บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ที่สำคัญ

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.

เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA

เครื่องวัดการดูดกลืนแสงยูวี (UV - Visible Spectrophotometer) รุ่น UV-160 ของบริษัท Shimadzu Corporation, Japan.

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

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

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น RO-8 ของบริษัท Memmert, Western Germany

เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Psychrotherm controlled environment incubator shaker) รุ่น 6-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA

เครื่องควบแน่น (Condenser) ขนาด 300 มิลลิเมตร กราวจอยท์ด้านนอกขนาด 24/40 ของบริษัท Gerhardt, Germany

เคมีภัณฑ์

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนิวเตรียนท์ (Nutrient broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

แป้ง (Soluble starch) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

ทวีน 80 (Tween 80) ของบริษัท Ajax Chemical, Austratia.

เคซีน (Casein hammerstein) ของบริษัท ICN Biomedicals., USA.

นมผงพร่องมันเนย (Skim milk) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

ไทโรซีน (Tyrosine) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA

สารละลายโฟลินฟีนอล (Folin phenol reagent) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA

ซิลเวอร์ซัลเฟต (Silver sulfate) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA

สารละลายเฟอร์โรอิน (Ferroin reagent) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA

กัม (Gum arabic) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA

ผงถั่วเหลืองสกัด (Soytone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

วิธีการดำเนินการทดลอง

การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง เพื่อหาแบคทีเรียที่ย่อยสลายแป้ง โปรตีน และไขมัน

1. การเก็บตัวอย่างดิน และตัวอย่างน้ำ

ตัวอย่างดิน และน้ำเก็บจากบ่อเลี้ยงกุ้ง ที่อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา, อำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช และที่อำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา บ่อที่เก็บตัวอย่างเป็นบ่อดิน มีขนาดตั้งแต่ 2 - 6 ไร่ ลึกประมาณ 1.5 เมตร เก็บจากบ่อเลี้ยงกุ้งอายุ 2 เดือน 3 เดือน 3.5 เดือน และ 4.5 เดือน เก็บบริเวณทางน้ำเข้า กลางบ่อ และทางน้ำออก โดยเก็บตัวอย่างใส่ในหลอดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขนาด 30 มล.ปิดฝาให้แน่น เก็บในที่เย็นอุณหภูมิ 4 ^{0}ซ

2. คัดเลือกแบคทีเรียที่ย่อยสลายแป้ง โปรตีน และไขมัน

2.1 แยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายโปรตีน

นำตัวอย่างดิน และน้ำมาเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 % เจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสม เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งนมพร่องไขมัน (Skim milk agar)

(ภาคผนวก ก ข้อ 1) ที่ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. ดูผลการทดลองโดยเชื้อที่ย่อยโปรตีนได้จะเกิดบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีเชื้อที่เจริญ (Gerhardt และคณะ, 1981)

นำเชื้อที่แยกได้จากข้างต้นมาเขี่ยบนอาหารแข็ง Skim milk agar (ภาคผนวก ก ข้อ 1) บ่มที่อุณหภูมิเดิมจนเกิดโคโลนีเดี่ยว ทำซ้ำอีกครั้งเพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ แล้วเก็บเชื้อไว้ในอาหารแข็งเอียงนิวเตรียนท์ (Nutrient agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 2)

2.2 แยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายแป้ง

ทำการทดลองคล้ายกับข้อ 1 แต่เปลี่ยนอาหารแข็งที่ใช้ทดสอบการย่อยสลายเป็นอาหารแข็งแป้ง (Starch agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 3) ดูผลการทดลองโดยราดสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ข ข้อ 1) ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าเกิดเป็นบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีเชื้อที่เจริญ แสดงว่าเชื้อย่อยแป้งได้ (Gerhardt และคณะ, 1981)

2.3 แยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายไขมัน

ทำการทดลองคล้ายกับข้อ 1 แต่เปลี่ยนอาหารที่ทดสอบการย่อยสลายเป็นอาหารแข็งทวีน 80 (Tween 80 agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 4) ดูผลการทดลองโดยเชื้อที่ย่อยสลายไขมันได้จะเกิดตะกอนขุ่นขาวรอบโคโลนีเชื้อที่เจริญ (Demphey,1987)

