# บทที่ 3

# อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

## อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์

1.1 ตู้ถ่ายเชื้อ (larminar flow) รุ่น clean บริษัท Lab service, ประเทศไทย

1.2 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ ( incubator) รุ่น RQ-8 บริษัท Memmert, Germany

1.3 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (shaker) รุ่น Innova 2100 บริษัท New Brunswick Scientific, USA.

1.4 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (shaker) รุ่น G10 Gyrotory บริษัท New Brunswick Scientific, USA.

1.5 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น T26 บริษัท New Brunswick Scientific, USA.

1.6 เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด (analytical balance) รุ่น AG204 บริษัท Mettler toledo, Swizerland

1.7 เครื่องชั่งน้ำหนักหยาบ (laboratory balance) รุ่น PB3002 บริษัท Mettler toledo, Swizerland

1.8 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CH2 บริษัท Olympus, Japan

1.9 กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด(scanning electron microscope) รุ่น JSM5410LV

1.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) รุ่น cyberscan 1000 บริษัท Eutech Cyberscan, Singapor

1.11 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น spectronic 401 บริษัท Milton Roy

1.12 หม้อนึ่งความดัน (autoclave) รุ่น Tony SS-325 บริษัท Seiko, Japan

1.13 ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UL-60 บริษัท Mammert, USA.

1.14 เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี (gas chromatography) รุ่น Star3400cx บริษัท Varian, USA.

1.15 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)รุ่น 1-42K บริษัท Kontron Instrument, Japan

1.16 เครื่องกรอง millipore

1.17 กระดาษกรอง membrane filter ขนาด 47 mm. pore size 0.45 μm. บริษัท Advantec MFS Inc., Japan

1.18 ปั๊มดูดอากาศ บริษัท Hunter, Germany

1.19 เข็มฉีดยา เบอร์ 29G x 1 นิ้ว ขนาด 0.4x25 มิลลิเมตร บริษัท Nissho Nipro Corporation Ltd.,ประเทศไทย

1.20 หลอดฉีดยา (syring) ขนาด 1 มิลลิลิตร บริษัท Nissho Nipro Corporation Ltd., ประเทศไทย

1.21 จานเลี้ยงเชื้อ (Petredish) ชนิด Pyrex บริษัท Corning Ltd., England

1.22 ขวดทดลอง (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ชนิด Pyrex บริษัท Corning Ltd., England

1.23 ขวดทดลอง (Erlenmeyer flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร ชนิด Pyrex บริษัท Corning Ltd., England

1.24 จุกยาง

2. สารเคมี

2.1 ก๊าซเอธิลีน ($C_2H_4$) บริษัท ไทยอินดัสเตรียลแก๊ส จำกัด (มหาชน)

2.2 ก๊าซไนโตรเจน ($N_2$) บริษัท ไทยอินดัสเตรียลแก๊ส จำกัด (มหาชน)

2.3 แคลเซียมคาร์ไบด์ (Calcium carbide)

2.4 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) บริษัท Carlo erba reagent, Italy

2.5 เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) บริษัท Carlo erba reagent, Italy

2.6 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($Na_2Mo_4.2H_2O$) บริษัท Mallinckrodt chemical, USA.

2.7 แคลเซียมไฮโดรเจนออโทฟอสเฟต ($CaHPO_4.2H_2O$) บริษัท Carlo erba reagent, Italy

2.8 ไตรแคลเซียมฟอสเฟต ($Ca_3(PO_4)_2$) บริษัท Carlo erba reagent, Italy

2.9 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท ปรุงทิพย์, ประเทศไทย

2.10 แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)Mo_7O_{24}4H_2O$) บริษัท Malinckrodt, USA.

2.11 แอนติโมนีโปตัสเซียมทาร์เทรต ($KOOC(CHOH)_2COOSbO1/2H_2O$) บริษัท Carlo erba reagent, Italy

2.12 กรดซัลฟูริกเข้มข้น($H_2SO_4$, conc.) บริษัท Merck, Germany

2.13 กรดแอสคอบิก ($C_6H_8O_6$) บริษัท Ajax Chemical, Australia

2.14 โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) บริษัท Carlo erba reagent, Italy

2.15 กลูโคส (Glucose) food grade

2.16 ซูโครส (Sucrose) food grade

2.17 แมนนิทอล (Mannital) บริษัท Merck, Germany

2.18 แอมโมเนียมคลอไรด์ ($NH_4Cl$) บริษัท Carlo erba reagent, Italy

2.19 โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) บริษัท Carlo erba reagent, Italy

2.20 เปปโตน (peptone) บริษัท Difco, USA.

