2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

แบคทีเรีย

V. harveyi สายพันธุ์ 046	แยกจากกุ้งที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสงเก็บรักษาในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) ที่เติม Glycerol เก็บที่อุณหภูมิ -4°C โดยได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยคุณภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ
B. subtlis สายพันธุ์ ABS-D01, ABS-D02 ABS-D03, ABS-D06 ABS-D07, ABS-D08 ABS-D09, ABS-D10 ABS-D11, ABS-D12 ABS-D13, ABS-D19 ABS-D20, ABS-D21 ABS-D27, ABS-D28 ABS-D29, ABS-D30 ABS-D31, ABS-D32 และ ABS-D34	แยกจากดินในนาข้าวเก่า จังหวัดพัทลุง โครงการวิจัย "การพัฒนา Antagonist *Bacillus subtilis* สำหรับควบคุมโรคข้าว" ซึ่งสนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี 2538 – 2542

B. subtlis สายพันธุ์ ABS-D04, ABS-D05 ABS-D14, ABS-D15 ABS-D16, ABS-D17 และ ABS-D18 แยกได้จากดิน ของโครงการวิจัย "การขยายผลการใช้จุลินทรีย์ *B. subtilis* สำหรับควบคุมโรคไม้ผล" ซึ่งสนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ (เตรียมจากสูตรภาคผนวก)

- Tryptic Soy Agar (TSA) บริษัท Difco
- Tryptic Soy Broth (TSB) บริษัท Difco
- Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) บริษัท Merck

สารเคมี

- แอทธานอล (ethanol) ของบริษัท Merck
- กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl) ของบริษัท Merck
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Ajax chemicals

อุปกรณ์

micropipet ของบริษัท Gilson

micropipet ของบริษัท Finnpipette

spectrophotometer ของบริษัท HEWLETT PACKARD รุ่น HP8453 UV-Visible

กล้องถ่ายรูปของบริษัท Nikon รุ่น F-70

กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ของบริษัท Nikon รุ่น YS2-H

เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อแบบหมุนวน (orbital shaker) GALLENKAMP ของบริษัท Sanyo

เครื่องโซนิเคท (sonicator) ของบริษัท Branson sonifier

เครื่องเซนตริฟิวจ์ของบริษัท Beckman รุ่น Microfuge E

pH meter ของบริษัท Orion

เครื่อง vacuum concentrator and freeze dryer ของบริษัท Heto lab equipment รุ่น Maxy dry lyo

เครื่อง Homogenizer ของบริษัท polytom

ตู้อุ่นเชื้อ (hot air oven) ของบริษัท Memmert

ตู้กระจกขนาด 60x122x32.5 cm

เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 4 ตำแหน่ง ของบริษัท OHAUS

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ (autoclave) ของบริษัท Hirayama

เครื่อง rotary evaporator ยี่ห้อ Buchi

ตู้เขี่ยเชื้อ (bioharzard laminar flow) ยี่ห้อ GELAIRE

กรวยกรองเชื้อของบริษัท Millipore

แผ่นกรอง nitrocellulose (รูมีขนาด 0.45 μm) ยี่ห้อ Millipore

Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm

วิธีการ

2.1 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (*V. harveyi*)

2.1.1 การวัดการเจริญของ *V. harveyi* ที่ pH 7, 8 และ 9

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* บนอาหารวุ้น TSA (เติม1.5%NaCl) นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30°C ถ่ายชื้อหนึ่งลูป (loop) ลงไปในอาหารเหลว TSB (เติม 1.5%NaCl) ปริมาตร 20 ml ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ปริมาตร 100 ml เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อทีเลี้ยงได้มาจำนวน 5% inoculum ใส่ลงในฟลาสก์ที่บรรจุอาหารเหลว TSB (เติม 1.5%NaCl) ปริมาตร 40 ml ความเค็ม 15 ppt ที่มีค่า pH 7, 8 และ 9 (ทำชุดละ 2 ซ้ำ) แบ่งเชื้อที่เตรียมได้ใส่หลอดที่ปราศจากเชื้อแล้วหลอดละ 3 ml จำนวนชุดละ 5 หลอด นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อไปวัดความขุ่นโดยหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm (OD_{660}) ที่เวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ เพื่อดูการเจริญของ *V. harveyi* ในอาหารเลี้ยง

เชื้อที่มีสภาวะ pH ต่างๆ ที่เวลา 0–48 ชั่วโมง นำผลที่ได้มา พล็อตกราฟ ระหว่างค่า log OD_{660} กับ เวลา

