บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองและเคมีภัณฑ์

2.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น G-10 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc., USA.

เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น G-33 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., USA.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled Environment Incubator Shaker) รุ่น R-88 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., USA.

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น RC-5B ของบริษัท Sorvall Instrument

เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น SP-5A ของบริษัท Suntex Instruments Co., Ltd., Taiwan.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/vis Spectrophotometer) รุ่น PR-1 ของบริษัท Shimadzu, Japan.

เครื่องเก็บสารลำดับส่วน (Fraction Collector) รุ่น Frac. 200 ของบริษัท Pharmacia Fine Chemical, Japan.

เครื่องระเหยแห้ง (Lyophilyzer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan.

กระดาษกรอง (Millipore membrane) รุ่น GS pore size 0.45 ไมโครเมตร ของบริษัท Millipore Corporation, USA.

เครื่องปั๊ม (Multistatic pump) รุ่น 2-6200, 2-2601 ของบริษัท Buchler Instruments, USA.

เครื่องปั่นปรับความเย็น (Refrigerated Centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman, USA.

เครื่องระเหยสารภายใต้สภาวะสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) และอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan.

เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G 560 E ของบริษัท Scientific Industries, Inc., USA.

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan.

2.1.2 <u>เคมีภัณฑ์</u>

แบคโต-เปปโตน (Bacto-Peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

แบคโต-ทริปโตน (Bacto-Tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

กลูโคส (Glucose) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany.

แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ ของบริษัท Fluka Chemical, Switzerland.

เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany.

เมทานอล (Methanol) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany.

อะซิโตน (Acetone) ของบริษัท BDH Labotatories Supplies, England.

อะซิโตไนไทร์ (Acetonitrile) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany.

บิวทานอล (Butanol) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany.

ซีเอ็ม-เซฟาเด็กซ์ ซี-50 (CM-Sephadex C-50) ของบริษัท Phamacia Fine Chemicals, Sweden.

ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (DEAE-Sephadex A-50) ของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals, Sweden.

เซฟาเด็กซ์ จี-75 (Sephadex G-75)ของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals, Sweden.

ซิลิกาเจล (Wakogel C-200) ของบริษัท Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan.

ไตรฟลูโอโรอะซีติกแอซิด (Trifluoroacetic acid) ของบริษัท Sigma, USA.

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Farmitalia Carlo Erba, Italy.

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany.

โซเดียมโปตัสเซียมตาร์เตรท (Sodium Potassium Tartrate) ของบริษัท Fluka AG. Buchs, Switzerland.

เคมีภัณฑ์ชนิดอื่น ๆ เป็นเคมีภัณฑ์ระดับวิเคราะห์ (Analytical Reagent Grade) จากบริษัทต่าง ๆ ซึ่งนำมาใช้โดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีก

2.2 จุลินทรีย์

1. *Bacillus* sp. จำนวน 3 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารหมักดอง ผัก และผลไม้ จากตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง ทำการแยกโดย ผศ.จิราภรณ์ ธนียวัน

2. *Torulopsis glabrata* ATCC 15126 จาก ห้องปฏิบัติการสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. *Saccharomyces cerevisiae* จาก ห้องปฏิบัติการสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. จุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มอื่น ๆ จาก หน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ได้แก่

กลุ่มยีสต์ : *Kloeckera apiculata*

Saccharomycopsis lipolytica

Hansenula mrakii

Hansenula anomala

Kluveromyces drosophilarum

pichia kluyveri

Candida lipolytica

กลุ่มแบคทีเรีย : *Micrococcus luteus*

Pseudomonas aeruginosa

Bacillus subtilis

Escherichia coli

กลุ่มรา : *Aspergillus niger*

Penicillium sp.

Fusarium sp.

Cladosporium sp.

