเชื้อไปบ่มไว้ในตู้เย็น เป็นเวลา 30 นาที แล้วเอาออกมาดูการเหลว เชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยเจลาตินได้ จะทำให้อาหารไม่แข็งที่อุณหภูมิ 20 °C แสดงว่าผลเป็นบวก ถ้าอาหารยังแข็งอยู่แสดงว่าผลเป็นลบ (รูป 29)



รูป 29 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติในการย่อยเจลาตินของเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa*
(ที่มา : Anonymous5, No date)

12. การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท

เชื้อเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบในอาหาร nitrate broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง ทดสอบโดยหยด sulfanilic acid และ α - naphthylamine ถ้าเกิดสีแดงปนตะกอน แสดงผลการทดสอบเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีแดงเติมผงสังกะสีลงไป ถ้าเกิดสีแดงขึ้นผลเป็นลบ แต่ถ้าไม่เกิดสีเนื่องจากไนเตรทถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรท์และแก๊สไนโตรเจนโดยแบคทีเรีย แสดงว่าผลเป็นบวก

13. การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

เชื้อเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบในอาหาร nutrient agar slant หรือใน nutrient broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่ต้องการทดสอบ ตรวจสอบผลทุกวันจนครบ 7 วัน สังเกตการเจริญโดยดูจากรอย streak หรือ วัดความขุ่น

14. การทดสอบความสามารถในการใช้ malonate เป็นแหล่งคาร์บอน

เชื้อเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 - 48 ชั่วโมง ลงในอาหาร malonate broth บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลเป็นบวกละลบล้างให้ปฏิกิริยาเป็นด่าง โดยอาหารจะเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีฟ้าเข้ม แสดงว่าเชื้อนั้นสามารถใช้มาโลเนตเป็นแหล่งคาร์บอนได้

15. การทดสอบการใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ streak บนอาหาร Simmon ' s citrate agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าเชื้อนั้นสามารถใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (รูป 30)



รูป 30 แสดงผลการทดสอบการใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน

(ที่มา : Anonymous2, 1995)

16. การไฮโดรไลส์ aesculin

เลี้ยงเชื้อในอาหาร Aesculin hydrolysis แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 - 14 วัน ตรวจสอบโดยสังเกตดูการเกิดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาขึ้น เนื่องจากเชื้อไฮโดรไลส์ aesculin เป็น aesculetin ได้ แสดงผลการทดสอบเป็นบวก

17. การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตบางชนิด

การทดสอบทำโดยใช้เชื้ออายุ 24 - 48 ชั่วโมง ปริมาณ 1 loopful ลงในหลอดอาหารทดสอบ ตรวจสอบการเกิดแก๊สในหลอดคักแก๊ส และการเกิดกรดจากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์จากม่วงเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อนี้สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลชนิดนั้นได้ (รูป 31)



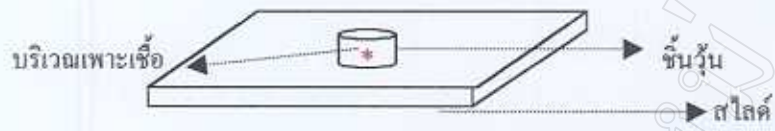
รูป 31 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตบางชนิด

(ที่มา : Margie, 1998)

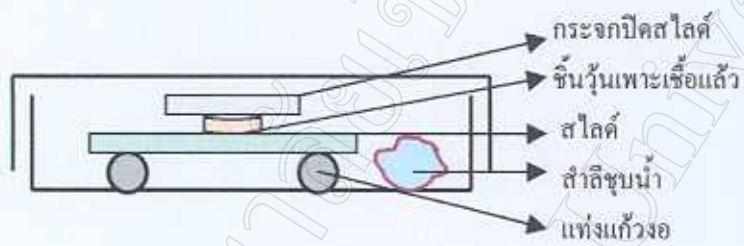
ภาคผนวก จ

เทคนิคการทำ slide culture

1. เตรียมสไลด์ กระจกปิดสไลด์ และแท่งแก้วอ ใส่ในจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อที่ 150°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
2. เทอาหาร PDA ลงในจานเพาะเชื้อให้ระดับอาหารสูงประมาณ 2 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้เย็น และผิวน้ำอาหารแห้ง
3. ใช้ cork borer ขนาด 0.5 มิลลิเมตร จุ่มแอลกอฮอล์ 95% เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อแล้วเจาะอาหาร PDA เป็นชิ้น ๆ
4. ใช้มีดขยี้ชิ้นที่เจาะเป็นชิ้น มาวางตรงกลางสไลด์ในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ ข้อ 1.
5. ใช้ loop เขี่ยรา มาแตะที่ขอบ 4 ด้านของชิ้นนั้น
6. ใช้ forceps จุ่มแอลกอฮอล์ 95% เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อ แล้วคีบกระจกปิดสไลด์วางปิดชิ้นนั้น ซึ่งปลูกเชื้อแล้ว
7. คีบก้อนสำลีที่ชุ่มด้วยน้ำกลั่นมาเชื้อ ใส่ในจานเพาะเชื้อ เพื่อให้ความชื้น
8. ป่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเส้นใยของราเจริญจนถึงขอบของกระจกปิดสไลด์ (รูป 32)
9. ตรวจสอบโครงสร้างของรากับกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10X และ 40X โดยการทำ wet mount และย้อมด้วย lactophenol cotton blue



ก แสดงตำแหน่งที่ปลูกเชื้อราบนชิ้นวุ้นซึ่งวางอยู่ตรงกลางสไลด์



ข แสดงจานเพาะเชื้อพร้อมสไลด์เพาะเลี้ยงเชื้อที่ทำสมบูรณ์แล้ว



รูป 32 เทคนิคการทำ slide culture

ภาคผนวก จ

การคำนวณจำนวนเซลล์ โดยการตรวจนับด้วย Haemocytometer

ปริมาตรใน 25 ช่องใหญ่ (400 ช่องเล็ก) = 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องใหญ่ = X เซลล์

สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องเล็ก = Y เซลล์ ($X = 16 Y$)

ใน 0.1 mm^3 มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด $X \times 25$

หรือ $Y \times 16 \times 25$ เซลล์

ใน 1 mm^3 มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด $X \times 25 \times 10$

หรือ $Y \times 16 \times 25 \times 10$ เซลล์

ใน 1 ml มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด $X \times 25 \times 10 \times 10^3$

หรือ $Y \times 16 \times 25 \times 10 \times 10^3$ เซลล์

$= 25 X \times 10^4$ หรือ $4Y \times 10^6$ เซลล์

เพราะฉะนั้น 1 ml มีจำนวนเซลล์ $= 25 X \times 10^4$

ภาคผนวก ข

การเตรียมความขุ่นของแบคทีเรีย

Mc Farland Nephelometer Standards (Baron and Finegold, 1990)

	Tube Number										
	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9
Approx. cell density ($\times 10^8$ /ml)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

- * ส่วนผสมของ 0.048 M BaCl_2 (1.175% w / v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) และ 0.36 M H_2SO_4 (1% v / v) ผสม 0.048 M BaCl_2 และ 0.36 M H_2SO_4 ตามอัตราส่วนที่กำหนด เก็บไว้ในหลอดฝาเกลียวขนาด 16 × 150 mm เมื่อต้องการใช้ให้เขย่าหลอด จะเกิดความขุ่นเทียบได้กับ Mc Farland เบอร์ต่างๆ