2.1.2 การหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณของ *V. harveyi*

ลากขีด *V. harveyi* ให้มีโคโลนีเดี่ยวบนอาหารวุ้น TSA (ติม 1.5%NaCl) บ่มที่ 30°C นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ *V. harveyi* 1 ลูป ลงในอาหารเหลว TSB ที่เติม 1.5%NaCl ปริมาตร 100 ml ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาดปริมาตร 250 ml นำไปเพาะเลี้ยง โดยเขย่า 200 rpm อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงเจือจางเชื้อด้วสารละลาย 1.5%NaCl ที่ปลอดเชื้อ โดยเจือจางแบบมีลำดับ 1:5 เป็น 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 และ 1:3125 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm โดยใช้อาหารเหลว TSB ที่เติม 1.5%NaCl เป็น Blank หาปริมาณเชื้อ (CFU/ml) ของ *V. harveyi* ในหลอดเริ่มต้น โดยวิธี colony plate count บนอาหารวุ้น TSA (เติม 1.5%NaCl) บ่มที่ 30 °C นาน 24 ชั่วโมง คำนวณปริมาณของเชื้อที่เจือจางจากเชื้อตั้งต้นตามอัตราส่วน นำค่าปริมาณของเชื้อที่คำนวณได้ในแต่ละอัตราส่วนการเจือจาง มาแปลงเป็นค่า log CFU/ml แล้วนำมาเขียนกราฟเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับค่า log OD_{660} ของเชื้อที่เจือจางแต่ละอัตราส่วน สำหรับใช้เป็นกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณเชื้อ *V. harveyi*

2.1.3 การหาการเจริญของ *V. harveyi* ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เตรียมเชื้อ *V. harveyi* เช่นเดียวกับหัวข้อ 2.1.1 ถ่ายเชื้อจำนวน 1% inoculum ไปใส่ในฟลาสก์ปริมาตร 250 ml ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (เติม 1.5%NaCl) ปริมาตร 40 ml จำนวน 6 ขวด เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37°C ชุดละ 2 ขวด วัดความขุ่นที่ OD_{660} ณ. เวลา 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ช.ม. โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เติม 1.5%NaCl เป็น blank บันทึกผลการทดลอง เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า log OD_{660} กับ เวลา ที่อุณหภูมิต่างๆ

2.1.4 การเจริญของ *V. harveyi* ที่ระดับความเค็มต่าง ๆ

นำอาหารวุ้น TSA (เติม NaCl) ให้มีความเข้มข้น 5, 25, 50, 75 และ 100 ppt มาทำการเลี้ยง *V. harveyi* โดยลากเขี่ยเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยว บ่มที่ 30°C นาน 24 ชั่วโมง สังเกตดูความสามารถในการเจริญที่ระดับความเค็มต่างๆ

2.2 **การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ** *V. harveyi* **(ดัดแปลงจาก** Vera *et al.*, 1992)

เพาะเลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* บนอาหารวุ้น TSA (เติม 1.5%NaCl) ที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30°C ขูดเชื้อมาเจือจางกับน้ำเกลือปลอดเชื้อ (NaCl 0.85 %)ให้ได้ระดับความเข้มข้น 0.08, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.5 โดยวัดหาค่าความขุ่นที่ OD_{660} ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วเทียบหาความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียจากกราฟมาตรฐานของเชื้อ *V. harveyi* ที่ได้จากข้อ 2.1.2 นำกุ้งกุลาดำที่มีขนาดประมาณ 15-20 กรัม จำนวน 50 ตัว ทำการฉีดเชื้อในระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ โดยใช้กุ้งทดลองระดับละ 10 ตัว ฉีดเชื้อเข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อ ตรงปล้องท้องปล้องที่ 6 ในปริมาณ 0.1 ml ของแต่ละระดับความเข้มข้น ส่วนในกลุ่มควบคุมมี 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อ ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งไม่ต้องฉีดสารใดๆ เลี้ยงกุ้งทดลองในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 30 ppt ที่อุณหภูมิประมาณ 28-30°C นาน 14 วัน บันทึกวันและจำนวนที่กุ้งตาย แล้วนำผลมาคำนวณหาค่า LD_{50} ตามวิธีของ Reed และ Muench (1938)

2.3 **การคัดเลือก** *B. subtilis* **สายพันธุ์ที่ยับยั้งการเจริญของ** *V. harveyi*