2.3 <u>การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อทดสอบ</u>

2.3.1 การแยกเชื้อจากตัวอย่างอาหารที่เก็บได้

โดยขีดเชื้อจากตัวอย่างต่าง ๆ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อวายเอ็ม (YM medium ภาคผนวกหมายเลข 1.1) เพื่อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว จากนั้นนำแต่ละโคโลนีไปทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบโดยการนำไปขีดไขว้ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Blue medium ภาคผนวกหมายเลข 1.2) ที่มีเชื้อทดสอบเจริญอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 48-72 ชม.ทำการคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่ให้บริเวณใส (Clear zone) เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

2.3.2 การทดสอบความสามารถในการฆ่าของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.3.1 ต่อเชื้อทดสอบกลุ่มต่างๆ

โดยนำเชื้อที่แยกได้จากข้อ 2.3.1 มาขีดไขว้ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งวายอีพีดี ภาคผนวกหมายเลข 1.2) ที่มีเชื้อทดสอบกลุ่มต่างๆเจริญอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 48-72 ชม. ตรวจดูและวัดความกว้างของบริเวณใสที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อ

การเตรียมเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ ทำได้โดยคัดเลือกตัวแทนของจุลินทรีย์ในกลุ่มต่าง ๆ ทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์กลุ่มละ 5-10 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้อาหารเหลวนิวเตรียนท์บรอท (Nutrient broth ภาคผนวกหมายเลข 1.3) จุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อวายเอ็ม (ภาคผนวกหมายเลข 1.1) ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล.ปริมาตร 50 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยอัตราเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 18-20 ชม. สำหรับจุลินทรีย์ในกลุ่มราใช้อาหารแข็งพีดีเอ (PDA medium ภาคผนวกหมายเลข 1.4) จากนั้นเจือจางให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วโดยการนับด้วย Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำไม้พันสำลีจุ่มน้ำกลั่นที่มีเซลล์จุลินทรีย์เจือจางอยู่มา swab บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (ภาคผนวกหมายเลข 1.2)

2.4 <u>การคัดเลือกเชื้อทดสอบที่ไวต่อการออกฤทธิ์ของทอกซินจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในข้อ 2.3.2</u>

2.4.1 การเปรียบเทียบระยะเวลาในการเจริญของเชื้อยีสต์ทดสอบ

โดยการเลี้ยงเชื้อยีสต์ทดสอบ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Torulopsis glabrata* และ *Saccharomyces cerevisiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลววายอีพีดี (YEPD Medium ภาคผนวกหมายเลข 1.5) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที ติดตามและเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อที่เวลาต่าง ๆ โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

2.4.2 การเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น จากการดูดซึมของทอกซินที่หยอดลงในวุ้นเพาะเชื้อที่มีเชื้อทดสอบเจริญอยู่

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. แต่ละสายพันธุ์ในอาหารเหลว (ภาคผนวกหมายเลข 1.5) ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน แยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ. นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปทำปราศจากเชื้อโดยการฉีดผ่านกระดาษกรอง (Millipore Filter Membrane) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ

การเตรียม *Torulopsis glabrata* และ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ตัวทดสอบ โดยการเลี้ยงในอาหารเหลว (ภาคผนวกหมายเลข 1.5) ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 ช.ม. จากนั้นเจือจางให้มีจำนวนเซลประมาณ 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว นำไม้พันสำลีจุ่มน้ำกลั่นที่มีเชื้อยีสต์เจือจางอยู่มา Swab ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (ภาคผนวกหมายเลข 1.2) ใช้ที่เจาะวุ้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 10 มม. เจาะลงบนวุ้นเพาะเชื้อจำนวน 3 หลุมต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ โดยให้แต่ละหลุมห่างกันพอสมควร หยอด 100 ไมโครลิตร ของน้ำเลี้ยงเซลล์ *Bacillus* sp. แต่ละสายพันธุ์ที่เตรียมไว้ ลงในแต่ละหลุมนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลา 1-2 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น หาค่าเฉลี่ยแล้วเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

2.5 <u>การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติดีที่สุดเพื่อใช้ในการผลิตทอกซิน</u>

2.5.1 การติดตามกราฟแสดงการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. ที่เวลาต่าง ๆ

โดยการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ F2.2, 5/12 และ 3/38 ที่ทำการคัดเลือกได้จากข้อ 2.3.2 ในอาหารเหลววายอีพีดี (ภาคผนวกหมายเลข 1.5)

ปริมาตร 50 มล. ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที ติดตามและเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อที่เวลาต่าง ๆ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (ภาคผนวกหมายเลข 1.2) เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Bacillus* sp. แต่ละสายพันธุ์ที่เวลาต่าง ๆ มาหยอดลงในวุ้นเพาะเชื้อที่มียีสต์ทดสอบเจริญอยู่

2.5.2 การทดสอบความเสถียร (Stability) ของทอกซินที่ผลิตได้

โดยการนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 และ 5/12 ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง,0°ซ.,-70°ซ. และนำไปผ่านการทำให้แห้งภายใต้อุณหภูมิต่ำ (Lyophilization) จากนั้นนำมาเปรียบเทียบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบโดยวิธี Tube Test

<u>การทดสอบความสามารถในการฆ่ายีสต์ทดสอบของทอกซินที่ผลิตได้โดยวิธี tube test</u>

การเตรียมยีสต์ตัวทดสอบ โดยการเขี่ยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 1 ลูปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลววายอีพีดี (ภาคผนวกหมายเลข 1.5) 50 มล.ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 ชม. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 1.0

เตรียมน้ำกลั่นปลอดเชื้อใส่ในหลอด ๆ ละ 2 มล. แล้วเติม 1 มล. ของส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. ที่ปั่นแยกเอาเซลล์ออก และ 0.2 มล. ของน้ำเลี้ยงยีสต์ทดสอบที่เตรียมไว้ ลงในหลอดน้ำกลั่น ทำซ้ำหลายครั้ง นำไปบ่มที่ 25°ซ. บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 ชม. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

2.6 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อ และติดตามความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างทอกซินของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2,2

โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.5 ในอาหารเหลววายอีพีดี (ภาคผนวกหมายเลข 1.5) ปริมาตร 50 มล. ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 25°ซ ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ,1951) และความสามารถในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ทดสอบในช่วงเวลาต่างๆ โดยวิธี Tube test

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างทอกซินที่คัดเลือกได้ในขวดแก้วทรงกรวย

เตรียมหัวเชื้อ (Starter) ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 โดยเขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารเอียงที่มีอายุ 24 ชม. ลงในอาหารเหลวนิวเตรียนท์ (ภาคผนวกหมายเลข 1.3) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 12 ชม. จนได้ความเข้มข้นของเชื้อเมื่อนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรได้เท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่าย 4% (ปริมาตร/ปริมาตร) ของหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวายอีพีดีเพื่อการผลิตสารปฏิชีวนะ (ภาคผนวกหมายเลข 1.5) ในปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที ตามอุณหภูมิและเวลาการบ่มที่ต้องการ แล้วจึงนำไปทดสอบความสามารถในการฆ่ากับยีสต์ทดสอบ

2.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตทอกซิน

ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทอกซินจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ F2.2 ในขวดเขย่าโดยวิธี Tube test เตรียมหัวเชื้อและเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 2.5 โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดวายอีพีดี (ภาคผนวกหมายเลข 1.5) สภาวะต่างๆที่ทำการศึกษา ได้แก่

2.7.1 ศึกษาระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตทอกซิน

ทำการศึกษาหาระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในขวดเขย่าที่มีการสร้างทอกซินสูงสุด โดยการแปรค่าระยะเวลาที่ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ F2.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 1-7 วัน

2.7.2 ศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตทอกซิน

ทำการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้น ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดวายอีนีดีในขวดเขย่า โดยการแปรผันความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 2.5-7.0 (โดยแปรผันค่าทีละ 0.5)

2.7.3 ศึกษาอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตทอกซิน

ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขวดเขย่าที่ใช้เครื่องเขย่าที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 25,30, 35,37 และ 40°ซ.

2.7.4 ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตทอกซิน

ศึกษาการเจริญและการผลิตทอกซินในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดวายอีนีดีที่แปรแหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส, ซูโครส, แป้ง แหล่งไนโตรเจน เช่น เปปโตน, ทริปโตน, ผงมอลท์สกัด และแหล่งเกลือแร่และไวตามิน เช่น สารสกัดจากยีสต์, คอร์น สตีฟ ลิเคอร์, คาซามิโนแอซิด

2.8 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ของทอกซินต่อยีสต์ทดสอบ

ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ของทอกซินที่ผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ F2.2 ที่คัดเลือกได้ ต่อยีสต์ทดสอบที่เลือกใช้โดยวิธี Tube test เตรียมหัวเชื้อและเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 2.5 โดยใช้สูตรอาหารเหลวสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ (ภาคผนวกหมายเลข 1.5) เป็นเวลา 3 วัน ปั่นแยกเซลออกโดยการปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 °ซ นำส่วนน้ำใสไปฉีดผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงนำไปทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อยีสต์ทดสอบ ซึ่งสภาวะต่าง ๆ ที่ทำการศึกษาได้แก่

2.8.1 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ของทอกซิน

โดยทำการทดสอบความสามารถของทอกซินในการฆ่าเชื้อยีสต์ทดสอบ โดยวิธี Tube Test ที่แปรค่าระยะเวลาในการบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 10 นาที จนถึง 24 ชม.