ตรวจวัดการเจริญ และความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์

1. การเตรียมหัวเชื้อเพื่อวัดการเจริญ และแอคติวิตีของเอนไซม์ (Enzyme activity)

เขี่ยเชื้อ 1 ลูปจากอาหารแข็งนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (LB medium) (ภาคผนวก ก ข้อ 5) ปริมาตร 50 มล. บรรจุในขวดแก้วทรงกรวย ขนาด 250 มล. เขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม. นำมาปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm. ด้วยอาหารเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์ให้ได้ค่า 1.0 (พิเชษ อิฐกอ, 2528) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการวัดการเจริญ และแอคติวิตีของเอนไซม์

2. ตรวจวัดการเจริญ และแอคติวิตีของเอนไซม์

2.1 แบคทีเรียที่ย่อยโปรตีน

นำหัวเชื้อที่เตรียมได้ 9 มล. ใส่ลงในอาหารที่ใช้ทดสอบการผลิตโปรตีเอส (ภาคผนวก ก ข้อ 6) ปริมาตร 300 มล. บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มล. เขย่าที่ 37 °ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปวัดการเจริญโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 nm. นำส่วนที่เหลือไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที ที่ 4 °ซ เพื่อตกตะกอนเซลล์ (ศิริเพ็ญ เวชชการันย์, 2534) นำส่วนใสไปหาแอคติวิตีของโปรตีเอสตามวิธีของ Keay และ Wildi (1970)

วิธีหาแอคติวิตีของโปรตีเอสตามวิธีของ Keay และ Wildi (1970) นำส่วนใส 1 มล. ผสมกับสารละลายเคซีน 2 % ปริมาตร 1 มล. บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกริยาและตกตะกอนโปรตีนด้วยการเติมกรดไตรครอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid) ความเข้มข้น 0.4 M ปริมาตร 2 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มต่อที่ 37 °ซ เป็นเวลา 20 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำส่วนใสที่ได้ 1 มล. เติมด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.4 M ปริมาตร 5 มล. และสารละลายโฟลินฟีนอลที่ละลายน้ำในอัตราส่วน 1:3 ปริมาตร 1 มล. ผสมสารให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ที่ 37 °ซ เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 660 nm.

วิธีทำกราฟมาตรฐานของไทโรซีน

ผสมสารละลายไทโรซีนปริมาตร 1 มล. ที่ละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริค ความเข้มข้น 0.2 N ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.4 M ปริมาตร 5 มล. และสารละลายโฟลินฟีนอลปริมาตร 1 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่ 37 °ซ เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm.

เอนไซม์ 1 หน่วย (unit) หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายเคซีนได้ไทโรซีน 0.5 ไมโครกรัม

2.2 แบคทีเรียที่ย่อยแป้ง

ทำการทดลองคล้ายกับข้อ 1 โดยวัดการเจริญ และแอคติวิตีของเอนไซม์โดยวิธีการหาน้ำตาลรีดิวซ์ (พิเชษ อิฐกอ, 2528)

วิธีหาแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส โดยนำส่วนใสที่ปั่นแยกได้มาเจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสมด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.9 ความเข้มข้น 0.02 M นำมา 0.5 มล. ใส่ลงในสารละลายแป้ง 2 % ปริมาตร 0.5 มล. บ่มที่ 50 ^{o}ซ นาน 5 นาที หยุดปฏิกริยาโดยแช่ในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายโดยวิธี Somogyi-Nelson (Aassar, 1992) (ภาคผนวก ค)

วิธีทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น ตั้งแต่ 0-100 ไมโครกรัมต่อโมล แล้วนำมาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson

ความสามารถในการย่อยแป้งของเอนไซม์ 1 หน่วย หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายแป้งได้น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที (Bergmann, Jun-ichi และ Hizukuri, 1988)

2.3 แบคทีเรียที่ย่อยสลายไขมัน

ทำการทดลองคล้ายกับข้อ .1 วัดการเจริญ และแอคติวิตีของเอมไซม์ โดยใช้วิธีของ Gowland, Kernick และ Sundaram (1987) ใช้อาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์ที่เติม Tween 80 1 % (ภาคผนวก ก ข้อ 7) วิธีวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส นำส่วนใส 0.5 มล. ผสมกับซับสเตรท 15 มล. ที่ประกอบด้วยกัม 1 % สารละลายโซเดียมคลอไรค์ความเข้มข้น 1 M 10 % แคลเซียมคลอไรค์ 0.05 % และน้ำมันมะกอก 1 % บ่มที่ 30 ^{o}ซ เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกริยาด้วยการเติมเอทานอล 20 มล. ไตเตรทกรดไขมันอิสระที่ได้จากปฏิกริยาด้วย สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 M ให้ถึงพีเอช 8 โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

วิธีทำกราฟมาตรฐานของกรดไขมันโอลิอิก (Oleic acid)

ชั่งกรดไขมันโอลิกที่มีความบริสุทธิ์สูง (Extra pure) 1000 ไมโครโมล (0.28247 กรัม) ละลายด้วยสารละลายผสมระหว่างเอทานอล กับ ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether) อัตราส่วน 1:1 ที่ปรับสภาพให้เป็นกลางแล้ว ปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 มล. สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้น 20 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 1 2 3 4 และ 5 มล. (20 40 60 80 และ 100 ไมโครโมล) เติมสารละลายซนิดเดิม 50 มล. ใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ไตเตรทด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5 M จนกระทั่งอินดิเคเตอร์เปลี่ยนสี

กำหนดให้หนึ่งหน่วยเอนไซม์มีค่าเท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลซ์ไขมันแล้วได้เป็นกรดไขมันอิสระ 1 ไมโครโมล ใน 1 นาที (Lawrence, Fryer และ Reiter, 1967)

ตรวจสอบสมบัติ และรูปร่างลักษณะของแบคทีเรีย

ศึกษาทางสัณฐาน สรีรวิทยา และชีวเคมี เพื่อเป็นแนวทางในการจำแนกแบคทีเรียโดยยึดหลักการจำแนกตาม Bergey 's Mannual of Systematic Bacteriology (Sneath และคณะ, 1986)

ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยา

สังเกตลักษณะขอบ รูปร่าง และลักษณะการสร้างสี (Pigment) ของโคโลนีเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 2) และลักษณะการเจริญในอาหารเหลวนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 8)

การติดสีแกรม

ใช้แบคทีเรียที่เจริญในอาหารแข็งนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 2) อายุ 24 ชม. นำไปย้อมแกรม (ภาคผนวก ข ข้อ 1-4) ดูรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

การย้อมเอ็นโดสปอร์

ใช้แบคทีเรียที่เจริญในอาหารแข็งนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 2) อายุ 48 ชม. นำมาย้อมเอ็นโดสปอร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 5) นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ สปอร์จะติดสีเขียวส่วนเซลล์จะติดสีแดง

ลักษณะทางชีววิทยา และชีวเคมี

การทดสอบการเคลื่อนที่

ปลูกเชื้อลงบนอาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test medium) (ภาคผนวก ก ข้อ 9) โดยแทงเข็มเขี่ยเชื้อลงไปจนสุดหลอดทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ถ้าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้จะมีรอยการเจริญออกจากรอยที่แทงไว้

การสร้างคะตะเลส

ใช้เชื้อแบคทีเรียที่เจริญในอาหารแข็ง นิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 2) อายุ 24 ชม. มากระจายลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 % ลงบนเชื้อ ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างคะตะเลสได้ให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่เกิดฟองก๊าซแสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างคะตะเลสได้ให้ผลเป็นลบ

การสร้างออกซิเดส

หยดสารเตตระเมทธิลพาราฟีนิลไดเอมีนไดไฮโดรคลอไรด์ (Tetramethyl paraphenyl diamine dihydrochloride) เข้มข้น 1 % (ภาคผนวก ข ข้อ 6) ลงบนกระดาษกรองจนชุ่ม แล้วใช้ลวดแพลตินัม เขี่ยเชื้อจากอาหารแข็งนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ป้ายบนกระดาษกรอง ถ้าเกิดสีม่วงขึ้นภายใน 10 วินาที แสดงว่าให้ผลเป็นบวก (Gerhardt และคณะ, 1981) สีที่เกิดขึ้นเนื่องจากแบคทีเรียมีการสร้างไซโตโครมออกซิเดส (Cytochrome oxidase) โดย N,N,N,N-Tetramethyl-p-phenylene-diamine dihydrochloride ถูกออกซิไดซ์โดย Oxidized cytochrome c จะเกิดสีม่วงของ Wurster's blue ถ้าไม่เกิดสีม่วง แสดงว่า แบคทีเรียไม่สร้างเอนไซม์ Cytochrome oxidase