ภาคผนวก ข

ผลการจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์

การจัดจำแนกยีสต์

รวบรวมยีสต์จากนมพาสเจอร์ไรซ์และโยเกิร์ตที่หมดอายุ และที่เปิดทิ้งไว้ ได้จำนวน 12 ไอโซเลท เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการสังเกตรูปร่าง ขนาด การจัดเรียงตัวของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์และนำมาตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเป็นยีสต์ 3 ชนิด (ตาราง 20, 21 และ รูป 33)

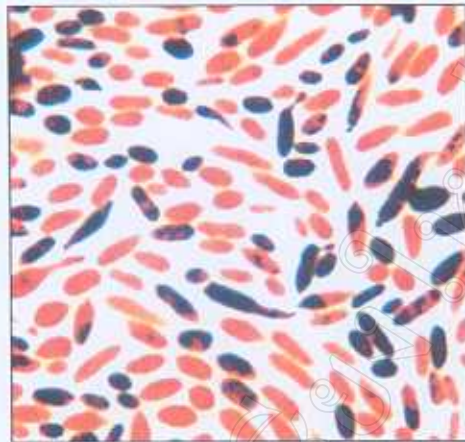
ตาราง 20 ไอโซเลทของยีสต์ที่รวบรวมจากนมพาสเจอร์ไรซ์และโยเกิร์ต

ชนิด	ไอโซเลท
Yeast 1	PS P e3, PS P e6
Yeast 2	PS W e2, PS W o6
Yeast 3	YF O o1, YF O o3, YF MB o1, YF MB o2, YF MB o4, YD BB o1, YD BB o2, YF M o1

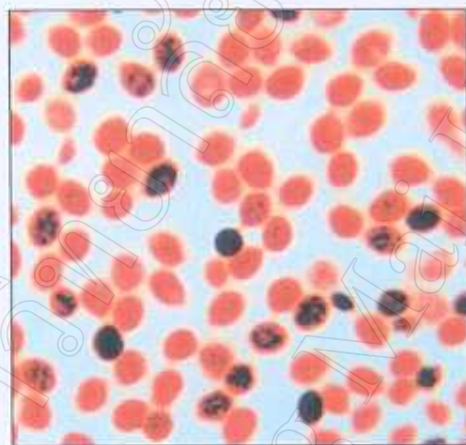
ตาราง 21 ลักษณะโคโลนีของ Yeast 1, Yeast 2 และ Yeast 3 บนอาหาร PDA

No	ลักษณะของโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารวุ้น					
	Shape	Color	Elevation	Surface	Edge	Optical
Yeast 1	Circular	White	Pulvinate	Smooth , Moist	Entire	Opaque , Glistening
Yeast 2	Circular	Pink – Red	Convex	Smooth , Moist	Entire	Opaque , Glistening
Yeast 3	Circular	White	Convex	Smooth , Moist	Entire	Opaque , Glistening

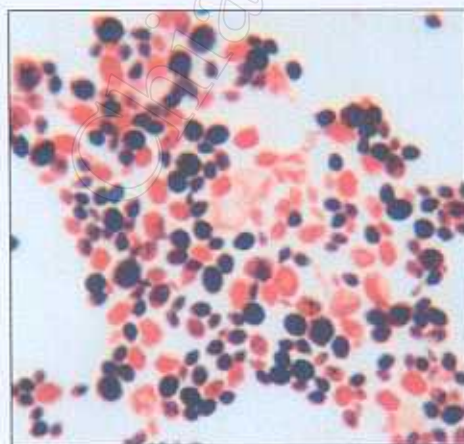
Yeast 1



Yeast 2



Yeast 3



รูป 33 ลักษณะของ Yeast 1, Yeast 2 และ Yeast 3 ได้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100 X

การจัดจำแนก

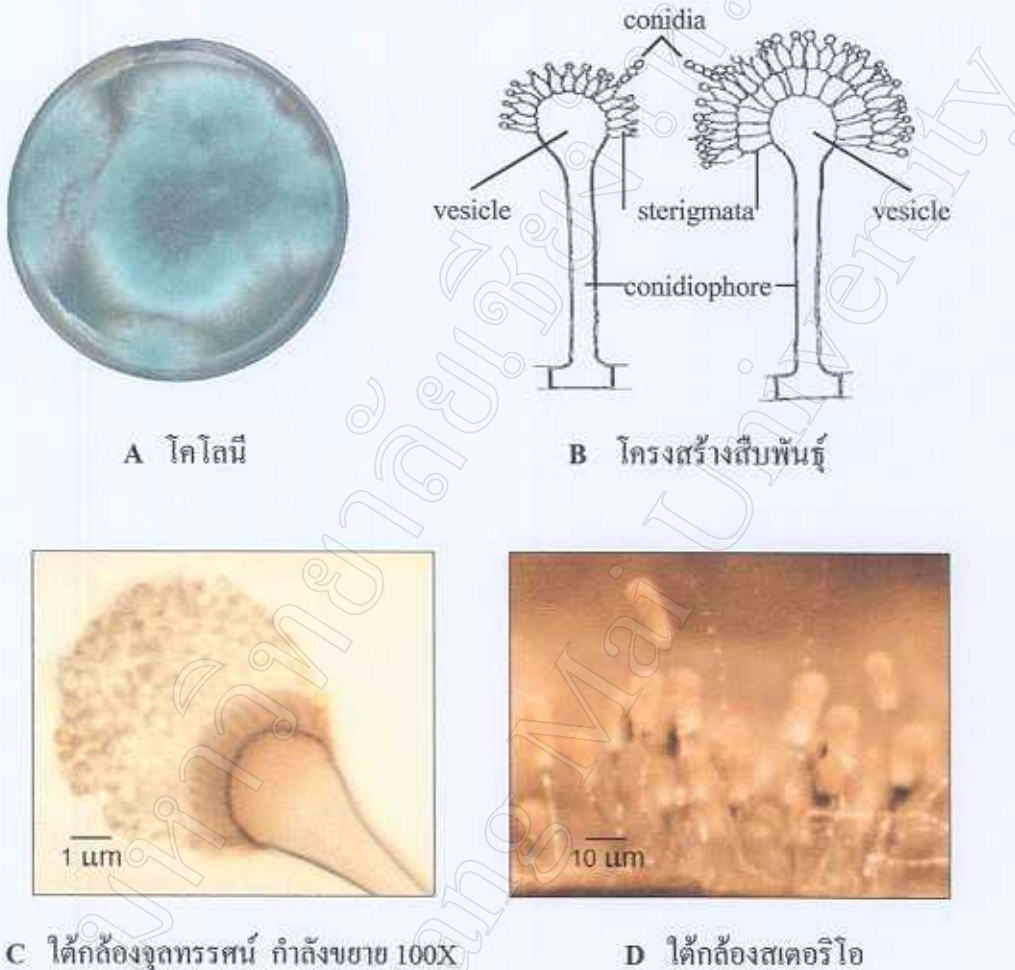
แยกเชื้อราจากนมพาสเจอร์ไรซ์และโยเกิร์ตที่เปิดตั้งทิ้งไว้ ได้จำนวน 10 ไอโซเลต (ตาราง 22) นำมาจัดจำแนกตาม The Genera of Fungi Sporulating in Pure culture (von Arx, 1981) Introductory Mycology (Alexopoulos *et al.*, 1996) และ Dictionary of The Fungi (Hawksworth *et al.*, 1995) ด้วยเทคนิคการทำ slide culture พบว่าเป็น *Aspergillus* spp. 2 ชนิด (รูป 34 และ 35) *Penicillium* spp. 2 ชนิด (รูป 36 และ 37) และ *Cladosporium* spp. 2 ชนิด (รูป 38 และ 39)

