บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกและจัดจำแนกแอคติโนมัยซิสที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากดินป่าชายเลน

เก็บตัวอย่างดินในป่าชายเลน บริเวณตำบลกำพวน อำเภอสุขสำราญ จังหวัดระนอง ปริมาณ 500 กรัม โดยใช้หลอดเก็บตัวอย่างดิน และเก็บรักษาดินที่อุณหภูมิ 4 ºC ก่อนนำมาแยกเชื้อโดยวิธี spread plate ตามวิธีของ Tortora et al. (1986) โดยนำตัวอย่างดินมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำมาผ่านกระบวนการ physical treatment และ chemical treatment ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละสกุล ทำการเจือจางโดยดูดสารละลายตัวอย่างมา spread plate บนอาหาร Humic acid-vitamin agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะ บ่มที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 21 วัน แยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยเลี้ยงบนอาหาร Yeast extract-malt extract agar

2. การคัดเลือกแอคติโนมัยซิสขั้นต้น

นำเชื้อบริสุทธิ์มาเลี้ยงบนอาหาร Yeast extract-malt extract agarโดยขีดเป็นเส้นตรงเดี่ยวยาวตามแนวนอนจากขอบหนึ่งถึงอีกขอบหนึ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 21 วัน เพื่อให้เชื้อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ตรวจสอบการสร้างออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ Bacillus subtilis ATCC6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Candida albicans* ATCC10231 โดยลากจุลินทรีย์ทดสอบเป็นเส้นตรงตั้งฉากกับแนวเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกค่า Inhibition zone และหาค่า Inhibition index

3. การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Seed medium (Yeast extract-malt broth, pH 7.3) นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน แล้วเลี้ยงต่อ

ในอาหาร Production medium (Yeast extract- malt extract broth ที่เติม 0.1% $CaCo_3$, pH 7.3) โดยเติม 1% inoculum Seed medium ลงใน Production medium นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน นำมากรองแยกเซลล์ออกโดยผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 นำส่วนใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยให้แห้งโดยใช้เครื่อง evaporation จะได้สารสกัดหยาบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในส่วน ethyl acetate

4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *Candida albians*, *Staphyloccus aureus* โดยวิธี agar diffusion (Lorian, 1980) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผล Inhibition zone

5. การจัดจำแนกแอคติโนมัยซิสที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อที่แยกได้ แล้วนำมาเทียบเคียงกับเอกสารอ้างอิงดังนี้ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 2000, Shirling & Gotlieb, 1966, Williams et al., 1968, Krassilinikov, 1984 และ Holt et al., 1994 โดยทำการจัดจำแนกถึงระดับ genus

2) ศึกษาคุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมี

คุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมีที่ศึกษาได้แก่ วิเคราะห์ผนังเซลล์ วิเคราะห์ whole cell hydrolysates วิเคราะห์ Polar lipid วิเคราะห์ Cellular fatty acid วิเคราะห์ Isoprenoid quinone

3) การจัดจำแนกระดับ species

จัดจำแนกแอคติโนมัยซิสในระดับ Species โดยหาลำดับเบสของ 16s rRNA ยีน สกัด Genomic DNA ของแบคทีเรียและเพิ่มปริมาณ (Amplify) DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ forward (5′-CGTCGACGAGCTCAGAGTTTGATCCTGGTCAG-3′) และ reverse (5′-CCCGGGTACCAAGCTTAAGGAGGTGATCCACCGCA -3′) แล้วทำ

การวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16s rRNA โดยการทำ DNA sequencing และนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล NCBI และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W และ Mega (Thompson et al., 1997; Kumar et al., 2001) และจัดทำฐานข้อมูลแอคติโนมัยซิส

6. นำข้อมูลมาวิเคราะห์และสรุปผลการศึกษา