หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 3

# ผลการวิจัย

## 3.1 การคัดเลือก Bacillus spp. ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้ง Streptomyces scabies

### 3.1.1 การคัดเลือก Bacillus spp. โดยวิธีการขีดไขว้กับเชื้อ S. scabies

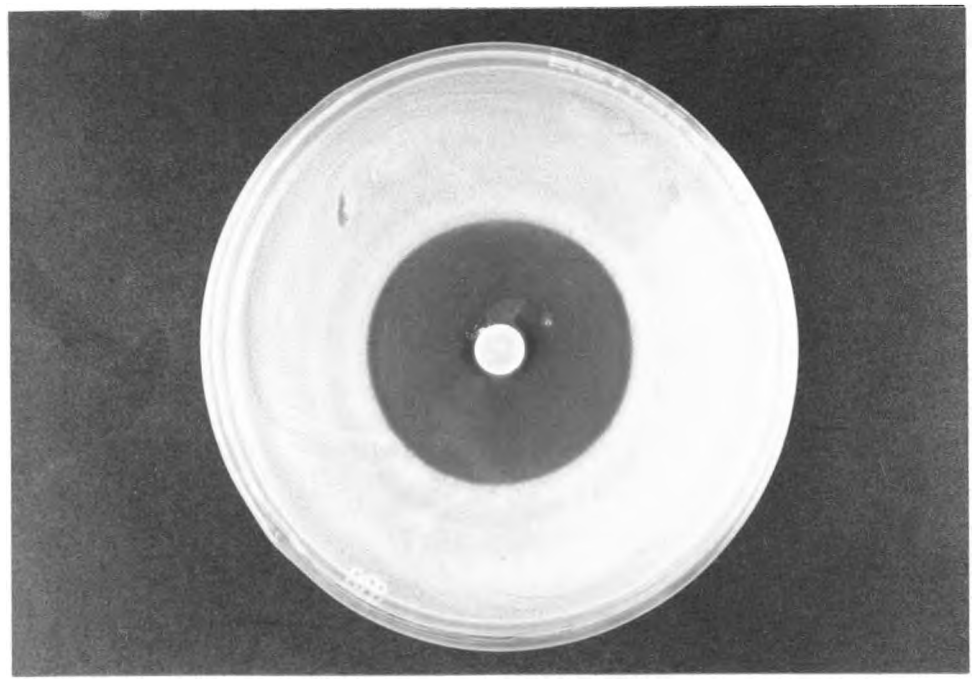
จาก Bacillus spp. จำนวน 8 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง S. scabies โดยวิธีการขีดไขว้ปรากฏว่ามี 4 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้งได้ดีดังแสดงในตารางที่ 3.1

### 3.1.2 การคัดเลือก Bacillus spp. โดยการดูบริเวณยับยั้งรอบกระดาษทดสอบ

หลังจากทดสอบความสามารถในการยับยั้ง S. scabies อย่างประมาณการ โดยวิธีการขีดไขว้จากข้อ 3.1.1 แล้ว ทำการคัดเลือกขั้นละเอียดด้วยการเลี้ยงในอาหารเหลว โดยเลี้ยงที่สภาวะเดียวกัน ทำให้ปราศจากเชื้อก่อนโดยการกรองด้วยมิลลิพอร์เมมเบรน แล้วจึงทำการทดสอบปริมาณสารปฏิชีวนะดังวิธีการในข้อ 2.3.2 ผลการคัดเลือกปรากฏว่าสายพันธุ์ B1 ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งดีที่สุด รองลงไปได้แก่ B2 ส่วน B3 และ B4 ให้ผลใกล้เคียงกัน ที่เหลืออีก 4 สายพันธุ์ไม่ให้บริเวณใสรอบกระดาษทดสอบดังแสดงในตารางที่ 3.1 รูปที่ 3.1 และ 3.2 ก.

รูปที่ 3.1 แสดงการยับยั้งของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ต่อ S. scabies โดยวิธีการขีดไขว้ เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 4 วัน

ก



ข

รูปที่ 3.2 แสดงการยับยั้งรอบกระดาษทดสอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธีซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ (Diffusion method) ของ Bacillus sp.สายพันธุ์ B1
ก เมื่อใช้ S. scabies เป็นจุลินทรีย์ตัวทดสอบ
ข เมื่อใช้ Arthrobacter sp. เป็นจุลินทรีย์ตัวทดสอบ

ตารางที่ 3.1 เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้ง S. scabies ของ Bacillus spp. จำนวน 8 สายพันธุ์

| | ประสิทธิภาพการยับยั้ง S. scabies | |
|---|---|---|
| Bacillus spp. | วิธีขีดไขว้ | วิธีการใช้กระดาษทดสอบเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง |
| B1 | +++++ | 3.5 ซม. |
| B2 | ++++ | 3.0 ซม. |
| B3 | ++++ | 2.0 ซม. |
| B4 | ++++ | 2.0 ซม. |
| B5 | +++ | - |
| B6 | ++ | - |
| B7 | ++ | - |
| B8 | + | - |

3.2 การตรวจสอบชนิดของ Bacillus spp. ที่คัดเลือกได้ ทางอนุกรมวิธาน

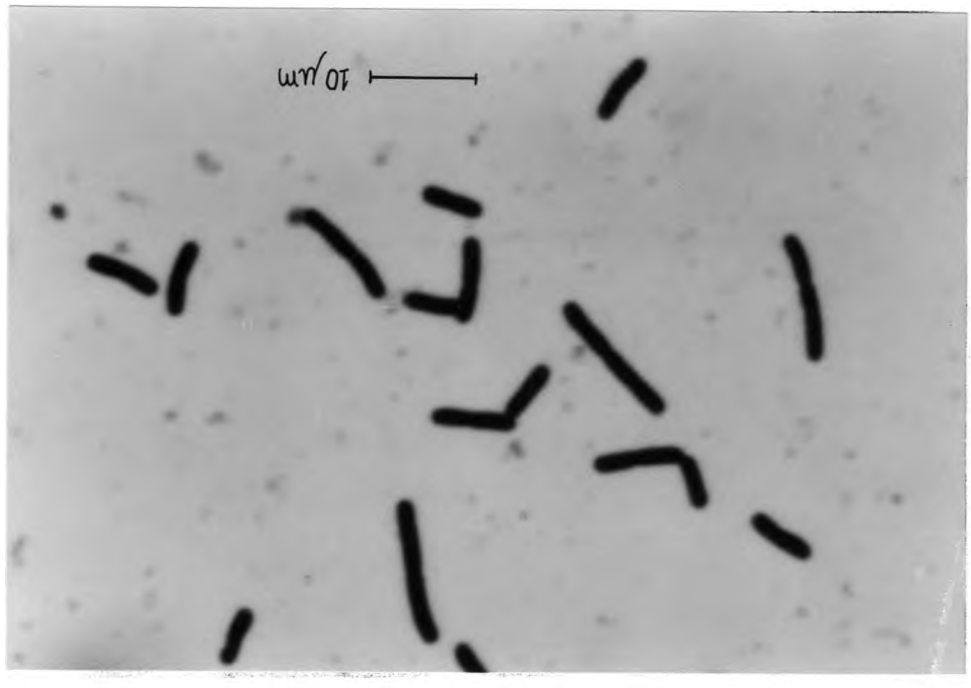
ตรวจสอบชนิดของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง S. scabies ได้สูงสุด พบว่าลักษณะโคโลนีบนอาหารนิวเตรียนท์ อการ์มีสีขาวขุ่นแห้งกระด้าง เมื่อใช้สีย้อม ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็นแกรมล์บวก รูปร่างเป็นท่อนมีเอนโดสปอร์รูปไข่อยู่ตรงกลางเซลล์ มีสมบัติในการย่อยเคซีน แป้งและใช้ซิเตรต ให้ผลบวกเมื่อทดสอบคาตาเลส (catalase test) วี.พี (V-P test) ซึ่งให้ความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 6.0 แต่ให้ผลลบเมื่อทดสอบอินโดล (indole test) ผลิตกรดออกมาเมื่อเลี้ยงในเบซัล มีเดียม ที่มีน้ำตาลกลูโคส แมนนิทอล และไซโลส สามารถเจริญได้ในอาหารนิวเตรียนท์ บรอท ที่มีความเป็น

กรด-ด่าง 6.8 แซบบรอด เดกซ์โทรส บรอท ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 5.7 ซอลท์ โทเลอแรนซ์มีเดียม ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2.0% 5.0% 7.0% และ 10.0% และสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 55°ซ. ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และ 3.3 และรูปที่ 3.3

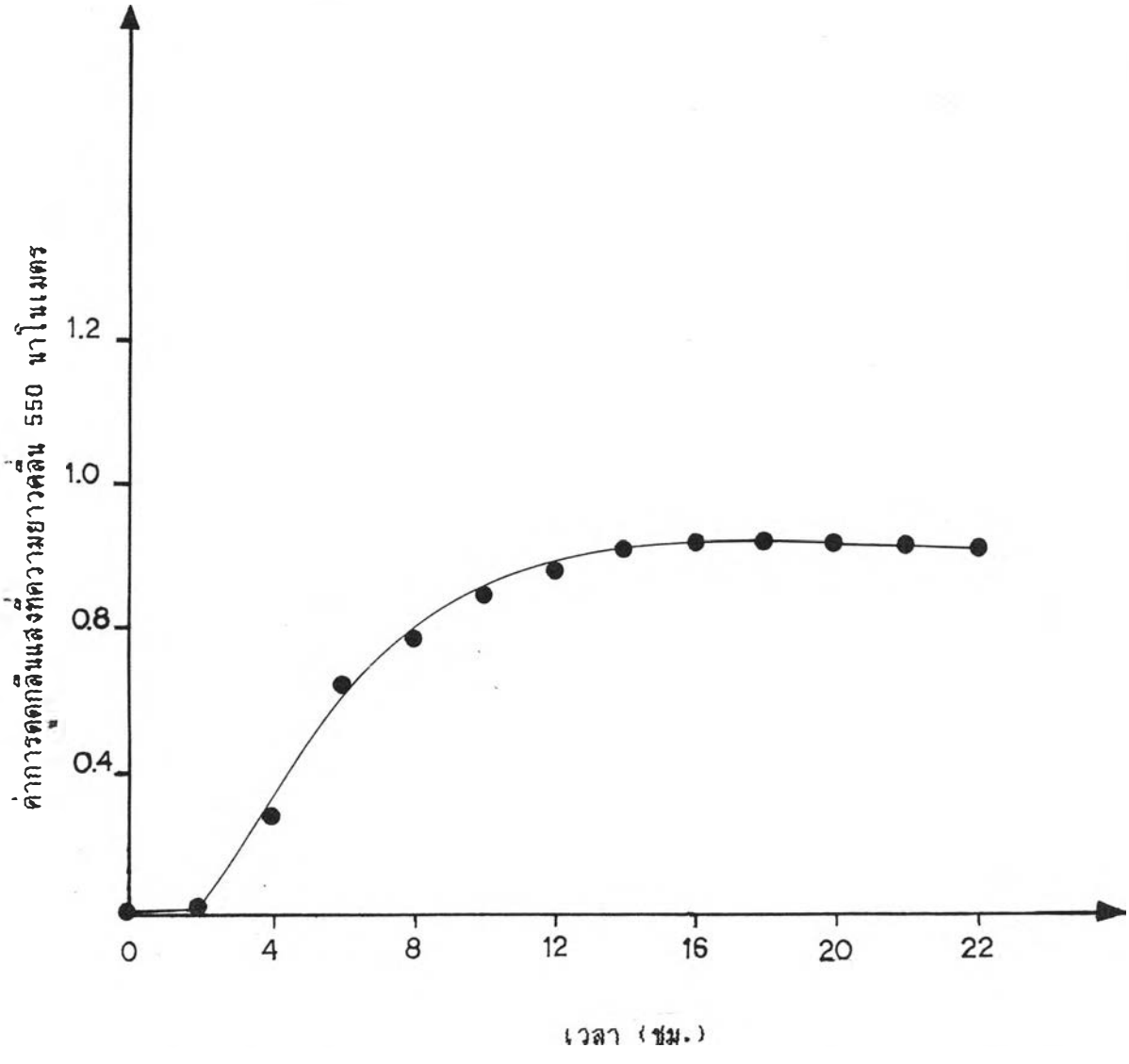
ตารางที่ 3.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1

| ลักษณะ | รายละเอียด |
|---|---|
| โคโลนีบนนิวเตรียนท์ อการ์ | ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-5 มม. แห้ง, กระด้าง ไม่เป็นมัน สีขาวขุ่น |
| เซลล์ : รูปร่าง | เป็นท่อนตรง |
| : แกรมส์ สเตน | ติดสีน้ำเงิน (positive) |
| เอนโดสปอร์ : รูปร่าง | เป็นรูปไข่ |
| : ตำแหน่ง | ตรงกลางเซลล์ |

จากการศึกษารูปแบบการเจริญของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ในขวดเขย่า เป็นเวลา 24 ชม. วัดการเจริญโดยดูค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 3.4




รูปที่ 3.3 รูปร่างของ Bacillus sp.สายพันธุ์ B1 เมื่อเซลล์อายุได้ 12 ชั่วโมง (กำลังขยาย 400 เท่า)




รูปที่ 3.4 รูปแบบการเจริญของ Bacillus sp.สายพันธุ์ B1ในอาหารนิวเตรียนท์บรอท เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่า ติดตามการเจริญโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

ตารางที่ 3.3 ลักษณะทางสรีระวิทยา (Physiological characteristics) ของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1

| ลักษณะที่ศึกษา | ผลการศึกษา |
|---|---|
| ทดสอบคาตาเลส | + |
| ทดสอบวี-พี | + |
| ทดสอบอินโดล | - |
| การย่อยเคซีน | + |
| การย่อยแป้ง | + |
| การใช้ซิเตรต | + |
| การผลิตกรดจากน้ำตาล | |
| กลูโคส | + |
| แมนนิทอล | + |
| ไซโลส | + |
| pH จาก วี-พี บรอท | < 6.0 |
| การเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ | |
| 2.0% | + |
| 5.0% | + |
| 7.0% | + |
| 10.0% | + |
| การเจริญในแซบบรอดเดกซ์โทรสบรอท pH 5.7 | + |
| การเจริญในนิวเตรียนท์บรอท pH 6.8 | + |
| การเจริญในแอนแอโรบิค อการ์ | + |
| การเจริญในสภาวะอุณหภูมิ 55°ซ. | + |

จากผลการศึกษาจากตารางที่ 3.2 และ 3.3 พิจารณาได้ว่า Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 มีคุณสมบัติคล้ายคลึงเป็น Bacillus licheniformis (Sneath และคณะ, 1986)

3.3 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียตัวทดสอบ (Testing Bacteria) ทางอนุกรมวิธาน