ตาราง 22 ไอโซเลตของเชื้อราที่รวบรวมจากนมพาสเจอร์ไรซ์และโยเกิร์ต

ชนิด	ไอโซเลต
<i>Aspergillus</i> 1	YD C ๐1 , PS W ๐8 , PS P ๐6
<i>Aspergillus</i> 2	YD C ๐3 , PF LF ๐3
<i>Penicillium</i> 1	PS P ๐1
<i>Penicillium</i> 2	PM HL ๐2 , PS P ๐7
<i>Cladosporium</i> 1	PF P ๐1
<i>Cladosporium</i> 2	PS W ๐9

รหัส YD C 01 , PS W 08 และ PS P 06

โคโคนีสีเขียว สร้างสปอร์เป็นพวงสีเขียวมะกอก เส้นใยมีผนังกันตามขวาง โคนิดิโอฟอร์ สีเขียวใส ตั้งตรง ไม่แตกแขนง vesicle พองออกเป็นรูปกระบอก มีขนาด $5.0-7.5 \times 7.5-20.0$ ไมโครเมตร โคนิเดียมกลมสีเขียวใส มีขนาดประมาณ 2.5 ไมโครเมตร (รูป 34)



รูป 34 ลักษณะของ *Aspergillus* sp. 1

สามารถลำดับขั้นทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้

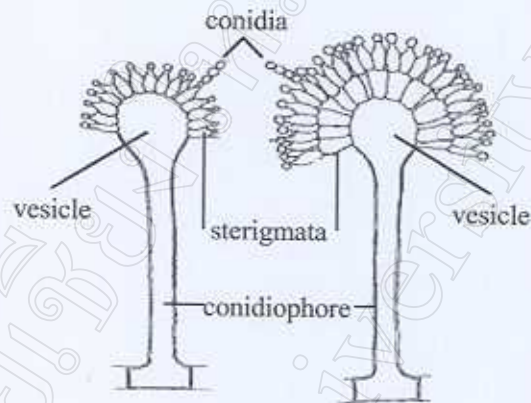
Division	<i>Eumycota</i>
Subdivision	<i>Deuteromycota</i>
Class	<i>Hyphomycetes</i>
Order	<i>Moniliales</i>
Family	<i>Moniliaceae</i>
Genus	<i>Aspergillus</i>

รหัส YD C o3 และ PF LF o3

โคโลนีสีเขียว สร้างสปอร์เป็นผนังเซลล์สีเขียวมรกต เส้นใยมีผนังกันตามขวาง โคนิดิโอฟอร์ สีเขียวใส ตั้งตรง ไม่แตกแขนง vesicle พองออกเป็นรูปกระบอก ไม่มี metulae มีขนาด 5.0-7.5 x 7.5-20.0 ไมโครเมตร โคนิเดียกลมสีเขียวใส มีขนาดประมาณ 2.5 ไมโครเมตร (รูป 35)



A โคโลนี



B โครงสร้างสืบพันธุ์



C ใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100X



D ใต้กล้องสเตอริโอ

รูป 35 ลักษณะของเชื้อรา *Aspergillus* sp. 2

สามารถลำดับขั้นทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้

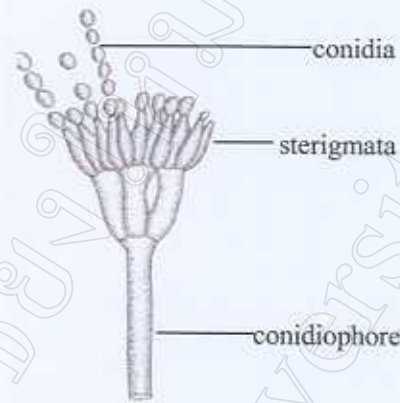
Division	<i>Eumycota</i>
Subdivision	<i>Deuteromycota</i>
Class	<i>Hyphomycetes</i>
Order	<i>Moniliales</i>
Family	<i>Moniliaceae</i>
Genus	<i>Aspergillus</i>

รหัส PSP 01

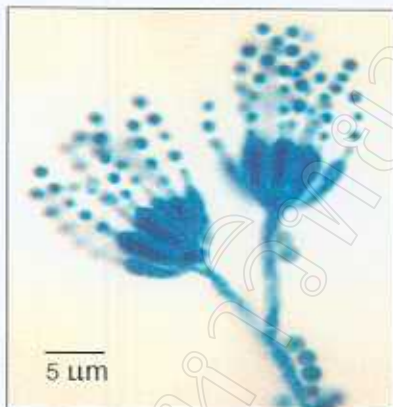
โคนิดิโอฟอร์ยาวตรง แดกกิ่งก้านคล้ายแปรง sterigmata เกิดอยู่ที่ส่วนปลายของเส้นใย
โคยตรง (ไม่มี vesicle) โคนิเดียรูปร่างกลม ต่อกันเป็นสายยาว เกิดอยู่ที่ปลาย sterigmata



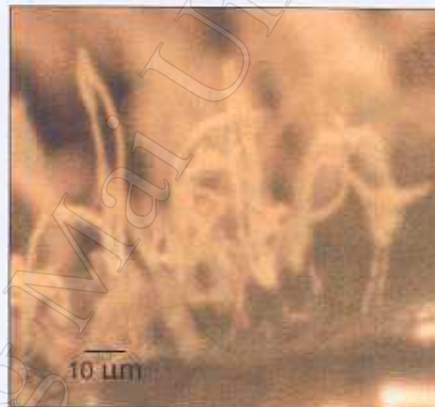
A โคนิเดีย



B โครงสร้างสืบพันธุ์



C ใ้ก่ด้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100X



D ใ้ก่ด้องสเตอริโอ

รูป 36 ลักษณะของ *Penicillium* 1

สามารถลำดับชั้นทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้

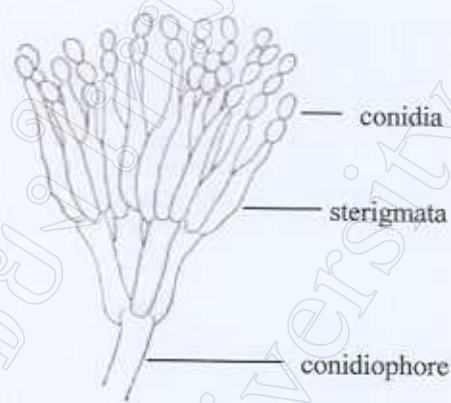
Division	<i>Eumycota</i>
Subdivision	<i>Deuteromycota</i>
Class	<i>Hyphomycetes</i>
Order	<i>Moniliales</i>
Family	<i>Moniliaceae</i>
Genus	<i>Penicillium</i>

รหัส PM HL o2 และ PS P o7

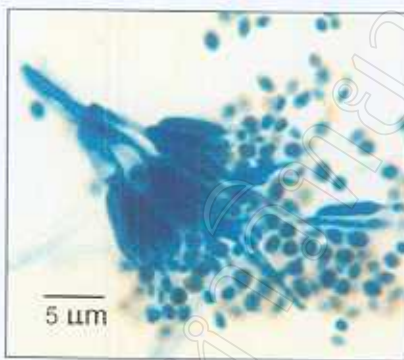
โคนิโดฟอร์ยาวตรง แดกกิ่งก้านคล้ายแปรง sterigmata เกิดอยู่ที่ส่วนปลายของเส้นใย
โคขตรง (ไม่มี vesicle) โคนิเคิรูปร่างกลม ต่อกันเป็นสายยาว เกิดอยู่ที่ปลาย sterigmata



