บทที่ 2

วิธีการทดลอง

1. การแยกและคัดเลือกเชื้อสเตรปโตมัยซีทจากดินตัวอย่าง

1.1 เก็บตัวอย่างดินจากเกาะตะรุเตา 20 จุด เกาะอาดัง 10 จุด เกาะราวี 10 จุด รวม 40 จุด ที่มีภูมิประเทศที่แตกต่างกัน โดยนำดิน 5.0 g มาเจือจางในสารละลาย 0.85 % NaCl ปริมาตร 45.0 ml เขย่าที่ 120 rpm เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงนำดินตัวอย่างที่ได้มาทำการเจือจางต่อเป็น 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} ตามลำดับ แล้วจึงทำการวัด pH ของดินตัวอย่าง

1.2 เพาะเลี้ยงเชื้อในดินที่เจือจางแล้วที่ 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} ด้วยวิธีการ spread plate ลงบนอาหาร Glucose Yeast extract Malt (GYM) agar (Boudemagh *et al.*, 2005) ที่เติมยาปฏิชีวนะ cycloheximide 50 µg/ml และ nalidixic acid 20 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน

1.3 นับและแยกเชื้อกลุ่มแอคไทโนมัยซีทที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYM agar

1.4 แยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดย streak plate ลงบนอาหาร GYM agar ให้ได้เชื้อประมาณ 300 สายพันธุ์

1.5 เก็บเชื้อใน glycerol 20% ที่อุณหภูมิ -80°C

2. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อ *Streptomyces* spp.

2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายสปอร์

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายสปอร์ด้วยเทคนิค slide culture (Bergey 's Manual of Determinative Bacteriology Eighth Edition) โดยการเตรียมอาหาร GYM agar plate จากนั้นตัดอาหารเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 5 x 5 mm นำอาหารที่ตัดแล้ววางลงบนสไลด์ที่อยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ loop ปลอดเชื้อแตะสปอร์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่บริสุทธิ์ แล้วแตะบริเวณด้านข้างของชิ้นอาหารแล้วปิดทับชิ้นวุ้นอาหารด้วย cover slip ที่ปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 - 21 วัน จึงตรวจดูลักษณะของเส้นใยด้วยกล้องจุลทรรศน์พร้อมถ่ายรูป โดยลักษณะที่จัดเป็น genus *Streptomyces* คือ substrate mycelium ที่เจริญเข้าไปในอาหารวุ้นต้องไม่แตกหักเป็น

ท่อนๆ และสังเกตลักษณะของ aerial mycelium ที่เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหารวุ้น ซึ่งต่อมาพัฒนาเป็นสายสปอร์ในลักษณะต่างๆ เช่น สายสปอร์ที่มีปลายตรง (straight), คดงอเล็กน้อย (flexuous), รูปตะขอ (hook) และเป็นเกลียว (spiral) เป็นต้น

2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยา

2.2.1 การสร้าง diffusible pigment

เลี้ยงเชื้อในอาหาร oatmeal agar slant (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C บันทึกผลหลังจาก 14 วัน โดยนำ slant ไปเทียบสีกับสีมาตรฐาน The NBS-ISCC Color System (http://www.dodomagnifico.com/Colors/Cent.html)

2.2.2 การสร้าง melanin pigment

เลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone yeast – extract iron agar และ tyrosine agar (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 4 วัน ตรวจผลการทดสอบในวันที่ 4 โดยเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ ถ้าเชื้อสามารถสร้าง melanin pigment จะมีรงควัตถุสีน้ำตาล สีน้ำตาลแกมเขียวหรือสีดำลงในอาหารทดสอบ ผลการทดสอบเป็นบวกโดยเชื้ออาจสร้าง melanin pigment ในอาหารทดสอบชนิดใดชนิดหนึ่ง