2.8.2 ศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ของทอกซิน

โดยทำการทดสอบความสามารถของทอกซินในการฆ่าเชื้อยีสต์ทดสอบ โดยวิธี Tube Test ที่ทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในหลอดทดลองที่ทำการบ่มทอกซินกับยีสต์ทดสอบด้วย 0.1 โมลาร์ของบัฟเฟอร์ต่าง ๆ 4 ชนิด ได้แก่

- ไฮโดรคลอริก-โปแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Hydrochloric acid-Potassium Chloride Buffer) ความเป็นกรด-ด่างที่ทำการศึกษาคือ 2.0
- ซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Citrate-Phosphate Buffer) ความเป็นกรด-ด่างที่ทำการศึกษาคือ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0
- ทริสไฮดรอกซีเมทธิล อะมิโนมีเทนบัฟเฟอร์ (Tris Hydroxymethyl Aminomethane Buffer) ความเป็นกรด-ด่างที่ทำการศึกษาคือ 8.0 และ 9.0

- ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (Glycine-NaOH Buffer) ความเป็นกรด-ด่างที่ทำการศึกษาคือ 10.0

2.8.3 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ของทอกซิน

โดยทำการทดสอบความสามารถของทอกซินในการฆ่าเชื้อยีสต์ทดสอบ โดยวิธี Tube Test โดยแปรค่าอุณหภูมิของการบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ต่าง ๆ กันคือ 25°ซ., 30°ซ. และอุณหภูมิห้อง

2.8.4 ศึกษาระยะเวลาในการเจริญของเชื้อทดสอบที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ของทอกซิน

โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ทดสอบในอาหารเหลว (ภาคผนวกหมายเลข 1.5) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25 °ซ ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที ติดตามการเจริญของยีสต์ที่เวลาต่างๆ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และทดสอบช่วงเวลาของการเจริญที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ของทอกซินโดยวิธี Tube test และติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

2.9 <u>การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของทอกซินที่ผลิตได้</u>

2.9.1 การทดสอบว่าเป็นสารประเภทโปรตีนหรือไม่

โดยดูสมบัติการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและ 260 นาโนเมตร ประกอบกับการสังเกตและเปรียบเทียบบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการหยอดทอกซิน, การหยอดเอนไซม์โปรติเอส (Protease) และการหยอดสารละลายผสมระหว่างทอกซินกับเอนไซม์โปรติเอสปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมต่าง ๆ ของวุ้นเพาะเชื้อที่มียีสต์ทดสอบเจริญอยู่

2.9.2 การเติมสารทวีน 80 (Tween 80) ลงในหลอดทดสอบ

โดยทำการเติมทวีน 80 ปริมาตร 1 มล.ลงในหลอดทดสอบของการทดสอบโดยวิธี Tube test ซึ่งประกอบไปด้วย 1 มล. ของทอกซิน และ 0.2 มล.ของยีสต์ทดสอบ เปรียบเทียบความสามารถของทอกซินในการฆ่ายีสต์ทดสอบ โดยการติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กับหลอดทดสอบอื่นๆ ที่ไม่มีการเติมทวีน 80

2.9.3 การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของทอกซิน

ทำการแยกทอกซินที่ผลิตได้ตามวิธีในข้อ 2.4.2 ออกมาแล้วละลายทอกซินในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 4 ชนิด เช่นเดียวกับข้อ 2.8.2 แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลา 10 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปทดสอบความสามารถในการฆ่ายีสต์ทดสอบโดยวิธี Tube Test

