

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ (Petri – Dish)
2. ขวดซีรัม (Serum Bottles)
3. จุกยางสำหรับปิดขวดซีรัม (Butyl Rubber Stoppers)
4. ปีกเกอร์
3. ขวดรูปชมพู่ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร
4. ขวดรูปชมพู่วัดปริมาตร (Volumetric Flask)
5. หลอดทดลอง
6. กระบอกตวง
7. Microcentrifuge Tube
8. หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Tube)
9. หัวกรอง (Milli - Pore Filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
10. กระดาษกรอง
11. แท่งแก้วกระจายเชื้อ (Spreader)
12. กระบอกฉีดยาขนาด 1, 5, 10 และ 25 มิลลิลิตร
13. ปิเปต
14. ออโตปิเปต

เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง
2. เครื่องชั่งแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง
3. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV – Visible Spectrophotometer: Cintra 40)
4. เครื่องมือวัดคุณภาพน้ำ (Multiprobe : Horiba W – 20XD Series)
5. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
6. ตู้บ่มอุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส และ 700 องศาเซลเซียส
7. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)

8. เครื่องเขย่า (Shaker)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
10. เครื่อง PCR (Perkin Elmer รุ่น DNA Thermal Cycler 480)
11. Electrophoresis Apparatus

อาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ข

1. Tryptic Soy Broth (TSB)
2. Tryptic Soy Agar (TSA)
3. Actinomycete Agar
4. MacConkey Agar
5. 0.85% NaCl
6. Pseudomonas Isolation Agar
7. TCBS Agar
8. Plate Count Agar (PCA)
9. Luria – Bertani broth (LB broth)
10. Medium for Sulfide Oxidizers
11. Medium for Ammonia Oxidizers, Brackish
12. Medium for Nitrite Oxidizers, Brackish

แบคทีเรีย

คัดแยกได้จากดินบ่อทุ่งกุลาลำดำ ซึ่งใช้สัญลักษณ์ต่อไปนี้

T1 คือ *Oceanisphaera* sp.

T6 คือ *Bacillus polymyxa*

A2 คือ *Bacillus licheniformis*

A4.2 คือ *Bacillus subtilis*

A7.1 คือ *Bacillus megaterium*

A16 คือ *Bacillus thuringiensis* หรือ *B. cereus*

สารเคมี

วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ก

1. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์การหาปริมาณไนเตรต

- 1.1 โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3)
- 1.2 บรูซีนซัลเฟต (Brucine Sulfate)
- 1.3 กรดซัลฟานิลิก (Sulfanilic Acid)
- 1.4 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- 1.5 กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)
- 1.6 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

2. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์การหาปริมาณไนไตรต์

- 2.1 โซเดียมไนไตรต์ (NaNO_2)
- 2.2 ซัลฟานิลาไมด์ (Sulfanilamide)
- 2.3 กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)
- 2.4 N-(1-naphthyl) Ethylenediamine Dihydrochloride (NNED)

3. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์การหาปริมาณแอมโมเนีย

- 3.1 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)
- 3.2 โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (5.5% Available Chlorine)
- 3.3 โซเดียมซิเตรท (Sodium Citrate)
- 3.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 3.5 โซเดียมไนโตรพรัสไซด์ (Sodium Nitroprusside)
- 3.6 ฟีนอล (Phenol)
- 3.7 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)

4. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์การหาปริมาณฟอสเฟต

- 4.1 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- 4.2 แอมโมเนียมพาราโมลิบเดต (Ammonium Paramolybdate)
- 4.3 แอนติโมนีโพแทสเซียมทาร์เตต (Antimony Potassium Tartate)
- 4.4 กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)
- 4.5 L – Ascorbic Acid

5. สารเคมีสำหรับสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

- 5.1 TES Buffer (วิธีเตรียม ภาคผนวก ก)
- 5.2 DNAzol Reagent (บริษัท แอปลิค ไชเอ็นซ์ จำกัด)
- 5.3 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล และ 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล
- 5.4 1x TE Buffer (วิธีเตรียม ภาคผนวก ก)