2.2.3 การเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ทำการ streak เชื้อบนอาหาร GYM agar บ่มที่อุณหภูมิ 10, 20, 28, 37 และ 45°C บันทึกผลการเจริญหลังจาก 14 วัน ถ้าเชื้อมีการเจริญให้ผลการทดสอบเป็นบวก แต่ถ้าเชื้อไม่เจริญให้ผลการทดสอบเป็นลบ

2.2.4 การเจริญที่ pH ต่าง ๆ

ทำการ streak เชื้อบนอาหาร GYM agar ที่ปรับ pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 10.0 และ 11.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30°C บันทึกผลการเจริญหลังจาก 14 วัน ถ้าเชื้อมีการเจริญให้ผลการทดสอบเป็นบวก แต่ถ้าเชื้อไม่เจริญให้ผลการทดสอบเป็นลบ

2.2.5 การใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. บนอาหาร GYM agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วันหลังจากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อแตะสปอร์ของเชื้อแทงลงในอาหาร basal medium agar (ภาคผนวก ก) ซึ่งเติมคาร์โบไฮเดรต 18 ชนิด ได้แก่ adonitol,

L-arabinose, cellobiose, dextran, D-fructose, D-galactose, *meso*-inositol, inulin, D-lactose, mannitol, D-mannose, D-melezitose, raffinose, L-rhamnose, sucrose, trehalose, xylitol และ D-xylose ความเข้มข้นสุดท้าย 1% w/v บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลโดยใช้ D - glucose เป็น positive control และ อาหาร basal medium ที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนเป็น negative control ถ้าการเจริญของเชื้อมากกว่า negative control ให้ผลเป็นบวก ถ้าเชื้อเจริญน้อยกว่าหรือเท่ากับ negative control ให้ผลเป็นลบ

2.2.6 การใช้แหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. บนอาหาร GYM agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วันหลังจากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อแตะสปอร์ของเชื้อแทงลงในอาหาร basal medium agar (ภาคผนวก ก) ซึ่งเติมแหล่งไนโตรเจน 8 ชนิด ได้แก่ L-arginine, L-histidine, L- methionine, potassium nitrate, L-phenylalanine, L-serine, L-threonine และ L-valine ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1% w/v บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 14 วัน ใช้ glucose 1% w/v เป็นแหล่งคาร์บอน ตรวจผลโดยใช้ L-asparagine เป็น positive control และ อาหาร basal medium ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเป็นnegative control ถ้าการเจริญของเชื้อมากกว่า negative control ให้ผลเป็นบวก ถ้าเชื้อเจริญน้อยกว่าหรือเท่ากับ negative control ให้ผลเป็นลบ

2.3 การทดสอบทางชีวเคมี

2.3.1 ความสามารถในการย่อยสลายอาบูติน (arbutin)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM มาเลี้ยงในอาหารเอียง arbutin soft agar (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 วัน ตรวจผลจากการเกิดสีน้ำตาลดำหรือสีดำในอาหาร

2.3.2 ความสามารถในการย่อยสลายซิเตรท (citrate)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM มาเลี้ยงในอาหารเอียง citrate medium (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12 วัน ตรวจผลการเปลี่ยนสีอาหารจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินบันทึกผล

2.3.3 ความสามารถในการย่อยสลายดีเอ็นเอ (DNA)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เจริญบนอาหาร GYM โดยการ streak บน slant ของอาหาร DNase test agar (ภาคผนวก ก) จานละ 8 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลจากการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อบันทึกผล

2.3.4 ความสามารถในการย่อยสลายเอสคูลิน (esculin)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. มาเลี้ยงในอาหารเอียง esculin soft agar (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 วัน ตรวจผลจากการเกิดสีน้ำตาลดำหรือสีดำในอาหาร

2.3.5 ความสามารถในการย่อยสลายยูเรีย (urea)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM มาเลี้ยงในอาหารเอียง urea medium (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลการเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีบานเย็นบันทึกผล

2.3.6 การรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction)