**วิธีการทดลอง**

1. การแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟต

เก็บตัวอย่างดิน ปุ๋ยอินทรีย์ต่างๆ สลัดจ์น้ำเสีย และตัวปลวกจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย มาแยกเชื้อ

นำตัวอย่างดิน ปุ๋ยอินทรีย์ต่างๆ สลัดจ์น้ำเสีย มาเจือจางในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปขีดเส้น (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจนที่ใส่แคลเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($CaHPO_4$) เป็นแหล่งฟอสฟอรัส (สูตร 1 ภาคผนวก ก) และเติม cyclohexamide 30 ไมโครกรัมต่อลิตร ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากเชื้อโดยวิธีนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ส่วนตัวอย่างปลวกใช้ตัวปลวกที่ยังมีชีวิตวางในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟดึงลำไส้บริเวณปลายก้นของตัวปลวกออกมา ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) จิ้มของเหลวภายในลำไส้ตัวปลวก ขีดเส้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับตัวอย่างดิน ปุ๋ย และสลัดจ์น้ำเสีย บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 วัน เลือกแบคทีเรียที่มีวงใสรอบโคโลนีมาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดอาหารเอียง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

2. การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟตได้สูง

2.1 ทดสอบประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียที่แยกได้ด้วยวิธีอะเซธิลีนรีดักชัน (Acetylene reduction) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.1.1 นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้ในข้อ 1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจน (สูตร 2 ภาคผนวก ก) 10 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ

2.1.2 เตรียมก๊าซอะเซธิลีนโดยนำแคลเซียมคาร์ไบด์มาทำปฏิกิริยากับน้ำแล้วเก็บก๊าซอะเซธิลีนที่เกิดขึ้นใส่ขวดทดลองขนาดเล็กโดยวิธีให้ก๊าซแทนที่น้ำ ปิดปากขวดด้วยจุกยางให้แน่น

2.1.3 ทำการแลกเปลี่ยนก๊าซภายในหลอดทดลองกับก๊าซอะเซทิลีน โดยเปลี่ยนจุกสำลีที่ปิดปากขวดเลี้ยงเชื้อเป็นจุกยาง เพื่อป้องกันการซึมผ่านเข้าออกของก๊าซ ใช้เข็มฉีดยาดูดอากาศออก 3 มิลลิลิตร นำก๊าซอะเซทิลีนที่เตรียมจากข้อ 2.1.2 ฉีดเข้าแทนที่อากาศที่ดูดออกไป เพื่อรักษาสมดุลของความกดอากาศภายในและภายนอกขวด บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.4 วัดปริมาณก๊าซเอธิลีนที่สร้างขึ้น โดยดูดก๊าซตัวอย่างจากขวดอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟีภายใต้ที่ปรับสภาวะดังนี้

| | |
|---|---|
| ชนิดของคอลัมน์ | : โพราแพคเอ็น (porapak N) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 มิลลิลิตรยาว 225 เซนติเมตร |
| ก๊าซตัวพา (carrier gas) | : ก๊าซไนโตรเจน ($N_2$) |
| ชนิดของเครื่องตรวจ | : Flame Ionization Detector (FID) |
| อุณหภูมิของคอลัมน์ | : 90 องศาเซลเซียส |
| อุณหภูมิของเครื่องฉีด | : 110 องศาเซลเซียส |
| อุณหภูมิของเครื่องตรวจ | : 120 องศาเซลเซียส |
| อัตราการไหลของก๊าซไฮโดรเจน | : 30 มิลลิลิตร/นาที |
| อัตราการไหลของอากาศ | : 30 มิลลิลิตร/นาที |
| อัตราการไหลของก๊าซไนโตรเจน | : 30 มิลลิลิตร/นาที |

retention time ของก๊าซเอธิลีน คือ ประมาณ 1 นาที และก๊าซอะเซทิลีนประมาณ 1.4 นาที

ในขณะเดียวกันก็ฉีดตัวอย่างก๊าซเอธิลีนมาตรฐานความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ควบคู่ไปด้วยเพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหาก๊าซเอธิลีนที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรีย

2.1.5 หาน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย โดยอบกระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาด 0.45 ไมครอน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ นำมาชั่งน้ำหนักกระดาษเปล่าไว้ นำกระดาษกรองนี้ไปกรองเซลล์แบคทีเรียในขวดทดลอง หลังจากที่ได้วัดการตรึงไนโตรเจนแล้ว จากนั้นนำกระดาษกรองไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หรืออบจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ แล้วชั่งหาน้ำหนักกระดาษกรองรวมกับเซลล์ คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

2.1.6 คำนวณประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ โดยคำนวณค่าปริมาณก๊าซเอธิลีนที่เกิดขึ้นเทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้งและระยะเวลาที่บ่มเชื้อร่วมกับก๊าซอะเซทิลีนของแบคทีเรีย ซึ่งมีวิธีการและสูตรในการคำนวณดังนี้

2.1.6.1 คำนวณหาปริมาณก๊าซเอธิลีนที่เกิดขึ้น ตามวิธีของ Turner และ Gibson (1980) ดังนี้

$$C_2H_4\ (\mu mol) = [\ (P \times A) - (p_2 \times a_2)\ ]E$$

ซึ่ง E เป็นค่าคงที่จากการฉีดก๊าซเอธิลีนมาตรฐาน $= 0.0446Z / (p_1 \times a_1)$

โดยแทนค่า Z = ปริมาณก๊าซที่ฉีด (µl)

$p_1$ และ $a_1$ = peak area และ attenuation ของก๊าซเอธิลีนมาตรฐาน

$p_2$ และ $a_2$ = peak area และ attenuation ของก๊าซเอธิลีนที่เกิดขึ้นในชุดควบคุม

P และ A = peak area และ attenuation ของก๊าซเอธิลีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่าง

2.1.6.2 คำนวณหาปริมาณก๊าซเอธิลีนที่เกิดขึ้นทั้งหมดเทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียต่อระยะเวลาในการบ่มเชื้อด้วยก๊าซอะเซธิลีน

เนื่องจากปริมาณเอธิลีนที่คำนวณได้จากข้อ 2.1.6.1 เป็นปริมาณต่อตัวอย่างก๊าซที่ฉีด 1 มิลลิลิตร แต่ปริมาณก๊าซทั้งหมดในขวดเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 50 มิลลิลิตร และใช้เวลาในการบ่ม 24 ชั่วโมง หลังการแลกเปลี่ยนก๊าซ จึงมีวิธีในการคำนวณหาปริมาณก๊าซเอธิลีนที่เกิดขึ้นทั้งหมดเทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง ดังนี้

$$\text{Total } C_2H_4(\mu mol/mg \text{ cell dry wt./hr.}) = [C_2H_4\ (\mu mol) \times 50] / [\text{cell dry weight (mg)} \times 24]$$

2.2 ทดสอบประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียที่แยกได้ด้วยวิธีคัลเลอริเมตริกดีเทอร์มิเนชัน (Colorimetric determination of phosphorus ) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.2.1 นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้จากข้อ 1 ไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจนที่ใส่ไตรแคลเซียมฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัสตามสูตร 2 ในภาคผนวก ก จำนวน 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง โดยทำ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ

2.2.2 เก็บตัวอย่างเชื้อที่เลี้ยงในข้อ 2.2.1 ในวันที่ 2 6 10 และ 14 หลังบ่มเชื้อ โดยใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูดเชื้อจากขวดลี้ยงเชื้อขวดละ 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที หรือทำซ้ำจนกว่าจะได้สารละลายที่ใส เพื่อแยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) ไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตที่อยู่ในรูปสารละลาย (soluble phosphate) จากนั้นทำการเจือจางน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำกลั่นให้มีอัตราส่วน 1:50 หรือ 1:100 ตามความเหมาะสม