6. สารเคมีและเอนไซม์สำหรับเพิ่มปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

- 6.1 Platinum *pfx* DNA Polymerase
- 6.2 10x Amplification Buffer
- 6.3 10 mM dNTP Mixture
- 6.4 50 mM MgSO₄
- 6.5 ไพร์เมอร์ (Primer mix; FC27 และ RC1492)

ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษามีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ Forward Primer(FC27)

5' – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG – 3' และ Reverse Primer

(RC1492) 5' – TACGGC TAC CTT GTT ACG ACT T – 3'

- 6.6 10x Loading Dye

- 6.7 Agarose Gel

วิธีดำเนินการทดลอง

เก็บตัวอย่างดินจากบ่อกึ่งกลาดำมาทำให้จุลินทรีย์ในดินมีความคุ้นเคยกับสารประกอบไนโตรเจน ไนไตรต์ และแอมโมเนีย เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารดังกล่าวลงไปได้

1. การคัดแยกจุลินทรีย์จากดินตัวอย่างที่ทำให้คุ้นเคยกับสารประกอบไนโตรเจน ไนไตรต์ และแอมโมเนียที่ต้องการศึกษาประสิทธิภาพการลดสารดังกล่าว

1.1 คัดแยกจุลินทรีย์จากดินตัวอย่างที่ทำให้คุ้นเคยกับสารประกอบไนโตรเจน ไนไตรต์ และแอมโมเนีย โดยแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ Actinomyces Agar และ BT Medium กับ Tryptic Soy Agar (TSA) ที่มีการเติมไนโตรเจนความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ไนไตรต์ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ และเบนโซเอทความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 นำจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดิน มาทดสอบความสามารถในการทนต่อไนไตรต์อีกครั้ง ด้วยการใช้นิไตรต์ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ มาเกลี่ย (Spread Plate) ลงบนผิวหน้าอาหาร TSA และ Actinomyces Agar ปล่อยให้สารดังกล่าวซึมและผิวหน้าอาหารแห้งจึงทำการ Subculture นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3 เก็บรักษาเซลล์แบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) ที่เติมกลีเซอรอลลงไป 30 เปอร์เซ็นต์แบ่งใส่ Microcentrifuge Tube นำไปแช่แข็งเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้งหมดมาทำการศึกษาประสิทธิภาพการลดไนเตรตในไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟต ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไนเตรตโดยแบคทีเรียผสมที่ทำการคัดแยกได้จากตัวอย่างดินบ่อทุ่งกุลารด้า

2. การเตรียม Cell Suspension ของเชื้อแบคทีเรียผสมที่คัดแยกได้จากดินตัวอย่าง เพื่อใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพในการลดไนเตรต ในไนไตรต์ แอมโมเนีย และฟอสเฟต

2.1 นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ทดสอบความสามารถในการทนต่อไนไตรต์ทั้งหมด 6 ชนิด โดยนำเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิดมาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 50 มิลลิลิตร เติมนิโตรเจนในหลอดความเข้มข้น 3.80 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 นำเชื้อที่ได้จากข้อ 2.1 มาใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเพื่อเก็บเซลล์ 10 มิลลิลิตร โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 200 มิลลิลิตร ที่มีการเติมนิโตรเจนในหลอดความเข้มข้น 3.80 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3 นำเซลล์ที่ได้ไปทำการปั่นเพื่อแยกเซลล์และเก็บเซลล์ ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งไปแล้วเติม Phosphate Buffer Saline (PBS) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนอีกครั้ง ทำเช่นนี้จนครบ 3 ครั้ง เพื่อเป็นการล้างเซลล์

2.4 นำเซลล์ที่ได้ไปละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร เท่ากับ $1.5 \text{ A.U. } (2.13 \times 10^{10} \text{ CFU/ml})$ เพื่อให้ได้ Cell Suspension สำหรับการเตรียมแบคทีเรียผสม