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในอาหาร nitrate broth (ภาคผนวก ก)บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน โดยหยด sulfanilic acid solution และ alpha-napthylamine solution อัตราส่วน 1:1 (ภาคผนวก ก) ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่าไนเตรทถูกรีดิวซ์ผลการทดลองเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีแดงให้เติมผงสังกะสีลงไป ถ้าเกิดสีแดงในขั้นตอนนี้แสดงว่าไนเตรทในอาหารถูกรีดิวซ์ด้วยผงสังกะสีได้ผลเป็นลบ แต่ถ้าไม่เกิดสีแดงในอาหารสรุปผลเป็นบวกเนื่องจากเชื้อใช้ไนเตรทในอาหารได้เปลี่ยนเป็นไนไตรท์แล้วถูกรีดิวซ์ต่อไปเป็นแอมโมเนียหรือก๊าซไนโตรเจน จึงทำให้ไม่มีสีแดงเกิดขึ้น

2.4 ความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์

2.4.1 ความสามารถในการย่อยสลายเคซีน (casein)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM นำมา spot ลงบนอาหารแข็งที่มี skimmed milk 1% w/v (ภาคผนวก ก) จานละ 8 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณย่อยสลายบันทึกผล

2.4.2 ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส (cellulose)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM นำมา spot ลงบนอาหารแข็งที่มี Carboxyl methyl cellulose 1% w/v (ภาคผนวก ก) จานละ 8 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลโดยหยด congo red 0.1% ให้ท่วมจาน แช่ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเติม NaCl 1 N ให้ท่วมจาน จะเห็นการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณย่อยสลายบันทึกผล

2.4.3 ความสามารถในการย่อยสลายไคติน (chitin)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM มาเลี้ยงในอาหารแข็ง colloidal chitin agar (ภาคผนวก ก) จานละ 8 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลจากการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณย่อยสลายบันทึกผล

2.4.4 ความสามารถในการย่อยสลายเจลาติน (gelatin)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM นำมา spot ลงบนอาหารแข็งที่มี gelatin 0.4% w/v (ภาคผนวก ก) จานละ 8 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลโดยหยด $HgCl_2$ 0.1 N ให้ท่วมจาน จะเห็นการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณย่อยสลายบันทึกผล

2.4.5 ความสามารถในการย่อยสลายแป้ง (starch)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM มาเลี้ยงในอาหารแข็งที่มี starch soluble 1% w/v (ภาคผนวก ก) จานละ 8 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลจากการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณย่อยสลายบันทึกผล

2.4.6 ความสามารถในการย่อยสลายไทโรซีน (tyrosine)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM มาเลี้ยงในอาหารแข็ง L-tyrosine medium (ภาคผนวก ก) จานละ 8 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลจากการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณย่อยสลายบันทึกผล

2.4.7 ความสามารถในการย่อยสลายทวิน 80 (tween 80)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM นำมา spot ลงบนอาหารแข็งที่มี tween 80 1% w/v (ภาคผนวก ก) จานละ 8 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณย่อยสลายบันทึกผล

2.4.8 ความสามารถในการย่อยสลายแซนทีน (xanthine)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM มาเลี้ยงในอาหารแข็งที่มี xanthine 0.4 % w/v (ภาคผนวก ก) จานละ 8 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลจากการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณย่อยสลายบันทึกผล

2.4.9 ความสามารถในการย่อยสลายไซแลน (xylan)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM มาเลี้ยงในอาหารแข็งที่มี xylan 0.5 % w/v (ภาคผนวก ก) จานละ 6 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลโดยหยดไอโอดีนให้ท่วมจาน จะการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณย่อยสลายบันทึกผล

2.5 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่ผสมสารยับยั้ง

2.5.1 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่ผสม cobalt (II) chloride ($CoCl_2$)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM มาเลี้ยงในอาหารที่มี $CoCl_2$ 0.01 % w/v (ภาคผนวก ก) โดยการ streak plate จานละ 8 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ถ้าเชื้อมีการเจริญให้ผลการทดสอบเป็นบวก แต่ถ้าเชื้อไม่เจริญให้ผลการทดสอบเป็นลบ