2.3.1 **การทดสอบการยับยั้งระหว่างเซลล์ของเชื้อ** *V. harveyi* **กับ** *B. subtilis*

เพาะเลี้ยง *B. subtilis* ที่ต้องการทดสอบ ในอาหาร TSB (เติม1.5%NaCl) เขย่าที่ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยง *V. harveyi* บนอาหาร TSA (เติม1.5%NaCl) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงได้มาเจือจางในน้ำเกลือ 1.5%NaCl ให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/ml โดยวัดให้ได้ OD_{660}= 0.1 (มีเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml) หยด *V. harveyi* ที่เตรียม 150 µl และเกลี่ยให้ทั่วบนอาหารวุ้น TSA ที่เติม 1.5%NaCl และเจาะรูด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm จำนวน 4 หลุม นำ *B. subtilis* แต่ละสายพันธุ์หยดลงในหลุม ๆ ละ 40 µl โดยทุกขั้นตอนใช้เทคนิคที่สะอาดปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง สังเกตวงใสที่เกิดขึ้นรอบๆ บริเวณหลุมที่หยด *B. subtilis* บันทึกผล จากผลที่ได้ ทำการคัดเลือกเชื้อ *B. subtilis* ที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi*

2.3.2 **การทดสอบการยับยั้งเซลล์ *V. harveyi* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis***

นำเชื้อ *B. subtilis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB (เติม 1.5%NaCl) เขย่าที่ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ แยกเอาแต่เฉพาะน้ำเลี้ยงเชื้อ (Supernate) แบ่งไปทดสอบเป็น 2 ชุด โดยชุดแรกเป็นน้ำเลี้ยงเชื้อที่ยังไม่ได้กรอง ส่วนชุดที่สองเป็นน้ำเลี้ยงเชื้อที่กรองโดย Milipore filter ขนาดรูกรอง 0.45 µm และทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 10 เท่า โดยใช้เครื่อง vacuum concentrator and freeze dryer ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* โดยทำการเพาะเลี้ยง *V. harveyi* บนอาหาร TSA (เติม 1.5%NaCl) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 6 ชั่วโมง ทำการทดสอบต่อไปดังเช่นในข้อ 2.3.1 คัดเลือกเชื้อ *B. subtilis* ที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ได้ดีที่สุด

2.4 **การศึกษาการเจริญของ *B. subtilis***

2.4.1 **การวัดการเจริญของ *B. subtilis* ที่ pH 7, 8 และ 9**

ทำการทดลองลักษณะเดียวกับหัวข้อ 2.1.1 โดยใช้ *B. subtilis*

2.4.2 **การหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ *B. subtilis***

ทำการทดลองลักษณะเดียวกับหัวข้อ 2.1.2 โดยใช้ *B. subtilis*

2.4.3 **การเจริญของ *B. subtilis* ที่ระดับความเค็มต่าง ๆ**

นำอาหารวุ้น TSA (เติม NaCl) ให้มีความเข้มข้น 5, 25, 50, 75 และ 100 ppt มาทำการเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ จากข้อ 2.3.2 โดยลากเขี่ยเชื้อให้ได้โคโลนีเดียว บ่มที่ 30°C นาน 24 ชั่วโมง สังเกตดูความสามารถในการเจริญที่ระดับความเค็มต่างๆ

2.5 **การทดสอบสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ต่อการยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi***

2.5.1 **การเตรียม *V. harveyi***

เพาะเลี้ยง *V. harveyi* บนอาหารวุ้น TSA (เติม 1.5%NaCl) บ่มที่ 30°C นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายจากจานอาหารโดยละลายในหลอดที่บรรจุน้ำเกลือ (1.5 %NaCl) จำนวน 4.5 ml ทำการเจือจางให้มีความขุ่นของเชื้อที่ OD_{660} = 0.1

2.5.2 **การเตรียมสารออกฤทธิ์แบบต่าง ๆ จาก** *B. subtilis*

เพาะเลี้ยง *B. subtilis* ในฟลาสก์ขนาด 125 ml ที่บรรจุอาหาร TSB (เติม 1.5%NaCl) ปริมาตร 10 ml ความเค็ม 15 ppt เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm นาน 24 ชั่วโมง โดยนำเชื้อทั้งหมดที่เลี้ยงได้นี้ ไปเตรียมสารออกฤทธิ์ 5 แบบ ๆ ละ 2 ml ดังนี้ คือ

แบบที่ 1 ประกอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อกับตัวเซลล์ *B. subtilis* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่กล่าวมาข้างต้น