2.5 คำนวณผลละลายของเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิดมา 10 มิลลิลิตร นำมาใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุ TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และมีการเติมนิโตรเจน

ในหลอดลงไปที่ความเข้มข้น 3.80 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปปั่นบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.6 ถ่ายเชื้อแบคทีเรียผสมที่ได้จากข้อ 2.5 ในปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุ TSB ปริมาตร 180 มิลลิลิตร และเติมโปแตสเซียมไนเตรด ที่ความเข้มข้น 3.80 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปปั่นบน เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำเช่นเดียวกับข้อ 2.3 และ 2.4 เพื่อให้ได้ Cell Suspension ของเชื้อแบคทีเรียผสมทั้ง 6 ชนิด

3. การทดสอบประสิทธิภาพในการลดไนเตรด ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟตของแบคทีเรียผสม 6 ชนิด ที่ผ่านการทำให้คุ้นเคยกับสารที่ต้องการศึกษา โดยการใช้ น้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไนเตรด

3.1 การทดสอบประสิทธิภาพในการลดสารดังกล่าวภายในขวดซีรัมขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 7 ใบ โดยจะมีการแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด ดังนี้

3.1.1 ชุดที่ 1 คือ ชุดทดลอง (Active Bottles) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกในการลดความเข้มข้นของไนเตรด ไนไตรต์ แอมโมเนีย และฟอสเฟตซึ่งจะใช้ขวดซีรัมขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ใบ นำมาเติมน้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งในปริมาตร 41.2 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตรตามลำดับ หลังจากนั้นจึงเติม Cell Suspension ของเชื้อผสมลงไป 1 มิลลิลิตร และเติมสารประกอบที่ต้องการศึกษาประสิทธิภาพการลดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ ไนเตรดความเข้มข้น 3.80 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนไตรต์ความเข้มข้น 1.20 มิลลิกรัมต่อลิตร แอมโมเนียที่ความเข้มข้น 2.30 มิลลิกรัมต่อลิตร และฟอสเฟตความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.1.2 ชุดที่ 2 คือ ชุดควบคุมแบบฆ่าเชื้อ (Sterile Bottles) เพื่อศึกษาปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ที่มีผลต่อการลดความเข้มข้นของไนเตรด ไนไตรต์ แอมโมเนีย และฟอสเฟต นอกจากแบคทีเรียซึ่งจะใช้ซีรัมขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 2 ใบ นำมาเติมน้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งในปริมาตร 41.2 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตรตามลำดับ แล้วเติม Cell Suspension ของเชื้อผสมลงไป 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อภายในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเติมสารประกอบที่ต้องการศึกษาประสิทธิภาพในการลดความเข้มข้นที่ความเข้มข้นเดียวกับข้อ 3.1.1

3.1.3 ชุดที่ 3 คือ ชุดควบคุมแบบที่ไม่ใส่เชื้อ (Background Bottles) เพื่อศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในธรรมชาติในการลดความเข้มข้นของไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนีย และฟอสเฟตซึ่งจะใช้ขวดซีรัมขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 2 ใบ และนำมาเติมน้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งในปริมาตร 42.2 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นเติมสารประกอบที่ต้องการศึกษาประสิทธิภาพการลดความเข้มข้นที่ความเข้มข้นเดียวกับข้อ 3.1.1 แต่จะไม่เติมแบคทีเรียผสมลงไป

3.2 ทำให้ความดันภายในขวดซีรัมของทุกชุดการทดลองเป็นศูนย์โดยการให้เข็มฉีดยาปลอดเชื้อเสียบลงไปที่ยุ่ข้างของขวดซีรัมแล้วปล่อยให้แรงดันภายในขวดออกมาแล้วนำทั้ง 3 ชุดการทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นใช้เข็มฉีดยาปลอดเชื้อดูดตัวอย่างน้ำภายในขวดซีรัมของทุกชุดการทดลองไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนีย และฟอสเฟต