2.5.2 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่ผสม crystal violet

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM มาเลี้ยงในอาหารแข็งที่มี crystal violet 0.0001% w/v (ภาคผนวก ก) โดยการ streak plate จานละ 8 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ถ้าเชื้อมีการเจริญให้ผลการทดสอบเป็นบวก แต่ถ้าเชื้อไม่เจริญให้ผลการทดสอบเป็นลบ

2.5.3 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่ผสม iron (II) sulfate ($FeSO_4$)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM มาเลี้ยงในอาหารที่มี $FeSO_4$ 0.05 และ 0.1 % w/v (ภาคผนวก ก) โดยการ streak plate จานละ 8 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ถ้าเชื้อมีการเจริญให้ผลการทดสอบเป็นบวก แต่ถ้าเชื้อไม่เจริญให้ผลการทดสอบเป็นลบ

2.5.4 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่ผสมฟีนอล (phenol)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM มาเลี้ยงในอาหารแข็งที่มี phenol 0.1% w/v (ภาคผนวก ก) โดยการ streak plate จานละ 8 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ถ้าเชื้อมีการเจริญให้ผลการทดสอบเป็นบวก แต่ถ้าเชื้อไม่เจริญให้ผลการทดสอบเป็นลบ

2.5.5 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่ผสมโพแทสเซียมเทลลูไรท์ (potassium tellurite)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM มาเลี้ยงในอาหารแข็งที่มี potassium tellurite 0.001 และ 0.01 % w/v (ภาคผนวก ก) โดยการ streak plate จานละ 8 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ถ้าเชื้อมีการเจริญให้ผลการทดสอบเป็นบวก แต่ถ้าเชื้อไม่เจริญให้ผลการทดสอบเป็นลบ

2.5.6 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM agar มาเลี้ยงในอาหารที่เติม sodium chloride ระดับความเข้มข้น 4, 7, 10 และ 13 % w/v โดยการ streak plate จานละ 8 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน จึงสังเกตการเจริญของเชื้อ ถ้าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ผลการทดสอบเป็นบวก ถ้าเชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตผลการทดสอบเป็นลบ เปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ได้เติม sodium chloride

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

2.5.7 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่ผสมโซเดียมเอไซด์ (sodium azide)

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร GYM มาเลี้ยงในอาหารที่มี sodium azide 0.01 และ 0.02 % w/v (ภาคผนวก ก) โดยการ streak plate จานละ 8 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ถ้าเชื้อมีการเจริญให้ผลการทดสอบเป็นบวก แต่ถ้าเชื้อไม่เจริญให้ผลการทดสอบเป็นลบ

2.6 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี Agar spot (Spelhaug and Harlander, 1989)

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์บนอาหารแข็งโดยวิธี agar spot เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเลี้ยงแบคทีเรีย *Streptomyces* ในอาหารแข็ง GYM โดยบ่มไว้ที่ 30°C เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำเชื้อที่ได้มา spot ลงใหม่ในอาหาร GYM จานละ 4 ไอโซเลท บ่มไว้ที่ 30°C เป็นเวลา 5 วัน แล้วราดทับด้วย TSYE soft agar (0.7% วุ้น) สำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย และ SDA soft agar (0.7% วุ้น) สำหรับเลี้ยงยีสต์ ปริมาตร 7 ml ที่มีเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์อยู่ 10^6 CFU/ml นำไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงวัด clear zone รอบโคโลนีของแบคทีเรีย สเตรปโตมัยซีท ส่วนเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์สามารถเตรียมได้โดยถ่ายเชื้อลงในอาหาร TSYE broth (แบคทีเรีย) และ SDB (ยีสต์) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับให้ได้ 10^6 CFU/ml แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 , *Escherichia coli* ATCC 25922 , *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 , *Micrococcus luteus* ATCC 7468 , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albicans* ATCC 90028

3. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์

3.1 วิธีการเตรียมเซลล์แบคทีเรียเพื่อทำการวิเคราะห์น้ำตาลและ DAP

ขูดเซลล์แบคทีเรียจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 5 loop ลงในหลอดที่มี 1 ml ของ 100% ethanol alcohol ริน alcohol ทิ้ง แล้วจึงใส่ลงใหม่อีก 1 ml เขย่าพอประมาณแล้วริน alcohol ทิ้ง นำหลอดไปอบแห้งที่อุณหภูมิประมาณ 37°C ประมาณ 1 คืน

3.2 การเตรียมน้ำตาลมาตรฐาน

น้ำตาลมาตรฐานจะแบ่งเป็น 2 ชุดคือ

ชุดที่ 1 : Galactose, Mannose, Xylose และ Rhamnose

ชุดที่ 2 : Glucose, Arabinose และ Ribose

โดยชั่งน้ำตาลอย่างละ 0.01 กรัม ละลายใน 0.5 N HCl 1 ml

3.3 Running solvent สำหรับการวิเคราะห์น้ำตาล

Ethyl acetate : Pyridine : Acetic acid : Distilled water ในอัตราส่วน 8 : 5 : 1 : 1.5

3.4 องค์ประกอบสารสเปรย์สำหรับการวิเคราะห์น้ำตาล

o-phthalic acid (C6H6O4) : Aniline (C6H5NH2) : n-Butanol saturated in water overnight ในอัตราส่วน 0.8 : 0.5 : 25

3.5 วิธีการวิเคราะห์น้ำตาลแบบ Paper Chromatography

เติมกรด HCl ความเข้มข้น 0.5 N 50-100 ul ลงในหลอดที่มีเซลล์แห้งของแบคทีเรียอยู่ นำหลอดไปอบที่อุณหภูมิ 110-120°C ประมาณ 15 นาทีหรือสังเกตจนกรดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน หยดสารละลายลงบนกระดาษ Whatman No.1 ที่เตรียมไว้ประมาณ 10 หยด หยดละ 1 ul โดยแต่ละตัวอย่างให้ห่างกันประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร หยดน้ำตาลมาตรฐานที่เตรียมไว้ประมาณ 3 หยด หยดละ 1 ul เป่าให้แห้งด้วย dryer หรือเครื่องเป่าผม นำไปใส่ในถัง (chromatography tank) ที่มีสารผสมของ running solvent อิ่มตัวอยู่แล้ว (โดยทำในที่มีเครื่องดูดอากาศ, hood) เมื่อสารผสมขึ้นมาเกือบขอบของแผ่นกระดาษโครมาโต-กราฟฟี ให้เอาออกเป่าให้แห้ง ฉีดพ่นสเปรย์ด้วยสารเคมีลงบนแผ่นกระดาษโครมาโต-กราฟฟีบางๆ นำแผ่นกระดาษโครมาโตกราฟฟีไปอบที่อุณหภูมิ 100°C ประมาณ 2-3 นาที จะปรากฏจุดของน้ำตาลแต่ละชนิด สังเกตและบันทึกผลตามชนิดของน้ำตาลมาตรฐานโดยจะเรียงลำดับจากข้างล่างของแผ่นโครมาโตกราฟฟี ดังนี้ น้ำตาลมาตรฐาน ชุดที่ 1 galactose, mannose, xylose, rhamnose น้ำตาลมาตรฐาน ชุดที่ 2 glucose, arabinose, ribose ส่วนน้ำตาล madurose จะปรากฏระหว่างน้ำตาล arabinose กับ xylose

3.6 วิธีการวิเคราะห์ DAP แบบ Paper Chromatography

การเตรียมเซลล์แบคทีเรียทำเช่นเดียวกับการวิเคราะห์น้ำตาลแต่ใช้กรด HCl ความเข้มข้น 6 N เมื่ออบเซลล์ประมาณ 15 นาที เซลล์จะเป็นสีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม การหยดลงแผ่นกระดาษโครมาโตกราฟฟีเว้นระยะแบบเดียวกับการวิเคราะห์น้ำตาล สารมาตรฐานที่ใช้หยดคือ DL-2,6-Diaminopimelic acid เตรียมโดยละลายใน HCl 6 N Running solvent สำหรับการวิเคราะห์ DAP คือ Methanol : Pyridine : 10 N HCl : Distill water ในอัตราส่วน 32 : 4 : 1 : 7 ผึ่งกระดาษกรองให้แห้งในตู้ดูดควัน พ่นด้วยสารละลาย 0.2% ninhydrin ใน acetone ให้ชุ่มทั่วแผ่น ผึ่งกระดาษกรองพอหมาดแล้วนำไปอบที่ 100°C ประมาณ 15 นาที สังเกตจุดสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบตำแหน่งกับสารละลายมาตรฐานของ diaminopimelic acid

4. การจัดจำแนกเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยใช้ numerical taxonomy (Kampfer *et al.*, 1991)

นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา การผลิตเม็ดสี และการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อสเตรปโตมัยซีทมาวิเคราะห์ทาง numerical taxonomy โดยใช้โปรแกรม NTSYS pc 2.1 วิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้ simple matching coefficient (Ssm) และทำการจัดกลุ่มโดยใช้ unweighted pair group method with arithmetic averages algorithm (UPGMA) และสร้าง dendrogram

5. คุณสมบัติทางด้านพันธุกรรม

5.1 ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rRNA gene ในเชื้อ *Streptomyces* spp.

5.1.1 การสกัด genomic DNA

สกัด genomic DNA ของสเตรปโตมัยซีทโดยใช้ G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร GYM broth ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ใส่ eppendoft tube นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทน้ำเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างเซลล์ให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ จำนวน 2 ครั้ง

5.1.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอส่วน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR

สังเคราะห์ส่วน16S rRNA gene โดยแบ่ง genomic DNA จำนวน 1 µl มาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S rDNA ของเชื้อ *Streptomyces* spp. โดย ใช้ universal primer forward (8f) 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' และ reverse

(1525r) 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAGGAGGTGATCCAGCC 3' (Shrout *et al.*, 2005)

โดยส่วนผสมในปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	11.5
10x PCR buffer	2.0
2.5 mM dNTPs	1.0
10 pmol primer 8f	1.0
10 pmol primer 1525r	1.0
5 U/ µl *Taq* DNA polymerase (ยี่ห้อ RBC)	0.5
DNA	3.0
Total volumn	20.0

นำเข้าเครื่อง Thermal cycle โดยจัดโปรแกรมอุณหภูมิและเวลาในแต่ละขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (^{o}C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	94	3	1
2. Denature	94	1	30
3. Annealing	60	1	
4. Extension	72	3	
5. Final extension	72	10	1

เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนทั้งหมด ทำ electrophoresis เพื่อตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ส่วน 16S rDNA ของเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยใช้ agarose gel 1% ในสารละลาย TE ในการทำ electrophoresis ผสม PCR product 3 µl กับ loading dye 1 µl หยดใส่แผ่น gel แล้วจึงเปิดเครื่อง electrophoresis ให้มีความต่างศักย์ 100 volts ประมาณ 20 นาที หลังจากนั้นนำ gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำ gel ไปล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที ดูลักษณะการเกิดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

5.1.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อมาตรฐานวงศ์ Streptomycetaceas ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูลในเว็บไซต์ของ EzTaxon server (http://www.eztaxon.org/; Chun *et al.*, 2007) นำนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด สร้าง phylogenetic tree ใช้วิธี neighbour-joining (Jukes & Cantor, 1969)