บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

1. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
2. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Microscope)
3. เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลม (Needle)
4. เข็มเขี่ยเชื้อปลายกลม (Loop)
5. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
6. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
7. เครื่องไมโครเวฟ
8. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator)
9. เครื่องเสปคโตรโฟโตมิเตอร์ UV-Vis spectrophotometer
10. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
11. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
12. ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Laminar Airflow)
13. เครื่องอบความร้อนแห้ง (Hot air flow)
14. ปิเปตทิป (Pipette Tips) ขนาด 1,000 200 และ 10 ul
15. ปากคีบ (Forceps)
16. ออโต้ปิเปต (Auto pipette) ขนาด 100 – 1000 ul
17. ออโต้ปิเปต (Auto pipette) ขนาด 20 – 200 ul
18. ออโต้ปิเปต (Auto pipette) ขนาด 2 – 20 ul
19. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
20. หลอด Centrifuge พลาสติกขนาดมาตรฐาน
21. ถุงร้อน
22. อ่างเก็บน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)
23. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
24. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 100 และ 500 ml
25. หลอดทดลอง (Test tube)
26. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250,500 และ 1000 ml
27. แท่งแก้วเขี่ยเชื้อ (Spreader)
28. ขวดแก้วก้นกลม (Round Bottom Flask)
29. กรวยกรองแก้ว (Glass funnel)
30. ปาสเจอร์ปิเปต (Pasteur Pipette)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

31. กระจกสไลด์ (Microscope Slide)
32. กระจกปิดสไลด์ (Cover Glass)
33. เครื่องเขย่าแบบสั่น (Vortex Mixer)
34. จานเพาะเลี้ยงแบบ 96 หลุม (96 Well Plate)
35. เครื่องแยกสารพันธุกรรมในแนวนอน (Gel electrophoresis)
36. เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH meter)
37. เครื่องล้างอัลตราโซนิค (Ultrasonic Cleaner)
38. เครื่องถ่ายภาพ Gel (Gel Documentation)

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. 2% Carboxy methyl cellulose agar (CMC)
2. Carrot agar (CA)
3. Humic acid vitamin (HV) agar ที่ผสมสาร Nystatin และ $K_2Cr_2O_7$ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25.0 ug/ml และ 75.0 ug/ml ตามลำดับ
4. International Streptomyces Project-2 agar (ISP-2 agar)
5. International Streptomyces Project-2 broth (ISP-2 broth)
6. Mueller Hinton agar (MAH)
7. Mueller Hinton broth (MHB)
8. Nutrient agar (NA)
9. Nutrient broth (NB)
10. Trypticase soy agar (TSA)

สารเคมี

1. Agar
2. 70 % alcohol
3. Dimethyl sulfoxide
4. Ethyl acetate
5. Glucose
6. Humic acid
7. Malt Extract
8. Methanol
9. Nutrient broth
10. Nystatin
11. Peptone
12. Potassium chloride

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

13. Sodium bicarbonate
14. Sodium chloride
15. Sodium hydroxide
16. Sodium hypochlorite
17. Tween 20
18. Glycerol
19. Vitamin B รวม
20. Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$)

3.1.3 พืชตัวอย่าง คือ ทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง (*Durio zibethinus* Murray)

1. ทุเรียนพันธุ์นกหยิบ
2. ทุเรียนพันธุ์พวงมณี
3. ทุเรียนพันธุ์กระปุกทอง

3.1.4 จุลินทรีย์ทดสอบ

1. *Escherichia coli* ATCC 25922
2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28753
3. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
4. *Bacillus cereus* TISTR 2372
5. *Phytophthora* sp. สายพันธุ์ L04, M01 และ R01

3.1.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder)

1. 1 kb DNA Ladder

3.1.6 Primer สำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และการหาลำดับของนิวคลีโอไทด์

1. Forward primer (m27F): 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′
2. Reverse primer (m1525R): 5′-AAGGAGGTGATCCAGCC-3′
3. Reverse primer (m1492R): 5′-AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3′
4. Forward primer (m692F): 5′-AATTCCTGGTGTAGCGGT-3′
5. Reverse primer (m800R): 5′-GGATTAGATACCCTGGTA-3′

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากใบ กิ่ง และรากของทุเรียนพันธุ์นกหยิบ พวงมณี และกระปุกทองดี โดยวิธี Surface sterile

1. ล้างตัวอย่างพืชด้วยน้ำประปา 1 ครั้ง และนำตัวอย่างพืชเข้าเครื่องล้างอัลตราโซนิค (Ultrasonic Cleaner) เป็นเวลา 10 นาที