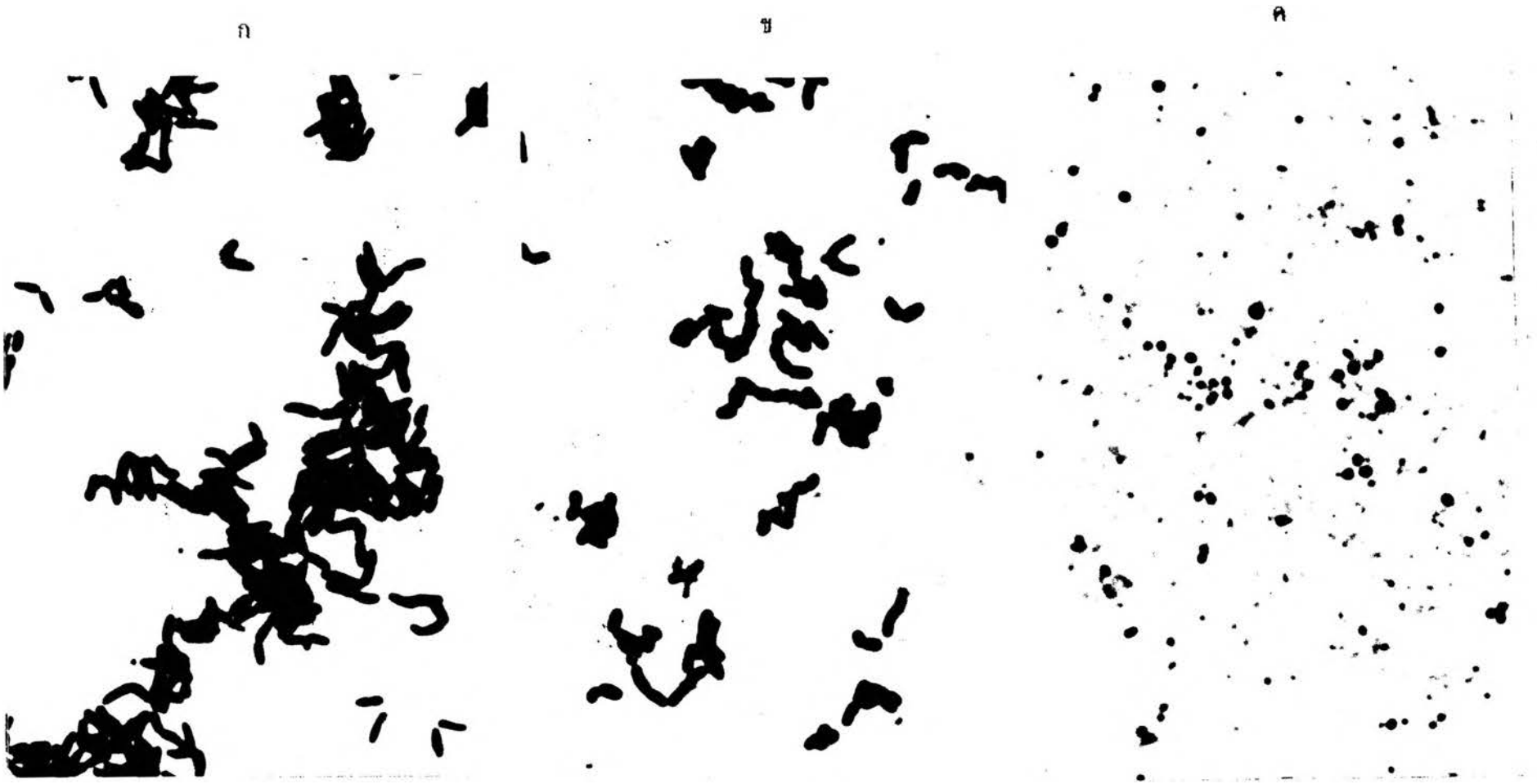
เนื่องจากการใช้ S. scabies เป็นตัวทดสอบปฏิกริยาของสารปฏิชีวนะต้องใช้เวลาถึง 4 วัน จึงจะทราบผลจึงได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีการเจริญเร็วกว่าและถูกยับยั้งได้เหมือนกับ S. scabies แต่เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่แยกได้เองจึงนำมาตรวจสอบชนิดทางอนุกรมวิธาน เพื่อจะได้ทราบว่าเป็นเชื้อที่สามารถใช้ในห้องปฏิบัติการได้

ตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นจุลินทรีย์ตัวทดสอบแทน S. scabies ในการศึกษาขั้นต่อไป พบว่าโคโลนีบนอาหารนิวเตรียนท์ อการ์ มีลักษณะขอบเรียบ เป็นมัน สีครีม เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง รูปร่างของเซลล์ขึ้นกับวงจรการเจริญกล่าวคือ จะมีรูปร่างเป็นแท่งไม่แน่นอน (Irregular rod) บ้างก็จัดตัวเป็นเป็นรูปตัววี (V-formations) เมื่ออายุได้ 24 ชม. จะเริ่มเปลี่ยนรูปร่างจนเมื่อแก่มากขึ้นเซลล์จะเริ่มเปลี่ยนรูปร่างเป็นทรงกลมไปเรื่อย ๆ จนหมดประมาณ 1 สัปดาห์ดังรูปที่ 3.5

และเมื่อถ่ายในอาหารใหม่เซลล์จะเปลี่ยนรูปร่างเป็นรูปท่อนใหม่อีกครั้ง เซลล์ไม่มีการเคลื่อนที่ ไม่มีขบวนการหมักน้ำตาลและไม่ทำให้เกิดกรดในอาหารเปปโตน ไม่มีเอนไซม์ เซลลูเลสและยูรีเอส ไม่สามารถเจริญได้ถ้าไม่มีออกซิเจน สามารถย่อยแป้งและนม เมื่อทดสอบคาตาเลสได้ผลบวก สามารถใช้เกลืออะซิเตตได้แต่ใช้เกลือซิเตรตไม่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 3.4 และ 3.5

ตารางที่ 3.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียตัวทดสอบที่นำมาใช้แทน S. scabies

| ลักษณะ | รายละเอียด |
|---|---|
| โคโลนีบนนิวเตรียนท์ อการ์ | ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 มม. เป็นมัน ไม่ใส นูนเล็กน้อย สีครีม เมื่อแก่จะกลายเป็นสีเหลืองอ่อน |
| เซลล์ : รูปร่าง | เป็นวงจรของรูปแท่งที่ไม่แน่นอนกับทรงกลม |
| : แกรมส์ สเตน | ติดสีน้ำเงิน (positive) แต่จะถูกดีคัลเลอไรซ์ (decolorize) เล็กน้อยเมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้น |
| เอนโดสปอร์ | ไม่มี |




รูปที่ 3.5 รูปร่างของ Arthrobacter sp.ที่ใช้เป็นจุลินทรีย์ตัวทดสอบ
ก เมื่อจุลินทรีย์อายุได้ 12 ชั่วโมง; ข เมื่อจุลินทรีย์อายุได้24 ชั่วโมง;
ค เมื่อจุลินทรีย์อายุได้ 7 วัน (กำลังขยาย 400 เท่า)

ตารางที่ 3.5 ลักษณะทางสรีระวิทยาของแบคทีเรียตัวทดสอบที่นำมาแทน *S. scabies*

| ลักษณะที่ศึกษา | ผลการศึกษา |
|---|---|
| ทดสอบคาตาเลส | + |
| ทดสอบการเคลื่อนที่ | - |
| การย่อยเคซีน | + |
| การย่อยแป้ง | + |
| การย่อยเซลลูโลส | - |
| การย่อยยูเรีย | - |
| การใช้ซิเตรต | - |
| การใช้อะซิเตต | + |
| การใช้เจลาติน | + |
| การทำให้เกิดกรดเมื่อเลี้ยงในเปปโตนมีเดียมเมื่อมีน้ำตาล | |
| - ดี-กลูโคส | - |
| - ดี-แมนนิทอล | - |
| - ดี-ซูโครส | - |
| การเจริญในแอนแอโรบิค อการ์ | - |

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาทั้งหมด พิจารณาได้ว่าแบคทีเรียตัวทดสอบที่จะนำมาใช้แทน *S. scabies* เป็น *Arthrobacter* sp. (Sneath และคณะ, 1986)

3.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในขวดเขย่าเพื่อให้ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุด

3.4.1 ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

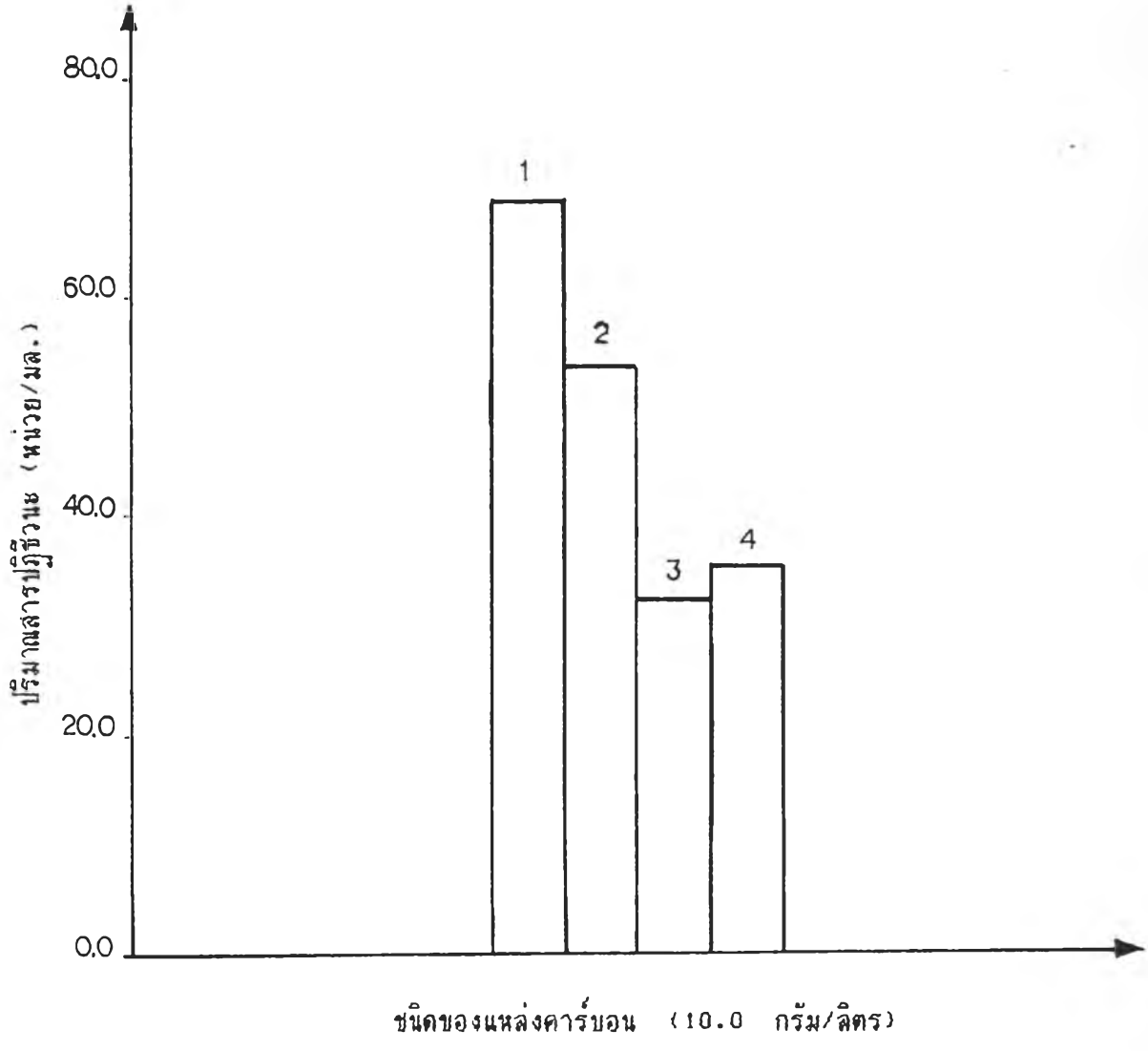
3.4.1.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

ได้ศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในขวดเขย่าเพื่อให้ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุดตามวิธีการในข้อ 2.6 โดยให้สูตรอาหารที่ใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ (Haavik และ Thomassen, 1973) (ภาคผนวกหมายเลข 1.2) แต่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนตลอดไปจนถึงความเข้มข้นที่เหมาะสม จากผลการศึกษาพบว่ากลูโคส 10.0 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตสารปฏิชีวนะเกิดสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แป้ง, ซูโครส และกากน้ำตาล ดังรูปที่ 3.6 และ 3.7 ดังนั้นกลูโคส 10.0 กรัม/ลิตร จึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดที่ใช้ในการศึกษาต่อไป

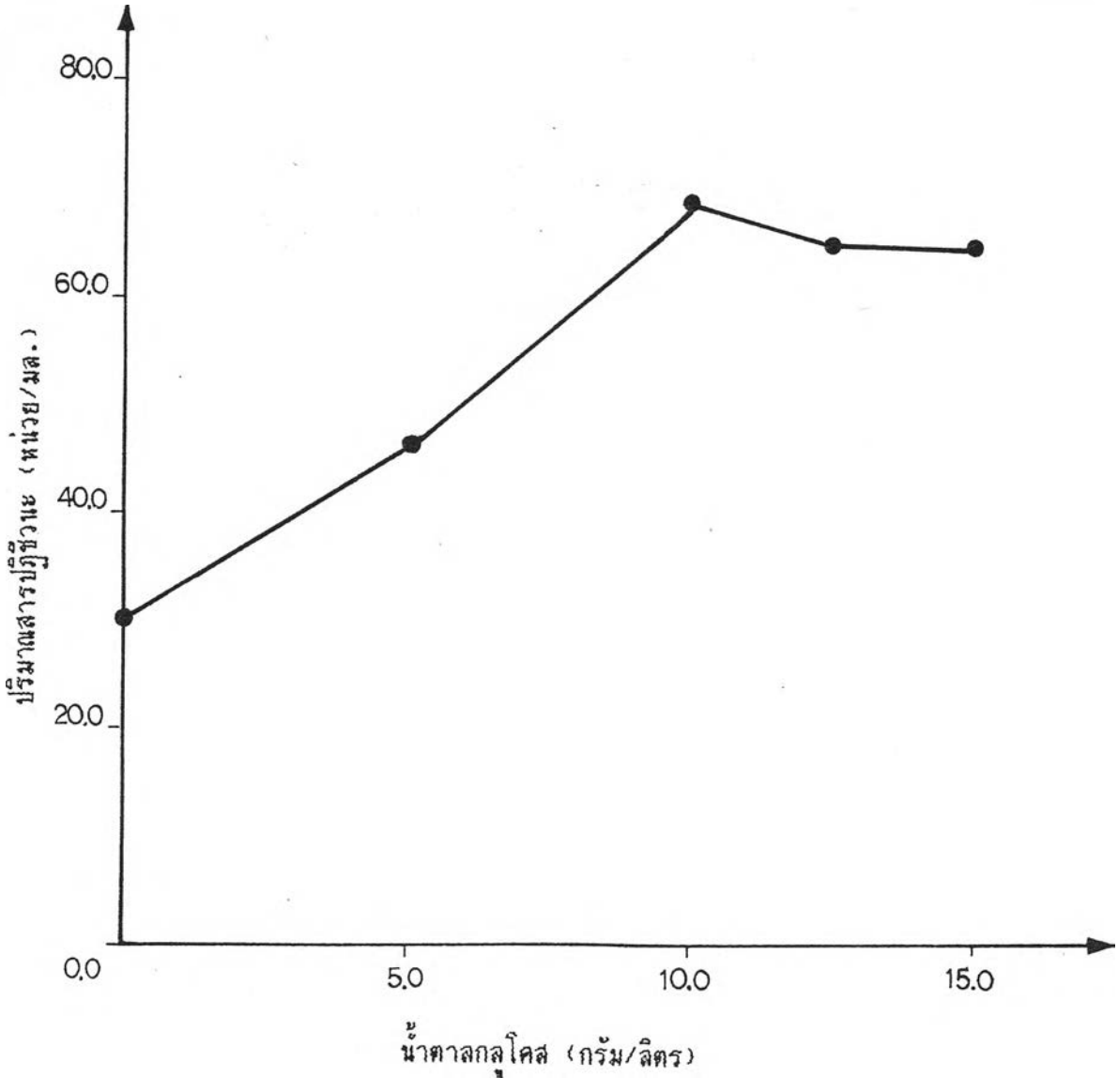
3.4.1.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในขวดเขย่าเพื่อให้ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุด วิธีการศึกษาทำเช่นเดียวกับการหาแหล่งคาร์บอน กล่าวคือแปรผันชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เป็นวัตถุดิบ ได้แก่ ซอยโทน กากถั่วเหลือง กากถั่วเหลืองย่อยด้วยกรดกำมะถันและคอร์นสตีฟลิเคอร์ พบว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวจะให้ความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายของการหมักมีค่าต่ำมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งคอร์นสตีฟลิเคอร์ ซึ่งไม่ให้ผลผลิตเลยนั้นมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.03 แต่เมื่อเติมเปปโตน 10.0 กรัม/ลิตร ทำให้ความเป็นกรด-ด่างและสารปฏิชีวนะเพิ่มสูงขึ้น เช่น ในซอยโทนให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 166.5% และความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นจาก 6.50 เป็น 7.57 ตามลำดับ จึงใช้ซอยโทนในการศึกษาต่อไป ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 3.8