2.9.4 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของทอกซิน

ทำการแยกทอกซินที่ผลิตได้ตามวิธีในข้อ 2.4.2 ออกมาแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 ,-20 ,0 ,4 ,45 ,60°ซ. และอุณหภูมิห้อง เป็นเวลาต่างๆกัน คือ 0-7 วัน สำหรับอุณหภูมิ 45 ,60 °ซ และอุณหภูมิห้อง 0-30 วันสำหรับอุณหภูมิ 4 °ซ และ 0-15 อาทิตย์ สำหรับอุณหภูมิ -70 ,-20 ,และ 0 °ซ เมื่อครบกำหนดในแต่ละช่วงเวลา จึงนำออกมาทดสอบการออกฤทธิ์กับยีสต์ทดสอบโดยวิธี Tube Test

2.10 <u>การทำทอกซินกึ่งบริสุทธิ์</u> (Jiraporn และคณะ,1992)

2.10.1 การแยกเซลล์ *Bacillus* sp. ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

หลังจากเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ F2.2 เพื่อผลิตทอกซินได้ตามต้องการแล้ว จึงนำมาแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ. แยกน้ำใสส่วนบนไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรอง (Millipore Filter Membrane) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปสกัดต่อในขั้นตอนต่อไป

2.10.2 การแยกทอกซินโดยการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl)

นำน้ำใสจากข้อ 2.10.1 มาตกตะกอนด้วย 6 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริกจนมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.5 แยกเก็บตะกอนโดยนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ. ละลายตะกอนที่ได้ใน 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 ปริมาตร 50 มล. นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ. ข้ามคืน โดยเขย่าเป็นครั้งคราวจนกว่าตะกอนจะละลายหมด

2.10.3 การสกัดแยกทอกซินด้วยบิวทานอล (Butanol)

นำสารละลายตะกอนจากข้อ 2.10.2 มาเติม -20°ซ.อะซิโตนที่เย็นจัดปริมาตร 116 มล. เขย่าจะเกิดตะกอนขึ้นมาอีก นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งประมาณ 1-2 ชม. จากนั้นนำไปปั่นแยกเพื่อเก็บส่วนน้ำใสที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 0°ซ. กำจัดอะซิโตนออกโดยนำไประเหยภายใต้สภาวะสุญญากาศ (Vacuum Evaporation) นำสารที่เหลืออยู่ไปสกัด 2 ครั้ง ด้วยบิวทานอล 50 มล. โดยใช้กรวยแยก (Separatory Funnel) เก็บส่วนชั้นบิวทานอลไว้ นำไปลดปริมาตรโดยการระเหยภายใต้สภาวะสุญญากาศจนเหลือประมาณ 5 มล.

i17384287x

2.10.4 การแยกทอกซินโดยการทำโครมาโตรกราฟี

2.10.4.1 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ซิลิกาเจล

เตรียมเจลโดย ชั่งซิลิกาเจล (Wako gel C-200) ประมาณ 100 กรัม นำไปอบแห้งเพื่อกำจัดโมเลกุลของน้ำที่อุณหภูมิ 180°ซ. เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง แช่ในบิวทานอล 500 มล. คนให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน เทส่วนน้ำใสทิ้งพร้อมกับเจลละเอียด จากนั้นบรรจุเจลลงในคอลัมน์แก้วขนาด 2.4x45 เซนติเมตร ให้ได้เจลสูงประมาณ 30 เซนติเมตร ผ่านบิวทานอลลงในคอลัมน์ประมาณ 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหลประมาณ 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที ค่อย ๆ ใส่สารละลายทอกซินที่อยู่ในชั้นบิวทานอลจากข้อ 2.10.3 5 มิลลิลิตรมาผ่านลงบนผิวหน้าเจล ชะโปรตีนภายในคอลัมน์ออกด้วย 200 มิลลิลิตร ของบิวทานอล, อะซิโตน, เอทานอล, อะซิโตไนไทร์ และเมทานอล ตามลำดับ เก็บลำดับส่วนละ 3 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ทดสอบความสามารถในการฆ่าของทอกซินในแต่ละหลอด จากนั้นรวมหลอดที่มีแอคติวิตีเข้าด้วยกัน นำไปทำให้เข้มข้นโดยการระเหยภายใต้สภาวะสุญญากาศ วัดปริมาตรแล้วละลายกลับด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 มิลลิลิตร วัดแอคติวิตี และหาปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ,1951)

2.10.4.2 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50

ชั่งดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ประมาณ 1 กรัม ในสารละลาย 500 มิลลิลิตร 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ต้มให้เดือด 2 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลพองเต็มที่ เทส่วนน้ำใสทิ้งพร้อมกับเจลละเอียด ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง จากนั้นนำเจลบรรจุลงในคอลัมน์หลอดฉีดยาขนาดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ข้ามคืนจนเจลอยู่ในสภาวะสมดุล มีอัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อย ๆ ใส่สารละลายของทอกซินที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ซิลิกาเจล 1 มิลลิลิตร จากข้อ 2.10.4.1 ลงบน

ผิวหน้าเจลเบา ๆ ชะโปรตีนส่วนที่ไม่ถูกจับด้วยเม็ดเจลออกให้หมดด้วย 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ติดตามโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าเข้าใกล้ 0 จากนั้นจึงชะโปรตีนที่ถูกจับด้วยเจลออกด้วย 0-1.0 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์ใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 เก็บลำดับส่วนละ 3 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากนั้นรวมหลอดที่ออกมากับโปรตีนในยอด (peak) เดียวกันเข้าด้วยกัน นำไปทำให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ และละลายกลับด้วย 3 มิลลิลิตรของ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ นำมาทดสอบความสามารถในการฆ่าของทอกซินต่อยีสต์ทดสอบ และหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ,1951.

2.10.4.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75

เตรียมเจลที่จะใช้โดยแช่เซฟาเด็กซ์ จี-75 ประมาณ 1 กรัม ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 200 มล. ต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 ชม. ปล่อยให้เย็น แล้วบรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาด 1.0 x 35 ซม. ให้ได้เจลสูงประมาณ 30 ซม. ผ่านสารละลาย 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ ประมาณ 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหลประมาณ 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำสารละลายของทอกซินที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 และทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการทำให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศจากข้อ 2.10.4.2 มาผ่านลงคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 เก็บสารละลายโปรตีนลำดับส่วนละ 3 มิลลิลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากนั้นรวมหลอดที่ออกมากับโปรตีนยอด (peak) เดียวกันเข้าด้วยกัน นำไปทำให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศและละลายกลับด้วย 3 มิลลิลิตร ของ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ นำมาทดสอบความสามารถในการฆ่ายีสต์ทดสอบและหาปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ,1951)

2.10.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของทอกซินด้วยเครื่อง HPLC

นำทอกซินก่อนและหลังการผ่านขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ ไปตรวจสอบด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (Shimadzu LC-3A) โดยใช้ Reverse phase Lichro CART 250-4 (100 RP-18) คอลัมน์ขนาด 250 x 4 มม.ID. ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany มีลิเนียร์เกรเดียนท์ 0-100 % ของ 10% และ 90% อะซิโตไนไทร์ในน้ำเป็นตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดย UV detector ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

2.10.6 การทำอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น (SDS Gel Electrophoresis) ตามวิธีของ Laemmli,1970.

โดยประกบแผ่นแก้วขนาด 16x18 เซนติเมตร 2 แผ่นเข้าด้วยกัน สอดแผ่นพลาสติก (Spacer) หนา 3 มิลลิเมตร ที่ขอบด้านข้างทั้ง 2 ข้าง เทสารละลายผสมของเซพาเรตติงเจล (Separating gel) ที่มีเจลความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์(ภาคผนวกหมายเลข 4.9) ลงไปในแผ่นแก้วให้ได้ความสูง 9 เซนติเมตร หยดน้ำลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูง 2 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 45 นาทีจนกระทั่งเจลแข็งตัว เทน้ำออกแล้ววางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง(Slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้วทั้งสอง เทสารละลายผสมของสแตกกิงเจล (Stacking gel) ซึ่งมีองค์ประกอบดังแสดงในภาคผนวกหมายเลข 4.10 เมื่อเจลแข็งตัวแล้วดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวกหมายเลข 4.2) 2-3 ครั้ง แล้วเติมอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ลงในช่องใส่ตัวอย่างจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์และโปรตีนมาตรฐานละลายในบัฟเฟอร์ ซึ่งส่วนประกอบแสดงในภาคผนวกหมายเลข 4.6 และต้มให้เดือดที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยอดลงในช่องใส่ตัวอย่างบนแผ่นเจล ทำการอิเลคโตรโฟริซิสที่ 50 มิลลิแอมแปร์ จนกระทั่งสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนลงมาถึงปลายสุดของแผ่นเจล ต่อจากนั้นนำแผ่นเจลนี้มาแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีน (ภาคผนวกหมายเลข 4.11) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชะล้างสีด้วยสารละลายชะล้างสี (ภาคผนวกหมายเลข 4.12) จนเห็นแถบของโปรตีนชัดเจน

<u>สรุปแผนภาพขั้นตอนการทำทอกซินกึ่งบริสุทธิ์</u>

อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.สายพันธุ์ F2.2

↓ 10,000 รอบ/นาที 10 นาที ที่ 4°ซ

ส่วนน้ำใส

↓ กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

↓ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 2.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (6 N)

↓ 10,000 รอบ/นาที 15 นาที ที่ 0°ซ

ตะกอน

↓ ละลายด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.5)

↓ เติม -20°ซ อะซิโตน แล้วตั้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 1-2 ชม.

↓ 12,000 รอบ/นาที ที่ 0°ซ

ส่วนน้ำใส

↓ กำจัดอะซิโตนโดยการระเหยภายใต้สภาวะสุญญากาศ

↓ สกัดแยกทอกซินด้วยบิวทานอล 2 ครั้ง

ชั้นบิวทานอล

↓ ลดปริมาตรโดยการระเหยภายใต้สภาวะสุญญากาศ

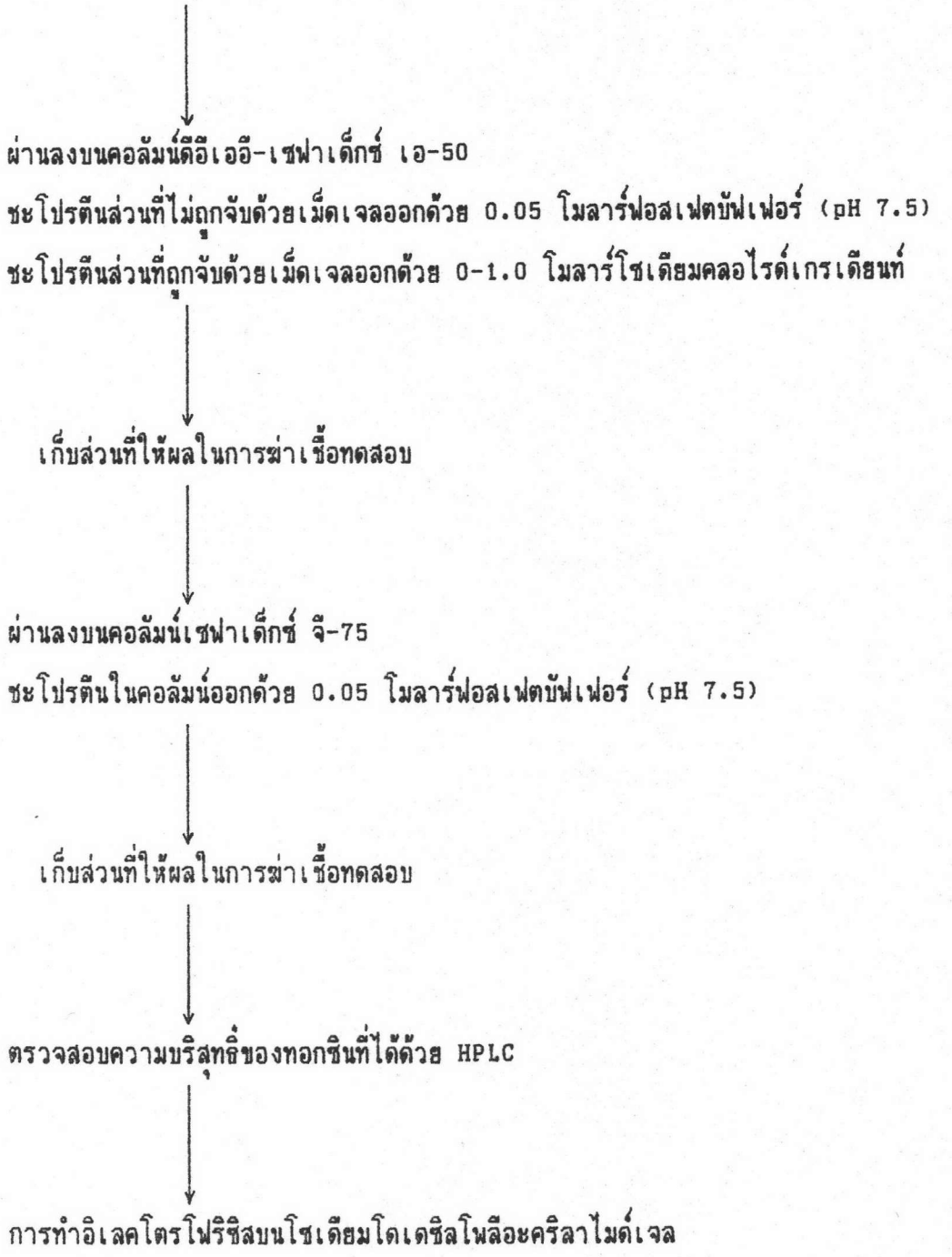
ผ่านลงบนคอลัมน์ซิลิกาเจล (Wacogel C-2000)

ชะโปรตีนในคอลัมน์ด้วยบิวทานอล อะซิโตน เอธานอล อะซิโตไนไทร์ และเมธานอล ตามลำดับ

↓

เก็บส่วนที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบ

↓


ผ่านลงบนคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50
ชะโปรตีนส่วนที่ไม่ถูกจับด้วยเม็ดเจลออกด้วย 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.5)
ชะโปรตีนส่วนที่ถูกจับด้วยเม็ดเจลออกด้วย 0-1.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์
เก็บส่วนที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบ
ผ่านลงบนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75
ชะโปรตีนในคอลัมน์ออกด้วย 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.5)
เก็บส่วนที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบ
ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของทอกซินที่ได้ด้วย HPLC
การทำอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจล

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ทำโดยใช้วิธีการของ Lowry และคณะ (1951) นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 1.0 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายผสม C (ภาคผนวกหมายเลข 3.3) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15-20 นาที เติมสารละลาย D (ภาคผนวกหมายเลข 3.4) 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำส่วนผสมนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin) ที่ความเข้มข้นจาก 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.11 การตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ทางอนุกรมวิธาน

นำ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้ง *Saccharomyces cerevisiae* ได้ดีที่สุดมาตรวจสอบชนิดทางอนุกรมวิธาน โดยวิธีของ Sneath และคณะ (1986)

2.11.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Cultural and Morphological Characteristics) โดยศึกษาลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (ภาคผนวกหมายเลข 1.2) ตลอดจนการศึกษาขนาดรูปร่างและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.11.2 ศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมี (Physiological and Biochemical Characteristics) โดยศึกษาการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ การเกิดปฏิกริยาทางชีวเคมีกับรีเอเจนท์ที่ใช้ทดสอบ การทนเกลือและอุณหภูมิสูง รวมทั้งการศึกษารูปแบบของการเจริญของเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบคือ

- อาหารวุ้นนิวเตรียนท์ (Nutrient Agar ภาคผนวกหมายเลข 1.6)
- อาหารโอ-เอฟ เบซัล (OF Basal Medium ภาคผนวกหมายเลข 1.7)
- อาหารซิมมอน ซิเตรท (Simmon Citrate Medium ภาคผนวกหมายเลข 1.8)
- อาหารเหลววี-พี (Voges-Proskaver Broth ภาคผนวกหมายเลข 1.9)
- อาหารเหลวแซบอรอด เด็กซ์โทรส (Sabouraud Dextrose Broth ภาคผนวกหมายเลข 1.10)
- อาหารวุ้นสตาร์ช (Starch Agar ภาคผนวกหมายเลข 1.11)
- อาหารอินโดล โปรดักชั่น (Indole Production Medium ภาคผนวกหมายเลข 1.12)
- อาหารซอล์ท โทเลอแรนซ์ (Salt Tolerance Medium ภาคผนวกหมายเลข 1.13)
- นิวเตรียนท์ เจลาติน (Nutrient Gelatin ภาคผนวกหมายเลข 1.14)
- อาหารเหลวฟีนอล เรด เบส (Phenol Red Broth Base ศึกษาการสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาล ดี-กลูโคส (D-glucose), ดี-ฟรุกโตส (D-fructose), ดี-แมนนิทอล (D-mannitol), ดี-ไซโลส (D-xylose) และ แอล-อะราบิโนส (L-arabinose) ภาคผนวกหมายเลข 1.15)