3.3 ตรวจสอบประสิทธิภาพในการลดสารดังกล่าวของเชื้อผสมด้วยการวัดปริมาณไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟตโดยเริ่มตั้งแต่วันที่แรกของการทดลอง

4. การวิเคราะห์ปริมาณไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟตในน้ำตัวอย่างที่ทำการศึกษา ด้วยการเก็บน้ำตัวอย่างจากการทดลอง 3 ชุด ในปริมาตรขวดละ 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที เพื่อให้เกิดการตกตะกอน แล้วนำส่วนใสมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟต ตามวิธีการดังนี้

4.1 การวัดปริมาณแอมโมเนีย ซึ่งได้ทำการประยุกต์มาจาก American Water Works Association and Water Pollution Control Federation (1980) มีขั้นตอนดังนี้

4.1.1 เจือจางตัวอย่าง 10 เท่า โดยการดูดน้ำตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงมาในปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำกลั่น 1,800 ไมโครลิตร เพื่อให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครลิตร จากนั้นเติมฟีนอลรีเอเจนต์และโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ชนิดละ 80 ไมโครลิตร แล้วเติม Alkaline Stock Solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

4.1.2 ปิดปลายหลอดทดลอง เพื่อป้องกันแอมโมเนียจากบรรยากาศลงไปที่เจือปน ตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ให้สารละลายทำปฏิกิริยาโดยสมบูรณ์ประมาณ 60 นาที จะได้สารประกอบสีน้ำเงิน

4.1.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

4.2 การวัดปริมาณไนเตรต วิธีการนี้ได้ทำการประยุกต์มาจากคู่มือวิเคราะห์น้ำเสียของม้านลิน ตันทูลเวคม์ (2538) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

4.2.1 เจือจางตัวอย่าง 40 เท่า โดยดูดน้ำตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงมาในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำกลั่น 1,950 ไมโครลิตร เพื่อให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครลิตร เติมนิเตรียมคลอไรด์ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และสารละลายซัลฟิวริก 2 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองไปแช่ในน้ำแข็งให้สารละลายเย็นลง

4.2.2 เติมสารละลายบรูซัน – ซัลฟานิลิกปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปอังไอน้ำอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำหลอดทดลองไปแช่ในน้ำแข็งให้สารละลายเย็นลง

4.2.3 วัดค่าเปอร์เซ็นต์ Transmittance (%T) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

4.3 การวัดปริมาณไนไตรต์ วิธีการนี้ได้ทำการประยุกต์มาจากคู่มือวิเคราะห์น้ำของ Stickland and Parson (1972) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

4.3.1 เจือจางตัวอย่าง 10 เท่า โดยการดูดน้ำตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงมาในปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่น 1,800 ไมโครลิตร เพื่อให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครลิตร เติม Sulfanilamide ปริมาตร 40 ไมโครลิตรและ NNED 40 ไมโครลิตร

4.3.2 ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ เป็นเวลา 5 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง เกิดเป็นสารประกอบสีบานเย็น

4.3.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

4.4 การวัดปริมาณฟอสเฟต วิธีการนี้ได้ประยุกต์มาจาก American Water Works Association and Water Pollution Control Federation (1980) มีขั้นตอนดังนี้

4.4.1 เจือจางตัวอย่าง 2 เท่า โดยการดูดน้ำตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงมาในปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 1,000 ไมโครลิตร เพื่อให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครลิตร แล้วเติม Mixed Molybdate ปริมาตร 400 ไมโครลิตร

4.4.2 ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณเป็นเวลา 5 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง จะเกิดเป็นสารประกอบสีน้ำเงิน

4.4.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น

885 นาโนเมตร

5. การทดสอบประสิทธิภาพในการลดไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟตจากการจับคู่ของแบคทีเรียผสม 2 ชนิดที่ผ่านการทำให้คุ้นเคยกับสารประกอบที่ โดยการใช้ น้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไนเตรต

5.1 ดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพในการลดเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟตระหว่างการใส่แบคทีเรียผสม 6 ชนิด กับการใส่แบคทีเรียผสม 2 ชนิด

6. จัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการลดไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟตได้ดี ซึ่งทำการศึกษาลักษณะเบื้องต้นโดยศึกษาลักษณะทางกายภาพของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ย้อมแกรมเพื่อศึกษารูปร่าง ลักษณะและการจัดเรียงตัวของเซลล์ จากนั้นใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับหาลำดับเบสเพื่อการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ซึ่งมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

6.1 การสกัดดีเอ็นเอ (ดัดแปลงมาจาก Sacchi, Whitney, Mayer, Morey, Steigerwalt, Boras, Weyant and Popovic, 2002) โดยเตรียมสารละลายเซลล์จุลินทรีย์ (Cell Suspension) จากการนำเซลล์จากจานเพาะเชื้อมา 1 โคโลนี มาละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาให้ความร้อนอีกครั้งที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที อีกครั้งและนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน (Overnight) นำสารละลายเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จากนั้นแบ่งสารละลายเซลล์มา 180 ไมโครลิตร แล้วเติม 10X TE Buffer ลงไป 20 ไมโครลิตร

6.2 การเตรียมจีโนมดีเอ็นเอจากแบคทีเรียโดยการสกัดด้วย DNAzol

6.2.1 เลี้ยงแบคทีเรียใน LB Broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ข้ามคืน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

6.2.2 เทน้ำใสส่วนบน (Supernatant) ที่ทิ้ง ล้างด้วย TES Buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง

6.2.3 เติม DNAzol reagent ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายใส่ Microcentrifuge Tube หลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วดูดขึ้นดูดลงเพื่อให้เซลล์แตก

6.2.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูด
ส่วนบนใส่อหลอดใหม่

6.2.5 ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
ต่อ DNAzol 1 มิลลิลิตร ผสมกันโดยการกลับไปกลับมา ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 – 3 นาที
แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

6.2.6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4
องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6.2.7 เทน้ำส่วนบนทิ้งล้างดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ปริมาตร 1
มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งเมื่อใส่ แล้วผสมโดยการกลับไปมา 3 – 6 ครั้ง ตั้งไว้ที่
อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที

6.2.8 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

6.2.9 เทน้ำส่วนบนทิ้งทำให้แห้งโดยการคว่ำบนกระดาษทิชชูที่สะอาดและ
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 – 2 นาที

6.2.10 ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น หรือ 1X TE Buffer ปริมาตร 100
ไมโครลิตร

6.3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (16S rRNA) ด้วย *px* DNA Polymerase ใน
Microcentrifuge Tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร โดยผสมสารต่างๆ ลงในหลอด ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10x <i>pfx</i> Amplification buffer	5	1 เท่า
10 mM dNTP mixture	1.5	0.3 มิลลิโมลาร์
50 mM MgSO ₄	1	1 มิลลิโมลาร์
Primer mix (10 μ M each)	1.5	0.3 มิลลิโมลาร์
Template DNA	5	-
Platinum <i>pfx</i> DNA polymerase	0.5	-
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	35.5	-
ปริมาตรสุดท้าย	50	-

6.4 ผสมสารต่าง ๆ ให้เข้ากันและรวบรวมสารไว้กันหลอดโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ประมาณ 3 วินาที

6.5 นำ Microcentrifuge Tube ใส่ในเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมดังต่อไปนี้

ตารางที่ 7 ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาที่ใช้ต่อรอบ
Initial denaturation	94	3 นาที
Denaturation	94	15 วินาที
Annealing	55	30 วินาที
Extension	68	1 นาที 30 วินาที
Final extension	68	10 นาที

6.6 เมื่อปฏิกิริยา PCR สิ้นสุดแล้วเติม 10x Loading Dye จำนวน 2 ไมโครลิตร ผสมกับ PCR Product จำนวน 10 ไมโครลิตร นำไปตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

7. ศึกษาความสัมพันธ์ค่าความขุ่น (OD) กับจำนวนเซลล์ที่นับได้ (จำนวนโคโลนี) โดยวิธีการนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ (Plate Count) เพื่อเปรียบเทียบค่าความขุ่นของเซลล์ที่ 1, 1.5, 2 และ 2.5 Absorbance Unit กับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญ (งูลักษณะ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547)

8. การทดสอบความสามารถและวัดประสิทธิภาพการลดไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนีย และฟอสเฟตในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลองโดยการใส่กลุ่มแบคทีเรียเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3

8.1 สร้างบ่อเลี้ยงกุ้งจำลองด้วยการใส่บ่อไฟเบอร์ซีเมนต์พื้นผิวขนาด $0.8 \times 1.2 \times 0.6$ เมตร จำนวน 6 บ่อ ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 2 ชุด คือ ชุดทดลองและชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียผสมลงไป อย่างละ 3 บ่อ โดยแต่ละบ่อมีการเติมดินคั่นบ่อกุ้งกุลาดำที่บริเวณพื้นบ่อจำลองความหนา 7 เซนติเมตร และฉาบด้วยดินตะกอนบริเวณผิวหน้าดินพื้นบ่อปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นเติมน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำลงไปให้มีปริมาตรต่ำกว่าปากบ่อจำลอง 10 เซนติเมตร โดยจะปรับค่าความเค็มของน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งให้มีค่าเท่ากับ 7 ส่วนในพันส่วน ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

8.2 เปิดเครื่องตีน้ำเพื่อเพิ่มออกซิเจนให้แก่บ่อเลี้ยงกุ้ง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงลงกุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลองจำนวน 20 ตัวต่อบ่อ โดยที่กุ้งกุลาดำจะมีน้ำหนักเฉลี่ย 28.8 กรัม และมีความยาวของลำตัว 15 เซนติเมตร (อายุกุ้งกุลาดำประมาณ 3 เดือน) ซึ่งในชุดทดลองจะมีการเติมกลุ่มแบคทีเรียลงไปเป็นปริมาตร 10, 20 และ 30 มิลลิลิตร ในวันแรก วันที่ 7 และวันที่ 21 ของการทดลองตามลำดับ สำหรับกลุ่มของแบคทีเรียที่จะเติมลงไปนั้นจะต้องมีจำนวนเซลล์ประมาณ 2.13×10^{10} CFU/ml ส่วนในชุดควบคุมจะไม่มีการเติมแบคทีเรียผสมลงไป

8.3 เติมน้ำในเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้นเดียวกับการทดลองในข้อ 3 ในวันแรกของการทดลอง จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 และ 21 ของการทดลองตามลำดับ

8.4 ทำการตรวจวัดประสิทธิภาพการลดไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนีย และฟอสเฟต เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 4. และตรวจวัดคุณภาพน้ำทางกายภาพ ได้แก่อุณหภูมิ ความเค็มความเป็นกรดต่าง ค่าออกซิเจนละลายน้ำโดยเครื่อง Multiprobe (Horiba W - 20XD Series) เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพน้ำและความสามารถในการลดความเข้มข้นไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนีย และฟอสเฟต

8.5 คำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนีย และฟอสเฟต จากสูตรต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การลดลง} = \left[\frac{\text{ความเข้มข้นเริ่มต้น} - \text{ความเข้มข้นสุดท้าย}}{\text{ความเข้มข้นเริ่มต้น}} \right] \times 100$$

8.6 ตรวจสอบการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ และเชื้อก่อโรค โดยการนับจำนวนแบคทีเรีย (Plate Count Agar) จากตัวอย่างน้ำและดินตะกอนภายในบ่อกึ่งกลาดำจำลอง

8.6.1 เก็บตัวอย่างน้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกึ่งกลาดำจำลองด้วยหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