2. ตัดตัวอย่างใบ กิ่ง ราก ของพืชให้ได้ขนาดประมาณ 1.0 x 1.0 cm แล้วนำชิ้นส่วนตัวอย่างพืชแช่ใน 0.1% Tween 20 เป็นเวลา 1 นาที 70% Alcohol เวลา 5 นาที 3% Sodium hypochlorite 10 นาที ตามลำดับ และล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 30 วินาที และแช่ใน 10% Sodium bicarbonate 10 นาที แล้วผึ่งบนผ้าขาวบางปลอดเชื้อจนแห้ง

3. นำตัวอย่างน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ล้างครั้งที่สามปริมาตร 200 µl Spread ลงบนอาหาร International Streptomyces Project-2 agar (ISP-2 agar) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวิธี Surface sterile

4. วางชิ้นตัวอย่างพืชที่ผ่านการทำ Surface sterile ลงบนอาหาร Humic acid vitamin agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์

5. สังเกตการเจริญของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทที่อยู่บริเวณชิ้นตัวอย่างพืช มีลักษณะคล้ายผงแป้ง ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร ISP-2 agar และเก็บเชื้อที่บริสุทธิ์ลงใน 20% Glycerol ที่อุณหภูมิ -70 °C

3.2.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีขีดขวาง (Cross streak)

1. ทำการ Streak เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีสที่คัดแยกได้ลงบนอาหาร Muller hinton agar (MHA) โดยใช้พื้นที่ 1 ใน 4 ของเพลต บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน

2. เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบคือ *B. cereus* TISTR 2372, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 28753 โดยถ่ายเชื้อดังกล่าวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrinent broth (NB) 1 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3. ทำการปรับปริมาณเชื้อด้วย 0.85 % NaCl ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standards No. 0.5 จะได้เซลล์ประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml

4. ใช้ไม้พันสาลีที่ฆ่าเชื้อแล้วชุบเชื้อทดสอบ ขีดตั้งฉากห่างจากรอยขีดของเชื้อแอคติโนมัยซีทประมาณ 0.5 cm บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. สังเกตการเจริญและการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ บันทึกผลการทดลอง (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.2.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อราไฟทอปธอรา

เนื่องจากผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มแบคทีเรียด้วยวิธี Cross streak ให้ผลการยับยั้งไม่มากเท่าที่ควร ผู้วิจัยจึงทำการทดลองเพิ่มกับเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มเชื้อราที่ก่อโรคในทุเรียนพันธุ์เศรษฐกิจ คือ เชื้อราไฟทอปธอรา ซึ่งเพาะเลี้ยงเชื้อราไฟทอปธอราโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Carrot agar (CA) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4-5 วัน จากนั้นนำเชื้อราไปทดสอบด้วยการใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราไฟทอปธอรา แล้วใช้เข็มเขี่ยปลายงอ (Bent needle) ย้ายชิ้นวุ้นไปวางลงตรงกลางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Carrot agar (CA) เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

3.2.4 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราไฟทอปธอราด้วยวิธี Dual culture

เพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอราได้ ในการทดลองใช้วิธี Dual culture โดยใช้ Loop แตะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทจากโคโลนีอายุ 7-10 วัน แล้วขีดเชื้อยาวประมาณ 2.0 เซนติเมตร บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Carrot agar (CA) ให้ห่างจากขอบจาน 2.0 เซนติเมตร ทั้งหมด 3 มุม ส่วนอีกมุมให้ขีดด้วยน้ำกลั่นห่างจากขอบจาน 2.0 เซนติเมตร เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง จนเชื้อแอคติโนมัยซีทสร้างสปอร์ จากนั้นใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราไฟทอปธอราจากโคโลนีอายุ 4-5 วัน แล้ววางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ CA โดยวางตรงจุดศูนย์กลางของจานที่มีเชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญอยู่ก่อน บ่มเชื้อทั้งสองที่อุณหภูมิห้อง รอจนเชื้อราด้านชุดควบคุมเจริญห่างจากขอบของจานเพาะเชื้อประมาณ 0.5 เซนติเมตร ให้ทำการวัดความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อราไฟทอปธอราในชุดควบคุมและชุดทดสอบ แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อราไฟทอปธอรา (Percent inhibition of radial growth : PIRG) โดยมีสูตรคำนวณดังนี้ PIRG = [(R1-R2)/R1]x100 โดยที่ R1 เป็นความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อราไฟทอปธอราในชุดควบคุม และ R2 เป็นความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อราไฟทอปธอราในชุดทดสอบ

3.2.5 การทดสอบการสร้างสารระเหยยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอราของเชื้อแอคติโนมัยซีท

นำจานอาหาร CA ซึ่งเพาะเชื้อราไฟทอปธอราที่มีชิ้นวุ้นซึ่งมีเส้นใยของเชื้อราจากการเจาะด้วย Cork borer มาประกบกับเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เจริญจนเต็มจานเพาะเชื้อ และมีชุดควบคุมโดยนำเชื้อราไฟทอปธอรามาประกบกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 agar ที่ไม่มีเชื้อแอคติโนมัยซีท ซึ่งเชื้อราไฟทอปธอราจะอยู่ด้านบนเสมอ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง รอจนเชื้อราในชุดควบคุมเจริญห่างจากขอบของจานเพาะเชื้อประมาณ 0.5 เซนติเมตร ให้ทำการวัดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราไฟทอปธอราในชุดควบคุมและชุดทดสอบ แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อราไฟทอปธอรา (Percent inhibition of radial growth : PIRG) โดยมีสูตรคำนวณดังนี้ PIRG = [(R1-R2)/R1]x100 โดยที่ R1 เป็นความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราไฟทอปธอราในจานควบคุม และ R2 เป็นความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราไฟทอปธอราในจานทดสอบ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.2.6 การทดสอบการสร้างสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิในการยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอรา

ทดสอบโดยทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหาร ISP2 broth เป็นเวลา 5-7 วัน หรือจนกว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทจะสร้างสปอร์ จากนั้นใช้ปิเปตดูดส่วนของอาหารที่เลี้ยงเชื้อใส่หลอดทดลอง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และกรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดรู 0.45 ไมครอน จากนั้นใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อ CA

จำนวน 4 ด้านโดยห่างจากขอบจาน 2.0 เซนติเมตร แล้วนำวุ้นออกจะได้หลุ่ม แล้วดูดอาหารที่เลี้ยงเชื้อที่ทำการกรองแล้วใส่หลุมทั้ง 3 หลุม หลุมละ 40 ไมโครลิตร ส่วนอีกหนึ่งหลุมให้ใช้อาหาร ISP2 broth ที่ไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อมาก่อนเพื่อใช้เป็นชุดควบคุม แล้วทำการวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราไฟทอปธอราตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ CA บ่มเชื้อทั้งสองที่อุณหภูมิห้อง รอจนเชื้อราด้านชุดควบคุมเจริญห่างจากขอบของจานเพาะเชื้อประมาณ 0.5 เซนติเมตร ให้ทำการวัดความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อราไฟทอปธอราในชุดควบคุมและชุดทดสอบ แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อราไฟทอปธอรา (Percent inhibition of radial growth : PIRG) โดยมีสูตรคำนวณดังนี้ PIRG = [(R1-R2)/R1]x100 โดยที่ R1 เป็นความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อราไฟทอปธอราในชุดควบคุม และ R2 เป็นความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อราไฟทอปธอราในชุดทดสอบ

3.2.7 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอราด้วยสปอร์ที่มีชีวิตของเชื้อแอคติโนมัยซีท

ทดสอบโดยทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร ISP-2 agar slant ในหลอดทดลอง เป็นเวลา 4-5 วันหรือจนกว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทจะสร้างสปอร์ จากนั้นเทสารละลาย 0.05% Tween 80 ให้ท่วมผิวหน้าอาหารและใช้ Loop เขี่ยให้สปอร์หลุดออกมาอยู่ในสารละลาย แล้วปรับความเข้มข้นของสปอร์ด้วยสารละลาย 0.05% Tween 80 ให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 1 ซึ่งมีความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 3.0×10^8 Spores/ml จากนั้นปรับความเข้มข้นของสปอร์สุดท้ายให้เท่ากับ 10^7 Spores/ml ด้วยสารละลาย 0.05% Tween 80 จากนั้นนำสปอร์มาผสมกับอาหาร ISP-2 agar แล้วเทอาหารที่มีสปอร์ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราไฟทอปธอราลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน หรือรอจนเชื้อราในชุดควบคุม (เชื้อราไฟทอปธอราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท) เจริญห่างจากขอบของจานเพาะเชื้อประมาณ 0.5 เซนติเมตร ให้ทำการวัดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราไฟทอปธอราในชุดควบคุมและชุดทดสอบ แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อราไฟทอปธอรา (Percent inhibition of radial growth : PIRG) โดยมีสูตรคำนวณดังนี้ PIRG = [(R1-R2)/R1]x100 โดยที่ R1 เป็นความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราไฟทอปธอราในจานควบคุม และ R2 เป็นความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราไฟทอปธอราในจานทดสอบ

3.2.8 ทดสอบการยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอราด้วยสปอร์ที่ไม่มีชีวิตของเชื้อแอคติโนมัยซีท

ทดสอบโดยทำการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทเช่นเดียวกับข้อก่อนหน้านี้ (3.2.7) จากนั้นนำสปอร์มาผสมกับอาหาร ISP-2 agar แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทอาหารที่มีสปอร์ที่ถูกฆ่าแล้วลงในจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปทำการ

เพาะเลี้ยงเชื้อราไฟทอปธอราลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ไม่มีชีวิต บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน หรือรอจนเชื้อราในชุดควบคุม (เชื้อราไฟทอปธอราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท) เจริญห่างจากขอบของจานเพาะเชื้อประมาณ 0.5 เซนติเมตร ให้ทำการวัดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราไฟทอปธอราในชุดควบคุมและชุดทดสอบ แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อราไฟทอปธอรา (Percent inhibition of radial growth : PIRG) โดยมีสูตรคำนวณดังนี้ PIRG = [(R1-R2)/R1]x100 โดยที่ R1 เป็นความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราไฟทอปธอราในจานควบคุม และ R2 เป็นความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราไฟทอปธอราในจานทดสอบ

3.2.9 ทดสอบการผลิตเอนไซม์ Cellulase ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอรา

ทดสอบโดยการใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทถ่ายลงตรงกลางจานบนผิวหน้าอาหาร 2% Carboxy methyl cellulose agar (CMC) ส่วนจานที่เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) ใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ที่สามารถสรางเอนไซม Cellulase ได บ่มเชื้อทั้งหมดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำการทดสอบโดยใช้สารละลาย Gram's iodine เทให้ท่วมผิวหน้าอาหาร ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเท Gram's iodine ทิ้ง แล้วสังเกตและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใส (Clear zone) และขนาดโคโลนีของเชื้อในหน่ายมิลลิเมตร

3.2.10 การสกัดสารสกัดหยาบจากเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

1. ทำการ Streak เชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุดจำนวน 1 ไอโซเลท ให้เต็มผิวหน้าอาหาร ISP-2 agar จำนวน 200 Plates บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 10 วัน สังเกตการสร้างสปอร์

2. ตัดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญของแอคติโนมัยซีทด้วยใบมีดให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก ใส่ลงใน Flask ขนาด 2000 ml ให้ได้ประมาณ 1 ใน 4 ของ Flask แล้วเติมตัวทำละลาย Ethyl acetate ให้ท่วมชิ้นวุ้น ปิดฝาให้แน่นแล้วแช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

3. นำสารสกัดที่ได้มากรองผ่านสาลี และกระดาษกรอง จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ให้เหลือแต่สารสกัดหยาบที่ต้องการ และทำการชั่งน้ำหนักและบันทึกลักษณะของสารสกัดหยาบที่ได้

3.2.11 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

3.2.11.1 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (Minimal inhibitory concentration, MIC)

มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

1. เตรียมสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทโดยใช้ Dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลาย และเตรียมให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10,240 µg/ml โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller hinton broth

2. เตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller hinton broth ใน 96 well plate ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1,024 และ 2,048 µg /ml ตามลำดับ ในปริมาตร 100 µl ต่อหลุม

3. เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller hinton broth ให้มีความเข้มข้นเป็น 2×10^5 CFU/ml และเติมเชื้อลงในแต่ละหลุมปริมาตร 100 µl จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 และ 1,048 µg/ml ตามลำดับ โดยจะได้ปริมาตรเป็น 200 µl และเชื้อจุลินทรีย์มีความเข้มข้นเป็น 1×10^5 CFU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. ใช้ชุดควบคุมบวก (Positive control) เป็นยาปฏิชีวนะ Gentamicin ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.0156 – 16.0000 µg/ml และชุดควบคุมลบ (Negative control) เป็นสารละลาย DMSO ร้อยละ 5 ทั้งหมดเตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller hinton broth

5. สังเกตการเจริญของเชื้อในแต่ละหลุม หากเชื้อเจริญจะทำให้อาหารมีความขุ่น โดยหลุมที่ใส (ไม่ขุ่น) หลุมใดมีความเข้มข้นต่ำสุด ให้รายงานค่าความเข้มข้นของหลุมนั้นเป็นค่า MIC ในหน่วย µg/ml

3.2.11.2 การหาค่าความเข้มขันต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (Minimal bactericidal concentration, MBC)

1. ดูดสารแขวนลอยของเชื้อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อจากทุกหลุมที่ไม่ขุ่นในข้อ 5 ของหัวข้อ 3.2.11.1 ปริมาตรหลุมละ 10 µl ปล่อยลงบนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) และทำการ Streak ให้กระจาย จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. ตรวจสอบการเจริญเป็นโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยสารแขวนลอยของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเจริญเป็นโคโลนีมาจากหลุมใดที่มีความเข้มข้นต่ำสุด ให้รายงานค่าความเข้มข้นของหลุมนั้นเป็นค่า MBC ในหน่วย µg/ml

3.2.12 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกโดยวิธี Slide culture

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

1. ตัดอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 agar เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดประมาณด้านละ 0.5 cm

2. วางวุ้นที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสลงบนตรงกลางของสไลด์แก้ว นำเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทที่ต้องการศึกษาแตะที่ด้านข้างทั้ง 4 ด้าน แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ปราศจากเชื้อ

3. เทน้ำกลั่นปลอดเชื้อเทลงบนสำลีหรือกระดาษซับที่ปลอดเชื้อในจานเพาะเชื้อประมาณ 3 ml เพื่อให้เกิดความชื้น แล้วนำไปบ่มที่ 30 °C สังเกตการเจริญของเชื้อ (ประมาณ 7 วัน) หรือจบกว่าเชื้อจะสร้างสปอร์

4. นำกระจกปิดสไลด์ออก โดยต้องนำไปวางบนหยดสี Lactophenol cotton blue 1 หยด ที่อยู่ตรงกลางของสไลด์แผ่นใหม่ ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศแล้วนำไปสังเกตลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ พร้อมบันทึกภาพ และใส่สเกลในภาพเพื่ออ้างอิงขนาด

3.2.13 การศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA และการสร้าง Phylogenetic tree เพื่อระบุชนิดของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท

1. เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ต้องการศึกษาในอาหาร ISP-2 broth ปริมาตร 20 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C พร้อมกับการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน สังเกตการสร้างสปอร์

2. ทำการเก็บเกี่ยวเชื้อปริมาตร 4 ml แล้วปั่นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ตามด้วยปั่นล้างด้วย 1X TE buffer และสกัดดีเอ็นของเชื้อแอคติโนมัยซีทในสารละลาย 1X TE buffer โดยใช้การต้มในน้ำเดือด ตามวิธีของ Cook และ Meyers (2003) : 1908

3. เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA ของเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้ Primer 27F (5′-GAG TTTGATCCTGGCTCAG-3′) และ 1525R (5′-AAGGAGGTGATCCAGCC-3′) โดยใช้ Annealing ที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 30 วินาที จำนวน 30 รอบ

4. ตรวจสอบผลผลิต PCR โดยการทำ Gel electrophoresis โดยใช้ 1% Agarose gel ที่ผสมสารละลาย RedSaft ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 V เป็นเวลา 25 นาที ใน 1X Tris acetate EDTA (TAE) runing buffer

5. หากมีผลผลิต PCR ที่คาดว่ามีขนาดประมาณ 1,500 bp ให้นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดน้ำยา PCR Product Purification Kit แล้วตรวจสอบผลผลิต Purified PCR โดยการทำ Gel electrophoresis อีกครั้ง

6. หากมีผลผลิต Purified PCR ให้ทำการหาลำดับเบส (Sequencing) ที่บริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย โดยใช้ Primer ทั้งหมด 4 เส้น ได้แก่ 27F (5′-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′), 692F (5′-AATTCCTGGTGTAGCGGT-3′), 800R (5′-GGATTAGATACCCTGGTA-3′) และ 1492R (5′-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3′)

7. นำลำดับเบสที่ได้มาทำการประกอบลำดับให้สมบูรณ์แล้ววิเคราะห์ลำดับเบส โดยทำการ BLAST ในเว็บไซต์ https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi เพื่อให้ทราบสกุลและชนิดที่ใกล้เคียงของเชื้อแอคติมัยซีทที่คัดแยกได้

8. นำผลที่ได้จากการ BLAST โดยนำลำดับเบสของเชื้อที่ใกล้เคียงกับเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ต้องการศึกษาจำนวน 20 ชนิด พร้อมกับเชื้อที่เป็น Out group อีก 1 ชนิด มาสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชั่น 7 โดยใช้วิธี Neighbor–Joining และใช้ค่า Bootstrap เป็น 1000