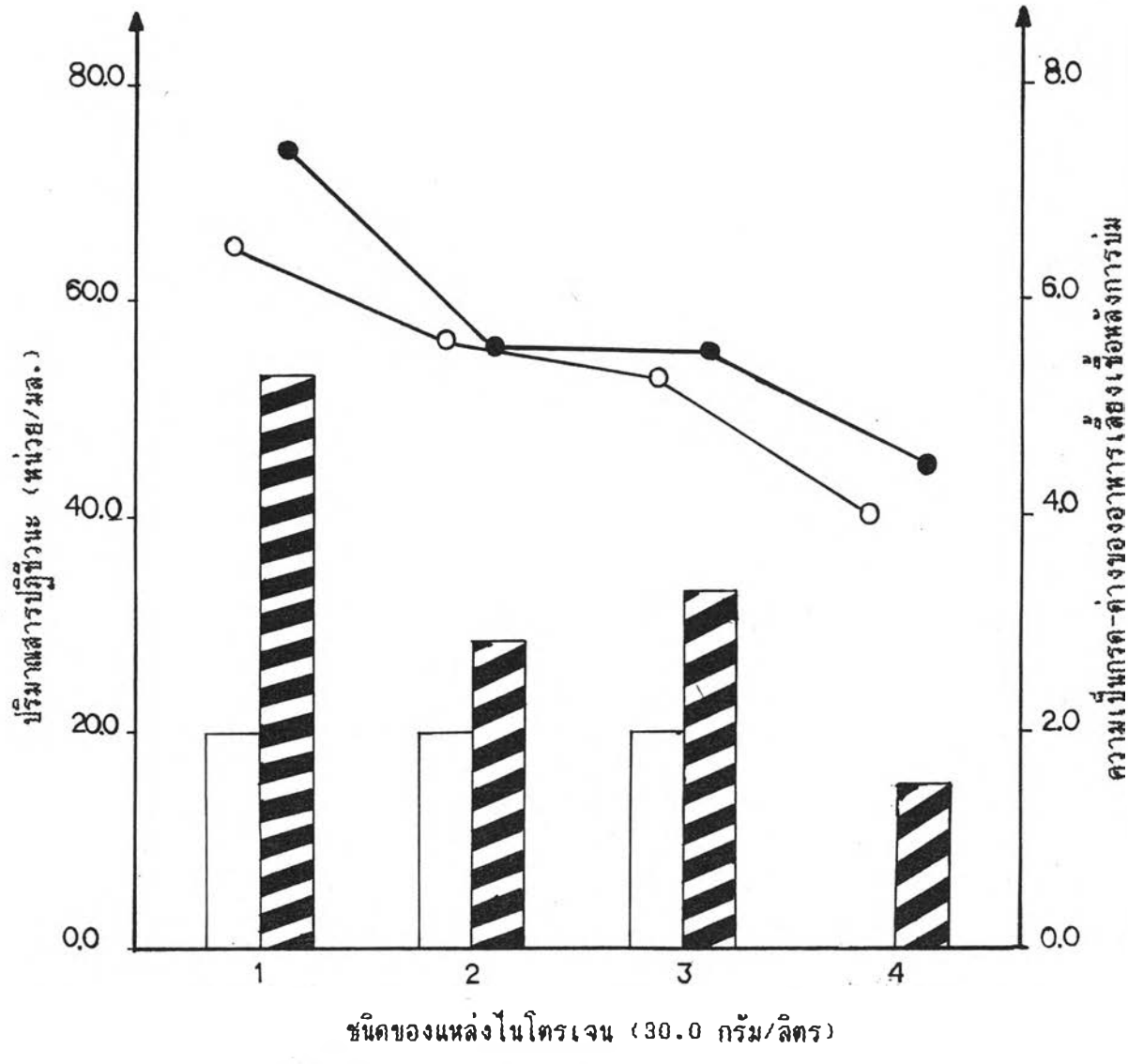
กำหนดให้ซอยโทน 20.0 กรัม/ลิตร เป็นตัวคงที่ทำการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนตัวที่ 2 ที่ทำการศึกษาได้แก่ เปปโตน




รูปที่ 3.6 ผลของแหล่งสารคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงใน ภาคผนวกเลขที่ 1.2 โดยที่ 1,น้ำตาลกลูโคส ; 2,น้ำตาลซูโครส ; 3,แป้ง ; 4,กากน้ำตาล




รูปที่ 3.7 ผลของการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในภาคผนวกเลขที่ 1.2




รูปที่ 3.8 ผลของแหล่งสารไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในภาคผนวกเลขที่ 1.2 โดยที่ 1, ซอยโทน ; 2, กากถั่วเหลือง ; 3, กากถั่วเหลืองย่อยด้วยกรดกำมะถัน ; 4, คอร์นสตีนลิเคอร์ และ

□ , ปริมาณสารปฏิชีวนะเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดเดียว 30.0 กรัม/ลิตร

▨ , ปริมาณสารปฏิชีวนะเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจน 20.0 และเปปโตน 10.0 กรัม/ลิตร

○—○ , ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดเดียว

●—● , ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจน เมื่อรวมกับเปปโตน

ผงสกัดมอลท์ ผงสกัดยีสต์ และทริปโตน ผลการศึกษาพบว่า 10.0 กรัม/ลิตร ของผงสกัดมอลท์ให้ผลผลิตสูงสุดดังรูปที่ 3.9 และ 3.10

กำหนดให้ 10.0 กรัม/ลิตร ของผงสกัดมอลท์เป็นตัวคงที่ทำการศึกษาความเข้มข้นของซอยโทนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1

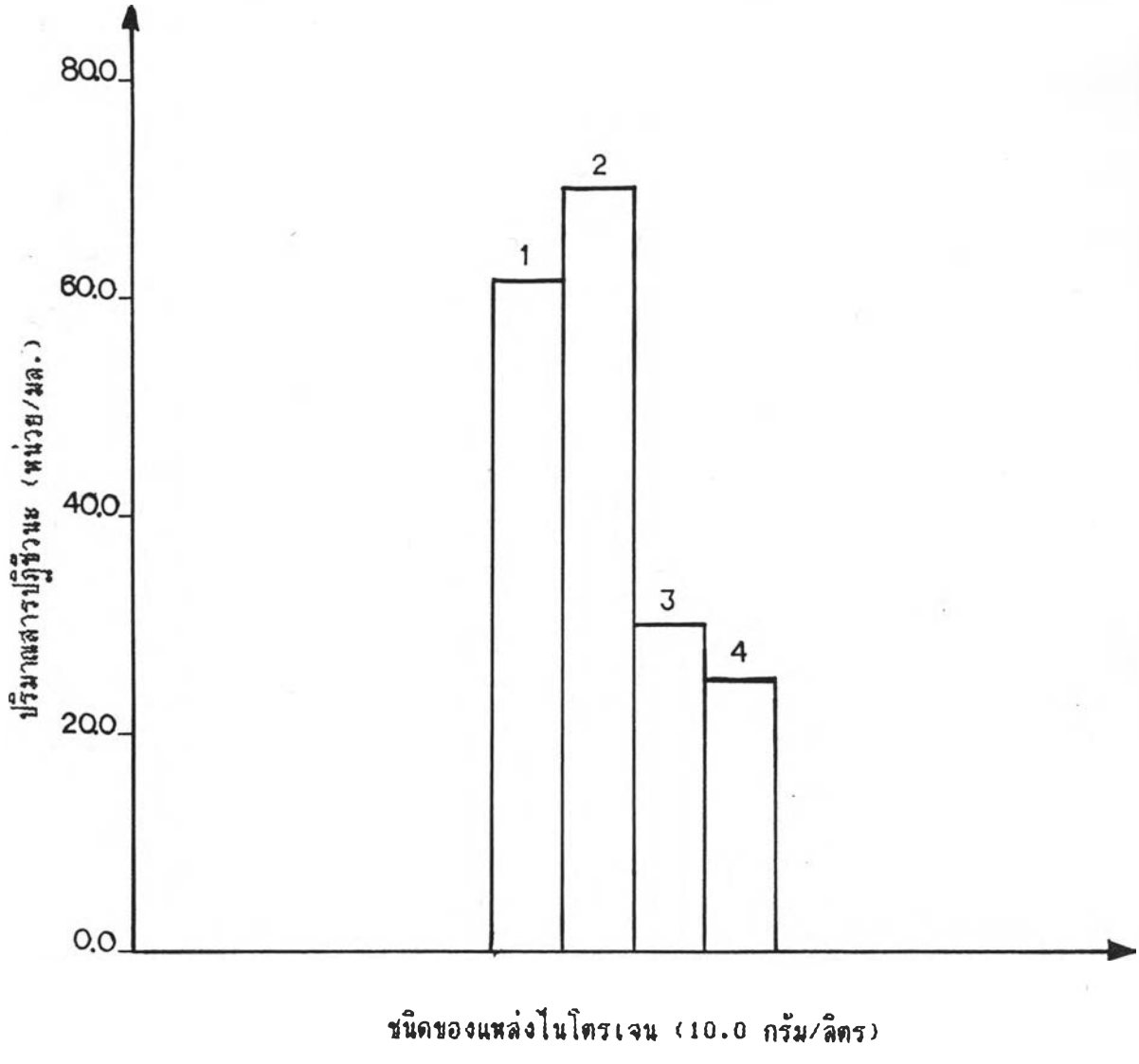
จากผลการศึกษาพบว่า ซอยโทน 20.0 กรัม/ลิตร สามารถให้ปริมาณสารปฏิชีวนะสูงสุดดังรูปที่ 3.11

ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดได้แก่ ซอยโทนร่วมกับผงสกัดมอลท์

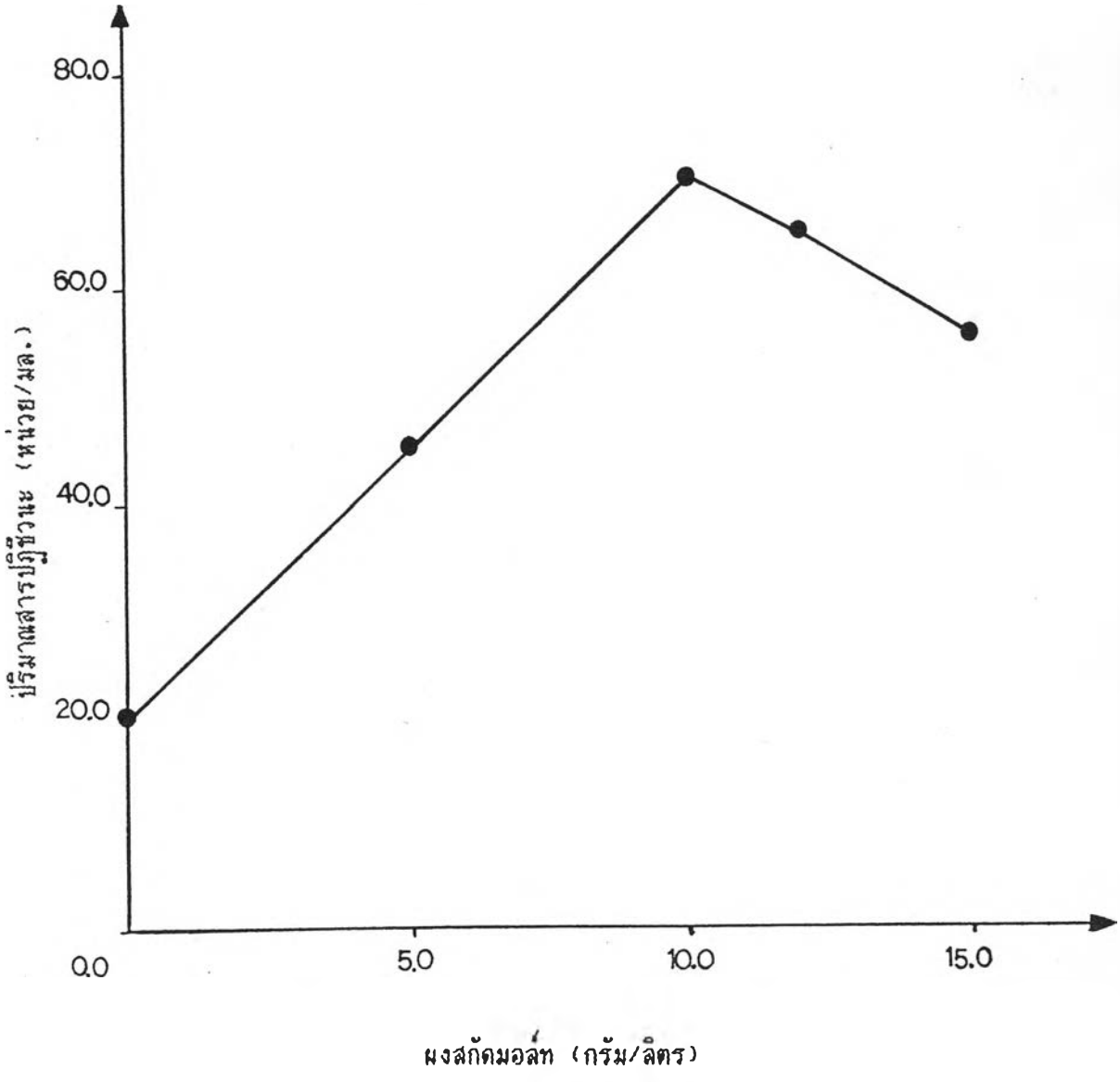
3.4.1.3 แหล่งเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ (Trace element)

ได้แปรผันชนิดและปริมาณที่เหมาะสมของเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ โดยเลี้ยง Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ตามวิธีการในข้อ 2.6 แล้วศึกษาผลของปริมาณเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$) แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$) โปรแตสเซียมซัลเฟต ($K_2SO_4$) และ 5.0 กรัม/ลิตร แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) จากผลการศึกษาพบว่าคัลเซียมคลอไรด์ทำให้ปริมาณสารปฏิชีวนะลดลง ดังนั้นไม่ควรใช้ $CaCl_2$ ในการผลิตสารปฏิชีวนะสำหรับ $FeSO_4.7H_2O$ 0.028 กรัม/ลิตร $MgCl_2.6H_2O$ 0.005 กรัม/ลิตร $MnSO_4.H_2O$ 0.010 กรัม/ลิตร และ $K_2SO_4$ 1.60 กรัม/ลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะดังแสดงในตารางที่ 3.6

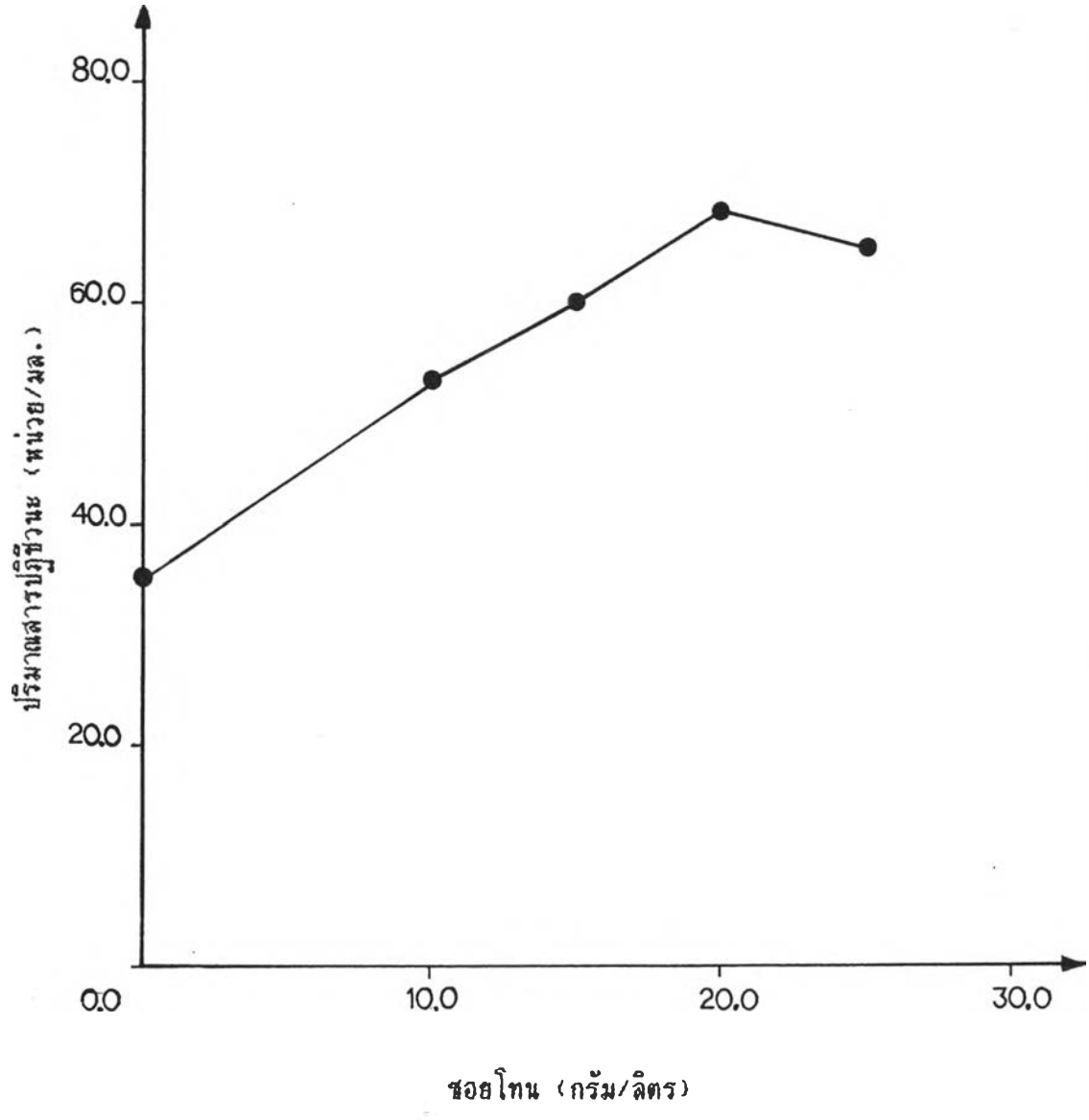
สำหรับ $CaCO_3$ ความเข้มข้น 5.0 กรัม/ลิตร ทำให้การผลิตสารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัด เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นตัวละเทินซึ่งมีผลต่อความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อควบคู่ไปด้วย โดยเลี้ยงในสูตรอาหารสำหรับผลิตสารปฏิชีวนะเช่นกันแต่ศึกษาโดยใช้แหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกันผสมกับเปปโตน 10.0 กรัม/ลิตรเป็นตัวคงที่ แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ได้แก่ ซอยโทน กากถั่วเหลือง และกากถั่วเหลืองสกัดไขมันอย่างละ 20.0 กรัม/ลิตร พบว่าแคลเซียมคาร์บอเนต ทำ




รูปที่ 3.9 ผลของแหล่งสารไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ เมื่อผสมกับซอยโทน 20.0 กรัม/ลิตร ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 โดยที่องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในภาคผนวกเลขที่ 1.2 เมื่อ 1,เปปโตน ;2,ผงสกัดมอลท์ ;3,ทริปโตน ;4,ผงสกัดยีสต์




รูปที่ 3.10 ผลของการแปรผันความเข้มข้นของผงสกัดมอลท์ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 โดยผสมกับซอยโทน 20.0 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงใน ภาคผนวกเลขที่ 1.2

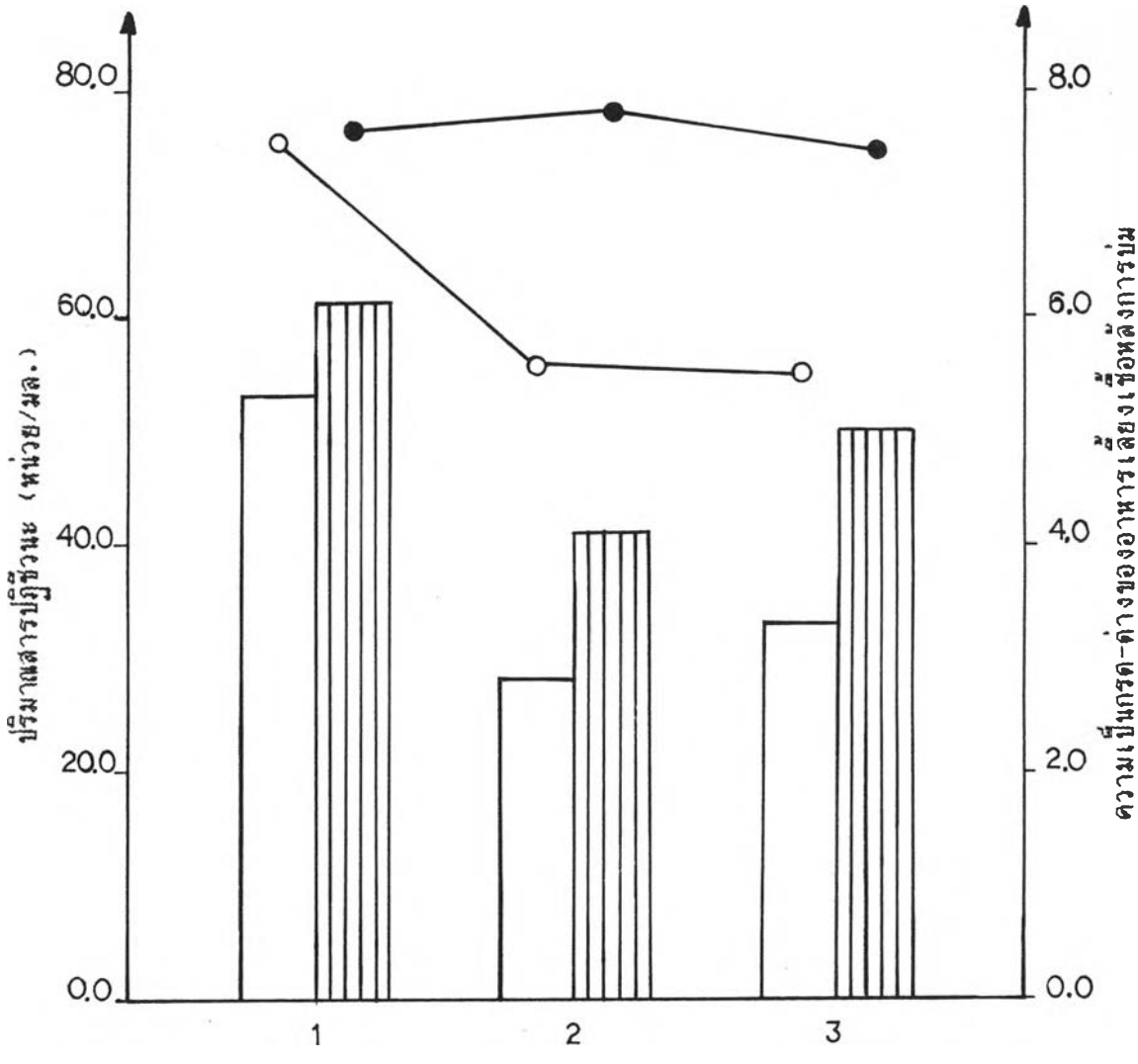



รูปที่ 3.11 ผลการแปรผันความเข้มข้นของซอยโทนต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 โดยผสมกับผงสกัดมอลท์ 10.0 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในภาคผนวกเลขที่ 1.2

ให้ปริมาณสารปฏิชีวนะเพิ่มสูงขึ้นมากและความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก็เพิ่มสูงขึ้นด้วย โดยเฉพาะในกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองสกัดไขมันสำหรับซอยโทน แม้ว่าความเป็นกรด-ด่าง จะเพิ่มขึ้นไม่มากแต่ปริมาณสารปฏิชีวนะก็เพิ่มสูงขึ้นคิดเป็น 15.7 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 3.12

3.4.2 <u>ระยะเวลาของการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ</u>

ทำการศึกษาเพื่อหาช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อ <u>Bacillus</u> sp. สายพันธุ์ B1 ในขวดเขย่า เพื่อให้ได้ปริมาณสารปฏิชีวนะสูงสุด ซึ่งควรเป็นระยะเวลาที่สั้นที่สุด ได้ทำการศึกษาตามวิธีการในข้อ 2.6 โดยใช้สูตรอาหารสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ (ภาคผนวกหมายเลข 1.2) และได้ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด คือ กลูโคสกับซูโครส ในปริมาณ 10.0 กรัม/ลิตร เท่ากัน โดยเก็บตัวอย่างเมื่อเลี้ยงเชื้อได้นาน 16 24 28 36 และ 50 ชม. แต่สำหรับซูโครสเก็บตัวอย่างใน ชม. ที่ 16 28 36 และ 50 ชม. ผลการศึกษาพบว่าเวลาที่ 36 ชม. เป็นเวลาที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าของน้ำตาลทั้งสองชนิด และพบว่าในช่วง 28 ชม. แรกของการผลิตสารปฏิชีวนะนั้น การเลี้ยงในน้ำตาลกลูโคสจะมีอัตราการผลิตที่ต่ำกว่าการเลี้ยงในน้ำตาลซูโครสมาก แต่จะเพิ่มอัตราการผลิตอย่างรวดเร็วเมื่อใกล้ถึงชั่วโมงที่ 36 (รูปที่ 3.13) ดังนั้นในการศึกษาจึงเก็บตัวอย่างที่เวลา 36 ชม.

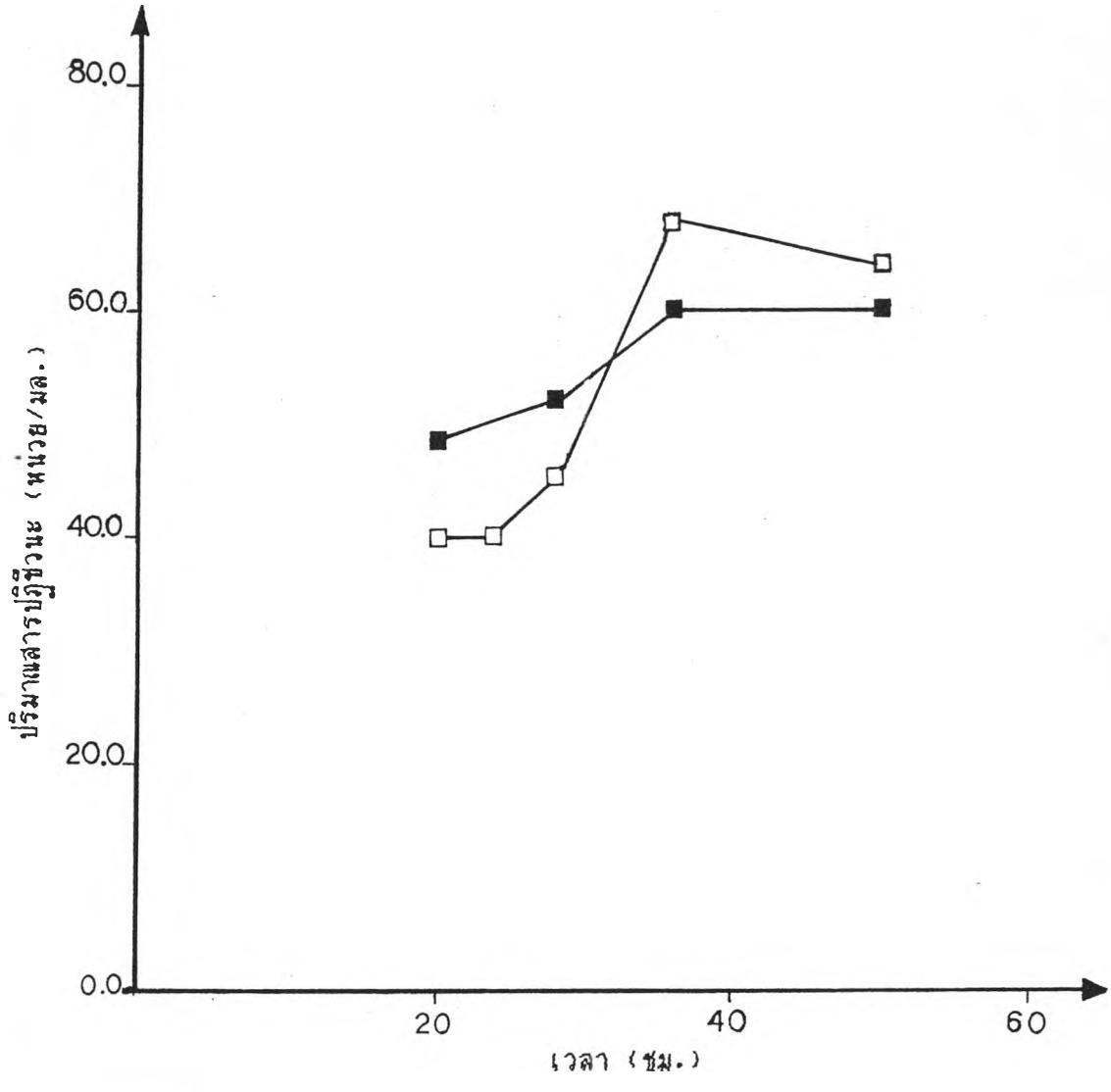



รูปที่ 3.12 ผลของ $CaCO_3$ 5.0 กรัม/ลิตร ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิด 20.0 กรัม/ลิตร ผสมกับเปปโตน 10.0 กรัม/ลิตร องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นแสดงในภาคผนวกเลขที่ 1.2 เมื่อ 1,ซอยโทน; 2,กากถั่วเหลือง; 3,กากถั่วเหลืองย่อยด้วยกรดก้ามะถัน และ

□ ,เมื่อไม่มี$CaCo_3$ ; ▥ ,เมื่อมี$CaCo_3$ ;

○—○ ,ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อไม่มี $CaCo_3$

●—● ,ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อมี $CaCo_3$




รูปที่ 3.13 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ในขวดเขย่า องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในภาคผนวกเลขที่ 1.2

□—□ , เมื่อน้ำตาลกลูโคส 10.0 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

■—■ , เมื่อน้ำตาลซูโครส 10.0 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 3.6 ผลกระทบของเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ในขวดเขย่า

| เกลือแร่ | | สารปฏิชีวนะ (หน่วย/มก.) |
|---|---|---|
| ชนิด | ปริมาณ (กรัม/ลิตร) | |
| แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) | 0.000 | 58.3 |
| | 0.001 | 55.0 |
| | 0.005 | 51.7 |
| | 0.010 | 45.0 |
| เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) | 0.000 | 50.0 |
| | 0.020 | 55.0 |
| | 0.024 | 60.0 |
| | 0.028 | 61.7 |
| | 0.032 | 58.3 |
| แมกนีเซียมคลอไรด์ | 0.000 | 58.3 |
| ($MgCl_2.6H_2O$) | 0.005 | 66.7 |
| | 0.007 | 53.3 |
| | 0.010 | 50.0 |
| | 0.013 | 46.7 |
| แมงกานีสซัลเฟต | 0.000 | 40.0 |
| ($MnSO_4.H_2O$) | 0.010 | 58.3 |
| | 0.015 | 51.7 |
| | 0.020 | 48.3 |
| โปตัสเซียมซัลเฟต ($K_2SO_4$) | 0.000 | 36.7 |
| | 1.000 | 50.0 |
| | 1.200 | 58.3 |
| | 1.600 | 61.7 |
| | 2.400 | 61.7 |

3.4.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

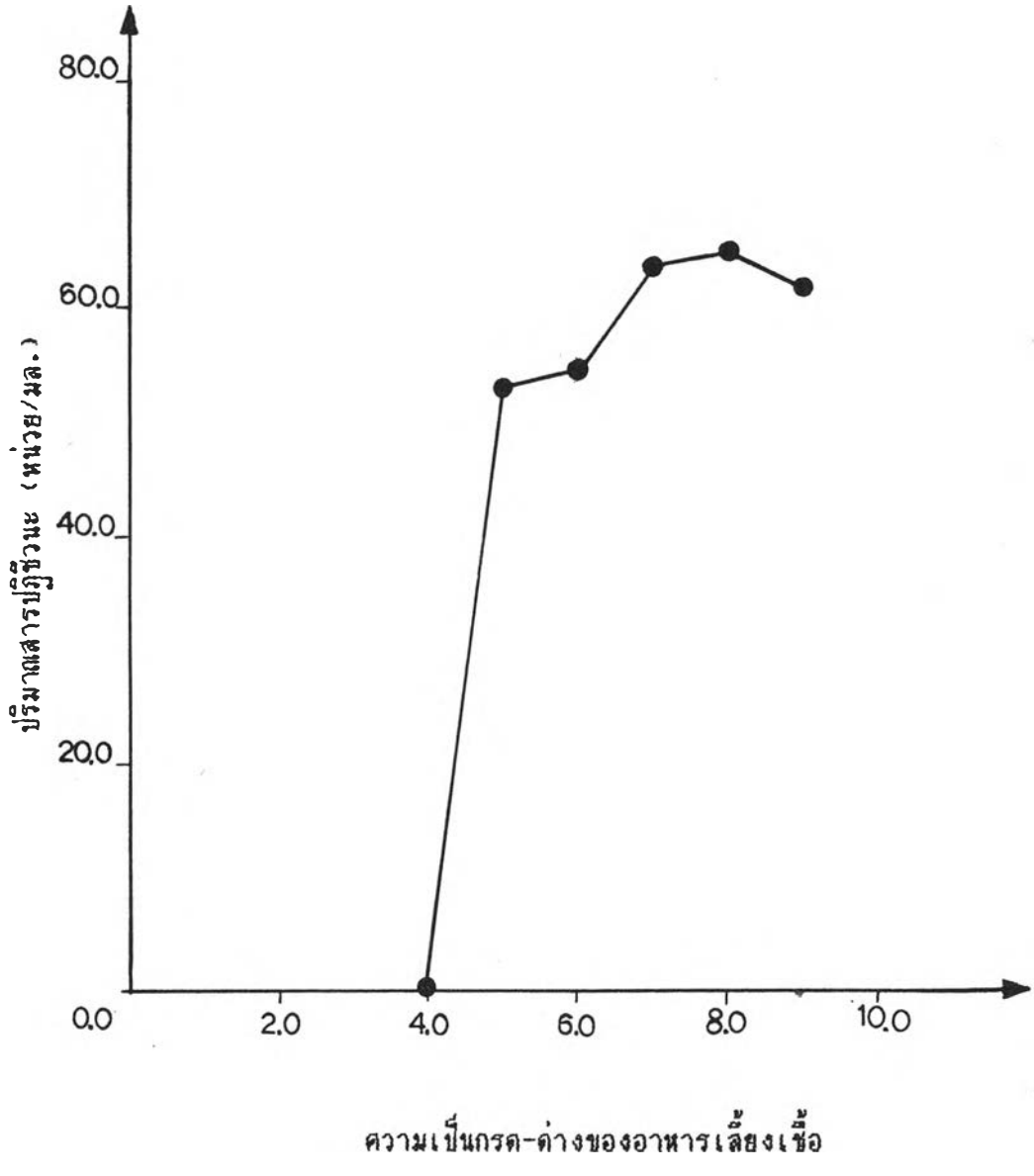
ทำการศึกษาเพื่อหาความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ในขวดเขย่า เลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 2.6 และใช้สูตรอาหารสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ (ภาคผนวกหมายเลข 1.2) ทำการศึกษาโดยแปรผันความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 4.00-9.00 และเก็บตัวอย่างพร้อมกันที่เวลา 36 ชม. พบว่าเชื้อ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่างค่อนข้างสูงคือ ตั้งแต่ 7.00-8.50 ดังแสดงในรูปที่ 3.14

3.4.4 อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

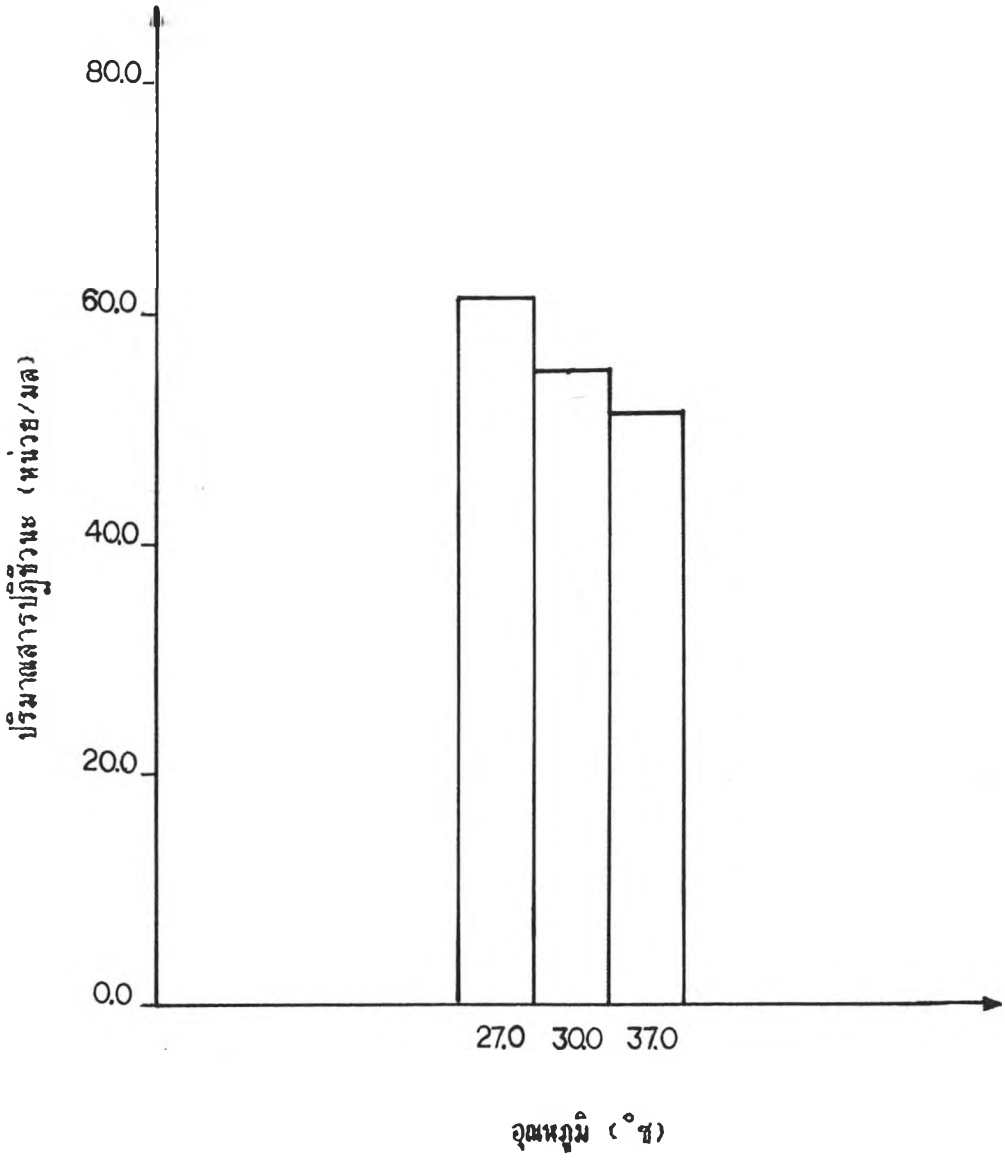
ศึกษาอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ในขวดเขย่า เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.6 และใช้สูตรอาหารเหลวสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ (ภาคผนวกหมายเลข 1.2) ทำการศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ ทำการแปรผันอุณหภูมิที่ศึกษาเป็น 27°ซ. 30°ซ. และ 37°ซ. พบว่าอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 คือ 27°ซ. ดังแสดงในรูปที่ 3.15

3.4.5 รูปแบบของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารปฏิชีวนะ

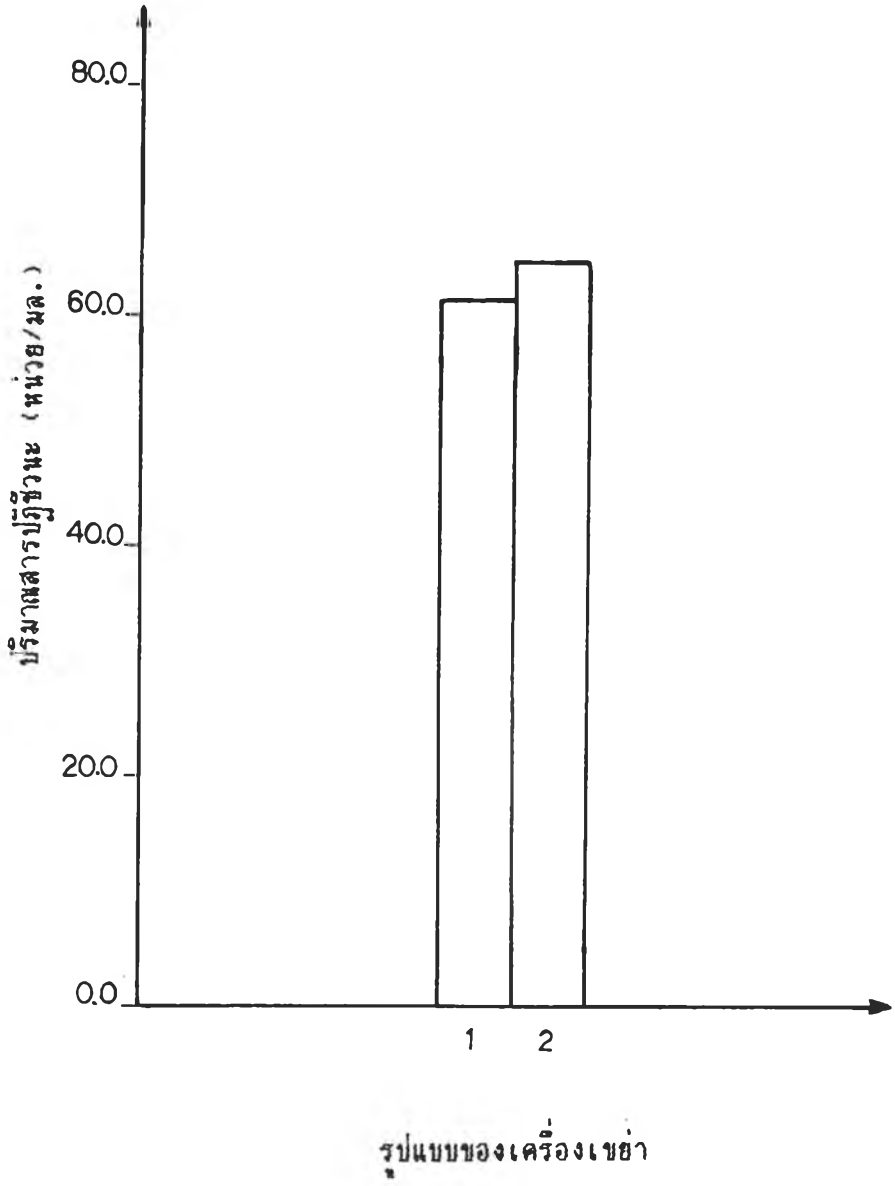
ศึกษารูปแบบของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารปฏิชีวนะของ B. licheniformis ทำการเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.6 และใช้สูตรอาหารเหลวสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ (ภาคผนวกหมายเลข 1.2) แบ่งการบ่มเชื้อเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกบ่มบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี กลุ่มที่สองบ่มบนเครื่องเขย่าแบบรีซิโปรคอล เก็บตัวอย่างพร้อมกันที่ 36 ชม. นำไปหาปริมาณสารปฏิชีวนะ พบว่าการบ่มบนเครื่องเขย่าแบบรีซิโปรคอลให้ปริมาณสารปฏิชีวนะสูงกว่าการบ่มแบบโรตารีเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 3.16




รูปที่ 3.14 ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (Initial pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ในขวดเขย่า




รูปที่ 3.15 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ในขวดเขย่า



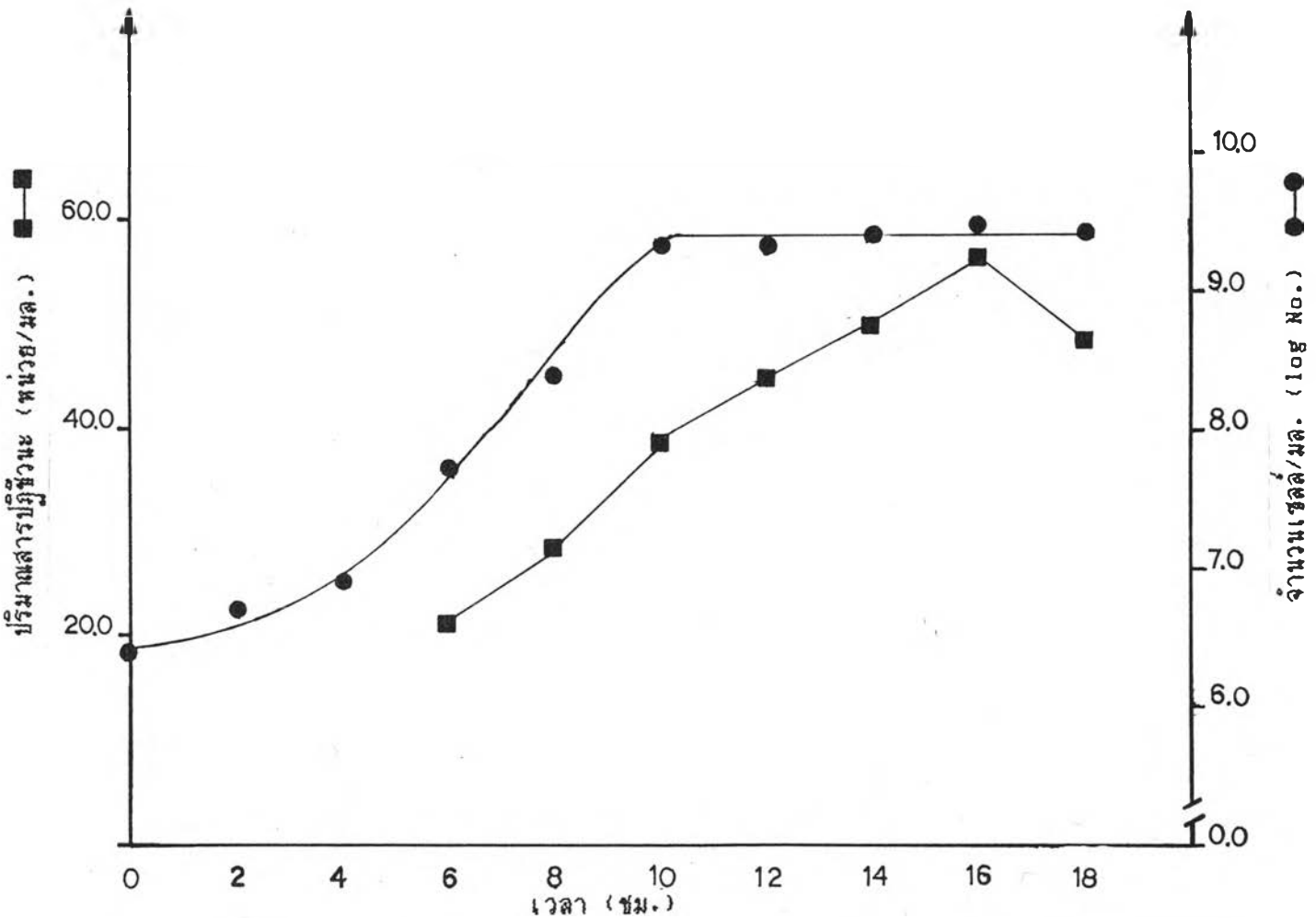

รูปที่ 3.16 ผลของรูปแบบของเครื่องเขย่าที่ใช้ในการบ่มเชื้อต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1
1, แบบโรตารี และ 2, แบบรีซิโปรคอล

3.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เตรียมหัวเชื้อ (วิธีข้อ 2.5) 240 มล. ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 2,760 มล. ซึ่งองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อได้จากผลการศึกษาในหัวข้อ 3.4.1 คือกลูโคส 10.0 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ซอยโทน 20.0 กรัม/ลิตร กับผงสกัดมอลท์ 10.0 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และเฟอรัสซัลเฟต 0.028 กรัม/ลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ 0.005 กรัม/ลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.010 กรัม/ลิตร โปตัสเซียมซัลเฟต และแคลเซียมคาร์บอเนต 5.0 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งเกลือแร่ แต่เนื่องจากใช้ซอยโทนถึง 20.0 กรัม/ลิตร ในการหมักแต่ละครั้งต้องใช้ในปริมาณสูงถึง 55.2 กรัม จึงใช้กากถั่วเหลืองย่อยด้วยกรดกำมะถันซึ่งเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่ายและราคาถูก แทนการใช้ซอยโทนสำหรับปริมาตรที่ใช้นั้นคำนวณจากปริมาณไนโตรเจนที่มีในซอยโทน (9.65%) และในกากถั่วเหลืองที่นำมาย่อยด้วยกรดกำมะถัน (7.85%) ดังนั้นต้องใช้กากถั่วเหลือง 24.6 กรัมแทนซอยโทน 20 กรัม ส่วนสภาวะแวดล้อมของการหมักได้จากการศึกษาในขวดเขย่า กล่าวคือ ความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วง 7.00-8.00 และอุณหภูมิ 27°ซ. จากนั้นทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะในถังหมักขนาด 5 ลิตร ได้แก่

3.5.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการหมักและความสัมพันธ์ของการผลิตสารปฏิชีวนะกับการเจริญของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1

ศึกษาช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมของการหมักเพื่อให้ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุด โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะแวดล้อมที่ศึกษาได้จากการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 3.5 ทำการศึกษาโดยเก็บตัวอย่างประมาณ 5 มล. ทุก 2 ชั่วโมง นำไปหาปริมาณสารปฏิชีวนะตามวิธีการและพร้อมกันนั้นก็นำไปหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ (viable number) ของจุลินทรีย์ โดยเลี้ยงในอาหารนิวเตรียนท์ อการ์ (รูปที่ 3.17) พบว่าในถังหมักขนาด 5 ลิตร




รูปที่ 3.17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยที่อัตราการให้อากาศ 1 ลิตร/1 ลิตรของอาหาร/นาที และอัตราการกวน 300 รอบ/นาที

Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 16 ซึ่งเป็นช่วงหลังของการเจริญ

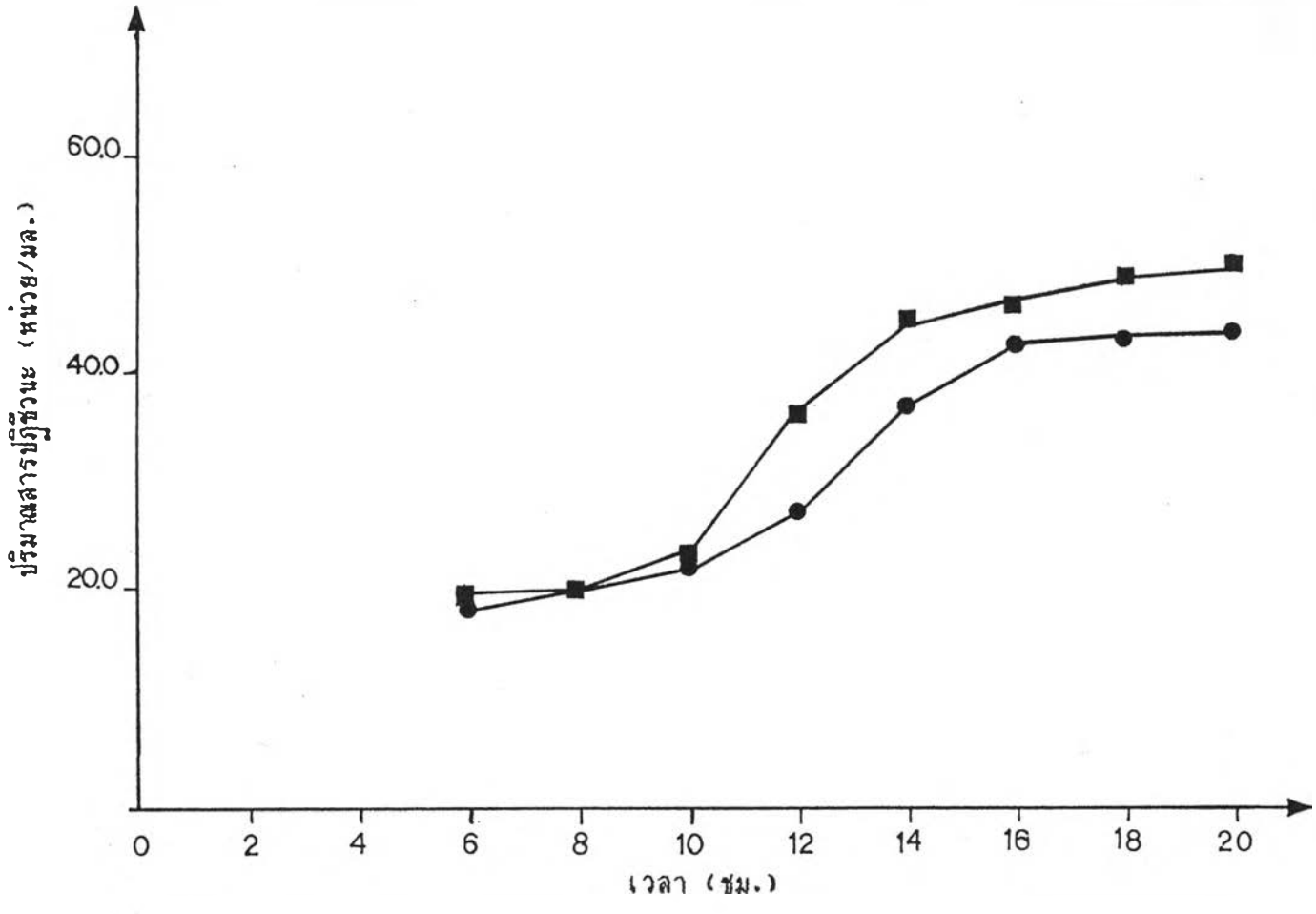
3.5.2 เปรียบเทียบการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 เมื่อควบคุมและไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง

ศึกษาความแตกต่างในการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการศึกษาโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะแวดล้อมเช่นเดียวกับข้อ 3.5.1 แต่เพิ่มการศึกษาโดยไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างตลอดการหมักจากผลการศึกษาพบว่าเมื่อควบคุมความเป็นกรด-ด่างตลอดการหมักนั้น Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ให้ผลผลิตสูงกว่าเมื่อปล่อยความเป็นกรด-ด่างให้เป็นไปตามธรรมชาติ ดังแสดงในรูปที่ 3.18

3.5.3 อัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1

ศึกษาอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักโดยใช้สูตรอาหารเหลวและสภาวะแวดล้อมที่ศึกษาได้จากการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 3.5 ทำการศึกษาโดยแปรผันอัตราการกวนตั้งแต่ 200-500 รอบ/นาที โดยกำหนดให้อัตราการให้อากาศคงที่ 1 ลิตร/1 ลิตรของอาหาร/นาที

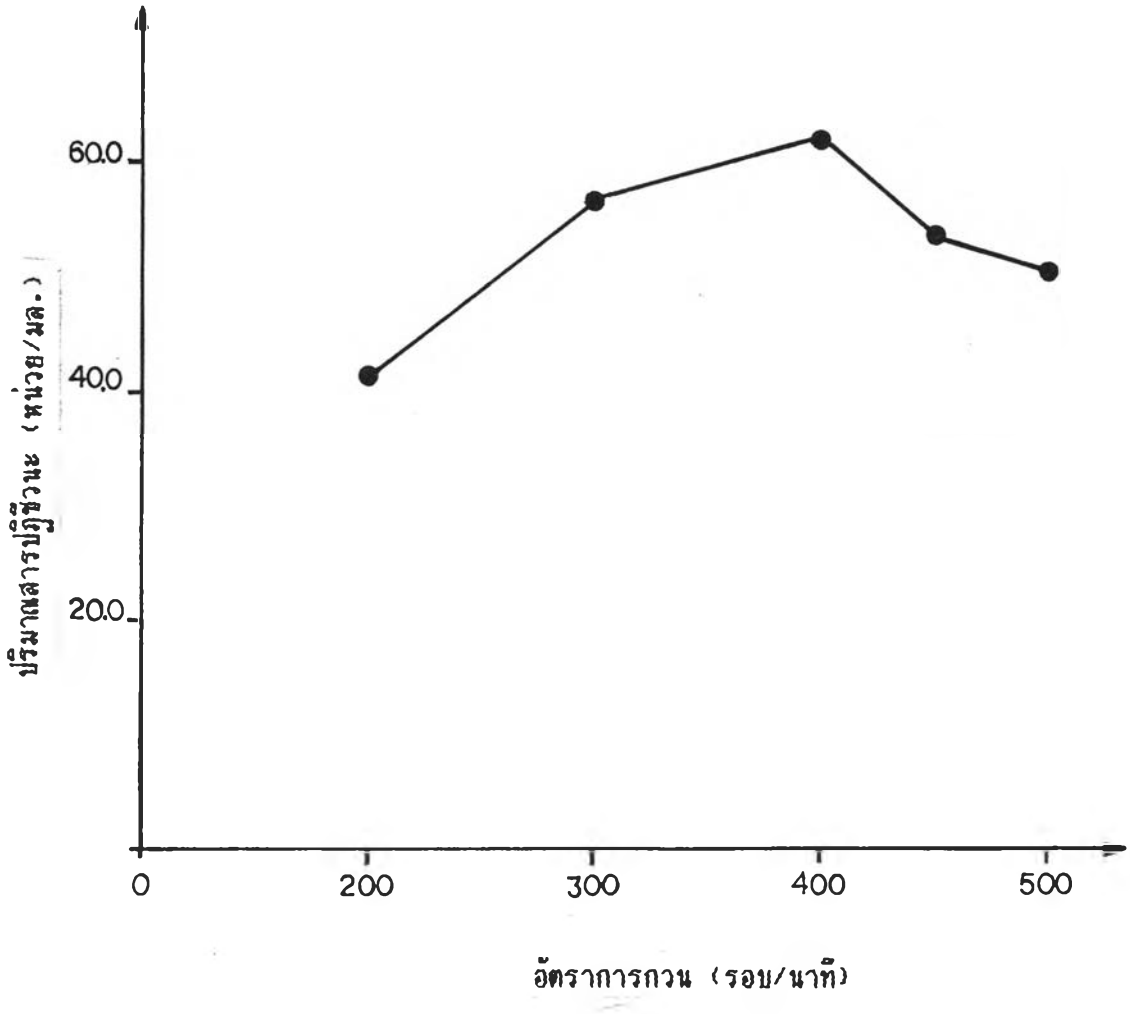
สำหรับการหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมนั้นศึกษาโดยแปรผันอัตราการให้อากาศตั้งแต่ 0.6-1.3 ลิตร/1 ลิตรของอาหาร/นาที โดยที่ให้อัตราการกวนคงที่ 400 รอบ/นาที โดยเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 16 พบว่าอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่ 400 รอบ/นาทีและ 1 ลิตร/1 ลิตรของอาหาร/นาที ตามลำดับเป็นอัตราที่ทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุดดังแสดงในรูปที่ 3.19 และ 3.20 ตามลำดับ



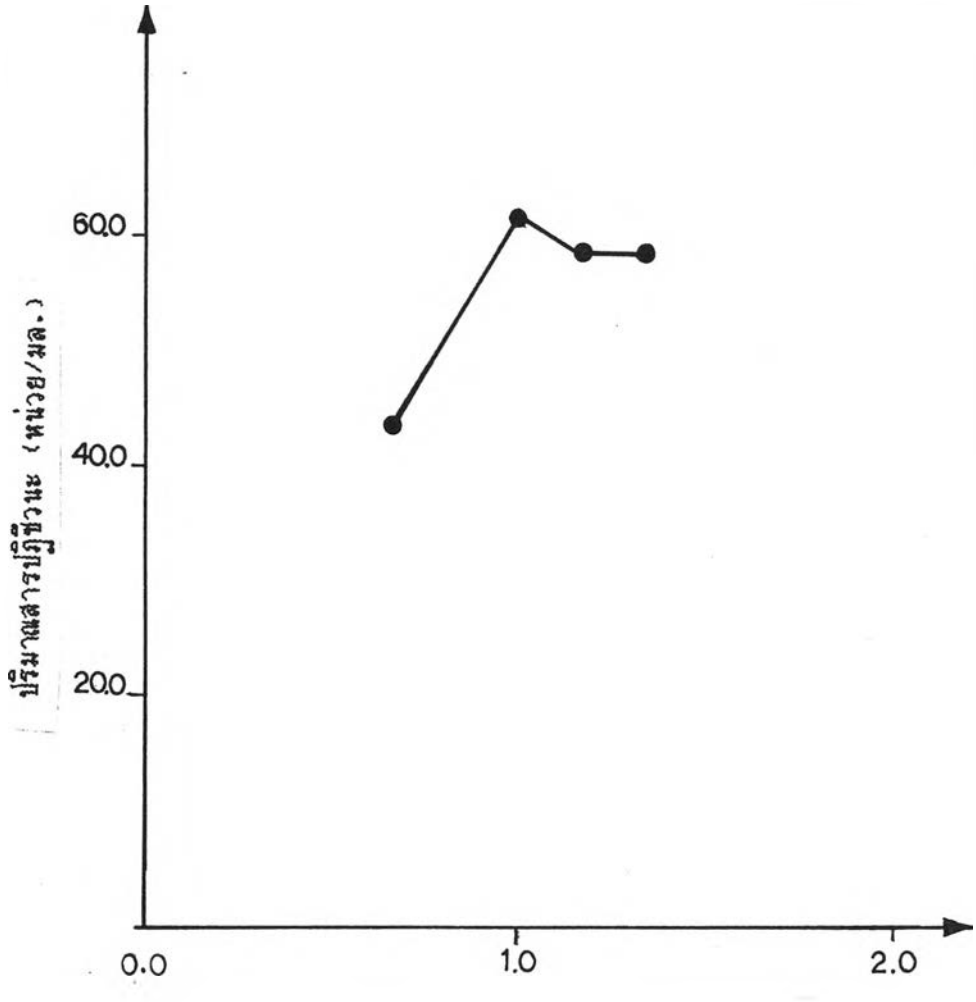

รูปที่ 3.18 ผลการเปรียบเทียบเมื่อควบคุมความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 7.0-8.0 ตลอดการหมัก กับการไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างตลอดการหมัก ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 โดยที่ อัตราการให้อากาศ 1ลิตร/1ลิตรของอาหาร/นาที และ อัตราการกวน 200 รอบ/นาที

■—■ , ปริมาณสารปฏิชีวนะเมื่อควบคุมความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

●—● , ปริมาณสารปฏิชีวนะเมื่อไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ




รูปที่ 3.19 ผลของการแปรผันอัตราการกวน ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร กำหนดให้อัตราการให้อากาศคงที่ 1ลิตร/1ลิตรของอาหาร/นาที




รูปที่ 3.20 ผลการแปรผันอัตราการให้อากาศต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยกำหนดให้อัตราการกวนคงที่ 400 รอบ/นาที

3.6 การสกัดแยกสารปฏิชีวนะ

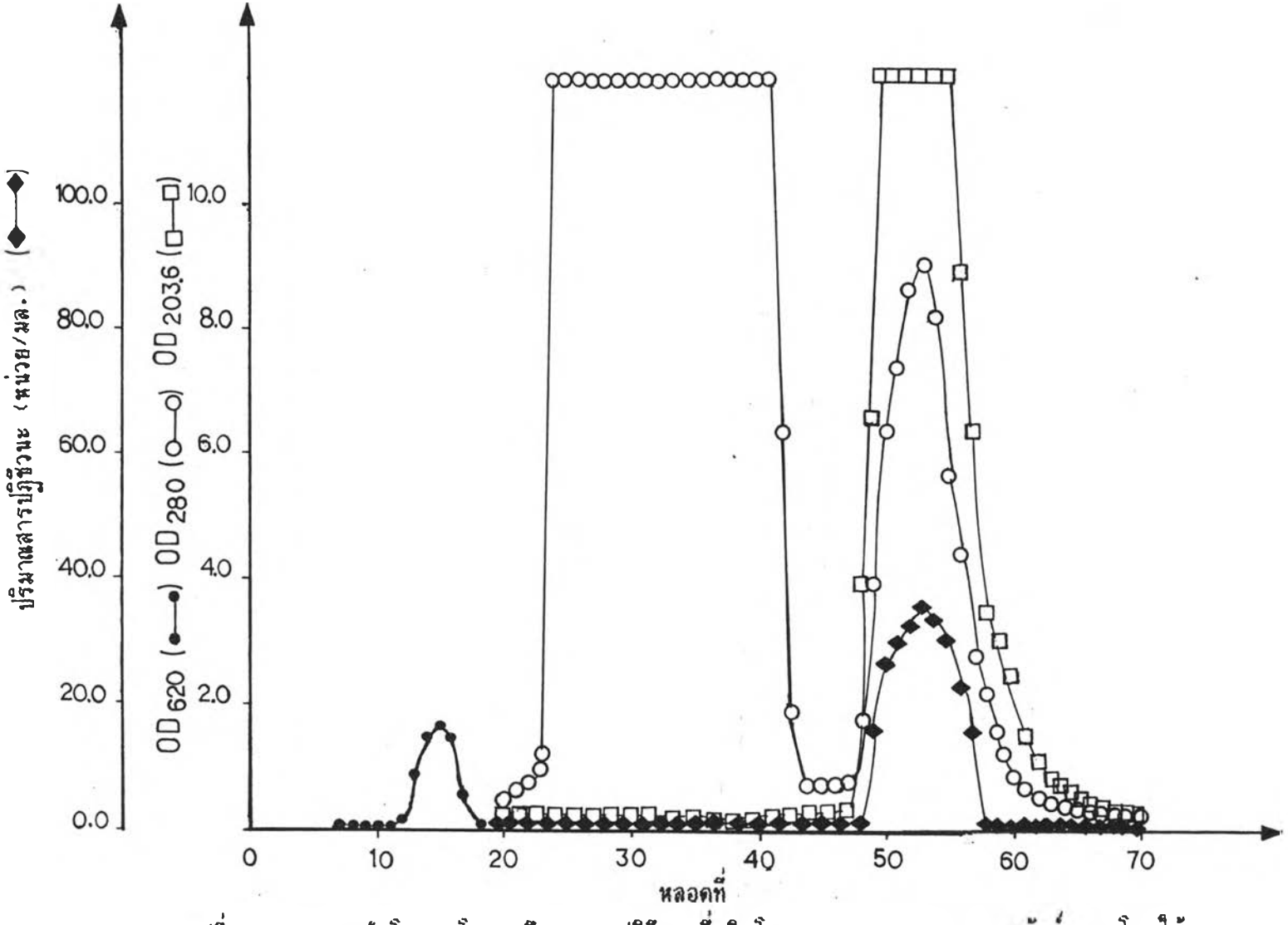
3.6.1 การแยกสารปฏิชีวนะโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]

นำน้ำหมักหรือน้ำเลี้ยงเชลล์มาปั่นแยกเชลล์ออกตามวิธีการในข้อ 2.10.1 แล้วจึงนำน้ำหมักที่ได้ไปสกัดแยกสารปฏิชีวนะโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในความเข้มข้น 0-20, 20-40, 40-60, 60-80 และ 80-90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังจากนำแต่ละลำดับส่วนไปปั่นแยกตะกอนสารปฏิชีวนะออกตามวิธีการในข้อ 2.10.2 จึงหาปริมาณสารปฏิชีวนะที่เหลือในสารละลาย ผลการศึกษาพบว่าสารปฏิชีวนะไม่ตกตะกอนในช่วง 0-20 เปอร์เซ็นต์ แต่จะตกตะกอนได้ดีในช่วง 20-80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการสกัดแยกสารปฏิชีวนะโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตนั้นทำการตกตะกอนสองครั้งคือ 0-20 เปอร์เซ็นต์ เพื่อแยกโปรตีนชนิดอื่นออกไป และ 20-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นช่วงที่ตกตะกอนสารปฏิชีวนะ ดังแสดงในตารางที่ 3.7

3.6.2 การแยกสารปฏิชีวนะโดยการทำโครมาโตกราฟี

3.6.2.1 การทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Gel Permeation Chromatography)

นำสารปฏิชีวนะที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 20-80 เปอร์เซ็นต์ ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 14 มล. ผ่านลงในคอลัมน์ของเซฟาเด็กซ์ จี-25 (ขนาด 2.6x75 ซม.) ซึ่งวิธีการเตรียมได้กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.11.1 ชะล้างด้วยน้ำกลั่น เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลำดับส่วนละ 5 มล. มาวัดปริมาณโปรตีนและปริมาณสารปฏิชีวนะ ดังผลการทดลองในรูปที่ 3.21 พบว่ามีโปรตีนออกมา 2 ยอด ซึ่งสารปฏิชีวนะออกมากับโปรตีนยอดที่ 2 และออกมาหลังปริมาตรช่องว่างในคอลัมน์ (150 มล.) มาก รวมหลอดที่มีสารปฏิชีวนะเข้าด้วยกันนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องไลโอฟิไลเซอร์ เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป



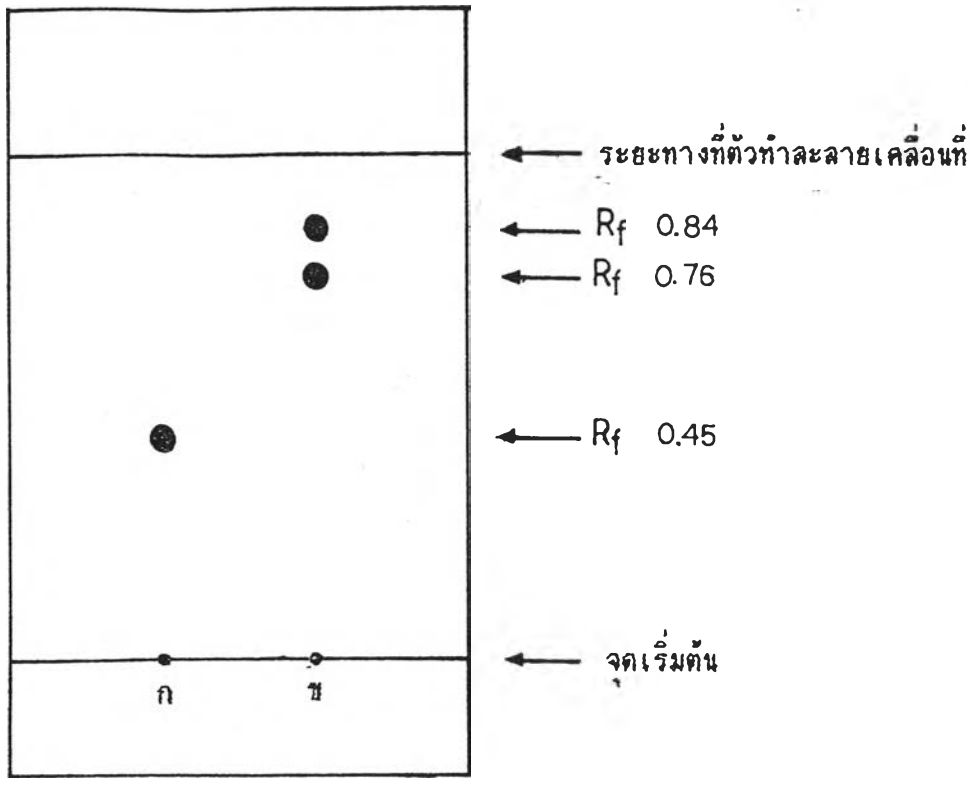

รูปที่ 3.21 การทำโครมาโตกราฟีของสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-25 กำหนดให้ ●—●, OD620; ○—○, OD280; □—□, OD 203.6; ◆—◆, ปริมาณสารปฏิชีวนะ (หน่วย/มล.)

ตารางที่ 3.7 ผลการตกตะกอนสารปฏิชีวนะด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ตามลำดับส่วน

| ลำดับส่วน | ปริมาณสารปฏิชีวนะที่เหลือในสารละลาย (หน่วย/มล.) |
|---|---|
| น้ำหมักก่อนการตกตะกอน | 61.7 |
| แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0-20% | 58.3 |
| แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 20-40% | 50.0 |
| แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 40-60% | 41.7 |
| แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 60-80% | 16.7 |
| แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 80-90% | 13.3 |

3.6.2.2 การทำโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin Layer Chromatography)

ทำโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง โดยใช้ตัวอย่างที่เตรียมได้จากการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีในหัวข้อ 3.6.2.1 วิธีการศึกษาได้กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.11.2 พบว่า ในระบบตัวทำละลาย 2 ระบบที่ศึกษานั้นสารปฏิชีวนะจะให้ค่า Rf ต่างกัน กล่าวคือในระบบ ก. ซึ่งประกอบด้วยสารผสมของบิวทานอล:น้ำ:แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ในอัตราส่วน 4:2:1 จะให้แถบของสารปฏิชีวนะบนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบผิวบางเพียงแถบเดียว ให้ค่า Rf 0.45 ส่วนในระบบ ข. ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมของโพรพานอล:น้ำ:แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์:เอทิลอะซิเตต ในอัตราส่วน 5:3:1:1 จะให้แถบของสารปฏิชีวนะ 2 แถบ ให้ค่า Rf 0.84 กับ 0.76 ดังแสดงในรูปที่ 3.22




รูปที่ 3.22 แสดงค่า Rf จากการทำโครมาโตกราฟีแบบผิวบางของสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ
ระบบ ก ประกอบด้วย บิวทานอล : น้ำ : แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ในอัตราส่วน 4:2:1
ระบบ ข ประกอบด้วยโพรพานอล: น้ำ: แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์: เอทธิลอะซิเตต ในอัตราส่วน 5:3:1:1

3.7 ศึกษาสมบัติทางเคมีของสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1

3.7.1 ความสามารถในการละลายในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ละลายสารตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.2.1 ในอัตราส่วนเท่า ๆ กัน ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ พบว่าสารปฏิชีวนะที่ศึกษาสามารถละลายได้ดีที่สุดในน้ำ บิวทานอล เมทธานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ละลายได้ปานกลางในเอทธานอล โพรพานอล อะซีโตน เอทธิลอะซิเตต และละลายได้น้อยในไดไอโซโพรพิลอีเธอร์ และเบนซีน สำหรับกรดอะซิติกนั้นทำลายปฏิกิริยาของสารปฏิชีวนะ ในการศึกษากำหนดให้ปริมาณการละลายในน้ำเป็น 100% ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 3.8

ตารางที่ 3.8 การละลายของสารปฏิชีวนะ จาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

| ชนิดของตัวทำละลาย | ปริมาณสารปฏิชีวนะที่ละลายในตัวทำละลาย (%) |
|---|---|
| น้ำ | 100.0 |
| บิวทานอล | 96.0 |
| เมทธานอล | 89.1 |
| แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ | 89.1 |
| เอทธานอล | 85.5 |
| โพรพานอล | 82.2 |
| อะซีโตน | 75.0 |
| เอทธิลอะซิเตต | 71.5 |
| ไดไอโซโพรพิลอีเธอร์ | 57.7 |
| เบนซีน | 50.5 |
| กรดอะซิติก | N.D.(สูญเสียปฏิกิริยา) |

หมายเหตุ : N.D. ไม่สามารถตรวจสอบได้

3.7.2 ความเสถียรของสารปฏิชีวนะที่ระดับความเป็นกรด-ด่างในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ

ศึกษาความเสถียรของสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 3 ชนิด คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่างที่ศึกษาคือ 8.0, 7.5, 7.0 และ 6.0 ซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่างที่ศึกษาคือ 6.5, 6.0, 5.5, และ 5.0 และอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่างที่ศึกษาคือ 5.5, 5.0, 4.5 และ 4.0 ทำการศึกษาโดยบ่มสารปฏิชีวนะในบัฟเฟอร์ที่ศึกษา 12 ชม. ที่อุณหภูมิ 25°ซ. แล้วจึงหาปริมาณสารปฏิชีวนะที่เหลือในบัฟเฟอร์ โดยกำหนดให้ปฏิกริยาของสารปฏิชีวนะเริ่มต้นเป็น 100% พบว่าสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 มีความเสถียรสูงในบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่าง สูง ได้แก่ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แต่มีความเสถียรต่ำในบัฟเฟอร์ที่ค่อนข้างเป็นกรด ได้แก่ ซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง อะซิเตตบัฟเฟอร์นั้นเป็นบัฟเฟอร์ที่ไม่เหมาะต่อสารปฏิชีวนะที่ศึกษามากดังแสดงในตารางที่ 3.9

ตารางที่ 3.9 ความเสถียรของสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างในบัฟเฟอร์ 3 ชนิด

| ชนิดของบัฟเฟอร์ | เปอร์เซ็นต์ปฏิกริยาของสารปฏิชีวนะในบัฟเฟอร์หลังจากบ่มที่ 25°ซ. 12 ชม. (%) |
|---|---|
| ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ | |
| pH 8.0 | 81.9 |
| pH 7.5 | 81.9 |
| pH 7.0 | 78.1 |
| pH 6.0 | 77.8 |
| ซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ | |
| pH 6.5 | 75.0 |
| pH 6.0 | 75.0 |
| pH 5.5 | 71.8 |
| pH 5.0 | 68.8 |
| อะซิเตตบัฟเฟอร์ | |
| pH 5.5 | 40.8 |
| pH 5.0 | 0.0 |
| pH 4.5 | 0.0 |
| pH 4.0 | 0.0 |

3.7.3 ความเสถียรของสารปฏิชีวนะที่อุณหภูมิต่าง ๆ

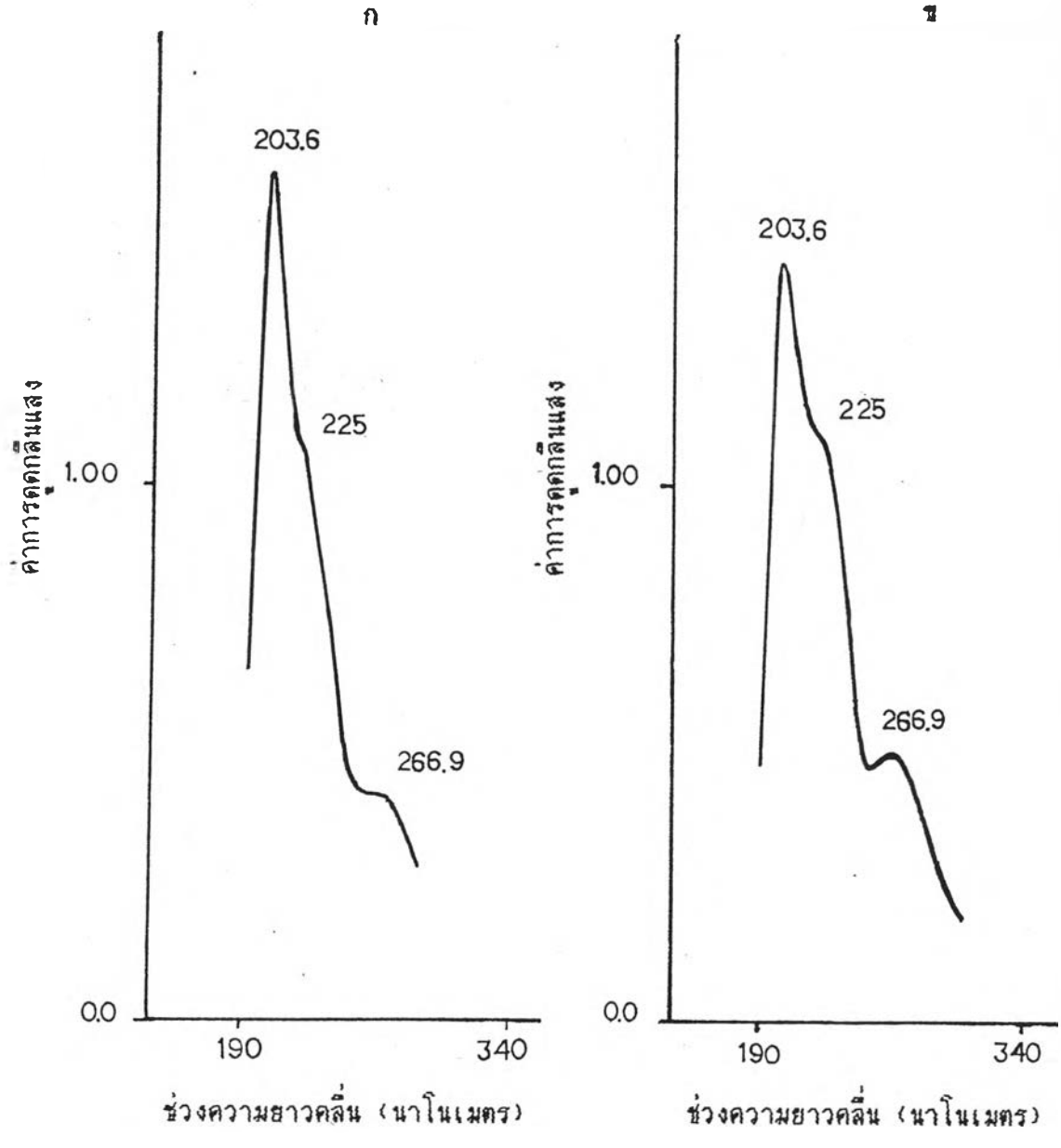
ศึกษาความเสถียรของสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 เมื่อบ่มในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่างกัน ศึกษาโดยใช้สารละลายของสารปฏิชีวนะที่ปราศจากเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 4°ซ. 25°ซ. และ 50°ซ. ทำการทดสอบปริมาณสารปฏิชีวนะโดยใช้จุลินทรีย์ตัวทดสอบเป็นระยะ ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 3.10

ตารางที่ 3.10 ความเสถียรของสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

| อุณหภูมิ (°ซ.) | ระยะเวลาที่สารปฏิชีวนะสามารถเสถียรอยู่ได้ |
|---|---|
| 4 | มากกว่า 30 วัน |
| 25 | 5 วัน |
| 50 | 5 ชม. |

3.8 ศึกษาสมบัติทางกายภาพของสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1

ศึกษาสมบัติการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเล็ตในช่วงความยาวคลื่น 190-340 นาโนเมตร เตรียมตัวอย่างที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ที่ได้จากการทำโครมาโตกราฟีแบบผิวบางในข้อ 3.6.2.2 โดยขูดแถบของสารปฏิชีวนะจากแผ่นโครมาโตกราฟีแบบผิวบางจากระบบตัวทำละลาย ข. โดยขูดจากทั้งสองแถบที่มีค่า Rf 0.76 และ 0.84 มาละลายในน้ำกลั่นกรองด้วยกระดาษวอทแมนเบอร์ 1 นำน้ำใสที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 190-340 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 3.23 พบว่าทั้งสองแถบของสารปฏิชีวนะดูดแสงมากที่ความยาวคลื่นของแสง 203.6, 266.9 และมีไหล่กราฟที่ 225 นาโนเมตร แต่จะต่างกันตรงลักษณะส่วนโค้งของกราฟซึ่งแถบที่มี Rf 0.76 จะมีการเว้ามากกว่าแถบที่มี Rf 0.84




รูปที่ 3.23 รูปแบบของการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1
ก, เป็นอนุพันธ์ที่มีค่า Rf 0.84
ข, เป็นอนุพันธ์ที่มีค่า Rf 0.76

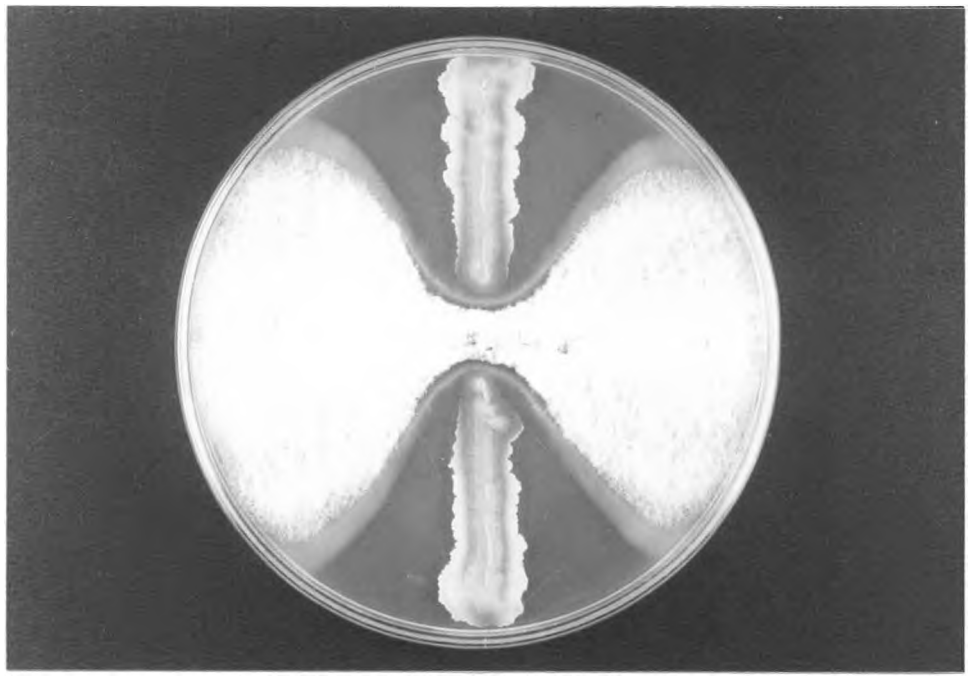
ตารางที่ 3.11 ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ต่อการยับยั้งราที่ทำให้เกิดโรคพืชบางชนิด โดยวิธีการขีดไขว้

| ชนิดของรา | โรคพืช | ผลการทดสอบ |
|---|---|---|
| Alternalia solani | โรคเน่าของมะเขือเทศ | + |
| Bipolaris sorghi | โรคใบจุดของข้าวฟ่าง | + |
| Botryodiplodia sp. | โรคลำต้นแห้งของปอกระเจา | + |
| Collectotrichum gloeosporioides | โรคกุ้งแห้งของพริก มะม่วง | + |
| Corynespora cassiicola | โรคใบจุดเป้ากระสุน | + |
| Fusarium sp. | โรคเน่าของหอม | + |
| Phytophthora parasitica | โรคสมอดำของฝ้าย | + |
| Rhizoctonia solani | โรคโคนเน่าระดับดินของฝ้าย | + |
| Sclerotium rolfsii | โรคลำต้นเน่าของถั่ว | + |

3.9 ศึกษาประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ

3.9.1 ศึกษาประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ที่มีผลยับยั้งต่อราที่ก่อให้เกิดโรคพืช

ศึกษาประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ที่มีผลยับยั้งต่อราที่ก่อให้เกิดโรคพืช ศึกษาโดยวิธีขีดไขว้ดังวิธีการในข้อ 2.3.1 ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 3.11 พบว่าสารปฏิชีวนะที่ศึกษานอกจากจะสามารถยับยั้ง S. scabies ซึ่งก่อให้เกิดโรคหูดในมันฝรั่งแล้วยังสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคแก่พืชเศรษฐกิจอื่น ๆ อีกหลายชนิด เช่น B. sorghi ที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดของข้าวฟ่าง ดังแสดงในรูปที่ 3.24



รูปที่ 3.24 ประสิทธิภาพการยับยั้งของสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ต่อการยับยั้ง Bipolaris sorghi ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดของข้าวฟ่าง

3.9.2 ศึกษาประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ที่มีผลยับยั้งต่อแบคทีเรีย

ศึกษาโดยวิธีการดูบริเวณยับยั้งรอบกระดาษทดสอบดังวิธีการในข้อ 2.3.2 ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 3.12 พบว่าสารปฏิชีวนะสามารถยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมล์บวกบางชนิด

ตารางที่ 3.12 ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย

| ชนิดของแบคทีเรีย | แกรมล์ | ผลการทดสอบ |
|---|---|---|
| Escherichia coli | - | - |
| Pseudomonas aeruginosa | - | - |
| Proteus vulgaris | - | - |
| Staphylococcus aureus | + | - |
| Bacillus subtilis | + | + |
| Micrococcus luteus | + | + |