บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS 3020 ของบริษัท SANYO, JAPAn
2. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 ของบริษัท Memmert, Germany
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Memmert, Germany
4. เครื่องชั่งรุ่น PG-200-S และ AG 285 ของบริษัท METLER TOLEDO, Switzerland
5. เครื่องชั่งรุ่น AG285 ของบริษัท Metter Toledo
6. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries, USA
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น stratagene® ของบริษัท Profuge
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 3700 ของบริษัท Kubota, Japan
10. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น BV-124 ของบริษัท International scientific supply
11. ตู้บ่มชนิดควบคุมอุณหภูมิ (oven incubator) รุ่น INE 500 ของบริษัท Memert, Geramany
12. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น S20-K ของบริษัท Metter Toldo
13. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -70 ซ° รุ่น ULT 1786 ของบริษัท FORMA Scientific, USA
14. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 ซ° รุ่น MDF-U322 ของบริษัท SANYO Electric, Japan
15. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส (agarose gel electrophoresis) รุ่น Mupid-2 Advance ของบริษัท Cosmo Bio
16. ชุดเครื่องมือทำ SDS-polyacrylamind gel electrophoresis (Protein III System) ของบริษัท BioRad, USA
17. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA
18. เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven) Turbora รุ่น MW-2020
19. เครื่องกวนโดยใช้แม่เหล็ก (magnetic stirrer) ของบริษัท Clifton Ceraplate

20. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท Axygen Sciencetific, USA
21. หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 200 ไมโครลิตร ของบริษัท Corning Incorporation, USA
22. Heat block รุ่น Thermomixer compact ของบริษัท Eppendrof
23. เครื่องดูเจลด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต (gel documentation system) ของบริษัท Bio-rad, USA
24. เครื่องฉายรังสี UV รุ่น Foto/Prep I ของบริษัท Fotodyne
25. เครื่องเขย่าแบบหมุน (rotary shaker) รุ่น innova 2300 ของบริษัท New Brunswick scientific
26. เครื่องปั่นเหวียงสูญญากาศ รุ่น concentrator 5301 ของบริษัท Eppendrof, Germany
27. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated incubator shaker) ของบริษัท New Brunswick Scientific

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดเคมีภัณฑ์สำเร็จ

1. Trisma base (tris[hydroxymethyl] aminomethane, $C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA
2. กรดฮูมิก (Humic acid) ของบริษัท Sigma, USA
3. เอนเซดเอมีน (N-Z amine from Bovine milk) ของบริษัท Sigma, USA
4. ซัสเตรท (อะดินีน (Adenine) กวานีน (Guanine)ไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine) และ ไซแลน (Xylan from oat-spelt)) ของบริษัท Fluka Chemic, Germany
5. แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) ของบริษัท Fluka Chemic, Germany
6. น้ำตาลอะราบิโนส (L-(+)-arabinose) น้ำตาลแรมโนส (L-(+)-Rhamnose monohydrate ของบริษัท Merk, Germany และ น้ำตาลราฟฟิโนส (D-(+)-Raffinose pantahydrate ของบริษัท Fluka Biochemika, Switzerland
7. Sodium dodecyl sulfate (SDS) ของบริษัท Amersham Bioscience AB, Sweden
8. 10% Ammonium persulfate ของบริษัท Amersharm Bioscience, Sweden
9. ชุดสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล QI Aquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
10. สารปฏิชีวนะ สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) ของบริษัท M&H Manufacturing นีสแตติน (Nystatin) และ ไซโคลเฮกซาไมด์ (Cyclohexamide) ของบริษัท Sigma, USA
11. ไลโซไซม์ (Lysozyme) ของบริษัท Sigma, USA

12. Protenase K ของบริษัท Sigma, USA
13. DNA ladder ของบริษัท Fermentus, Canada
14. Vent polymerase ของบริษัท Biolab
15. สารผสม dNTP (dNTP mix) ของบริษัท Fermentus, Canada
16. อะกาโรสเจล (Agarose gel) ของบริษัท Research organics
17. เอทิลแอลกอฮอล์บริสุทธ์ (Absolute ethanol) ของบริษัท Merck, Germany
18. ไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ของบริษัท Merck, Germany
19. เอทิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) ของบริษัท Fluka Chemic, Germany
20. Acrylamide/Bisacrylamide 40% solution ของบริษัท Sigma, USA
21. TEMED (N,N,N′,N′-Tetramethyethylenediamide) ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
22. เอนโดนิวคลีเอสเรสตริกชันเอนไซม์ (endonuclease restriction enzyme) *Hae*III และ *Bst*UI (Bsh1236I) ความเข้มข้น 10 ยูนิต/ไมโครลิตร(BsuRI) ของบริษัท Fermentus, Canada

3.3 จุลินทรีย์

- *Eschericia coli* ATTC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATTC 25923
- *Candida albicans* ATTC 70014
- *Aspergirus niger* ATTC 6275

3.4 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์สังเคราะห์โดยบริษัท Bio Basic Inc., Canada ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

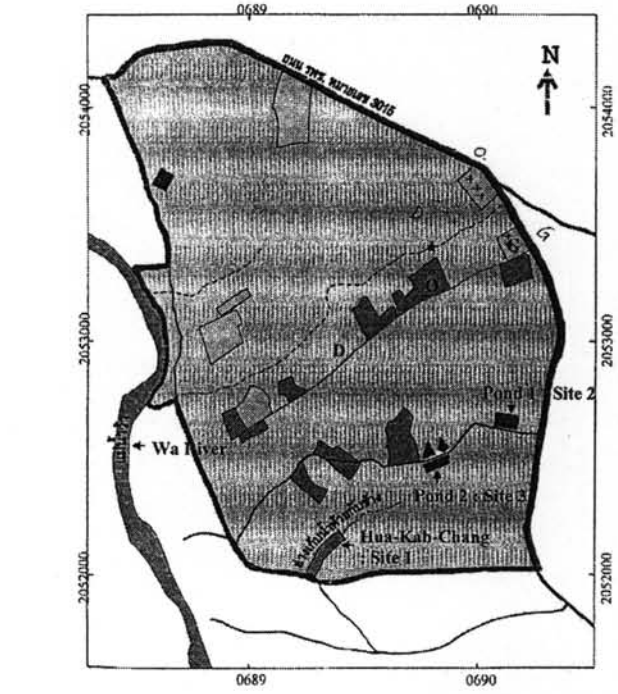
บริเวณ	ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′)	เอกสารอ้างอิง
16S-ITS	pA	Fwd (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3')	Lanoot และคณะ (2500)
	BL25	Rev (5' - GCGCCCTTAAAAACTTGG - 3')	Lanoot และคณะ (2500)
16S rDNA	pA	Fwd (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3')	Lanoot และคณะ (2500)
	StrepE	Rev (5' - CACCAGGAATTCCGATCT - 3')	Rintala และคณะ (2001)
	StrepF	Rev (5' - ACGTGTGCAGCCCAAGACA - 3')	Rintala และคณะ (2001)
	pH	Rev (5'- AAGGAGGTGATCCAGCCGCA -3')	Lanoot และคณะ (2500)

3.5 โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. Quality One (Bio-rad, version 4.1.0)
2. CiustalW (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw, version 1.83)
3. Bioedit (Tom Hall, version 5.0.9)
4. Phylip (J. Felsenstein's Phylip software version 3.63)
5. Treeview (Roderic D. M. Page, version 1.6.6)

3.6 การแยก *Streptomyces* spp. จากตัวอย่างดินในจังหวัดน่านให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่างดินที่เก็บจากตำบลไหล่น่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน (รูปที่ 3.1) (ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา และ รศ.จริยา เล็กประยูร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) โดยทำการเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณต่างๆกัน 3 บริเวณ คือ ทุ่งหญ้าหรือบริเวณที่มีวัชพืชขึ้น (Grass land or Vegetation, รหัสย่อ G) สวนมะม่วง (Orchard, รหัสย่อ O) และป่าเบญจพรรณ (Dry Dipterocarp, รหัสย่อ D) (ตารางที่ 3.2)



รูปที่ 3.1 แผนที่แสดงบริเวณเก็บตัวอย่างดิน (D: Dry Dipterocarp, O: Orchard และ G: Grass land หรือ Vegetation) ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก รศ.จริยา เล็กประยูร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.2 รหัสลักษณะของพื้นที่ที่เก็บดินตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างที่เก็บ

รหัสดิน	ลักษณะของพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง
G	ทุ่งหญ้า (Grass land or Vegetation)	2
D	ป่าเบญจพรรณ (Dry Dipterocarp)	7
O	สวนมะม่วง (Orchard)	2

ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัมแขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ใช้ปิเปตแก้วดูดสารแขวนลอยดังกล่าว ปริมาตร 1 มิลลิลิตรไปเจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นอนุกรมให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} ดูดสารแขวนลอยที่ได้อย่างละ 0.1 มิลลิลิตรมากระจายบนผิวหน้าอาหารแข็ง ชนิด Humic Acid-Vitamin Agar (ภาคผนวก ก) ซึ่งเป็น selective media ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 7 และ 9 นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5-7 วัน สังเกตลักษณะการเจริญของโคโลนีที่มีส่วนที่ฝังตัวอยู่ในส่วนของอาหารวุ้น และมีส่วนที่เป็นปุยสีขาวอยู่เหนือผิวหน้าอาหาร ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสายใยอาหาร และสายใยอากาศของแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptomyces* คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวจากทั้งจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 7 และ 9 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้ลูปแตะเบา ๆ ที่โคโลนีจากนั้นจึงนำมาลากบนอาหารแข็งชนิด SY (ภาคผนวก ก) ที่เติมยาต้านเชื้อราไซโคลเฮกซาไมด์ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะเฉพาะของ *Streptomyces* ซึ่งเป็นเชื้อบริสุทธิ์ขีดลงบนอาหารแข็งเอียงชนิด MS (ภาคผนวก ก) ตั้งชื่อ *Streptomyces* บริสุทธิ์ที่แยกโดยตั้งตาม รหัสตัวอย่างดิน อุณหภูมิที่ใช้แยก ค่าความเป็นกรดด่างที่ใช้แยก และหมายเลขเชื้อ ตามลำดับ ตัวอย่างเช่น G130701 แสดงว่าเป็นไอโซเลตบริสุทธิ์ที่มาจากดินตัวอย่างที่ 1 ที่เก็บจากบริเวณทุ่งหญ้า (Grass land) แยกได้ในสภาวะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 7 และเป็นเชื้อหมายเลข 01 เป็นต้น

3.7 การเก็บรักษาเชื้อ *Streptomyces* ที่บริสุทธิ์

3.7.1 เก็บในอาหารแข็งเอียงชนิด MS

ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ที่แก่แล้วของ *Streptomyces* ที่บริสุทธิ์มาขีดบนอาหารแข็งเอียงชนิด MS ซึ่งอยู่ในหลอดแก้วทดลองแบบฝาเกลียวโดยคลายฝาเกลียวเล็กน้อย บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน หรือจนกระทั่งสังเกตเห็นการสร้างสปอร์ แล้วจึงนำออกจากตู้บ่ม ปิดฝาเกลียวให้แน่น แล้วพันทับรอบรอยต่อฝาด้วยพาราฟิล์ม เก็บในห้องเย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1-2 เดือน หลังจากนั้นต้องทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารอาหารแข็งเอียงชนิด MS หลอดใหม่

3.7.2 เก็บในรูปแบบของสปอร์แขวนลอยใน 30% กลีเซอรอล

ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ที่แก่แล้วของ *Streptomyces* ที่บริสุทธิ์มาขีดบนอาหารแข็งเอียงชนิด MS ซึ่งอยู่ในหลอดแก้วทดลองแบบฝาเกลียวโดยคลายฝาเกลียวเล็กน้อย บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นานประมาณ 10 วันหรือจนกระทั่งสังเกตเห็นการเจริญและให้สปอร์แก่เต็มที่ แล้วจึงนำมาขูดสปอร์ออกโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อและใช้น้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตรผสมกับ Tween 80 ประมาณ 1 หยดที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นตัวแขวนลอย ดูดสปอร์แขวนลอยออกมากรองผ่านชุดกรองสปอร์ (ภาคผนวก ค) เพื่อแยกสายใยออก ส่วนของสปอร์จะอยู่ในสารละลาย ถ่ายสารละลายดังกล่าวลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 6 นาที เทส่วนสารละลายทิ้ง จากนั้นทำการล้างสปอร์ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อแล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทน้ำทิ้งแล้วจึงนำสปอร์ที่ได้ไปแขวนลอยใน 30% กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอแล้ว 2 ครั้งปริมาตร 300 ไมโครลิตร จึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บเป็น culture collection

3.8 การศึกษาสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี

ทำการศึกษาสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีของไอโซเลตที่แยกได้ทั้งหมดดังนี้

3.8.1 ศึกษาความสามารถในการสร้างสารรงควัตถุของ *Streptomyces* spp. เบื้องต้นโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งสูตรเบนเนต (Bennette) (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 32 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 วัน เพื่อสังเกตการสร้างรงควัตถุของสปอร์ และรงควัตถุที่แทรกซึมในอาหาร

3.8.2 ศึกษาลักษณะสายสปอร์ของเชื้อที่แยกได้ โดยการทำ slide culture โดยเขี่ยสปอร์ขีดลงบนอาหารแข็งสูตรเบนเนต แล้วจึงปักกระจกปิดสไลด์ลงในอาหารแข็งให้ทำมุม 45 องศากับอาหาร นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่ 32 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 วัน หรือจนกระทั่งเห็นการเจริญของสายใยและสปอร์บนกระจกปิดสไลด์ แล้วจึงนำกระจกปิดสไลด์ มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยกำลังขยาย 100 เท่า แล้วจำแนกลักษณะของสายสปอร์ที่พบตามที่ระบุใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1989) ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆดังนี้

1. สายสปอร์เป็นเกลียว (Spiral&Coil; SC)
2. สายสปอร์ปลายโค้ง (Retinaculum Apertum,RA) แบ่งเป็น 2 แบบ คือ
   - สายสปอร์ปลายโค้งแบบตะขอ (Atypical)
   - สายสปอร์ปลายโค้งแบบวงกลม (Typical)
3. สายสปอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรง (Rectus Flexibilis Straight)
4. สายสปอร์มีลักษณะโค้งงอเล็กน้อย (Rectus Flexibilis Flexuous)

3.8.3 ศึกษาการเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 7 และ 9 ในอาหารแข็งเบนเนตและสังเกตว่ามีการเจริญได้หรือไม่ที่สภาวะดังกล่าวข้างต้น

3.8.4 ศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน โดยการเลี้ยงเชื้อที่แยกได้ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ L-อะราบิโนส ราฟฟิโนส แรมโนส และ ซูโครส ความเข้มข้น 1% ในอาหารเหลวสูตรทดสอบการใช้น้ำตาล (ภาคผนวก ก) ซึ่งเป็น minimal salt medium แล้วสังเกตการเจริญในอาหารดังกล่าวว่าเจริญได้หรือไม่ เปรียบเทียบกับอาหารที่ปลอดเชื้อเป็นชุดทดลองควบคุม *Streptomyces* ที่สามารถใช้น้ำตาลดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนได้จะมีการเจริญที่มีลักษณะขุ่นขาวของสายใย ซึ่งจะสังเกตการเจริญนั้นหลังจากทำการลงเชื้อในวันที่ 7 และ 14

3.8.5 ศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์รงควัตถุเมลานิน โดยนำเชื้อที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหารสูตร Tyrosine Agar (ภาคผนวก ก) ซึ่งมีส่วนประกอบของ L-ไทโรซีน บ่มประมาณ 5-7 วัน หากเชื้อสามารถใช้ L-ไทโรซีน และเจริญได้ในอาหาร จะทำให้เห็นการสร้างรงควัตถุเมลานินซึ่งเป็นสีดำหรือสีน้ำตาลเข้มรอบๆโคโลนี

3.8.6 ศึกษาความสามารถในการย่อย 0.4% ไซแลน 0.1% กวานีน 0.4% อะดีนีน และ 0.4% ไฮโปแซนทีน ที่เติมลงในอาหารแข็งสูตรเบนเนต (Bennette) (ภาคผนวก ก) หาก *Streptomyces* สามารถเจริญและย่อยสารประกอบดังกล่าวได้จะสังเกตเห็นบริเวณใสรอบโคโลนี

3.8.7 นำข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.8.1 – 3.8.6 มาประมวลและจัดกลุ่ม *Streptomyces* ในขั้นต้น

3.9 การเตรียมจีโนมิคดีเอ็นเอ

3.9.1 การเลี้ยง *Streptomyces* เพื่อเก็บเกี่ยวสายใย

คัดเลือก *Streptomyces* 100 ไอโซเลต จากตัวแทนกลุ่มที่จัดกลุ่มด้วยลักษณะฟีโนไทป์ตามข้อ 3.8.7 เลี้ยงในอาหารเหลว GYM (Han และคณะ, 2005) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 30 มิลลิลิตรในขวดแก้วทรงกรวยที่ใส่ขดลวดสปริงไว้กันขวดเพื่อป้องกันการเกาะกันของสายใยและเป็นการเพิ่มปริมาณอากาศ บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน แล้วจึงทำการเก็บเกี่ยวสายใยโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วจึงเทส่วนน้ำใสทิ้ง ส่วนของสายใยจะตกตะกอนอยู่ก้นหลอด ล้างสายใยด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TE แล้วจึงปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่าเดิม ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง แล้วจึงเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TE เล็กน้อยเพื่อแขวนลอยสายใย แล้วถ่ายลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง แล้วจึงเก็บเฉพาะส่วนของสายใยในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ

3.9.2 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (Song และคณะ, 2004)

ชั่งสายใยที่เก็บเกี่ยวได้น้ำหนักเปียก 2 กรัม ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ละลายสายใยด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ SET (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร เติม Lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วจึงเติม 10% SDS ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรทั้งหมด จากนั้นเติม Protenase K ให้มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง กลับหลอดเบาๆเป็นระยะ หลังจากนั้นเติม 5M Nacl ปริมาตร 1 ใน 3 ของปริมาตรทั้งหมด และเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรทั้งหมด แล้วเขย่าให้เข้ากันจนเป็นสีขาวขุ่น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 x *g* นาน 15 นาที จากนั้นดูดเฉพาะส่วนใสด้านบนลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอลปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรทั้งหมด กลับหลอดไปมาช้าๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 x g นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทิลแอลกอฮอล์ ที่แช่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 g นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงสูญญากาศ นาน 7 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเติม RNaseA ให้มีความ

เข้มข้นสุดท้าย 20 ไมโครกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปสกัดด้วย phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) ในปริมาตร 1 เท่าเขย่าอย่างแรงให้เข้ากัน แล้วนำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 g นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้นของดีเอ็นเอ ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วยเอทิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ที่เย็น ปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรทั้งหมด แล้วเติม 3M โซเดียมอะซีเตท ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรทั้งหมด ตั้งหลอดทิ้งไว้ในน้ำแข็งนาน 15 นาทีเพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน แล้วนำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 g นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง จะเห็นตะกอนสีขาวขนาดเล็กที่ก้นหลอด ล้างตะกอนด้วย 70% เอทิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 g นาน 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงสูญญากาศ นาน 7 นาที แล้วจึงละลายด้วยสารละลาย 1X TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.9.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำจีโนมิคดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 0.5X TAE กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ นาน 30 นาที แล้วย้อมด้วย เอทิเดียมโบรไมด์ (2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในบัฟเฟอร์ 1X TE) นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำปลอดประจุ นาน 5 นาที แล้วนำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้เครื่อง Gel Documentation System เพื่อดูสภาพของจีโนมิคดีเอ็นเอโดยรวม จากนั้นนำจีโนมิคดีเอ็นเอที่ได้นั้นมาเจือจาง 100 เท่า แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 260 นาโนเมตรซึ่งดีเอ็นเอจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และโปรตีนจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาอัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} หากค่าที่ได้อยู่ในระหว่าง 1.8 - 2.0 แสดงว่าจีโนมิคดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำมาใช้ในการศึกษาต่อไปได้ หากมีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนโปรตีนสูง และหากมีค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอสูง

3.10 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S-ITS เพื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RFLP (RFLP fingerprinting)

3.10.1 การหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

ทำการเจือจางตัวอย่างจีโนมิคดีเอ็นเอที่ได้ข้างต้นให้มีความเข้มข้นเป็น 150 นาโนกลัมต่อไมโครลิตร 75 นาโนกลัมต่อไมโครลิตร และ 30 นาโนกลัมต่อไมโครลิตร นำจีโนมิคดีเอ็นเอที่ได้มาทำ PCR ตามองค์ประกอบดังแสดงในตารางที่ 3.3 โดยใช้ primer pA เป็น forward primer จำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 8-27 ของ 16S rDNA ใน *E.coli* และ primer BL235R เป็น reverse primer จำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 3-20 ของ 23S rDNA ใน *E.coli* และใช้องค์ประกอบของปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 3.3 ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะมีความยาวประมาณ 1800 bp ประกอบด้วยส่วนของ 16S rDNA และบริเวณ ITS หรือเรียกบริเวณนี้ว่า 16S-ITS

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR

รีเอเจนท์	ความเข้มข้น	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย (µM)
น้ำ HPLC	-	18.4	-
10X Thermophoe Buffer	10 เท่า	2.5	0.2
สารผสม dNTP	10 มิลลิโมลาร์	1.6	0.5
VENT DNA polymerase	20 ยูนิต/ไมโครลิตร	0.5	1.0
ไพรเมอร์1 (forward)	10 ไมโครโมลาร์	0.5	0.5
ไพรเมอร์2 (reverse)	10 ไมโครโมลาร์	0.5	0.5
จีโนมิคดีเอ็นเอ	-	1.0	-
ปริมาตรสุทธิ	-	10	-

สภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

Hot start	95 องศาเซลเซียส 5 นาที	
Denaturation	94 องศาเซลเซียส 1 นาที	30 รอบ
Annealing	53 องศาเซลเซียส 1.20 นาที	
Extention	72 องศาเซลเซียส 1 นาที	
Final Extention	72 องศาเซลเซียส 10 นาที	

นำผลิตภัณฑ์ PCR มาวิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส เพื่อตรวจสอบการเกิดแถบผลิตภัณฑ์ PCR และเลือกค่าการเจือจางจีโนมิคดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR

3.10.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S-ITS ด้วยวิธี PCR

นำจีโนมิคดีเอ็นเอที่ได้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา PCR มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S-ITS ซึ่งมีความยาวประมาณ 1800 bp ด้วยไพรเมอร์ pA และ BL325R (Rintala, 2001) ตามองค์ประกอบและสภาวะในการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้น เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพียงพอต่อการนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป

3.10.3 การตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III และ *Bst*UI เพื่อจัดกลุ่มตามลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RFLP (RFLP DNA fingerprinting) (Lanoot และคณะ, 2005)

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ตามข้อ 3.10.2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hae*III และ *Bst*UI โดยทำการตัดด้วยเอนไซม์แต่ละชนิดแยกกัน ซึ่งมีองค์ประกอบปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 3.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา แล้วจึงบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา

ตารางที่ 3.4 องค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

รีเอเจนต์	ความเข้มข้น	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำ HPLC	-	9.5	-
บัฟเฟอร์ R	10 เท่า	2.0	1 เท่า
เอนไซม์ตัดจำเพาะ	10 ยูนิตต่อไมโครลิตร	1.0	0.5 ไมโครโมลาร์
ผลิตภัณฑ์ PCR	-	8.0	-
ปริมาตรสุทธิ	-	20	-

แล้วจึงนำไปวิเคราะห์โดย 8% โพลีอะคลิลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส (ความหนา 0.5 มิลลิเมตร) ด้วยบัฟเฟอร์ 1X TBE (Lanoot และคณะ, 2005) ใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำปลอดประจุนาน 15 นาที และดูเจลภายใต้เครื่อง Gel Documentation System เพื่อเก็บข้อมูลลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบริเวณ 16S-ITS และวิเคราะห์ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้โปรแกรม Quality One หลังจาก

นั้นจึงทำการจัดกลุ่มครั้งแรกด้วยลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบริเวณ 16S-ITS ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ชนิด *Hae*III แล้วจึงจัดกลุ่มย่อยด้วยลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบริเวณ 16S-ITS ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Bst*UI เพื่อทำการจัดกลุ่มของ *Streptomyces* spp. ที่มีการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกันไว้ในกลุ่มเดียวกัน

3.11 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยวิธี PCR

คัดเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มที่จำแนกได้จากข้อ 3.10.3 มาเพิ่มปริมาณ 16S rDNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer pA ข้างต้นเป็น forward primer และ primer pH (Rintala, 2001) เป็น reverse primer ซึ่งจำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1541-1522 ของ 16S rDNA ของ *E.coli* แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR มีความยาวประมาณ 1500 bp

3.12 การแยกดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุด QI Aquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

ทำตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ตัดอะกาโรสเจลตรงบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการภายใต้เครื่องฉายรังสี UV ด้วยใบมีดและนำชิ้นส่วนเจลใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลหลอมละลายจนหมด จากนั้นเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักชิ้นเจล กลับหลอดไปมา แล้วถ่ายสารละลายลงใน QI Aquick column ปริมาตร ไม่เกิน 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนที่ปั่นตกลงมาทิ้ง และหากสารละลายในหลอดไมโครเซนตรอฟิวจ์ยังคงเหลือ จึงนำมาใส่ใน QAlquick column แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง หลังจากนั้นล้างคอลัมม์ด้วยบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม เทส่วนใสทิ้ง กำจัดบัฟเฟอร์ PE ที่ยังคงเหลือในคอลัมน์โดยการปั่นเหวียงซ้ำอีกครั้ง ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม สารละลายดีเอ็นเอจะอยู่ในส่วนน้ำใสภายในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.13 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธ์ด้วยชุด QI Aquick Gel Extraction Kit (Qiagen) ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้วิธี Dye Terminator โดยใช้เครื่อง Licor NEN 2400 (1st BASE) ด้วยไพรเมอร์ pA เป็น forward primer ไพรเมอร์ pH ไพรเมอร์ StrepE และไพรเมอร์ StrepF เป็น reverse primer ซึ่งจะทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ครอบคลุมบริเวณ 16S rDNA ทั้งหมด ซึ่งการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ดำเนินการโดยบริษัท 1st BASE (สิงคโปร์)

3.14 สร้าง Phylogenetic Tree

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวแทน *Streptomyces* ทั้งหมดและจากฐานข้อมูล GenBank® (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) ถูกนำมาจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Clustal W แล้วนำมาแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการลบช่องว่างระหว่างเบสออกด้วยโปรแกรม Bloedit หลังจากนั้นวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Phylip โดยกำหนดให้ใช้แบบจำลองของ Kimura's 2 parameter (K2P) ในการวิเคราะห์ และสร้างแผนภูมิในรูปแบบ neighbor-joining method tree (NJ) ซึ่งกำหนดจำนวนชุดใน bootstrap เป็น 1000 ซ้ำ หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Treeview และแสดงผลในรูปแบบของ Phylogenetic Tree

3.15 การตรวจสอบความสามารถสร้างสารต้านจุลชีพโดย *Streptomyces* spp.

3.15.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ (ยุวดี มหาศักดิ์ศิริ, 2546)

เชื้อทดสอบประกอบไปด้วยตัวแทนของแบคทีเรียประเภทแกรมบวก แบคทีเรียประเภทแกรมลบ ยีสต์ และรา

3.15.1.1 แบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATTC 25922 เป็นตัวแทนแบคทีเรียแกรมลบและ *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 เป็นตัวแทนแบคทีเรียแกรมบวก โดยทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง Muller-Hinton agar (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำโคโลนีมาเจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีค่าความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland Standard

3.15.1.2 ยีสต์ทดสอบ ได้แก่ *Candida albicans* ATTC 70014 เลี้ยงบนอาหารแข็ง Sabouraud agar (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำโคโลนีมาเจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ให้มีค่าความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland Standard

3.15.1.3 ราทดสอบ ได้แก่ *Aspergillus niger* ATTC 6275 เลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน หรือจยมีการสร้างสปอร์ ขูดสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่น กรองสปอร์ จากนั้นเจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีค่าความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland Standard

3.15.2 การเตรียมตัวอย่างที่จะใช้ในการทดสอบจาก *Streptomyces* spp.

นำสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* ทั้ง 178 ไอโซเลตที่แยกได้ ถ่ายลงในอาหารเหลว C4 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อแยกส่วนของสายใยออก เก็บเฉพาะส่วนน้ำใสในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการทดสอบต่อไป

3.15.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านจุลชีพโดยใช้วิธี stainless cup

3.15.3.1 การทดสอบกับแบคทีเรียทดสอบ

ใช้สำลีก้านจุ่มลงในแบคทีเรียทดสอบแขวนลอยที่ถูกปรับความเข้มข้นแล้วป้ายลงบนหน้าอาหารแข็ง Muller-Hinton agar ให้ทั่วในสองทิศทางที่ตรงข้ามกัน ทิ้งไว้ให้หน้าอาหารแห้ง แล้วจึงป้ายซ้ำอีกรอบในทิศทางที่กลับกัน เมื่อหน้าอาหารแห้งแล้วจึงวาง stainless cup บนหน้าอาหารแข็งดูดส่วนน้ำใสจากข้อ 3.15.2 ใส่ลงใน stainless cup ปริมาตร 100 ไมโครลิตรแล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง มีโดยใช้ตัวควบคุมบวก (positive control) เป็น streptomycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ตัวควบคุมลบ (negative control) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ C4 ที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ แล้วจึงวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น (clear zone) รอบๆ stainless cup

3.15.3.2 การทดสอบกับยีสต์ทดสอบ

ใช้สำลีก้านจุ่มลงในยีสต์ทดสอบแขวนลอยที่ถูกปรับความเข้มข้นแล้วป้ายลงบนหน้าอาหารแข็ง Sabouraud agar ให้ทั่วในสองทิศทางที่ตรงข้ามกัน ทิ้งไว้ให้หน้าอาหารแห้ง แล้วจึงป้ายซ้ำอีกรอบในทิศทางที่กลับกัน เมื่อหน้าอาหารแห้งแล้วจึงวาง stainless cup บนหน้าอาหารแข็งดูดส่วนน้ำใสจากข้อ 3.15.2 ใส่ลงใน stainless cup ปริมาตร 100 ไมโครลิตรแล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยมีโดยใช้ตัวควบคุมบวก (positive control) เป็น nystatin ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ตัวควบคุมลบ

(negative control) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเจริญของเชื้อทดสอบ แล้วจึงวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น (clear zone) รอบๆ stainless cup

3.15.3.3 การทดสอบกับราทดสอบ

ใช้สำลีก้านจุ่มลงในราทดสอบแขวนลอยที่ถูกปรับความเข้มข้นแล้วป้ายลงบนหน้าอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) ให้ทั่วในสองทิศทางที่ตรงข้ามกัน ทิ้งไว้ให้หน้าอาหารแห้ง แล้วจึงป้ายซ้ำอีกรอบในทิศทางที่กลับกัน เมื่อหน้าอาหารแห้งแล้วจึงวาง stainless cup บนหน้าอาหารแข็งดูดส่วนน้ำใสจากข้อ 3.12.2 ใส่ลงใน stainless cup ปริมาตร 100 ไมโครลิตรแล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยมีโดยใช้ตัวควบคุมบวก (positive control) เป็น cyclohexamide ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ตัวควบคุมลบ (negative control) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเจริญของเชื้อทดสอบ แล้วจึงวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น (clear zone) รอบๆ stainless cup

แผนภูมิขั้นตอนการทดลองในงานวิจัยนี้