8.6.2 ดูดน้ำตัวอย่างจากบ่อเลี้ยงกึ่งกลาดำจำลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร ส่วนตัวอย่างดินตะกอนซึ่งน้ำหนัก 1 กรัม เติมน้ำใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้อัตราความเจือจางเท่ากับ 10^{-1} ทำการเจือจางต่อไปเป็นลำดับครั้งละ 10 เท่า จนได้อัตราความเจือจางที่เหมาะสม

8.6.3 ดูดสารละลายในแต่ละระดับความเข้มข้นมา 0.1 มิลลิลิตร แล้วทำการเกลี่ยเชื้อ (Spread) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ Plate Count Agar (PCA) เพื่อตรวจสอบการติดตามจำนวนแบคทีเรียในกลุ่มเฮเทอโรโทรป, *Pseudomonas Isolatin Agar* เพื่อตรวจสอบการติดตามแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas spp.*, *Actinomycete agar* เพื่อตรวจสอบการติดตามแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีต และ TCBS เพื่อตรวจสอบการติดตามแบคทีเรียก่อโรคในกลุ่ม *Vibrio spp.*

8.6.4 นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง

8.6.5 นับจำนวนโคโลนีบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA เพื่อคำนวณหาจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) และ จำนวนโคโลนีต่อกรัม (CFU/g) สำหรับตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนตามลำดับ

8.7 ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียในกลุ่ม Sulfide Oxidizers, Nitrite Oxidizers และ Ammonia Oxidizers โดยวิธีเอ็มพีเอ็น (Most Probable Number; MPN Method) จากตัวอย่างน้ำและดินตะกอนภายในบ่อกึ่งกลาดำจำลอง

8.7.1 ทำการทดลองด้วยเทคนิคปลดเชื้อ โดยดูดตัวอย่างน้ำที่เก็บจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร ส่วนตัวอย่างที่เป็นดินตะกอนซึ่งน้ำหนัก 1 กรัม เติมลงใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ไฮเดียมคลอไรด์ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ระดับความเจือจางเท่ากับ 10^{-1} ทำการเจือจางต่อไปเป็นลำดับครั้งละ 10 เท่าจนได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} และ 10^{-3}

8.7.2 ใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างความเจือจาง 10^{-1} ลงในหลอดอาหาร Medium for Sulfide Oxidizers จำนวน 5 หลอด, Medium for Nitrite Oxidizers, Brackish จำนวน 5 หลอด และ Medium for Ammonia Oxidizers, Brackish จำนวน 5 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-3} จะทำการทดลองเช่นเดียวกัน

8.7.3 บ่มหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด ที่มีการเติมตัวอย่างและหลอดควบคุมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเจริญของแบคทีเรียจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองเปรียบเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่มีการเติมตัวอย่างน้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลองลงไป

8.7.4 นำค่าจำนวนหลอดของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่ให้ผลบวกจากทุกค่าความเจือจางไปอ่านค่าปริมาณแบคทีเรียจากตารางเอ็มพีเอ็น (ภาคผนวก ง)

9. การหาอินทรีย์วัตถุโดยวิธี Loss On Ignition ตามวิธีของทัศนีย์ อัดตะนันท์และจรัสกร จันทรเจริญสุข (2542)

9.1 ตากดินให้แห้งแล้วนำไปร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร แล้วชั่งประมาณ 10 กรัม ใส่ในปิเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร โดยชั่งน้ำหนักปิเกอร์ทุกใบก่อนนำไปใช้

9.2 นำดินเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักดิน

9.3 นำดินเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 360 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักดิน

9.4 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุ (Organic Material) จากสูตร

$$\% \text{ O.M.} = \left[\frac{A - B \times 100}{A} \right] \times 1.15$$

โดย A คือ น้ำหนักดินหลังอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส

B คือ น้ำหนักดินหลังอบที่อุณหภูมิ 360 องศาเซลเซียส

10. ทำการวิเคราะห์ผลข้อมูลการทดลองด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS version 7.5 โดย
วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ แบบ Two - Way ANOVA ชนิด
Simple Factorial

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University