2.2.3 วิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตในรูปสารละลายจากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยวิธีคัลเลอริเมตริกดีเทอร์มิเนชัน (Colorimetric determination of phosphorus) ของ Anderson และ Ingram (1993) ซึ่งมีขั้นตอนในการวิเคราะห์ดังนี้

2.2.3.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้

สารละลายโมลิบเดต (Molybdate reagent) เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต 4.3 กรัมในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร ละลายแอนติโมนีโปตัสเซียมทาร์เทรต 0.4 กรัมในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร แล้วเติมลงในขวดวัดปริมาตร จากนั้นค่อยๆเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 54 มิลลิลิตรลงไปพร้อมๆ กับการเขย่า ปล่อยไว้ให้เย็นลงแล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายครบ 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 4 สัปดาห์

สารละลายกรดแอสคอบิก 1 % (Ascorbic acid) เตรียมโดย ละลายกรดแอสคอร์บิก 1 กรัมในน้ำ 100 มิลลิลิตร ซึ่งสารละลายนี้จะต้องเตรียมใหม่ทุกวัน

สารละลายฟอสเฟตมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ผ่านการอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมงแล้วเก็บให้เย็นใน desiccator 4.394 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร จะได้สารละลายฟอสเฟตมาตรฐานความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ความเข้มข้นฟอสเฟต 0, 1, 2, 3, 4 และ5 ไมโครกรัมต่อลิตร นำไปวิเคราะห์ตามวิธีการต่อไป และเขียนกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณเปรียบเทียบปริมาณฟอสเฟตที่อยู่ในรูปสารละลาย

2.2.3.2 วิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.2.2 มาใส่หลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดแอสคอบิก 4.0 มิลลิลิตร เติมสารละลายโมลิปเดต 3.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงนำไปวัดการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่เกิดขึ้น ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 880 นาโนเมตร

คำนวณหาปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้โดยกิจกรรมของแบคทีเรียมีค่าเท่ากับผลต่างของปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ในน้ำเลี้ยงเชื้อกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ

2.3 คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถทั้งในการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟตได้สูง โดยพิจารณาผลการทดสอบประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนจากการสร้างเอธิลีนสูงสุดและการละลายฟอสเฟตจากปริมาณฟอสเฟตที่อยู่ในรูปสารละลายของแบคทีเรียในข้อ 2.1 และ 2.2

3. การแปรผันปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

ทำการทดสอบหาชนิดของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.3 มาเลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy Broth เพื่อเพิ่มจำนวนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วปั่นแยกเซลล์แบคทีเรีย โดยปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง จึงนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาทำเป็น suspension ในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.1 – 0.4 เซลล์แบคทีเรียที่ได้นี้จะนำไปเป็นกล้าเชื้อในการทดสอบต่อไป

3.2 การแปรผันปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

3.2.1 การแปรผันแหล่งคาร์บอน

นำกล้าเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ซึ่งเตรียมไว้ในข้อ 3.1 มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ซึ่งภายในบรรจุอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนตาม สูตร 2 ในภาคผนวก ก 10 มิลลิลิตร โดยแปรผันแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ซูโครส และแมนนิทอล ที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ± 0.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยแต่ละแหล่งคาร์บอนทำ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธีอะเซธิลีน รีดักชันตามวิธีในข้อ 2.1

3.2.2 การแปรผันแหล่งไนโตรเจน

นำกล้าเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ซึ่งเตรียมไว้ในข้อ 3.1 มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ซึ่งภายในบรรจุอาหารเหลวตามสูตร 2 ในภาคผนวก ก 10 มิลลิลิตร โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรผันแหล่งไนโตรเจนเป็น 4 ชนิด ได้แก่ ใส่แอมโมเนียมคลอไรด์ โซเดียมไนเตรทและเปปโตนอย่างละ 0.5 กรัมต่อลิตร และไม่ได้เติมแหล่งไนโตรเจน ที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ± 0.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยแต่ละแหล่งไนโตรเจนทำ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธีอะเซธิลีน รีดักชันตามวิธีในข้อ 2.1

3.2.3 การแปรผันอุณหภูมิ

นำกล้าเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ซึ่งเตรียมไว้ในข้อ 3.1 มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ซึ่งภายในบรรจุอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนตามสูตร2 ในภาคผนวก ก 10 มิลลิลิตรโดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ± 0.2 และแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อเป็น 20 30 และ 40 องศาเซลเซียสในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยแต่ละอุณหภูมิทำ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธีอะเซธิลีน รีดักชันตามวิธีในข้อ 2.1

3.2.4 การแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง

นำกล้าเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ซึ่งเตรียมไว้ในข้อ 3.1 มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ซึ่งภายในบรรจุอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนตามสูตร2 ในภาคผนวก ก 10 มิลลิลิตร โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 5 6 7 8 และ 9 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยแต่ละค่าความเป็นกรด-ด่างทำ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธีอะเซธิลีน รีดักชันตามวิธีในข้อ 2.1

3.3 การแปรผันปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต

3.3.1 การแปรผันแหล่งคาร์บอน

นำกล้าเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ซึ่งเตรียมจากวิธีในข้อ 3.1 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ภายในบรรจุอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนที่ใส่ไตรแคลเซียมฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัสตามสูตร 2 ในภาคผนวก ก ปริมาตร 50 มิลลิลิตรและแปรผันแหล่งคาร์บอน 3 ชนิดได้แก่ กลูโคส ซูโครส และแมนนิทอล ที่ความเป็นกรด-ด่าง $7.0 \pm 0.2$ บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง โดยแต่ละแหล่งคาร์บอนทำ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อในวันที่ 2 6 10 และ 14 ไปวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตที่อยู่ในรูปสารละลายตามวิธีในข้อ 2.2.3

3.3.2 การแปรผันแหล่งไนโตรเจน

นำกล้าเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ซึ่งเตรียมจากวิธีในข้อ 3.1 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ภายในบรรจุอาหารเหลวที่ใส่ไตรแคลเซียมฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัสตามสูตร 2 ในภาคผนวก ก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรผันแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด ได้แก่ ใส่แอมโมเนียมคลอไรด์ โซเดียมไนเตรท เปปโตน อย่างละ 0.5 กรัมต่อลิตรและไม่ได้เติมแหล่งไนโตรเจน ที่ความเป็นกรด-ด่าง $7.0 \pm 0.2$ บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง โดยแต่ละแหล่งไนโตรเจนทำ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อในวันที่ 2 6 10 และ 14 ไปวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตที่อยู่ในรูปสารละลายตามวิธีในข้อ 2.2.3

3.3.3 การแปรผันอุณหภูมิ

นำกล้าเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ซึ่งเตรียมจากวิธีในข้อ 3.1 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ภายในบรรจุอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนที่ใส่ไตรแคลเซียมฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัส ตามสูตร 2 ในภาคผนวก ก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ความเป็นกรด-ด่าง $7.0 \pm 0.2$ และแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อ

เป็น 20 30 และ 40 องศาเซลเซียสในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยแต่ละอุณหภูมิทำ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อในวันที่ 2 6 10 และ 14 ไปวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ตามวิธีในข้อ 2.2 .3

3.3.4 การแปรผันความเป็น กรด-ด่าง

นำกล้าเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ซึ่งเตรียมจากวิธีในข้อ 3.1 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ภายในบรรจุอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนที่ใส่ไตรแคลเซียมฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัสตามสูตร 2 ในภาคผนวก ก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5 6 7 8 และ 9 ตามลำดับ บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง โดยแต่ละความเป็นกรด-ด่างทำ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อในวันที่ 2 6 10 และ 14 ไปวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตที่อยู่ในสารละลายตามวิธีในข้อ 2.2

4. การตรวจสอบลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

โดยนำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจนมาตรวจสอบลักษณะต่างๆ ได้แก่

4.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

โดยการย้อมสีแกรมแบคทีเรียเพื่อดูการติดสี ลักษณะรูปร่างของเซลล์ การเรียงตัวของเซลล์ และการสร้างสปอร์