แบบที่ 2 เซนตริฟิวส์แยกเอาเฉพาะน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบ

แบบที่ 3 ใช้เครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator) ทำให้เซลล์แตกแล้วปั่นแยกน้ำเลี้ยงเชื้อกับตัวเซลล์ออกจากกัน นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปกรองด้วย Milipore filter ขนาดรูของแผ่นกรอง 0.45 µm เก็บเฉพาะสารออกฤทธิ์ที่ปลอดเชื้อ

แบบที่ 4 ทำเช่นเดียวกับแบบบที่ 3 แต่ไม่กรองน้ำเลี้ยงเชื้อ ได้สารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีตัวเซลล์ผสมอยู่ด้วย

แบบที่ 5 ได้จากสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากตัวเซลล์ใน แบบที่ 3 ซึ่งมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่าโดยใช้เครื่อง vacuum concentrator and freeze dryer

2.5.3 **การทดสอบ**

นำสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ทั้ง 5 แบบ ที่เตรียมได้จากข้อ 2.5.2 ปริมาตรอย่างละ 40 µl หยดลงในหลุมที่เจาะบนอาหาร TSA (เติม 1.5%NaCl) ที่มีเชื้อ *V. harveyi* ที่เตรียมไว้ดังในข้อ 2.5.1 ปริมาตร 150 µl เกลี่ยกระจายอยู่บนผิวหน้า ทำ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณยับยั้งรอบ ๆ หลุม บันทึกผลการทดลอง

2.6 การทดสอบความเสถียรของสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis*

2.6.1 **การเตรียม** *V. harveyi*

ทำเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.5.1

2.6.2 **การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ** *B. subtilis*

เพาะเลี้ยง *B. subtilis* ในฟลาสก์ขนาด 125 ml ที่บรรจุอาหาร TSB (เติม 1.5%NaCl) ปริมาตร 10 ml เขย่า 200 rpm อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อกับตัวเซลล์ทั้งหมดที่เลี้ยงได้ไปทำให้ตัวเซลล์แตก ด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator) แล้วดูดใส่ในหลอด microtube ปริมาตร 1 ml ทั้งหมด 10 หลอด นำไปปั่นแยกตัวเซลล์กับน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากกัน นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปกรองโดย Millipore filter เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ไว้ทดสอบ 5 ml ที่เหลือใส่หลอดแก้วแล้วนำไปผ่านความร้อนในหม้อนึ่งไอน้ำ (autoclave) ความดัน 15 ปอนด์ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C นาน 5 นาที

2.6.3 **การทดสอบ**

นำเชื้อที่ได้จากข้อ 2.6.2 ทั้งที่กรองฆ่าเชื้อและที่ผ่านการนึ่งด้วยความดันจำนวน 40 µl หยดลงในหลุมที่เจาะไว้ อย่างละ 2 หลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm บนอาหารวุ้น TSA (เติม 1.5%NaCl) ที่มี *V. harveyi* เกลี่ยกระจายอยู่ทั่วบริเวณผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใสที่เกิดขึ้นรอบๆ บริเวณหลุม บันทึกผล

2.7 **การหาปริมาณของ** *B. subtilis* **ที่สามารถยับยั้ง** *V. harveyi* **บนอาหารวุ้น** TSA **ที่เติม** 1.5%NaCl

2.7.1 **การเตรียม** *V. harveyi*

เกลี่ยเชื้อ *V. harveyi* ให้แยกได้โคโลนีเดี่ยว บนอาหารวุ้น TSA (เติม 1.5%NaCl) บ่มที่ 30°C นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ *V. harveyi* 1 ลูป ลงในอาหารเหลว TSB (เติม 1.5%NaCl) ปริมาตร 10 ml ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 125 ml นำไปเพาะเลี้ยงโดยเขย่า 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณของเชื้อโดยใช้สูตรที่ได้จากกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณของ *V. harveyi* แล้วเจือจางเชื้อด้วย 1.5%NaCl ให้มีปริมาณเชื้อ 10^3 CFU/ml

2.7.2 **การเตรียม** *B.subtilis*

เตรียมลักษณะเดียวกับหัวข้อ 2.7.1 คำนวณหาปริมาณของเชื้อโดยใช้สูตรที่ได้จากกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณของ *B. subtilis* แล้วเจือจางเชื้อด้วย 1.5%NaCl ให้มีปริมาณเชื้อ 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 และ 10^1 CFU/ml

2.7.3 **การทดสอบ**

ผสมเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.7.1 และ 2.7.2 อย่างละ 1 ml เท่ากัน ลงในหลอดโดยใช้ปริมาณของ *B. subtilis* ที่ 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 และ 10^1 CFU/ml ขณะที่ *V. harveyi* มีปริมาณ 10^3 CFU/ml (ทำชุดละ 2 ซ้ำ) นำไปเขย่า 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง หาปริมาณเชื้อทั้งสองโดยทำ colony plate count บนอาหารวุ้น TSA (เติม 1.5%NaCl) ที่เลี้ยงผสมกันในช่วงเวลา 0 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง บันทึกจำนวนเชื้อทั้ง 2 ชนิด และนำมาแสดงผลเป็นค่า CFU/ml

2.8 **การหาค่า** MIC **และ** MBC **ของสารออกฤทธิ์ของ** *B.subtilis* **ต่อเชื้อ** *V. harveyi* **โดยวิธี** tube dilution

2.8.1 **การเตรียม** *V. harveyi*

ใช้เชื้อ *V. harveyi* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น TSA (เติม 1.5% NaCl) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง โดยเขี่ยเชื้อ 1 ลูป เจือจางด้วยน้ำเกลือ 1.5%NaCl ให้ได้ความขุ่นที่ OD_{660}= 0.1 (มีเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml) เจือจางแบบมีลำดับ (1:10) จำนวน 5 หลอดโดยใช้อาหารเหลว TSB (เติม 1.5%NaCl) เพื่อให้ได้เชื้อทดสอบความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10^3 CFU/ml

2.8.2 **การเตรียมสารสกัดหยาบของ** *B.subtilis* **(ดัดแปลงจาก** MaKeen *et. al*, 1986)

เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ในอาหาร TSB (เติม 1.5%NaCl) ปริมาตร 250 ml ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร จำนวน 2 ขวด บนเครื่องเขย่า 200 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน ปั่นแยกโดยใช้ความเร็ว 8,000 g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส มาปรับค่า pH ให้เท่ากับ 2.0 ด้วยสารละลาย 6 N HCl จากนั้นจึงนำไปปั่นแยกส่วนใสทิ้งที่ความเร็ว 15,000 g เป็นเวลา 20 นาที และนำส่วนที่เป็นตะกอนมาสกัดสารปฏิชีวนะด้วย 80 % แอทธานอล 45 ml

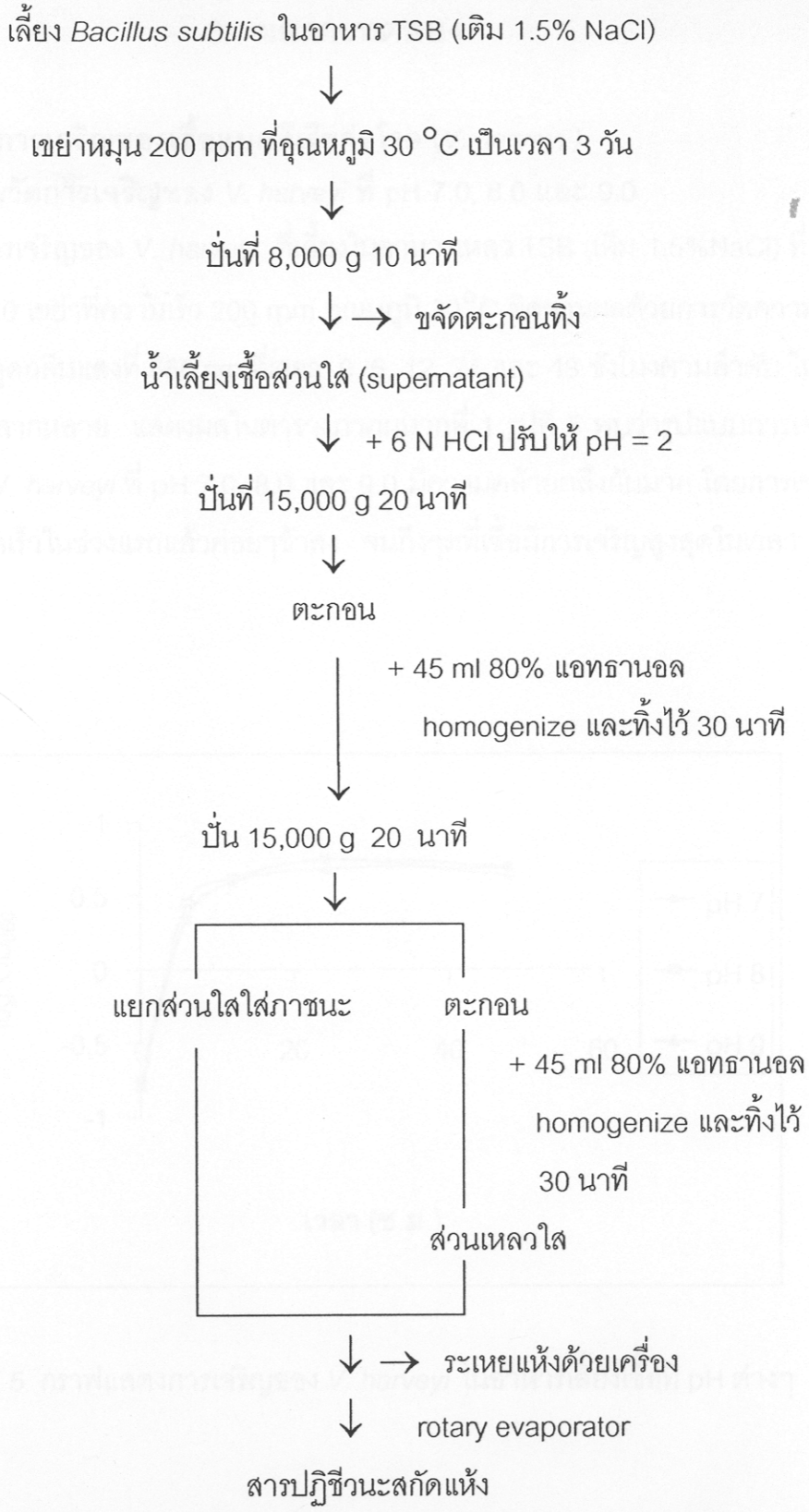
2 ครั้ง ทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ชั่งปริมาณสารที่ได้ แล้วนำสารมาละลายอีกครั้งใน 80 %แอทธานอล ได้สารสกัดหยาบ ดังแสดงในรูปที่ 4

2.8.3 เตรียมสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และการทดสอบ

ทำการเจือจางสารสกัดหยาบ 10 mg/ml ด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 2 mg/ml แล้วทำการเจือจางแบบมีลำดับ 1:2 จำนวน 5 หลอด ๆ ละ 1 ml ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (เติม 1.5%NaCl) ลงในหลอดทดลอง ได้สารสกัดหยาบหลอดละ 0.5 ml ที่มีความเข้มข้นจากหลอดที่ 1 ถึง 5 คือ 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 mg/ml ตามลำดับและหลอดควบคุมใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (เติม 1.5%NaCl) ใส่ *V. harveyi* ที่เตรียมไว้จากข้อ 2.8.1 ลงในทุกหลอด ๆ ละ 0.5 ml เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm นาน 24 ชั่วโมง สังเกตดูความขุ่นใสในแต่ละหลอด ซึ่งบ่งบอกถึงการเจริญของเชื้อทดสอบ อ่านค่า MIC โดยใช้ค่าความเข้มข้นของหลอดสุดท้ายที่มีความใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผลการทดลอง ถ่ายเชื้อ 0.1 ml จากหลอดที่ใสนำไปเกลี่ยบนอาหาร TCBS บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง อ่านค่า MBC ได้จากความเข้มข้นของจานอาหารสุดท้ายที่ไม่มีเชื้อ *V. harveyi* ขึ้น

2.9 การหาระดับความเข้มข้นของ*V. harveyi* ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบจาก *B. subtilis*

เตรียม *V. harveyi* ไว้ ที่ความเข้มข้น 10^3,10^4,10^5 และ 10^6 cfu/ml ผสมกับสารสกัดหยาบของ *B. subtilis* ที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml และ 0.5 mg/ml ในอัตราส่วน 1:1 จำนวน 1 ml เท่ากัน มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดหยาบเท่ากับ 0.5 และ 0.25 mg/ml ชุดละ 2 ซ้ำ เขย่าและเพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 rpm นาน 24 ชั่วโมง สังเกตดูความใสนำไปเกลี่ยบนอาหาร TCBS แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง อ่านค่า MBC จากความเข้มข้นของจานอาหารสุดท้ายที่ไม่มีเชื้อขึ้น



รูปที่ 4 แผนผังการสกัดสารปฏิชีวนะอย่างหยาบ (Mckeen *et al*., 1986)