หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 2

# อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

## 2.1 <u>อุปกรณ์ที่สำคัญและเคมีภัณฑ์</u>

### 2.1.1 <u>อุปกรณ์ที่สำคัญ</u>

เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น G-10 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., USA.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (controlled environment incubator shaker) รุ่น R-88 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., USA.

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น RC-5B ของบริษัท Sorvall Instrument.

เครื่องวัดค่าพี-เอช (pH meter) รุ่น SP-5A ของบริษัท Suntex Instruments Co., Ltd., Taiwan.

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA.

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น 200-20 ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan.

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV/vis Spectrophotometer) รุ่น PR-1 ของบริษัท Shimudzu, Japan.

เครื่องเก็บสารลำดับส่วน (Fraction Collector) รุ่น Frac. 200 ของบริษัท Pharmacia Fine Chemical, Japan.

เครื่องปั๊ม (Multistaltic Pump) รุ่น 2-6200, 2-2601 ของบริษัท Buchler Instruments, USA.

เครื่องระเหยแห้ง (Lyophilyzer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan.

กระดาษกรอง (millipore membrane) รุ่น GS pore size 0.22 ไมโครเมตร ของบริษัท Millipore Corporation, USA.

กระดาษทดสอบ (paper disc) ชนิดบางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มม. ของบริษัท Toyo Seisakusho Co., Ltd., Japan.

แผ่นโครมาโตกราฟีแบบผิวบางที่เคลือบด้วยซิลิกา เจล 60 รุ่น F254 ของบริษัท E Merck, Germany.

ถังหมัก (Fermenter) รุ่น EIM-FER 8009 MD และชุดควบคุมสภาวะ ของบริษัท L.E. Marubishi Co., Ltd., Japan

2.1.2 เคมีภัณฑ์

เซฟาเด็กซ์ จี-25 (Sephadex G-25) particle size : 20-80 ไมโครเมตร ของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals, Sweden.

แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ ของบริษัท Fluka Chemica, Switzerland.

กากถั่วเหลือง มีไนโตรเจน 7.85% (วิเคราะห์โดยวิธี Macro Kjeldahl โดยเครื่อง Kjeltec (KD-02)

แบคโต-ซอยโทน มีไนโตรเจน 9.65% ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

น้ำมันถั่วเหลือง (ใช้เป็น Antifoam-agent) ของบริษัทน้ำมันพืชไทย จำกัด ประเทศไทย

เอทธิล อะซิเตต (Ethyl acetate) ของบริษัท Searle, England

แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Ammonia solution) ของบริษัท BDH Chemicals Ltd., Poole, England.

โพรพิล อัลกอฮอล์ (Propan-1-ol) ของบริษัท BDH Chemicals Ltd., Poole, England.

บิวทิล อัลกอฮอล์ (Butan-1-01) ของบริษัท BDH Chemicals Ltd.

นินไฮดริน (Ninhydrin) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany.

เคมีภัณฑ์ชนิดอื่น ๆ เป็นเคมีภัณฑ์ระดับวิเคราะห์ (Analytical reagent grade) จากบริษัทต่าง ๆ ซึ่งนำมาใช้โดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีก

## 2.2 จุลินทรีย์

1. Bacillus spp. จำนวน 8 สายพันธุ์ ได้จากดินบริเวณที่ปลูกมันฝรั่งทำการแยกโดย รศ.สุรินา ชวนิชย์

2. Streptomyces scabies ได้จากห้องปฏิบัติการเก็บเชื้อของมหาวิทยาลัยกิวชิว ประเทศญี่ปุ่น

3. Arthrobacter sp.ได้จากการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

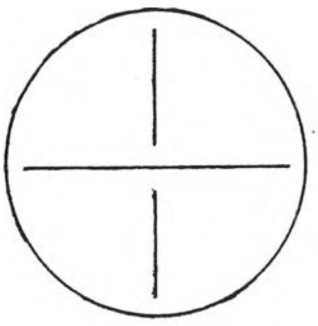
## 2.3 การคัดเลือก Bacillus sp. ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้ง Streptomyces scabies

2.3.1 คัดเลือกโดยวิธีขีดไขว้ (cross streak method) ตามวิธีของ Weinhold และคณะ, 1968

ขีดเชื้อ S. scabies จากหลอดอาหารเอียงที่มีอายุ 7 วัน เป็นเส้นตรงแบ่งครึ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อวายเอ็ม (YM medium ภาคผนวกหมายเลข 1.1) จากนั้นขีดไขว้ด้วย Bacillus sp. ที่มีอายุ 24 ชม. โดยให้เชื้อทั้งสองห่างกันเล็กน้อยประมาณ 0.5 ซม. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลา 4 วัน ดังรูปที่ 2.1

2.3.2 คัดเลือกโดยการดูบริเวณยับยั้งรอบกระดาษทดสอบ (Diffusion method) ตามวิธีของ Hugo และคณะ, 1980

เลี้ยงเชื้อ Bacillus spp. แต่ละสายพันธุ์ในอาหารเหลว (production medium, ภาคผนวกหมายเลข 1.2) 50 ml บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน แยกเซลล์ออกโดยการปั่น 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ. นำ




รูปที่ 2.1 แสดงวิธีการคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* sp ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. scabies* โดยวิธีการขีดไขว้ (Cross streak method)

น้ำใสที่ได้ไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการฉีดผ่านกระดาษกรอง (millipore filter membrane ขนาด 0.22 ไมโครเมตร) นำไปทดสอบหาปริมาณสารปฏิชีวนะโดยดูการยับยั้งต่อ S. scabies

การเตรียม S. scabies เป็นตัวทดสอบ โดยเลี้ยง S. scabies ในอาหารเหลว (ภาคผนวกหมายเลข 1.1) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. ใช้ขดลวดสปริงยาว 18 ซม. เพื่อป้องกันการเกาะตัวเป็นก้อนของเส้นใย บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28°ซ. ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน ผสม 1 มล. ของน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้กับ 15 มล. ของอาหารสำหรับเลี้ยง S. scabies เทใส่จานเลี้ยงเชื้อที่สะอาดปราศจากเชื้อ หลังจากอาหารแข็งตัวแล้ว ให้วางกระดาษทดสอบที่อิ่มตัวด้วย 20 ไมโครลิตรของน้ำเลี้ยงเซลล์ Bacillus spp. แต่ละสายพันธุ์ที่เตรียมไว้ โดยวางให้กระดาษทดสอบห่างกันพอสมควร โดยทำซ้ำกันหลายครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลา 4 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งรอบกระดาษทดสอบ หาค่าเฉลี่ย เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้ง S. scabies ของ Bacillus spp. แต่ละสายพันธุ์ โดยกำหนดให้ 1 หน่วย ของสารปฏิชีวนะเท่ากับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งรอบกระดาษทดสอบ

## 2.4 การตรวจสอบชนิดของ Bacillus sp. ทางอนุกรมวิธาน

นำ Bacillus sp. สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้ง S. sacabies ได้สูงสุด มาตรวจสอบชนิดทางอนุกรมวิธาน (Sneath และคณะ, 1986)

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphological Characteristics) โดยศึกษาลักษณะโคโลนีตลอดไปจนถึงการศึกษากล้องจุลทรรศน์

ศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา (physiological Characteristics) โดยศึกษาการเจริญในอาหารชนิดต่าง ๆ การเกิดปฏิกริยากับรีเอเจนท์ที่ใช้ทดสอบการทนเกลือและอุณหภูมิสูง รวมทั้งการศึกษารูปแบบของการเจริญของเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบคือ

- นิวเตรียนท์ อการ์ (Nutrient agar ภาคผนวกหมายเลข 1.3)
- แอนแอโรบิค อการ์ (Anaerobic agar ภาคผนวกหมายเลข 1.4)
- วี-พี บรอท (Voges-Proskaver broth ภาคผนวกหมายเลข 1.5)
- แซบบรอด เด็กซ์โทรส บรอท (Sabourand dextrose broth ภาคผนวกหมายเลข 1.6)
- เบซัล มีเดียม (ศึกษาการสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาล ดี-กลูโคส (D-glucose), ดี-แมนนิทอล (D-mannital) และ ดี-ไซโลส (D-xylose) ภาคผนวกหมายเลข 1.7)
- ซิเตรตและโปรพิโอเนท ยูติไลเซชั่น มีเดียม (Citrate and propionate utilization medium ภาคผนวกหมายเลข 1.8)
- สตาร์ช อการ์ (Starch agar ภาคผนวกหมายเลข 1.9)
- อินโดล โปรดักชั่น มีเดียม (Indole production medium ภาคผนวกหมายเลข 1.10)
- กลีเซอรอล อการ์ (glycerol agar ภาคผนวกหมายเลข 1.11)
- มิลค์ อการ์ (Milk agar ภาคผนวกหมายเลข 1.12)
- ซอลท์ โทเลอแรนซ์ มีเดียม (Salt tolerance medium ภาคผนวกหมายเลข 1.13)
- นิวเตรียนท์ เจลาติน (Nutrient gelatin ภาคผนวกหมายเลข 1.14)

## 2.5 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียตัวทดสอบ (Testing Organism) ทางอนุกรมวิธาน

เนื่องจากการใช้ S. scabies เป็นตัวทดสอบหาปริมาณสารปฏิชีวนะต้องใช้เวลานาน ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้หาแบคทีเรียชนิดที่เจริญเติบโตเร็ว และมีปฏิกริยาถูกยับยั้งใกล้เคียงกับของ S. scabies

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาเหมือนข้อ 2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบได้แก่

- นิวเตรียนท์ อการ์ (ภาคผนวกหมายเลข 1.3)
- แอนแอโรบิค อการ์ (ภาคผนวกหมายเลข 1.4)
- ซิเตรตและโปรพิโอเนท ยูติไลเซชัน มีเดียม ภาคผนวกหมายเลข 1.8)
- สตาร์ช อการ์ (ภาคผนวกหมายเลข 1.9)
- มิลค์ อการ์ (ภาคผนวกหมายเลข 1.12)
- นิวเตรียนท์ เจลาติน (ภาคผนวกหมายเลข 1.14)
- เปปโตน มีเดียม (Peptone medium ภาคผนวกหมายเลข 1.15)
- น้ำตาลที่ใช้ได้แก่ ดี-กลูโคส, ดี-แมนนิทอล, ดี-ซูโครส (ภาคผนวกหมายเลข 1.7)
- ออร์กานิค เอซิด มีเดียม (Organic acid medium)
- กรดออร์กานิคที่ใช้ได้แก่ โซเดียมซิเตรตและโซเดียมอะซิเตต ภาคผนวกหมายเลข 1.16)
- เซลลูโลส อการ์ (Cellulose agar ภาคผนวกหมายเลข 1.17)
- ยูเรีย อการ์ (Urea agar ภาคผนวกหมายเลข 1.18)

<u>การเลี้ยง *Bacillus* sp. ที่คัดเลือกได้ในขวดแก้วทรงกรวย</u>

เตรียมหัวเชื้อ (starter) ของ *Bacillus* sp. โดยเขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารเอียงลงในอาหารเหลว (ภาคผนวกหมายเลข 1.3) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 12 ชม. ความเข้มข้นของเชื้อเมื่อนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ได้ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่าย 8% (ปริมาตร/ปริมาตร) ของหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารปฏิชีวนะ (ภาคผนวกหมายเลข 1.2) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที ตามอุณหภูมิและเวลาการบ่มที่ต้องการแล้วจึงนำไปหาปริมาณสารปฏิชีวนะ

117339224

## 2.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะโดยเชื้อ *Bacillus* sp. ที่คัดเลือกได้ในขวดเขย่า

ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* sp. ที่คัดเลือกได้ในขวดเขย่า เตรียมหัวเชื้อและเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 2.6 โดยใช้สูตรอาหารเหลวสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ (ภาคผนวกหมายเลข 1.2) สภาวะต่าง ๆ ที่ทำการศึกษาได้แก่

### 2.7.1 ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ศึกษาแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ เช่น แป้ง กากน้ำตาล ซูโครส และกลูโคส แหล่งไนโตรเจน เช่น คอร์น สตีฟ ลิเคอร์ กากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน ซอยโทน เปปโตน ผงสกัดยีสต์ ทริปโตน และผงมอลท์สกัด เกลือแร่ต่าง ๆ เช่น แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$) โปแตสเซียมซัลเฟต ($K_2SO_4$) เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) และ 5 กรัม/ลิตร แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

### 2.7.2 ศึกษาระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

ทำการศึกษาหาระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในขวดเขย่าที่ให้ผลผลิตสูงสุด นอกจากนี้ยังได้ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างแหล่งคาร์บอนสองชนิด ได้แก่ กลูโคสกับซูโครสปริมาณ 10 กรัม/ลิตร เท่ากันว่าจะให้ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่างกันหรือไม่ โดยทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาตั้งแต่ 16-50 ชม.

### 2.7.3 ศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

ทำการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า โดยการแปรผันความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นตั้งแต่ 4.00-9.00

2.7.4 <u>ศึกษาอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ</u>

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าที่ใช้เครื่องเขย่าที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ โดยการทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 27°ซ. 30°ซ. และ 37°ซ.

2.7.5 <u>ศึกษารูปแบบของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารปฏิชีวนะ</u>

ศึกษาผลกระทบของรูปแบบของเครื่องเขย่าต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ โดยศึกษาบนเครื่องเขย่า 2 แบบ คือ แบบโรตารี (Rotary shaker) กับแบบรีซิโปรคอล (Reciprocal)

2.8 <u>การเลี้ยงเชื้อ</u> <u>Bacillus</u> sp. <u>ที่คัดเลือกได้ในถังหมักขนาด 5 ลิตร</u>

เตรียมหัวเชื้อ <u>Bacillus</u> sp. โดยวิธีเดียวกับข้อ 2.5 ถ่าย 8% (ปริมาตร/ปริมาตร) ของหัวเชื้อลงใน 2,760 มล. ของอาหารเหลวสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักนี้เป็นสูตรที่ได้จากการศึกษาในข้อ 2.6 รวมไปจนถึงการควบคุมสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ โดยชุดควบคุมของถังหมัก ศึกษาระยะเวลาของการหมักที่ให้ผลผลิตสูงสุด ศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญของ <u>Bacillus</u> sp. กับอัตราการผลิตสารปฏิชีวนะ และศึกษาอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม ทำการศึกษาโดยการเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง จึงนำไปปั่นแยกเซลล์เพื่อนำไปหาปริมาณสารปฏิชีวนะโดยวิธีทางชีววิทยาต่อไป

2.9 <u>การทดสอบสารปฏิชีวนะโดยวิธีทางชีววิทยา</u> (Bioassay)

การเตรียมจุลินทรีย์ตัวทดสอบโดยการเขี่ยเชื้อตัวทดสอบ 1 ลูป ใส่ในอาหารเหลว (ภาคผนวกหมายเลข 1.3) 50 มล. บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 12 ชม. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ได้ 0.45

เตรียมอาหารแข็งสูตรเดิมโดยแบ่งใส่หลอด ๆ ละ 15 มล. เมื่ออุณหภูมิของอาหารเหลวลดลงเหลือประมาณ 45°ซ. ผสมกับ 1 มล. ของหัวเชื้อของจุลินทรีย์ตัวทดสอบที่เตรียมไว้ แล้วจึงเทในจานเพาะเชื้อ ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว จึง

วางกระดาษทดสอบที่อิ่มตัวด้วย 20 ไมโครลิตร ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปั่นแยกเซลล์ Bacillus sp. ออกแล้ว โดยวางให้กระดาษห่างกันพอสมควร ทำซ้ำหลายครั้ง นำไปบ่มที่ 25°ซ. เป็นเวลา 12 ชม. แล้วจึงวัดบริเวณยับยั้งรอบกระดาษทดสอบ

กำหนดให้ 1 หน่วย ของสารปฏิชีวนะเท่ากับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งรอบกระดาษทดสอบ 3 ชม.

2.10 การสกัดแยกสารปฏิชีวนะ

2.10.1 การแยกเซลล์ Bacillus sp. ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

หลังจากบ่มเซลล์เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะได้ตามต้องการแล้ว จึงแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยการปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ. แยกน้ำใสส่วนบนไปสกัดต่อในขั้นต่อไป

2.10.2 การแยกสารปฏิชีวนะโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$

หลังจากแยกเซลล์ Bacillus sp. ออกจากน้ำหมักในข้อ 2.11.1 แล้วทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนสารปฏิชีวนะออกจากน้ำหนัก โดยใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 0-20, 20-40, 40-60, 60-80 และ 80-90 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และแยกตะกอนสารปฏิชีวนะแต่ละลำดับส่วนโดยนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ. แล้วจึงหาปริมาณสารปฏิชีวนะที่เหลือในสารละลาย

2.11 การแยกสารปฏิชีวนะโดยการทำโครมาโตกราฟี

2.11.1 การทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Gel Permeation Chromotography)

เตรียมคอลัมน์ของเซฟาเด็กซ์ จี-25 โดยการแช่เซฟาเด็กซ์ จี-25 ประมาณ 65 กรัม ในน้ำกลั่นที่มากเกินพอในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 3 ชม. ปล่อยทิ้งให้เย็นจึงนำเม็ดเจลที่พองตัวเต็มที่แล้วไปดูดอากาศออกโดยการใช้ปั๊มดูดอากาศ หลังจากนั้นนำเม็ดเจลไปบรรจุในคอลัมน์แก้วขนาด 2.6x75 ซม. ให้ได้เจลสูง 60 ซม. ผ่าน

น้ำกลั่นประมาณ 2 เท่าของปริมาตรเจลด้วยอัตราการไหล 46 มล./ชม. แรงดันของน้ำ 20 ซม. เพื่อให้เม็ดเจลอยู่ในสภาพสมดุลย์ในคอลัมน์ แล้วจึงตรวจสอบความสม่ำเสมอของการบรรจุคอลัมน์ด้วยการผ่านสารละลายบลูเด็กซ์แทรน 4 มก./มล. ลงในคอลัมน์พร้อมทั้งวัดปริมาตรช่องว่างในคอลัมน์ (void volume) โดยวัดการดูดแสงของบลูเด็กซ์แทรนที่ 620 นาโนเมตร

ละลายตะกอนที่ได้จากข้อ 2.11.2 ด้วยน้ำกลั่นโดยตัวอย่างที่จะแยกต้องไม่มากกว่า 5% (ปริมาตร/ปริมาตร) ของเจล ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวชะ เก็บตัวอย่างตามลำดับส่วนโดยเก็บหลอดละ 5.0 มล. นำแต่ละหลอดที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 203.6 นาโนเมตร พร้อมทั้งหาปริมาณการปฏิชีวนะในแต่ละหลอดโดยการทดสอบกับจุลินทรีย์ตัวทดสอบ รวมหลอดที่มีสารปฏิชีวนะเพื่อนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องไลโอฟิไลเซอร์

2.11.2 <u>การทำโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง</u> (Thin Layer Chromatography)

เตรียมตัวอย่างโดยละลายสารปฏิชีวนะที่ได้จากข้อ 2.12.1 ในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.25 มก./มล. จากนั้นนำไปหยด (spot) บนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบผิวบางที่เคลือบด้วยซิลิกาขนาด 10x5 ซม. จุดละ 3 ไมโครลิตร นำไปอบในถังโครมาโตกราฟีที่อิ่มตัวด้วยสารผสมของตัวทำละลาย (solvent system) สารละลายที่ใช้คือ

ก. บิวทานอล : น้ำ : แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ในอัตราส่วน 4:2:1

ข. โพรพานอล : น้ำ : แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ : เอทธิลอะซิเตต ในอัตราส่วน 5:3:1:1

เมื่อตัวทำละลายซึมมาถึงตำแหน่งที่ห่างจากปลายบนประมาณ 2.0 ซม. นำไปส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต นำไปทำให้แห้งแล้วพ่นด้วยสารละลายนินไฮดริน (Wagman และ Weinstein, 1973) นำไปอบที่อุณหภูมิ 80°ซ. 30 นาที จะเป็นจุดสีน้ำตาลอ่อนเปรียบเทียบตำแหน่งดังกล่าวกับตำแหน่งของจุดที่ปรากฏเมื่อส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต จากนั้นขูดแต่ละแถบไปทดสอบกับจุลินทรีย์ตัวทดสอบ จะทราบว่าแถบใดที่ปรากฏบนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบผิวบางเป็นสารปฏิชีวนะ วัดค่า Rf (ระยะทางที่สารเคลื่อนที่/ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่)

## 2.12 การศึกษาสมบัติทางเคมีของสารปฏิชีวนะ

### 2.12.1 ศึกษาความสามารถในการละลายในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ละลายสารปฏิชีวนะที่เตรียมได้ในข้อ 2.12.1 ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อไปนี้

น้ำ

เมทธานอล (Methanol)

เอทธานอล (Ethanol)

โพรพานอล (Propanol)

บิวทานอล (Butanol)

แอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์ (Ammonium hydroxide)

เอทธิลอะซิเตด (Ethyl acetate)

อะซีโตน (Acetone)

เบนซีน (Benzene)

ไดไอโซโพรพิลอีเธอร์ (Diisopropylaether)

กรดอะซิติก (Acetic acid)

เปรียบเทียบความสามารถในการละลายโดยการทดสอบทางชีววิทยาด้วยจุลินทรีย์ตัวทดสอบ

### 2.12.2 ศึกษาความเสถียรของสารปฏิชีวนะที่ระดับความเป็นกรด-ด่างในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ

ทำการศึกษาเหมือนข้อ 2.13.1 แต่ละลายสารปฏิชีวนะในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 3 ชนิด ได้แก่

- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่างที่ทำการศึกษาคือ 8.0, 7.5, 7.0 และ 6.0
- ซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่างที่ทำการศึกษาคือ 6.5, 6.0, 5.5 และ 5.0
- อะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่างที่ทำการศึกษาคือ 5.5, 5.0, 4.5 และ 4.0

โดยบ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ. นาน 12 ชม. แล้วจึงนำไปทดสอบหาปริมาณสารปฏิชีวนะที่เหลือในบัฟเฟอร์ โดยทดสอบกับจุลินทรีย์ตัวทดสอบ

2.12.3 ศึกษาความเสถียรของสารปฏิชีวนะที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ใช้สารละลายของสารปฏิชีวนะ ฉีดผ่านกระดาษกรอง (millipore membrane) นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 4°ซ. 25°ซ. และ 50°ซ. ทำการทดสอบปริมาณสารปฏิชีวนะโดยใช้จุลินทรีย์ตัวทดสอบเป็นระยะ ๆ

## 2.13 ศึกษาสมบัติทางกายภาพของสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B1

ศึกษาสมบัติการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเล็ต (190-340 นาโนเมตร) ละลายตัวอย่างที่ได้จากข้อ 2.12.2 ด้วยน้ำกลั่น ฉีดผ่านกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 นำน้ำใสที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเล็ตในช่วงความยาวคลื่น 190-340 นาโนเมตร เพื่อดูว่าสารสามารถดูดแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่นใด

## 2.14 ศึกษาประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* sp. ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ

ศึกษาประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B1 ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบมี 2 กลุ่ม คือ

2.14.1 ราที่ก่อให้เกิดโรคแก่พืชเศรษฐกิจ ทำการทดสอบโดยวิธีขีดไขว้ดังที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.1

2.14.2 แบคทีเรีย ทำการทดสอบโดยวิธีดูบริเวณยับยั้งรอบกระดาษทดสอบดังที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.2