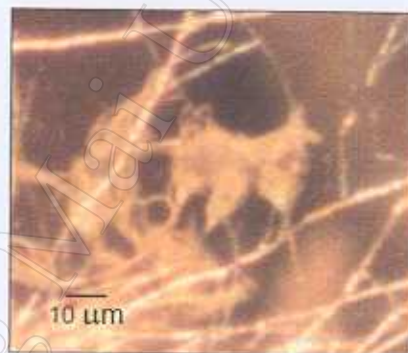
A โคโลนี



B โครงสร้างสืบพันธุ์



C ได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100X



D ได้กล้องสเตอริโอ

รูป 37 ลักษณะของ *Penicillium* 2

สามารถลำดับขั้นทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้

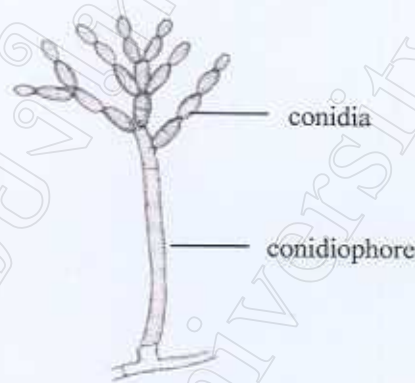
Division	<i>Eumycota</i>
Subdivision	<i>Deuteromycota</i>
Class	<i>Hyphomycetes</i>
Order	<i>Moniliales</i>
Family	<i>Moniliaceae</i>
Genus	<i>Penicillium</i>

รหัส PF P 01

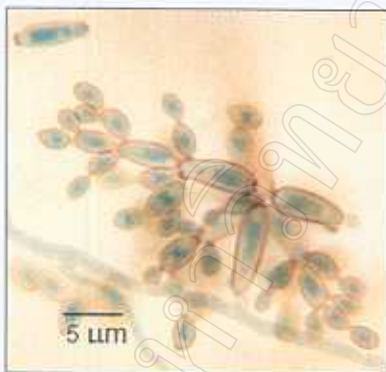
โคนิโดฟอร์ที่เข้ม แดกแขนงบริเวณส่วนปลายหรือส่วนกลาง ส่วนที่แตกแขนงมีลักษณะเป็นกระจุก หรือเกิดอยู่เดี่ยว ๆ โคนิเคียที่เข้ม มี 1 หรือ 2 cell รูปร่างแบนรูปไข่ไปจนถึงทรงกระบอก



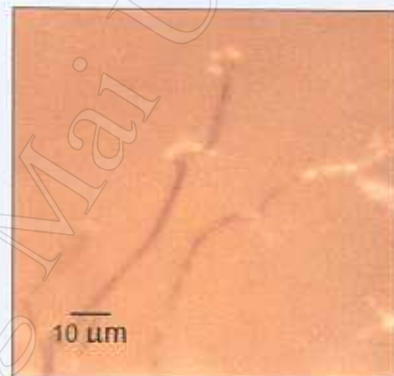
A โคลนี



B โครงสร้างสปอร์พันธุ์



C ได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100X



D ได้กล้องสเตอริโอ

รูป 38 ลักษณะของ *Cladosporium* 1

สามารถลำดับขั้นทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้

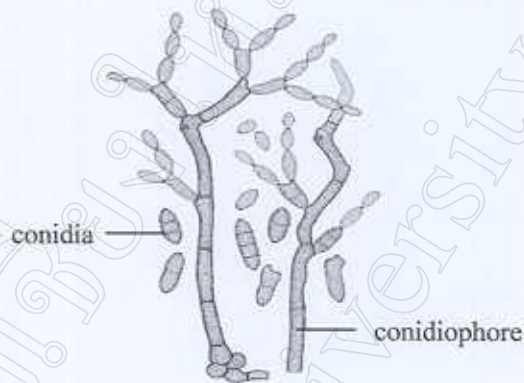
Division	<i>Eumycota</i>
Subdivision	<i>Deuteromycota</i>
Class	<i>Hyphomycetes</i>
Order	<i>Moniliales</i>
Family	<i>Moniliaceae</i>
Genus	<i>Cladosporium</i>

รหัส PS W o9

โคนิโดโฟร์สีเข้ม แดกแขนงบริเวณส่วนปลายหรือส่วนกลาง ส่วนที่แตกแขนงมีลักษณะเป็นกระจุก หรือเกิดอยู่เดี่ยว ๆ โคนิเดียสีเข้ม มี 1 หรือ 2 cell รูปร่างแบบรูปไข่ไปจนถึงทรงกระบอก



A โคลนิน



B โครงสร้างสืบพันธุ์



C ใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100X



D ใต้กล้องสเตอริโอ

รูป 39 ลักษณะของ *Cladosporium* 2

สามารถลำดับชั้นทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Division	<i>Eumycota</i>
Subdivision	<i>Deuteromycota</i>
Class	<i>Hyphomycetes</i>
Order	<i>Moniliales</i>
Family	<i>Moniliaceae</i>
Genus	<i>Cladosporium</i>

การจัดจำแนกแบคทีเรีย

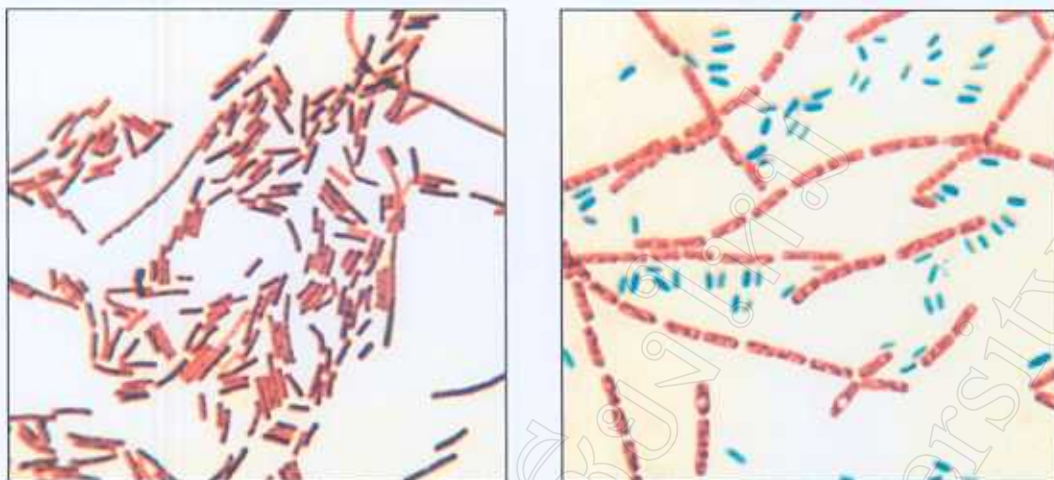
แยกแบคทีเรียจากนมพาสเจอร์ไรซ์และโยเกิร์ตที่เปิดตั้งทิ้งไว้ ได้จำนวน 78 ไอโซเลท เมื่อนำมาจัดจำแนกตาม Bergey ' s Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) พบว่าเป็น *Bacillus* spp. 21 ชนิด *Micrococcus* spp. 5 ชนิด *Streptococcus* spp. 2 ชนิด *Staphylococcus* spp. 3 ชนิด *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* sp. และ Unknown 5 ชนิด (ตาราง 23 และ รูป 40)