การทดสอบการสร้างอินโดล (Indole)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลวทริปโตเฟน (Tryptophane broth) (ภาคผนวก ก ข้อ 10) บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 48 ชม. ทดสอบการสร้างอินโดลโดยหยดสารละลายโคแวคส์ (Kovacs reagent) (ภาคผนวก ข ข้อ 7) 1-2 หยด ถ้าเกิดสีชมพูขึ้นแสดงว่า เชื้อสร้างเอนไซม์ทริปโตฟรานเนส (Tryptophanase) ย่อยสลายทริปโตเฟนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อินโดล ถ้าไม่เกิดสีแสดงว่าให้ผลเป็นลบ

การทดสอบเมทิลเรด (Methyl red test)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์-วีพี (MR-VP Medium) (ภาคผนวก ก ข้อ 11) บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. ตรวจผลโดยหยดสารละลายเมทิลเรด (ภาคผนวก ก ข้อ 8) 5-6 หยดลงไป ถ้าเกิดสีแดงขึ้นแสดงว่า แบคทีเรียสร้างกรดออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อะซิติก แลคติก หรือ ฟอร์มิก จากกลูโคส เนื่องจากเมททิลเรดจะเปลี่ยนสีในช่วงพีเอช 6.0 (สีเหลือง) และพีเอช 4.4 (สีแดง) จึงจัดว่าให้ผลเป็นบวก ถ้าเกิดสีเหลืองให้ผลเป็นลบ

การทดสอบเมททิลคาร์บินอล (Voges proskauer test)

ถ่ายแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MR-VP Medium (ภาคผนวก ก ข้อ 11) บ่มที่ 37 ^{o}ซ เป็นเวลา 48 ชม. ทดสอบโดยการเติมแอลฟาแนฟทอล (α-Naphthol) 5 % ปริมาตร 0.3 มล. ก่อนจึงใส่สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 40 % ปริมาตร 0.2 มล. (ภาคผนวก ข ข้อ 9) เขย่าให้ผสมกัน ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นภายใน 10 นาที หรือ 24 ชม. แสดงว่าแบคทีเรียมีการผลิตอะซิโตอิน (Acetoin) จากวัฏจักรบิวทีรีนไกคอล (Butylene glycol pathway) ซึ่ง 40 % โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จะเปลี่ยนกลับให้อะซิโตอิน กลายเป็น ไดอะซิติล (Diacetyl) และเกิดสารประกอบสีแดง โดยการเร่งปฏิกิริยาของ α-Naphthol ให้บันทึกผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีแดงให้ผลเป็นลบ

การสร้างยูรีเอส

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารคริสเตนส์ยูเรีย (Christensen' s urea) (ภาคผนวก ก ข้อ 12) บ่มเลี้ยงที่ 37 ^{o}ซ เป็นเวลา 1-4 วัน ถ้าปรากฏสีชมพูสดบนอาหาร แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างยูรีเอสย่อยสลายยูเรียให้แอมโมเนียออกมาทำให้อาหารมีสภาพเป็นด่างจึงเปลี่ยนสีฟีนอลเรดจากสีส้ม (พีเอช 6.8) กลายเป็นสีชมพูเข้ม (พีเอช 8.1) ให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีอาหารให้ผลเป็นลบ (Ederer, Chu และ Blazeric, 1971)

การใช้ไนเตรท

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลวไนเตรท (Nitrate broth) (ภาคผนวก ก ข้อ 13) บ่มเลี้ยงที่ 37^{o}ซ เป็นเวลา 48 ชม. ตรวจสอบไนไตรท์ที่เกิดขึ้นโดยการเติมกรดซัลฟานิลิค (Sulfanilic acid) 2-3 หยด และแอลฟาแนพทิลลามีน (α-Napthylamine) (ภาคผนวก ข ข้อ 10) ลงไปตามลำดับ ถ้าเกิดสีแดง ภายใน 30 วินาที ให้ผลเป็นบวก สีแดงที่เกิดขึ้น เนื่องจากไนไตรท์ที่เกิดขึ้นทำปฏิกิริยากับ Sulfanilic acid ได้สารประกอบประเภทเกลือไดอะโซเนียม (Diazonium) และเกลือที่ได้นี้จะรวมตัวกับ Napthylamine ทำให้เกิดสีแดงของอะโซดาย (Azodye) ที่ละลายน้ำได้ แต่ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงให้ผลเป็นลบ บางครั้งไนไตรท์ที่เกิดขึ้นทั้งหมดจะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย อาหารจึงไม่เปลี่ยนสี ดังนั้นจึงต้องใส่ผงสังกะสีลงไปทดสอบ ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดงเนื่องจากสังกะสีไปดึงออกซิเจนออกจากไนเตรทให้กลายเป็นไนไตรท์ แสดงว่าเชื้อไม่สามารถใช้ไนเตรทได้ให้ผลเป็นลบ ถ้าไม่เกิดสีแดง แสดงว่า ไนไตรท์เปลี่ยนเป็นแอมโมเนียหมดจึงให้ผลเป็นบวก