4.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

ซึ่งมีวิธีการเตรียมตัวอย่าง (Conventional method) ดังนี้คือ ตัดตัวอย่างวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีแบคทีเรียอยู่เป็นชิ้นเล็กขนาดประมาณ 5x5x3 มิลลิเมตร fix ตัวอย่างที่ตัดไว้ด้วยกลูตารอลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืนในตู้เย็นเพื่อรักษาคุณสมบัติของเซลล์ แล้วล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร 3 ครั้งโดยใช้เวลาครั้งละ 10-15 นาที จากนั้น fix ด้วยออสเมียมเตตระออกไซด์ ($OsO_4$) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 แล้วล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 ครั้ง ตามด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที จากนั้นดึงน้ำออกโดยแช่ในแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 30 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยแต่ละความเข้มข้นใช้เวลา 10-15 นาที ตามด้วยแช่ในแอลกอฮอล์บริสุทธิ์

อีก 15 นาที หลังจากนั้นทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤตด้วยเครื่อง Critical Point Dryer เพื่อไม่ให้เซลล์เสียรูปร่าง นำมาติดบนแท่งทองเหลือง (Stub) ด้วยเทป 2 หน้าหรือกาว แล้วฉาบตัวอย่างด้วยทองคำด้วยเครื่อง sputter 4-5 นาที หลังจากนั้นส่องดูลักษณะแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและบันทึกภาพเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องถ่ายภาพยี่ห้อ Mamiya รุ่น RB67 pro SD 120

4.3 การทดสอบทางชีวเคมี (Biochem test)

4.3.1 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ออกซิเดสและคะตะเลส

เอนไซม์ออกซิเดส สามารถตรวจสอบได้โดยใช้สารละลายอัลฟาเนปทอล หยดลงบนโคโลนีของเชื้อ หากผลเป็นบวกจะเกิดสีน้ำเงินขึ้นภายใน 10-30 วินาที ส่วนเอนไซม์คะตะเลสสามารถทดสอบได้โดยหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนโคโลนีเชื้อ หากผลเป็นบวกจะเกิดฟองอากาศขึ้น

4.3.2 การทดสอบการเคลื่อนที่

สามารถดูได้จากลักษณะการเจริญในอาหาร semi-solid ซึ่งเชื้อที่สามารถเคลื่อนที่ได้ จะเจริญแผ่ออกนอกรอย stab เชื้อ

4.3.3 การทดสอบ MR

โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MR-VP 0.5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบโดยการหยด methyl red ลงไป 1 หยด แล้วอ่านผล ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่าผลเป็นบวก หากเกิดสีเหลืองหรือสีส้มแสดงว่าผลเป็นลบ

4.3.4 การทดสอบ VP (Barritt' s method)

โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร MR-VP บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อมาใส่หลอดทดสอบที่สะอาด เติม 0.6 มิลลิลิตรของ 5% α-napthol solution และ 0.2 มิลลิลิตรของ 40% KOH เขย่าให้เข้ากันแล้วอ่านผล ถ้าเกิดสีแดงใน 5 นาทีแสดงว่าผลเป็นบวก หรือถ้าเป็นสีเหลืองแสดงว่าผลเป็นลบ

4.3.5 การทดสอบอินโดล (Kovac's method)

โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว tryptone บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วเติม Kovac's reagent 0.5 มิลลิลิตรลงไป แล้วอ่านผล ถ้าเกิดสีแดงที่ผิวชั้นบนแสดงว่าผลเป็นบวก ถ้าเกิดไม่เกิดสีแสดงว่าผลเป็บลบ

4.3.6 การทดสอบการใช้ซิเตรท (Citrate utilization test)

โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารวุ้นเอียง Simmon's citrate agar โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อทำให้เป็นจุด (point inoculate) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วอ่านผล ถ้าอาหารเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินแสดงว่าผลเป็นบวก ถ้าไม่มีการเปลี่ยนสีแสดงว่าผลเป็นลบ

4.3.7 การทดสอบการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis test)

โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี 0.2% soluble starch บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วหยดสารละลายไอโอดีน 2-3 หยด แล้วอ่านผล ถ้าอาหารเป็นสีน้ำเงินแต่บริเวณรอบๆ โคโลนีไม่มีสีแสดงว่าผลเป็นบวก แต่ถ้าเป็นสีน้ำเงินทั้งหมดแสดงว่าไม่มีการย่อยแป้ง

4.3.8 การทดสอบการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ($H_2S$)

โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) แตะเชื้อและ streak บนผิวของอาหาร triple sugar iron agar ในหลอกเอียงแล้วแทง (stab) ลงไปส่วนก้นหลอด บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลทุกวันจนครบ 5 วัน และสังเกตดูการเปลี่ยนสีของอาหารและการเกิดก๊าซ

4.3.9 การตรวจสอบการย่อยเจลาติน (Gelatin liquefaction test)

เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี gelatin 12% โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ stab ลงไปในอาหาร บ่มที่ 20-24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-30 วัน แล้วทดสอบการเหลวโดยเอาหลอดเลี้ยงเชื้อไปบ่มไว้ในตู้เย็น เป็นเวลา 30 วัน แล้วนำออกมาดูการเหลว ถ้ายังไม่เหลวบ่มต่อจนกระทั่งเหลวหรือจนกระทั่ง 30 วัน โดย strong positive คือทำให้อาหารเหลวที่อุณหภูมิต่ำภายใน 3 วัน ส่วน weak positive คือทำให้อาหารเหลวที่อุณหภูมิต่ำภายหลัง 3 วัน

4.3.10 การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท

การรีดิวซ์ไนเตรทเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส (nitrate reductase) ซึ่งจะเปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ และเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทส (nitrite reductase) ซึ่งจะเปลี่ยนไนไตรท์ไปเป็นก๊าซแอมโมเนีย ดังสมการ

$$NO_3^- + NADPH + H^+ \xrightarrow{\text{nitrate reductase}} NO_2^- + NADP^+ + H_2O$$

$$NO_2^- + 3NADPH + 3H^+ \xrightarrow{\text{nitrite reductase}} NH_3 + 3NADP^+ + H_2O + OH^-$$

สามารถทดสอบไนไตรท์ได้โดยใช้น้ำยาอัลฟาแนปทิลามีนและกรดซัลฟานิลิกอย่างละ 1 หยด หากมีไนไตรท์จะมีสีแดงเกิดขึ้น แต่หากไนไตรท์ถูกสลายต่อไปเป็นก๊าซแอมโมเนียและก๊าซไนโตรเจนแล้ว ผลการทดสอบจะไม่มีสีแดงเกิดขึ้นเนื่องจากไม่มีไนไตรท์เหลืออยู่จะต้องมีการทดสอบเพิ่มเติม โดยเติมผลสังกะสีลงไป ผงสังกะสีจะรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ ดังนั้นหากมีสีแดงเกิดขึ้นแสดงว่ามีไนเตรทอยู่ แต่หากเติมผงสังกะสีแล้วไม่เกิดสีแดงแสดงว่าไม่มีไนไตรท์เหลืออยู่ นั่นคือไนไตรท์ถูกเปลี่ยนไปเป็นก๊าซแอมโมเนียแล้ว

4.3.11 การทดสอบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ

ทดสอบความสามารถใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ซูโครส แมนนิทอล ฟรักโตส แลกโตส กาแลกโตส และมอลโตส โดยเตรียมอาหาร Andrade 's carbohydrate broth แล้วเติมน้ำตาลที่ต้องการทดสอบลงไป และเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีอินดิเคเตอร์ คือAcid fushin

ผสมอยู่ หากแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลชนิดนั้นได้ อาหารจะเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลือง เนื่องจากอาหารมีฤทธิ์เป็นกรดจากแบคทีเรียย่อยน้ำตาลไปเป็นกรดอินทรีย์หลายชนิด และหากมีก๊าซในหลอดดักก๊าซด้วยแสดงว่าแบคทีเรียย่อยน้ำตาลให้กรดและก๊าซ

หลังจากนั้นนำผลการทดสอบทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ทราบลักษณะแน่นอนในหนังสือ Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology Vol.1 (1984) เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย