บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์

1.1 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) รุ่น BV-124 บริษัท International Scientific Supply Co.Ltd., Thailand

1.2 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น D 0601 model 500 บริษัท Memmert, U.S.A.

1.3 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (shaker) รุ่น Gyrotory G10 บริษัท New Brunswick Scientific, U.S.A.

1.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 บริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.

1.5 ถาดกระจก ขนาดกว้าง 19 เซนติเมตร ยาว 31 เซนติเมตร สูง 1.5 เซนติเมตร และขนาดกว้าง 15 เซนติเมตร ยาว 24 เซนติเมตร สูง 1.5 เซนติเมตร

1.6 อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ขนาด bright line deep 1/10 มิลลิเมตร บริษัท Boeco, West Germany

1.7 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CHS บริษัท Olympus Optical Co. Ltd., Japan

1.8 เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น Vortex-2 Genie model G-560E บริษัท Scientific Industries, U.S.A.

1.9 หลอดแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet lamp) รุ่น 8T51G กำลังไฟ 10 W บริษัท Ainavlys. ETG., U.S.A.

1.10 เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่นCimarel 2 Barnstead/Thermolyne model 546720-26., U.S.A.

1.11 ตู้ดูดอากาศ

1.12 เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (pipette pump) รุ่น P-8049 ขนาด 2 มิลลิลิตร บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

1.13 หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (automatic steam sterilizer) รุ่น H-88L4 บริษัท Kokusan., Japan

1.14 แท่งสเตนเลสกลวง (cylinder) เส้นผ่าศูนย์กลางวงนอก 8 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางวงใน 6 มิลลิเมตร และยาว 10 มิลลิเมตร (± 0.1 มิลลิเมตร)

1.15 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KM-15200 บริษัท Kubota, Japan

1.16 เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius, Germany

1.17 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 บริษัท Corning, U.S.A.

1.18 เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High performance liquid chromatography, HPLC) รุ่น LC-3A บริษัท Shimadzu, Japan

1.19 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ ส่องกราด (scanning electron microscope) รุ่น JSM-T220A บริษัท Jeol, Japan

2. สารเคมี

2.1 คานามัยซินเอ ซัลเฟต (kanamycin A sulfate) บริษัท Sigma Chemical , U.S.A.

2.2 เอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน (N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine, NTG) บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

2.3 กรดมาลิอิค (maleic acid) บริษัท BDH Laboratory Chemical Ltd.,England

2.4 ทริส (Tris) บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

2.5 กรด 2,4,6 ไตรไนโตรเบนซินซัลโฟนิก (2,4,6 Trinitrobenzenesulphonic acid) บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

2.6 ไพริดีน (pyridine) บริษัท Merck, U.S.A.

2.7 อะซิโตนไนไตรล์ (acetonitrile) บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

วิธีการทดลอง

1. จุลินทรีย์

1.1 *Streptomyces kanamyceticus* K1 ได้รับจาก Laboratory of Applied Microbiology, Kyushu University, Japan ซึ่งสามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Crameri and Davies, 1986)

1.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

2. การเก็บรักษา

2.1 การเก็บรักษา *S. kanamyceticus* K1 และสายพันธุ์กลายพันธุ์

เขี่ยเส้นใย และสปอร์ของ *S. kanamyceticus* โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) ลาก (streak) บนผิวหน้าของอาหารวุ้นเอียง วายเอส (YS agar, ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7-10 วัน เมื่อเชื้อสร้างสปอร์เต็มที่ แล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ เพื่อเก็บรักษาอีก ทุก ๆ 1 เดือน โดยใช้วิธีเดียวกัน

2.2 การเก็บรักษา *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

เขี่ยเชื้อ *S. aureus* โดยใช้ลูป (loop) ลากลงบนผิวหน้าของอาหารวุ้นเอียง เอ็มวัน (M1 agar, ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เพื่อเก็บรักษาอีกทุก ๆ 1 เดือน โดยใช้วิธีเดียวกัน

3. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

3.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของ *S. kanamyceticus*

นำ *S. kanamyceticus* อายุ 7-10 วัน ซึ่งมีสปอร์เจริญเต็มที่ ที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารวุ้นเอียง วายเอส เติมสารละลาย ทวีนเอทตี (tween 80) ความเข้มข้น 0.01% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขี่ยสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอย

นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มากรองด้วยสำลีโดยวิธีการแบบปลอดเชื้อ หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยสารละลายนอร์มัลซาลีน (normal saline, NaCl 0.85% (น้ำหนักต่อปริมาตร)) ปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยนับด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer)

3.2 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของ *S. aureus*

นำ *S. aureus* อายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหารวุ้นเอียง เอ็มวัน มาเติมสารละลายนอร์มัลซาลีน 10 มิลลิลิตร เขี่ยเชื้อให้หลุดเป็นเซลล์แขวนลอย นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) เจือจางจนวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ เท่ากับ 0.1

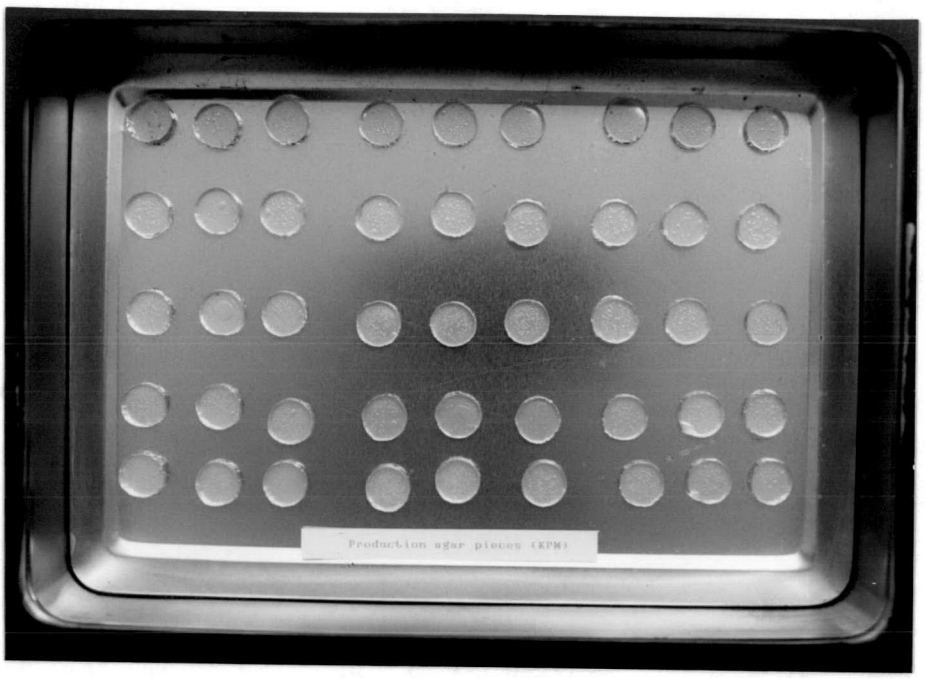
4. การเพาะเลี้ยงเชื้อ

4.1 การเตรียมหัวเชื้อ *S. kanamyceticus*

นำสปอร์แขวนลอยของ *S. kanamyceticus* ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวจีพีวาย (GPY medium, ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี (rotary shaker) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้สปอร์งอก และใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองต่อไป

4.2 การเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* ในอาหารวุ้นแข็งเพื่อสังเคราะห์คานามัยซิน

นำ *S. kanamyceticus* ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 4.1 ปริมาณ 1 ลูป เขี่ยให้ทั่วบริเวณบนผิวหน้าอาหารวุ้น เคพีเอ็มเอ (KPMA agar, ภาคผนวก ก) ที่มีลักษณะเป็นชิ้นกลม ที่มีความยาวเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร หนา 3 มิลลิเมตร ที่วางอยู่บนถาดกระจก ซึ่งบรรจุอยู่ในกล่องอลูมิเนียม ดังรูปที่ 11 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน



รูปที่ 11 การเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* บนอาหารวุ้น เคพีเอ็มเอ เพื่อสังเคราะห์คานามัยซิน

4.3 การเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า เพื่อสังเคราะห์คานามัยซิน

นำ *S. kanamyceticus* ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี (KPMB medium, ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

5. การศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์คานามัยซินของ *S. kanamyceticus*

5.1 การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (Microbiological assay) โดยวิธีการแพร่ (Agar diffusion method) (Code of federal regulation, title 21, 1987)

5.1.1 การวัดความสามารถในการสังเคราะห์คานามัยซิน ในอาหารวุ้น เคพีเอ็มเอ อาการ์

5.1.1.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

ใช้อาหารวุ้นแข็งเคพีเอ็มเอ ที่มี *S. kanamyceticus* เจริญอยู่บนผิวหน้า ที่บ่มเลี้ยงไว้เป็นเวลา 5 วัน ซึ่งเตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 4.2 เป็นตัวอย่างทดสอบ

5.1.1.2 การเตรียมอาหารวุ้นทดสอบ

5.1.1.2.1 การเตรียมอาหารวุ้นชั้นปรับระดับระนาบ (base layer)

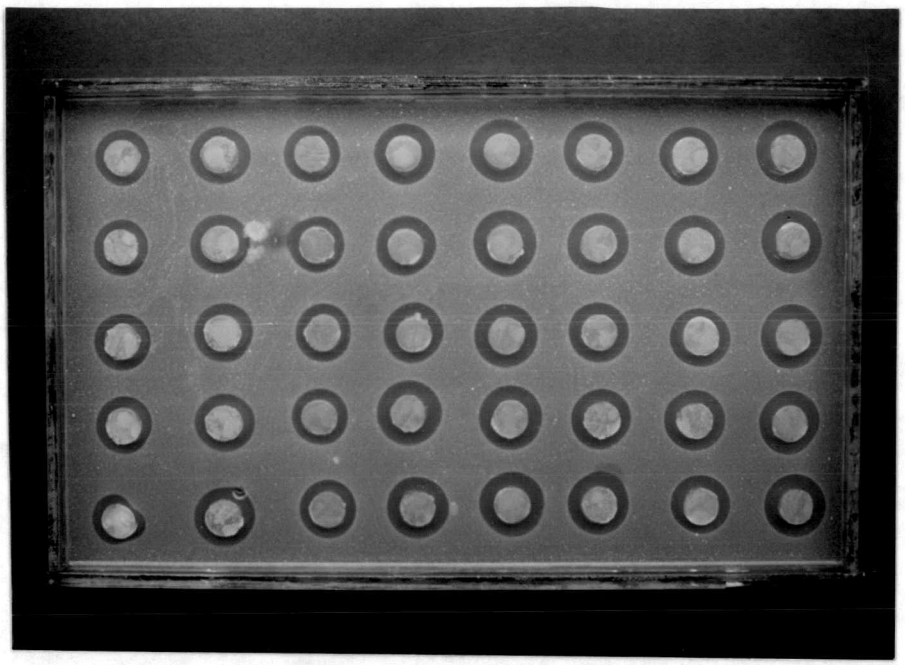
นำอาหารวุ้นแข็งเอ็มไฟว์ (M5 agar, ภาคผนวก ก) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เทลงถาดกระจกที่ปรับระดับแล้ว รอให้อาหารวุ้นแข็งตัว ให้ได้ความหนาประมาณ 3 มิลลิเมตร

5.1.1.2.2 การเตรียมอาหารวุ้นทดสอบชั้นที่มีเซลล์แขวนลอยของเชื้อทดสอบ (seed layer)

นำเชื้อ *S. aureus* ATCC 6538P ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.2 ใส่ลงในอาหารวุ้น เอ็มไฟว์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เขย่าให้เชื้อทดสอบกระจายทั่วอาหาร แล้วเทลงบนถาดกระจกที่มีอาหารวุ้นเอ็มไฟว์ ที่เตรียมจากวิธีการทดลองในข้อ 5.1.1.2.1 เอียงถาดกระจกให้อาหารวุ้นกระจายทั่วถาด และมีผิวหน้าเรียบ สม่ำเสมอ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารวุ้นแข็งตัว

5.1.1.3 การทดสอบการสังเคราะห์คานามัยซิน

วางชิ้นวุ้นตัวอย่างที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 5.1.1.1 ลงบนถาดวุ้นแข็งที่เตรียมจากวิธีการทดลองในข้อ 5.1.1.2 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง วัดความกว้างเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบ (clear zone) รอบชิ้นวุ้นตัวอย่าง เพื่อวัดการสังเคราะห์คานามัยซิน ดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 การวัดการสังเคราะห์คานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาของ *S. kanamyceticus* เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น เคพีเอ็มเอ

5.1.2 การวัดความสามารถในการสังเคราะห์คานามัยซินในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี

5.1.2.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

นำ *S. kanamyceticus* ที่เจริญอยู่ในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี อายุ 7 วัน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 4.3 นำไปปั่นแยกเส้นใย และตะกอนออกจากส่วนน้ำใส (supernatant) โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณคานามัยซินต่อไป

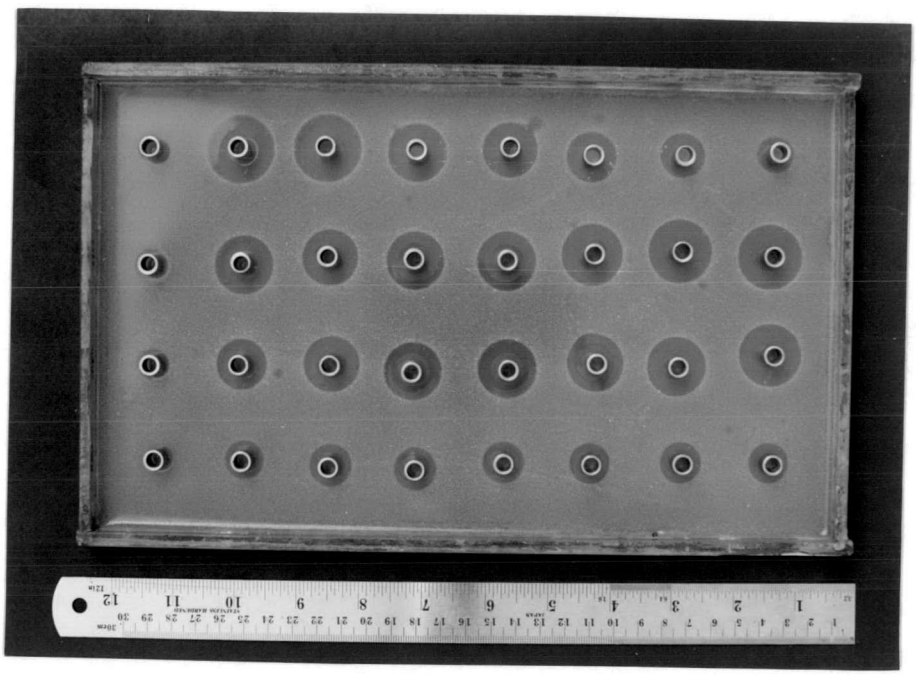
5.1.2.2 การเตรียมอาหารวุ้นทดสอบ

วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับวิธีการทดลองที่ 5.1.1.2

5.1.2.3 การหาปริมาณคานามัยซิน

นำท่อสเตนเลส (cylinder) วางลงบนถาดวุ้นที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 5.1.2.2 หยอดตัวอย่างที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 5.1.2.1 และคานามัยซิน เอ

ซัลเฟต มาตรฐาน ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้พาสเจอร์ปิเปต (pasture pipette) ให้เต็มท่อสเตนเลส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง วัดความกว้างเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบรอบแท่งสเตนเลส เพื่อเปรียบเทียบหาปริมาณคานามัยซิน กับกราฟมาตรฐานคานามัยซิน เอ ซัลเฟต (ภาคผนวก ค) (ในการหาปริมาณคานามัยซินในตัวอย่าง ต้องทำคานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน ควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง) ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 การวัดปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาของ *S. kanamyceticus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี

5.2 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High performance liquid chromatography, HPLC)

นำตัวอย่างส่วนน้ำใสที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 5.1.2.1 มาวิเคราะห์หาปริมาณคานามัยซินด้วยเครื่อง HPLC (Gambardella et al., 1985)

5.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างส่วนน้ำใสที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 5.1.2.1 หรือ คานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาเติมกรดไตรไนโตรเบนซินซัลโฟนิก (2,4,6 Trinitrobenzenesulphonic acid) เข้มข้น 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและเติม ไพริดีน (pyridine) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นด้วยน้ำประปา แล้วเติมอะซิโตไนไตรด์ (acetonitrile) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำตัวอย่างปริมาตร 25 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์หาปริมาณคามัยซิน ด้วยเครื่อง HPLC

5.2.2 ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

คอลัมน์ : Lichrocarp C_{18} reverse phase ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใน 0.4 เซนติเมตร ยาว 12.5 เซนติเมตร

สารละลายตัวพา : 0.02 โมลาร์ โปแตสเซียมฟอสเฟตบัปเฟอร์ pH 7.5 (ภาคผนวก ข) ต่อ อะซิโตไนไตรด์ ต่อ เมธานอล = 40:46:15 (ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร)

อัตราการไหล : 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที

อุณหภูมิ : 45 องศาเซลเซียส

ตรวจวัด : เครื่องตรวจวัดแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร

6. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

6.1 การชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet, UV)

นำสปอร์แขวนลอยของ *S. kanamyceticus* ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีเข็มยาว 7 เซนติเมตร (เพื่อกวนสปอร์ให้กระจายอย่างสม่ำเสมอในระหว่างการฉายแสง UV) และสารละลายนอร์มอลซาลีน อยู่ 20 มิลลิลิตร วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนเครื่องกวนแม่เหล็ก (megnatic stirrer) ฉายแสง UV ที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีระยะห่างระหว่างหลอด UV และจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 30 เซนติเมตร ฉาย แสง UV เป็นเวลา 0, 2, 4, 8 และ 16 นาทีตามลำดับ นำสปอร์ที่ผ่านการฉายแสง UV ไปเจือจางให้มีความเข้มข้นของสปอร์

แขวนลอยต่าง ๆ กัน และนำ 0.1 มิลลิลิตร ของสปอร์แขวนลอยไปเลี้ยงบนอาหารวุ้น วายเอส (YS agar, ภาคผนวก ก) โดยใช้แท่งแก้วที่ปราศจากเชื้อ เขี่ยสปอร์ให้กระจายเต็มผิวหน้าของอาหารวุ้นโดยวิธีสเปรดเพลท (spread plate) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) ไม่มีแสง เป็นเวลา 3-4 วัน นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่รอดชีวิตในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนเชื้ออยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมาคำนวณเป็นจำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยกำหนดให้ 1 โคโลนีเจริญมาจาก 1 สปอร์ และคำนวณหาเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของสปอร์ที่ผ่านการฉายแสง UV ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน ให้สปอร์ที่ ผ่านการฉายแสง UV นาน 0 นาที มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตเป็น 100 เปอร์เซนต์ นำข้อมูลที่ได้ มาเขียนกราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ที่ถูกฉายแสง UV ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน โดยให้เปอร์เซนต์การรอดชีวิตเป็นแกน Y และเวลาที่ฉายแสง UV เป็นแกน X

เก็บเชื้อที่มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตต่ำกว่า 5 เปอร์เซนต์ มาทำการคัดเลือกในขั้นปฐมภูมิต่อไป (Johdo et al., 1991)

6.2 การชักนำด้วยสาร NTG

นำสปอร์แขวนลอยของ *S. kanamyceticus* ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว เติม 1 มิลลิลิตรของสารละลาย NTG ที่ละลายใน 0.05 โมลาร์ ทริสมาลิอิค บัปเฟอร์ pH 9.0 (ภาคผนวก ข) เข้มข้น $1x10^{-1}$, $2x10^{-2}$, $1x10^{-2}$, $2x10^{-3}$, $1x10^{-3}$, $2x10^{-4}$, $1x10^{-4}$, $2x10^{-5}$ และ 0 โมลาร์ เพื่อให้ได้สปอร์ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลาย NTG เข้มข้น $5x10^{-2}$, $1x10^{-2}$, $5x10^{-3}$, $1x10^{-3}$, $5x10^{-4}$, $1x10^{-4}$, $5x10^{-5}$, $1x10^{-5}$ และ 0 โมลาร์ตามลำดับ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นแบ่งสารละลายสปอร์มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก (eppendorf) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกสปอร์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนสปอร์ที่ได้มาปั่นล้างด้วย 1 มิลลิลิตร ของสารละลายนอร์มัลซาลีน ทำการปั่นล้าง 2 ครั้ง เติมสารละลายนอร์มัลซาลีน 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์ต่าง ๆ กัน นำไปทดสอบหาเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของสปอร์หลังจากถูกชักนำด้วย NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยใช้วิธีเช่นเดียวกับวิธีการทดลองในข้อ 6.1 นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ที่ถูกชักนำด้วย NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยให้เปอร์เซนต์การรอดชีวิตเป็นแกน Y และความเข้มข้นสารละลาย NTG เป็นแกน X

I20503799

เก็บเชื้อที่มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตต่ำกว่า 20 เปอร์เซนต์ มาดำเนินการคัดเลือกในขั้นปฐมภูมิต่อไป (Delic et al., 1970; Johdo, et al., 1991)

7. การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้สูงขึ้น

7.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV หรือสาร NTG โดยเปรียบเทียบความสามารถในการสังเคราะห์คานามัยซินของสายพันธุ์กลายกับสายพันธุ์ตั้งต้น ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น เคพีเอ็มเอ ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.2 คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้งต่อเชื้อทดสอบมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น มาทดสอบในขั้นทุติยภูมิต่อไป

7.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

นำสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้จากขั้นปฐมภูมิ มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.3 นำน้ำหมักที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณคานามัยซินเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1.2 นำสายพันธุ์กลายที่สามารถสังเคราะห์คานามัยซินมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น และสูงที่สุด ไปทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของการสังเคราะห์คานามัยซิน

8. การทดสอบความเสถียรในการสังเคราะห์คานามัยซินของสายพันธุ์กลาย

นำสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้จากขั้นทุติยภูมิ มาเลี้ยงในอาหารเคพีเอ็มบี ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.3 วิเคราะห์หาปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ตามวิธีการทดลองที่ 5.1.2 โดยใช้สายพันธุ์กลายที่ผ่านการถ่ายเชื้อมาแล้วไม่ต่ำกว่า 2 ครั้ง คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ยังสามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้อย่างสม่ำเสมอ และมีปริมาณมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น มาเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการกลายพันธุ์ต่อไป และนำสายพันธุ์กลายที่สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้สูงที่สุดในการกลายพันธุ์ขั้นสุดท้ายมาวิเคราะห์หาปริมาณคานามัยซินด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.2

9. <u>การทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนหลักบางชนิด ในการสังเคราะห์คานามัยซินของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย</u>

นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย ที่เตรียมโดยวิธีการทดลองข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี (KPMB medium, ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรโดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีชนิดของแหล่งคาร์บอนหลักแตกต่างกัน 6 ชนิด คือ แป้ง (starch) มอลโตส (maltose) แลคโตส (lactose) กลูโคส (glucose) กาแลคโตส (galactose) และกากน้ำตาล (mollass) เข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นแยกเส้นใยออกจากส่วนน้ำใส ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1.2.1 ส่วนเส้นใยนำมาล้างแคลเซียมคาร์บอนเนต ที่ปนเปื้อนออกด้วย กรดซัลฟูริก เข้มข้น 1 นอร์มัล แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักแห้งด้วยเครื่องชั่งละเอียด เพื่อวัดอัตราการเจริญ ส่วนน้ำใสที่แยกได้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยใช้วิธี ฟีนอล-ซัลฟูริค (Phenol-sulfuric method) (ภาคผนวก ค) วัดความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1.2 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาชนิดของแหล่งคาร์บอนหลักที่สายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์กลาย สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์คานามัยซิน

10. <u>การทดสอบการสังเคราะห์คานามัยซินของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส</u>

นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี (KPMB medium, ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยแยกเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นแยกเส้นใยออกจากส่วนน้ำใส ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1.2.1 ส่วนเส้นใยนำมาล้างแคลเซียมคาร์บอนเนต ที่ปนเปื้อนออกด้วย กรดซัลฟูริก เข้มข้น 1 นอร์มัล แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนักแห้งด้วยเครื่องชั่งละเอียดเพื่อวัดอัตราการเจริญ ส่วนน้ำใสที่แยกได้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล โดยใช้วิธี ฟีนอล-ซัลฟูริค (ภาคผนวก ค) วัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดพีเอช และ วิเคราะห์

ปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1.2 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์การสังเคราะห์คานามัยซินของสายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์กลาย ที่อุณหภูมิทั้ง 2 ดังกล่าว

11. <u>การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ตั้งต้น K1 กับ สายพันธุ์กลาย</u>

11.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใย และสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ เขี่ยสปอร์และเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย ที่เจริญอยู่บนอาหารวุ้นเอียง วายเอส (YS agar, ภาคผนวก ก) ที่เตรียมจากวิธีการทดลองในข้อ 2.1 นำมาเลี้ยงบนอาหารวุ้น เอ็มเอส (MS agar, ภาคผนวก ก) ที่วางอยู่บนแผ่นกระจกสไลด์ (slide culture) บ่มที่ (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7-10 วัน แล้วนำมาศึกษาสัณฐานวิทยาของเส้นใย และสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

11.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (steriomicroscope)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ เขี่ยสปอร์และเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย ที่เจริญอยู่บนอาหารวุ้นเอียง วายเอส ที่เตรียมจากวิธีการทดลองในข้อ 2.1 นำมาลากลงบนผิวหน้าของอาหารวุ้น เอ็มเอส บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7-10 วัน แล้วนำมาศึกษาสัณฐานวิทยาของโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

11.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใย และสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ เขี่ยสปอร์และเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย ที่เจริญอยู่บนอาหารวุ้นเอียง วายเอส ที่เตรียมจากวิธีการทดลองในข้อ 2.1 นำมาลากลงบนผิวหน้าของอาหารวุ้น เอ็มเอส บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7-10 วัน แล้วนำไปเตรียมตัวอย่างสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด (ภาคผนวก ค)