ตาราง 23 ไอโซเลทของแบคทีเรียที่รวบรวมจากนมพาสเจอร์ไรซ์และโยเกิร์ต

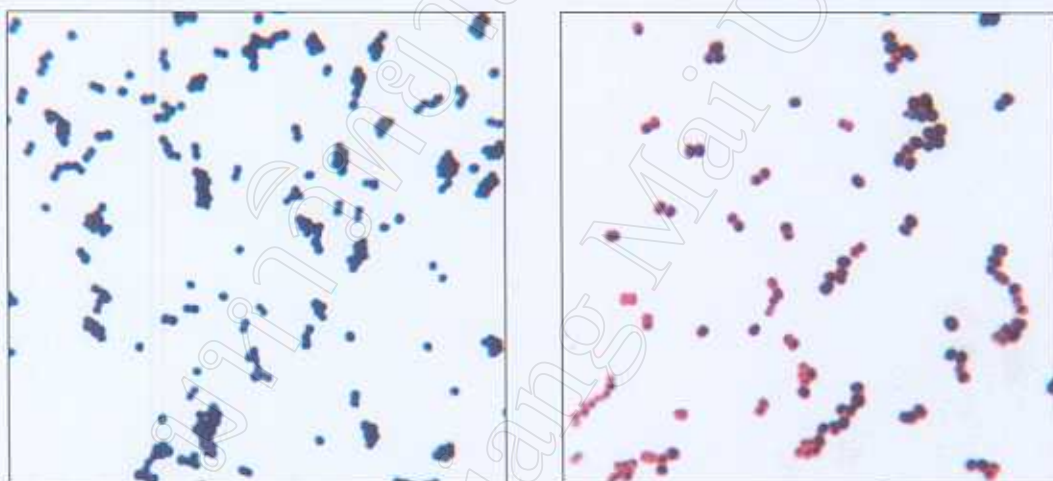
ชนิด	ไอโซเลท
<i>Bacillus cereus</i>	YD C e2, YD C e5, PF P e1, PS P o3, YF O o2, YF MB o6, YD BB o4, YD SB o1, YD BB e2, YD O e1, YF MB e1, YF O e1
<i>Bacillus subtilis</i>	PS P o4, PS P o5, PF SB o1, PS W o2, YD M e1
<i>Bacillus</i> sp. 1	PS P e2
<i>Bacillus</i> sp. 2	PS P e4, PS P e7
<i>Bacillus</i> sp. 3	PF SB e4, PF W o2
<i>Bacillus</i> sp. 4	PF SB e3
<i>Bacillus</i> sp. 5	PS P o2, PS W o7
<i>Bacillus</i> sp. 6	PF SB o2
<i>Bacillus</i> sp. 7	PF W o1
<i>Bacillus</i> sp. 8	PF B o1
<i>Bacillus</i> sp. 9	PF B o2
<i>Bacillus</i> sp. 10	PS W o4
<i>Bacillus</i> sp. 11	PM HL o1, PM CO o1, PM CO o2, PM CO o3
<i>Bacillus</i> sp. 12	PM CH o1
<i>Bacillus</i> sp. 13	PM CH o2
<i>Bacillus</i> sp. 14	PM K o1, PM K o2
<i>Bacillus</i> sp. 15	PM K o3, PM NF o1, PM SB o2
<i>Bacillus</i> sp. 16	PM NF o2

ตาราง 23 (ต่อ)

ชนิด	ไอโซเลท
<i>Bacillus</i> sp. 17	PM P o1
<i>Bacillus</i> sp. 18	PM Po2, PM SB o1, YF MB o3, YF MB o5
<i>Bacillus</i> sp. 19	PM W o1
<i>Streptococcus</i> sp. 1	YD BB o3, YD M o2, YD O o1
<i>Streptococcus</i> sp. 1	YF M o2, YD BB e3
<i>Micrococcus luteus</i>	PF LF e1, PF LF e5, PF LF o2
<i>Micrococcus varians</i>	PF LF e4
<i>Micrococcus kristinae</i>	PF W e1
<i>Micrococcus roseus</i>	PF SB e1
<i>Micrococcus</i> sp.	PF SB e3
<i>Staphylococcus aureus</i>	PS W o5
<i>Staphylococcus</i> sp. 1	YD M o1, YD M o3, YD SB o2
<i>Staphylococcus</i> sp. 2	YD BB e1
<i>Escherichia coli</i>	Stock culture
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Stock culture
<i>Salmonella</i> sp.	Stock culture
Unknown 1	PS W e2
Unknown 2	PS W o1
Unknown 3	PS W o3
Unknown 4	PS P e1, PF W e2
Unknown 5	PF LF o1



Bacillus spp.



Micrococcus spp.

รูป 40 *Bacillus* spp. และ *Micrococcus* spp. ในนมพาสเจอร์ไรซ์และไฮเกิร์ต

ภาคผนวก ฅ

ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ก่อปัญหาในนมพาสเจอร์ไรซ์ และโยเกิร์ต

ตาราง 24 ผลการเปลี่ยนแปลงจำนวนของจุลินทรีย์ในตัวแทนนมพาสเจอร์ไรซ์ และ โยเกิร์ต หลังจากเพาะจุลินทรีย์และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

No.	Code	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU / ml)			
		นมพาสเจอร์ไรซ์		โยเกิร์ต	
		จำนวนตั้งต้น	หลัง 24 hrs	จำนวนตั้งต้น	หลัง 24 hrs
1	PF LF e1	1.5×10^3	4.1×10^8	1.5×10^3	3.7×10^4
2	PF LF e4	1.5×10^3	3.8×10^8	1.5×10^3	3.2×10^4
3	PF LF e5	1.5×10^3	4.2×10^8	1.5×10^3	4.1×10^4
4	YD C e2	1.5×10^3	2.3×10^8	1.5×10^3	5.3×10^4
5	YD C e5	1.5×10^3	4.4×10^8	1.5×10^3	3.9×10^4
6	PF P e1	1.5×10^3	4.1×10^8	1.5×10^3	3.6×10^4
7	PF SB e3	1.5×10^3	3.6×10^8	1.5×10^3	3.0×10^4
8	PF W e1	1.5×10^3	2.2×10^9	1.5×10^3	6.2×10^4
9	PSP e1	1.5×10^3	2.1×10^8	1.5×10^3	3.1×10^4
10	PSP e2	1.5×10^3	1.8×10^9	1.5×10^3	4.7×10^4
11	PSP e3	1.5×10^3	3.0×10^6	1.5×10^3	3.3×10^7
12	PSP e4	1.5×10^3	8.8×10^7	1.5×10^3	2.9×10^4
13	PSP e6	1.5×10^3	2.2×10^8	1.5×10^3	3.8×10^4
14	PSP e7	1.5×10^3	3.7×10^7	1.5×10^3	3.1×10^4
15	PS W e1	1.5×10^3	8.2×10^6	1.5×10^3	2.4×10^7
16	PF W e2	1.5×10^3	4.2×10^8	1.5×10^3	3.7×10^4
17	PF SB e4	1.5×10^3	3.6×10^8	1.5×10^3	3.1×10^4
18	PF SB e1	1.5×10^3	2.7×10^9	1.5×10^3	5.2×10^4
19	PF SB e2	1.5×10^3	5.1×10^7	1.5×10^3	2.1×10^4

ตาราง 24 (ต่อ)

No.	Code	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU / ml)			
		นมพาสเจอร์ไรซ์		โยเกิร์ต	
		จำนวนตั้งต้น	หลัง 24 hrs	จำนวนตั้งต้น	หลัง 24 hrs
20	PS W e2	1.5×10^3	1.1×10^9	1.5×10^3	4.0×10^4
21	PS P o2	1.5×10^3	5.5×10^8	1.5×10^3	5.0×10^4
22	PS P o3	1.5×10^3	2.8×10^8	1.5×10^3	4.0×10^4
23	PS P o4	1.5×10^3	6.3×10^8	1.5×10^3	6.4×10^4
24	PS P o5	1.5×10^3	4.7×10^8	1.5×10^3	4.1×10^4
25	PF SB o1	1.5×10^3	2.8×10^8	1.5×10^3	3.1×10^4
26	PF SB o2	1.5×10^3	6.4×10^7	1.5×10^3	2.4×10^4
27	PF W o1	1.5×10^3	8.4×10^7	1.5×10^3	2.7×10^4
28	PF W o2	1.5×10^3	2.2×10^8	1.5×10^3	3.0×10^4
29	PF LF o1	1.5×10^3	1.8×10^9	1.5×10^3	4.1×10^4
30	PF LF o2	1.5×10^3	2.9×10^8	1.5×10^3	3.2×10^4
31	PF B o1	1.5×10^3	1.6×10^9	1.5×10^3	5.3×10^4
32	PF B o2	1.5×10^3	7.2×10^7	1.5×10^3	1.9×10^4
33	PS W o1	1.5×10^3	2.4×10^8	1.5×10^3	3.1×10^4
34	PS W o2	1.5×10^3	3.4×10^8	1.5×10^3	3.3×10^4
35	PS W o3	1.5×10^3	1.3×10^9	1.5×10^3	3.9×10^4
36	PS W o4	1.5×10^3	1.2×10^9	1.5×10^3	3.9×10^4
37	PS W o5	1.5×10^3	1.3×10^9	1.5×10^3	4.0×10^4
38	PS W o6	1.5×10^3	2.2×10^6	1.5×10^3	5.2×10^8
39	PS W o7	1.5×10^3	7.8×10^6	1.5×10^3	2.1×10^7
40	PM HL o1	1.5×10^3	9.2×10^8	1.5×10^3	8.5×10^3
41	PM CO o1	1.5×10^3	4.5×10^8	1.5×10^3	4.1×10^4
42	PM CO o2	1.5×10^3	4.3×10^8	1.5×10^3	3.9×10^4
43	PM CO o3	1.5×10^3	3.7×10^8	1.5×10^3	3.2×10^4
44	PM CH o1	1.5×10^3	5.5×10^7	1.5×10^3	6.2×10^4
45	PM CH o2	1.5×10^3	4.5×10^8	1.5×10^3	4.1×10^4
46	PM K o1	1.5×10^3	9.2×10^9	1.5×10^3	9.7×10^4

ตาราง 24 (ต่อ)

No.	Code	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU / ml)			
		นมพาสเจอร์ไรซ์		โยเกิร์ต	
		จำนวนตั้งต้น	หลัง 24 hrs	จำนวนตั้งต้น	หลัง 24 hrs
47	PMK o2	1.5×10^3	1.8×10^9	1.5×10^3	6.1×10^4
48	PMK o3	1.5×10^3	1.0×10^9	1.5×10^3	5.8×10^5
49	PMNF o1	1.5×10^3	3.6×10^9	1.5×10^3	3.1×10^4
50	PMNF o2	1.5×10^3	1.0×10^9	1.5×10^3	6.2×10^5
51	PMP o1	1.5×10^3	4.6×10^7	1.5×10^3	1.9×10^4
52	PMP o2	1.5×10^3	6.0×10^7	1.5×10^3	2.2×10^4
53	PM SB o1	1.5×10^3	2.8×10^8	1.5×10^3	3.2×10^4
54	PM SB o2	1.5×10^3	2.2×10^9	1.5×10^3	3.7×10^4
55	PM W o1	1.5×10^3	9.0×10^6	1.5×10^3	2.7×10^4
56	YF O o1	1.5×10^3	1.4×10^6	1.5×10^3	3.7×10^8
57	YF O o2	1.5×10^3	3.7×10^8	1.5×10^3	3.5×10^5
58	YF O o3	1.5×10^3	4.1×10^6	1.5×10^3	4.7×10^8
59	YF MB o1	1.5×10^3	3.2×10^6	1.5×10^3	3.1×10^8
60	YF MB o2	1.5×10^3	4.2×10^6	1.5×10^3	5.1×10^8
61	YF MB o3	1.5×10^3	5.6×10^8	1.5×10^3	5.5×10^5
62	YF MB o4	1.5×10^3	6.1×10^6	1.5×10^3	3.1×10^8
63	YF MB o5	1.5×10^3	2.6×10^8	1.5×10^3	3.3×10^6
64	YF MB o6	1.5×10^3	2.3×10^8	1.5×10^3	2.8×10^5
65	YD BB o1	1.5×10^3	8.4×10^6	1.5×10^3	4.7×10^8
66	YD BB o2	1.5×10^3	1.7×10^6	1.5×10^3	6.1×10^7
67	YD BB o3	1.5×10^3	3.1×10^8	1.5×10^3	3.1×10^6
68	YD BB o4	1.5×10^3	4.2×10^8	1.5×10^3	3.9×10^6
69	YD M o1	1.5×10^3	8.5×10^7	1.5×10^3	7.8×10^5
70	YD M o2	1.5×10^3	3.3×10^8	1.5×10^3	3.2×10^6
71	YD M o3	1.5×10^3	6.1×10^7	1.5×10^3	1.9×10^5
72	YF M o1	1.5×10^3	1.7×10^6	1.5×10^3	4.7×10^8
73	YF M o2	1.5×10^3	8.0×10^6	1.5×10^3	7.6×10^5

ตาราง 24 (ต่อ)

No.	Code	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU / ml)			
		นมพาสเจอร์ไรซ์		โยเกิร์ต	
		จำนวนตั้งต้น	หลัง 24 hrs	จำนวนตั้งต้น	หลัง 24 hrs
74	YD O o1	1.5×10^3	3.4×10^8	1.5×10^3	3.6×10^6
75	YD SB o1	1.5×10^3	3.1×10^8	1.5×10^3	2.9×10^6
76	YD SB o2	1.5×10^3	1.9×10^7	1.5×10^3	5.2×10^6
77	YD BB e1	1.5×10^3	2.9×10^8	1.5×10^3	3.3×10^6
78	YD BB e2	1.5×10^3	2.7×10^8	1.5×10^3	4.0×10^6
79	YD BB e3	1.5×10^3	3.2×10^6	1.5×10^3	3.1×10^7
80	YD O e1	1.5×10^3	1.8×10^8	1.5×10^3	2.1×10^6
81	YD M e1	1.5×10^3	1.2×10^8	1.5×10^3	3.9×10^6
82	YF MB e1	1.5×10^3	5.2×10^8	1.5×10^3	1.9×10^5
83	YF O e1	1.5×10^3	3.8×10^8	1.5×10^3	3.7×10^6
84	YD C o1	1.0×10^3	2.4×10^{10}	1.0×10^3	3.2×10^9
85	YD C o3	1.0×10^3	2.8×10^{10}	1.0×10^3	2.4×10^9
86	PF P o1	1.0×10^3	3.1×10^{11}	1.0×10^3	4.4×10^9
87	PF LF o3	1.0×10^3	1.6×10^{12}	1.0×10^3	6.8×10^9
88	PSP o1	1.0×10^3	6.4×10^{11}	1.0×10^3	3.6×10^9
89	PM HL o2	1.0×10^3	3.3×10^{13}	1.0×10^3	8.1×10^9
90	PS W o8	1.0×10^3	4.8×10^{12}	1.0×10^3	5.5×10^9
91	PS W o9	1.0×10^3	1.5×10^{13}	1.0×10^3	4.8×10^9
92	PSP o6	1.0×10^3	3.4×10^{11}	1.0×10^3	2.1×10^9
93	PSP o7	1.0×10^3	2.8×10^{12}	1.0×10^3	3.3×10^9
94	<i>B. cereus</i>	1.5×10^3	5.0×10^8	1.5×10^3	2.3×10^4
95	<i>B. subtilis</i>	1.5×10^3	4.5×10^8	1.5×10^3	4.4×10^4
96	<i>E. coli</i>	1.5×10^3	7.6×10^6	1.5×10^3	3.4×10^5
97	<i>Ent. aerogenes</i>	1.5×10^3	8.3×10^6	1.5×10^3	3.1×10^5
98	<i>M. luteus</i>	1.5×10^3	1.6×10^9	1.5×10^3	6.3×10^4
99	<i>S. aureus</i>	1.5×10^3	1.1×10^9	1.5×10^3	5.9×10^4
100	<i>Salmonella</i> sp.	1.5×10^3	7.1×10^7	1.5×10^3	3.9×10^5

ตาราง 25 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ในตัวแทนนมพาสเจอร์ไรซ์และโยเกิร์ต หลังจากเพาะจุลินทรีย์ และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

No.	Code	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)			
		นมพาสเจอร์ไรซ์		โยเกิร์ต	
		เริ่มต้น	หลัง 24 hrs	เริ่มต้น	หลัง 24 hrs
1	PF LF e1	6.75	6.25	3.8	3.6
2	PF LF e4	6.75	6.12	3.8	3.5
3	PF LF e5	6.75	6.25	3.8	3.5
4	YD C e2	6.75	6.5	3.8	3.55
5	YD C e5	6.75	6.7	3.8	3.55
6	PFP e1	6.75	6.35	3.8	3.5
7	PF SB e3	6.75	6	3.8	3.5
8	PF W e1	6.75	6.5	3.8	3.5
9	PS P e1	6.75	6.15	3.8	3.55
10	PS P e2	6.75	6.72	3.8	3.5
11	PS P e3	6.75	6.15	3.8	3.5
12	PS P e4	6.75	6.15	3.8	3.45
13	PS P e6	6.75	6.2	3.8	3.55
14	PS P e7	6.75	6.15	3.8	3.5
15	PS W e1	6.75	5.62	3.8	3.5
16	PF W e2	6.75	6.3	3.8	3.55
17	PF SB e4	6.75	6.45	3.8	3.45
18	PF SB e1	6.75	6.1	3.8	3.45
19	PF SB e2	6.75	6.3	3.8	3.5
20	PS W e2	6.75	6.75	3.8	3.48
21	PS P o2	6.75	6.25	3.8	3.48
22	PS P o3	6.75	6.65	3.8	3.5
23	PS P o4	6.75	6.5	3.8	3.55
24	PS P o5	6.75	6.45	3.8	3.45

ตาราง 25 (ต่อ)

No.	Code	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)			
		นมพาสเจอร์ไรซ์		โยเกิร์ต	
		เริ่มต้น	หลัง 24 hrs	เริ่มต้น	หลัง 24 hrs
25	PF SB o1	6.75	6.5	3.8	3.5
26	PF SB o2	6.75	6.05	3.8	3.5
27	PF W o1	6.75	5.45	3.8	3.45
28	PF W o2	6.75	6.45	3.8	3.5
29	PF LF o1	6.75	6	3.8	3.45
30	PF LF o2	6.75	6.25	3.8	3.5
31	PF B o1	6.75	6.1	3.8	3.45
32	PF B o2	6.75	6.25	3.8	3.38
33	PS W o1	6.75	6.52	3.8	3.45
34	PS W o2	6.75	6.45	3.8	3.5
35	PS W o3	6.75	5.45	3.8	3.45
36	PS W o4	6.75	6.32	3.8	3.5
37	PS W o5	6.75	5.6	3.8	3.5
38	PS W o6	6.75	5.7	3.8	3.5
39	PS W o7	6.75	6.32	3.8	3.55
40	PM HL o1	6.75	6.5	3.8	3.5
41	PM CO o1	6.75	6.45	3.8	3.5
42	PM CO o2	6.75	6.5	3.8	3.5
43	PM CO o3	6.75	6.55	3.8	3.45
44	PM CH o1	6.75	6.6	3.8	3.5
45	PM CH o2	6.75	6.52	3.8	3.48
46	PM K o1	6.75	6.32	3.8	3.5
47	PM K o2	6.75	6.32	3.8	3.45
48	PM K o3	6.75	6.12	3.8	3.5
49	PM NF o1	6.75	6.55	3.8	3.45
50	PM NF o2	6.75	6.45	3.8	3.5

ตาราง 25 (ต่อ)

No.	Code	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)			
		นมพาสเจอร์ไรซ์		โยเกิร์ต	
		เริ่มต้น	หลัง 24 hrs	เริ่มต้น	หลัง 24 hrs
51	PM P o1	6.75	6.35	3.8	3.5
52	PM P o2	6.75	6.35	3.8	3.5
53	PM SB o1	6.75	6.35	3.8	3.5
54	PM SB o2	6.75	6.5	3.8	3.55
55	PM W o1	6.75	6.35	3.8	3.5
56	YF O o1	6.75	6.25	3.8	3.48
57	YF O o2	6.75	6.65	3.8	3.5
58	YF O o3	6.75	6.3	3.8	3.55
59	YF MB o1	6.75	6.25	3.8	3.5
60	YF MB o2	6.75	6.25	3.8	3.45
61	YF MB o3	6.75	6.3	3.8	3.45
62	YF MB o4	6.75	6.3	3.8	3.5
63	YF MB o5	6.75	6.35	3.8	3.5
64	YF MB o6	6.75	6.6	3.8	3.5
65	YD BB o1	6.75	6.5	3.8	3.45
66	YD BB o2	6.75	6.45	3.8	3.55
67	YD BB o3	6.75	6.25	3.8	3.55
68	YD BB o4	6.75	6.5	3.8	3.5
69	YD M o1	6.75	6.3	3.8	3.52
70	YD M o2	6.75	6.5	3.8	3.5
71	YD M o3	6.75	6.3	3.8	3.45
72	YF M o1	6.75	6.25	3.8	3.55
73	YF M o2	6.75	6.4	3.8	3.55
74	YD O o1	6.75	6.35	3.8	3.5
75	YD SB o1	6.75	6.6	3.8	3.45

ตาราง 25 (ต่อ)

No.	Code	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)			
		นมพาสเจอร์ไรซ์		โยเกิร์ต	
		เริ่มต้น	หลัง 24 hrs	เริ่มต้น	หลัง 24 hrs
76	YD SB o2	6.75	6.35	3.8	3.5
77	YD BB e1	6.75	6.25	3.8	3.48
78	YD BB e2	6.75	6.55	3.8	3.45
79	YD BB e3	6.75	6.35	3.8	3.5
80	YD O e1	6.75	6.7	3.8	3.5
81	YD M e1	6.75	6.45	3.8	3.5
82	YF MB e1	6.75	6.65	3.8	3.5
83	YF O e1	6.75	6.7	3.8	3.55
84	YD C o1	6.75	6.7	3.8	3.55
85	YD C o3	6.75	6.65	3.8	3.5
86	PF P o1	6.75	6.65	3.8	3.6
87	PF LF o3	6.75	6.7	3.8	3.6
88	PSP o1	6.75	6.7	3.8	3.5
89	PMHL o2	6.75	6.65	3.8	3.55
90	PS W o8	6.75	6.55	3.8	3.55
91	PS W o9	6.75	6.55	3.8	3.6
92	PSP o6	6.75	6.5	3.8	3.6
93	PSP o7	6.75	6.7	3.8	3.55
94	<i>B. cereus</i>	6.75	6.5	3.8	3.5
95	<i>B. subtilis</i>	6.75	6.35	3.8	3.5
96	<i>E. coli</i>	6.75	5.05	3.8	3.48
97	<i>Ent. aerogenes</i>	6.75	5.55	3.8	3.45
98	<i>M. luteus</i>	6.75	6.7	3.8	3.45
99	<i>S. aureus</i>	6.75	6.38	3.8	3.45
100	<i>Salmonella</i> sp.	6.75	6.45	3.8	3.45

ภาคผนวก ญ

ผลการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยวิธี paper disc diffusion

ตาราง 26 ผลการยับยั้งของรอยัลเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 200 mg / ml ต่อเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 100 ไอโซเลท โดยวิธี paper disc diffusion

No.	Code	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (mm)			
		รูปแบบรอยัลเซลล์			
		Control	RJ 1	RJ 2	RJ 3
1	PF LF e1	-	23	18	12
2	PF LF e4	-	20	18	16
3	PF LF e5	-	24	17	12
4	YD C e2	-	16	13	10
5	YD C e5	-	15	13	12
6	PF P e1	-	8	8	-
7	PF SB e3	-	22	20	18
8	PF W e1	-	11	10	-
9	PSP e1	-	11	10	9
10	PSP e2	-	23	22	22
11	PSP e3	-	-	-	-
12	PSP e4	-	9	9	7
13	PSP e6	-	-	-	-
14	PSP e7	-	9	9	-
15	PS W e1	-	8	8	-
16	PF W e2	-	12	10	-
17	PF SB e4	-	14	14	12
18	PF SB e1	-	35	33	33
19	PF SB e2	-	27	25	23

ตาราง 26 (ต่อ)

No.	Code	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone (mm)			
		รูปแบบรอยัลเซลล์			
		Control	RJ 1	RJ 2	RJ 3
20	PS W e2	-	10	10	-
21	PS P o2	-	11	10	-
22	PS P o3	-	17	15	10
23	PS P o4	-	9	8	-
24	PS P o5	-	10	8	7
25	PF SB o1	-	11	11	-
26	PF SB o2	-	22	22	20
27	PF W o1	-	10	9	-
28	PF W o2	-	14	12	-
29	PF LF o1	-	13	9	9
30	PF LF o2	-	22	17	10
31	PF B o1	-	16	15	14
32	PF B o2	-	10	9	7
33	PS W o1	-	-	-	-
34	PS W o2	-	9	9	7
35	PS W o3	-	10	10	9
36	PS W o4	-	12	11	11
37	PS W o5	-	36	30	24
38	PS W o6	-	9	8	-
39	PS W o7	-	8	8	-
40	PM HL o1	-	9	9	7
41	PM CO o1	-	10	9	-
42	PM CO o2	-	14	12	10
43	PM CO o3	-	10	9	-
44	PM CH o1	-	10	10	9
45	PM CH o2	-	10	10	7
46	PM K o1	-	8	8	-

ตาราง 26 (ต่อ)

No.	Code	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone (mm)			
		รูปแบบรอยล์เซลล์			
		Control	RJ 1	RJ 2	RJ 3
47	PMK o2	-	9	8	-
48	PMK o3	-	7	7	-
49	PMNF o1	-	8	7	-
50	PMNF o2	-	9	9	-
51	PMP o1	-	11	10	-
52	PMP o2	-	-	-	-
53	PM SB o1	-	-	-	-
54	PM SB o2	-	9	7	-
55	PM W o1	-	9	9	-
56	YF O o1	-	-	-	-
57	YF O o2	-	14	11	7
58	YF O o3	-	-	-	-
59	YF MB o1	-	-	-	-
60	YF MB o2	-	-	-	-
61	YF MB o3	-	-	-	-
62	YF MB o4	-	-	-	-
63	YF MB o5	-	-	-	-
64	YF MB o6	-	16	12	9
65	YD BB o1	-	-	-	-
66	YD BB o2	-	-	-	-
67	YD BB o3	-	15	12	10
68	YD BB o4	-	15	13	7
69	YD M o1	-	-	-	-
70	YD M o2	-	13	10	-
71	YD M o3	-	-	-	-
72	YF M o1	-	8	7	-
73	YF M o2	-	11	12	8

ตาราง 26 (ต่อ)

No.	Code	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (mm)			
		รูปแบบรอยชัดเจน			
		Control	RJ 1	RJ 2	RJ 3
74	YD o o1	-	15	10	-
75	YD SB o1	-	15	11	7
76	YD SB o2	-	-	-	-
77	YD BB e1	-	9	9	7
78	YD BB e2	-	18	13	10
79	YD BB e3	-	13	11	8
80	YD O e1	-	16	11	7
81	YD M e1	-	9	9	7
82	YF MB e1	-	15	11	7
83	YF O e1	-	16	12	7
84	YD C o1	-	-	-	-
85	YD C o3	-	-	-	-
86	PF P o1	-	-	-	-
87	PF LF o3	-	-	-	-
88	PSP o1	-	-	-	-
89	PMHL o2	-	-	-	-
90	PS W o8	-	-	-	-
91	PS W o9	-	-	-	-
92	PSP o6	-	-	-	-
93	PSP o7	-	-	-	-
94	<i>B. cereus</i>	-	11	13	12
95	<i>B. subtilis</i>	-	23	23	21
96	<i>E. coli</i>	-	9	-	-
97	<i>Ent. aerogenes</i>	-	8	-	-
98	<i>M. luteus</i>	-	10	10	7
99	<i>S. aureus</i>	-	11	10	9
100	<i>Salmonella</i> sp.	-	9	-	-

หมายเหตุ

- control = ชุดควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)
RJ 1 = รอยัลเฮลตี้แบบสด
RJ 2 = รอยัลเฮลตี้แบบแช่เยือกแข็ง
RJ 3 = รอยัลเฮลตี้แบบแคปซูล

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาววนิดา ชื่นชื่น
วัน เดือน ปีเกิด	10 กรกฎาคม 2520
ภูมิลำเนา	จังหวัดชลบุรี
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยาประยุกต์ จากคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา เมื่อปีการศึกษา 2540
ที่อยู่ปัจจุบัน	105 / 179 หมู่ 6 ต. พลุตาหลวง อ. สัตหีบ จ.ชลบุรี 20180 (01) 8367225