การใช้ซิเตรท

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารซิมมอนส์ซิเตรท (Simmon' s citrate agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 14) บ่มเชื้อที่ 37 ^{o}ซ 2-7 วัน เชื้อที่สามารถใช้ซิเตรทได้จะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ในอาหารจากสีเขียวกลายเป็นสีน้ำเงิน เนื่องจากเชื้อสามารถใช้โซเดียมซิเตรท เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ทำให้ได้แอมโมเนียที่มีคุณสมบัติเป็นเบส ทำให้บรอมไทมอลบลู เปลี่ยนสีจากสีเขียวกลายเป็นสีน้ำเงิน ถ้าเชื้อไม่สามารถใช้โซเดียมซิเตรท ได้อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีเขียวเหมือนเดิม

การสร้างเจลาติเนส

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในหลอดอาหารเจลาติน (ภาคผนวก ก ข้อ 15) บ่มเลี้ยงที่ 22 ^{o}ซ เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำหลอดเลี้ยงเชื้อไปแช่เย็น 30 นาที ทำเปรียบเทียบกับหลอดอาหารที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ถ้าหลอดที่ใส่เชื้อสูญเสียคุณสมบัติการแข็งตัว แสดงว่าเชื้อสร้างเจลาติเนสย่อยเจลาตินได้ ให้ผลเป็นบวก

การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารแข็งทีเอสไอ (TSI agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 16) 2 ครั้งต่อ 1 หลอดอาหาร ครั้งแรกจะแทงลงไปในอาหารที่เอียงจนสุดหลอด ครั้งที่สองจะลากไปบนผิวหน้าอาหารที่เอียง บ่มเลี้ยงที่ 37 ^{o}ซ 24-48 ชม. สังเกตุดูการเปลี่ยนสีของอาหาร เชื้อที่ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้จะให้สีดำของเฟอรัสซัลไฟด์ตามรอยที่ปลูกเชื้อ อ่านผลเป็นบวก นอกจากนี้อาหาร TSI agar ยังสามารถทดสอบได้ 2 ชนิด คือ การทดสอบการใช้น้ำตาล และการทดสอบการเกิดก๊าซ เพราะในอาหารมีน้ำตาล 3 ชนิด คือ กลูโคส 1 ส่วน แลกโตส 10 ส่วน และซูโครส 10 ส่วน มีฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ ดังนั้นถ้าแบคทีเรียใช้น้ำตาลในขบวนการหมัก (Fermentation) ได้จะเจริญที่ก้นหลอด แต่ถ้าใช้น้ำตาลในขบวนการออกซิเดชัน (Oxidation) จะมีการเจริญที่ผิวหน้าของอาหาร แบคทีเรียที่ใช้กลูโคสได้อย่างเดียวในขบวนการหมักจะทำให้มีกรดเกิดน้อยจึงมีสีเหลืองเฉพาะที่ก้นหลอด ส่วนที่ผิวจะมีสีแดง ถ้าใช้ซูโครส หรือ แลกโตส ด้วยจะมีสีเหลืองที่ผิวอาหาร เพราะมีกรดเกิดจำนวนมาก ถ้าไม่มีการเปลี่ยนสีเลย แสดงว่าไม่มีการหมัก และถ้ามีก๊าซเกิดขึ้นจากการใช้น้ำตาล ฟองก๊าซจะอยู่ในวุ้นอาหาร

การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทดสอบการใช้น้ำตาล (Phenol red broth base) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลที่ใช้ทดสอบ 1 % (ภาคผนวก ก ข้อ 17) บ่มที่ 37 ^{o}ซ 18-24 ชม. สังเกตการสร้างกรด ถ้าเชื้อสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้จะสร้างกรดขึ้นมา ทำให้อินดิเคเตอร์ฟีนอลเรดในอาหารเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลืองให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีให้ผลเป็นลบ

การทดสอบความสามารถในการทนเกลือ (NaCl)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ที่เติมโซเดียมคลอไรค์ 0-10 % บ่มที่ 37 ^{o}ซ 48 ชม. ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยดูความขุ่นของเชื้อที่ขึ้นในอาหาร ถ้าเชื้อเจริญเกิดความขุ่นให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เจริญให้ผลเป็นลบ

การทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 2) บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20-60^{o}ซ เป็นเวลา 48 ชม. ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยดูความขุ่นของเชื้อที่ขึ้นในอาหาร ถ้าเชื้อเจริญเกิดความขุ่นให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เจริญให้ผลเป็นลบ

การทดสอบความสามารถในการเจริญที่พีเอชต่างๆ

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ที่ปรับพีเอชเป็น 3-10 บ่มที่ 37 ^{o}ซ 48 ชม. ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยดูความขุ่นของเชื้อที่ขึ้นในอาหาร ถ้าเชื้อเจริญเกิดความขุ่นให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เจริญให้ผลเป็นลบ

ตรวจสอบการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้แต่ละสายพันธุ์เลี้ยงในอาหารเหลวนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ปริมาตร 50 มล. เขย่าที่ 37 ^{o}ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เลี้ยงให้เชื้อเจริญอยู่ในช่วง log phase ปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ให้ได้ค่า 0.5 จึงเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปหาปริมาณเซลล์

ตั้งต้น ทดสอบการอยู่ร่วมกันโดยนำเชื้อแต่ละสายพันธุ์มาผสมในอัตราส่วนที่เท่ากันเป็นคู่ๆ นำไปเจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ที่ 37 ^{o}ซ 24 ชม. ตรวจดูโคโลนีที่เกิดขึ้นทั้งชนิดและจำนวนของเชื้อแต่ละสายพันธุ์

ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย

1. ถ่ายแบคทีเรียที่คัดเลือกได้แต่ละสายพันธุ์ลงในอาหารเหลวนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 8) ปริมาตร 100 มล. เขย่าที่ 37 ^{o}ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม. ปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm. ด้วยอาหารเหลวนิวเตรียนท์ให้ได้ค่า 1.0 นำเชื้อที่เลี้ยงได้นี้ไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายโดยนำเชื้อตั้งต้นแต่ละสายพันธุ์ปริมาตร 10 มล. ใส่ลงในน้ำเสียเทียมที่ประกอบอาหารกุ้งปริมาณ 1 % (ภาคผนวก ก ข้อ 18) เปรียบเทียบระหว่างน้ำธรรมดากับน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ปริมาตร 400 มล. บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยปริมาตร 1000 มล. เขย่าเลี้ยงที่ 30 ^{o}ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำทุกวันตั้งแต่วันเริ่มต้นไปจนครบ 7 วัน นำไปหาปริมาณสารอินทรีย์ที่มีอยู่ด้วยวิธี COD (Chemical oxygen demand) (Clesceri, Greenberg และ Trussell, 1989)

2. ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยใช้เชื้อผสม (Mixed culture) นำเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ปริมาตร 100 มล. เขย่าที่ 37 ^{o}ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม. ปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm. ด้วยอาหารเหลวนิวเตรียนท์ให้ได้ค่า 1.0 จากนั้นนำเชื้อแต่ละสายพันธุ์มาผสมในอัตราส่วนที่เท่ากัน โดยเริ่มจากการผสมเชื้อ 2 สายพันธุ์เข้าด้วยกันไปจนครบจำนวนเชื้อที่คัดเลือกได้ นำเชื้อผสมที่ได้ปริมาณ 10 มล. ใส่ลงในน้ำเสียเทียมที่ประกอบด้วยน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน เติมอาหารกุ้ง 1% (ภาคผนวก ก ข้อ 18) ปริมาตร 400 มล. บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยปริมาตร 1000 มล. เขย่าเลี้ยงที่ 30 ^{o}ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำทุกวันตั้งแต่วันเริ่มต้นไปจนครบ 7 วัน นำไปหาปริมาณสารอินทรีย์ที่มีอยู่ด้วยวิธี COD

3. นำเชื้อผสมที่สามารถย่อยสลายได้ดีที่สุดมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายเพิ่มเติม โดยเลี้ยงในน้ำเสียเทียมที่ประกอบด้วยน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน เติมอาหารกุ้ง 0.5 2 และ 3 % ตามลำดับ (ภาคผนวก ก ข้อ 18) ทำการทดลองคล้ายกับข้างต้น เก็บน้ำตัวอย่างเพื่อ นำไปหาปริมาณสารอินทรีย์ด้วยวิธี COD

การหาปริมาณสารอินทรีย์ด้วยวิธี COD

เตรียมสารละลายที่ใช้ทดสอบดังนี้

1. สารละลายมาตราฐานโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) 0.25 N ละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่อบแห้งดีแล้ว 12.259 กรัมในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

2. กรดซัลฟูริครีเอเจนท์ (Sulfuric acid reagent) ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 22 กรัม ในกรดซัลฟูริคเข้มข้น บรรจุขวดขนาด 9 ปอนด์ (2.65 ลิตร) เนื่องจากซิลเวอร์ซัลเฟตละลายยากอาจใช้เวลา 1-2 วัน จึงจะละลายหมด

3. สารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตไตแตรนท์ (Standard ferrous ammonium sulfate titrant) 0.1 N ละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$) ชนิด เอ อาร์ (Analytical grade crystals) 39 กรัม ในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำให้เย็นแล้วเจือจางเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้จะต้องหาความเข้มข้นที่แน่นอนทุกครั้งที่ใช้ โดยไตเตรตกับสารละลายมาตราฐานโพแทสเซียมไดโครเมต

การหาความเข้มข้นของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต

เจือจางละลายมาตราฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 10 มล. ให้มีปริมาตร 100 มล. เติมกรดซัลฟูริค (รีเอเจนท์ข้อ 2) 30 มล. ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาที ปล่อยให้เย็นแล้วนำไปไตเตรตกับสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต โดยใช้เฟอร์โรอิน (Ferroin) จำนวน 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์

<u>การคำนวณ</u>

$$\text{นอร์มัลลิตี (normality)} = \frac{\text{มล.โพแทสเซียมไดโครเมต} \times 0.25}{\text{มล.เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต}}$$

4. สารละลายเฟอร์โรอิน อินดิเคเตอร์ (Ferroin indicator solution) ละลาย 1,10 Phanonthroline monohydrate ($C_{12}H_2N_2$ H_2O) 1.485 กรัม พร้อมกับเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) 0.695 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางเป็น 100 มล.

วิธีวิเคราะห์

1. เติมน้ำตัวอย่าง 20 มล. หรือส่วนของน้ำตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 20 มล. ใส่ลงในขวดกลั่นขนาด 500 มล. ใส่ลูกแก้วลงไป 5-10 ลูก

2. เติมสารละลายมาตราฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 0.25 N 10 มล.

3. ค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริค (รีเอเจนท์ข้อ 2) ลงไป 30 มล.

4. ผสมให้เข้ากันกลั่นเป็นเวลา 2 ชม. ปล่อยทิ้งให้เย็นแล้วฉีดล้างส่วนที่อยู่ในเครื่องควบแน่นด้วยน้ำกลั่นก่อนถอดขวดกลั่นออก

5. เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 140 มล. ปล่อยให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง

6.ไตเตรทสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่เหลือจากปฏิกริยาด้วยสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เฟอร์โรอินเป็นอินดิเคเตอร์ 2 - 3 หยด จนกระทั่งส่วนผสมเปลี่ยนจากสีน้ำเงินแกมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง แสดงว่าถึงจุดยุติ

7. ทำแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่น 20 มล. แทนน้ำตัวอย่าง และทำเช่นเดียวกันกับน้ำตัวอย่างทุกประการ

<u>การคำนวณ</u>

$$\text{มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/ l) COD} = \frac{(a - b) \times c \times 8000}{\text{ปริมาณของตัวอย่างน้ำ (มล.)}}$$

เมื่อ a = ปริมาณเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มล.) ที่ใช้กับแบลงค์

b = ปริมาณเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มล.) ที่ใช้กับน้ำตัวอย่าง

c = นอร์มัลลิตีของเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต