บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียทนร้อนจากถั่วเน่า

1.1 การเก็บตัวอย่างถั่วเน่า

ซื้อถั่วเน่าทั้งแบบห่อและแบบแผ่นจากแหล่งต่างๆในภาคเหนือ จำแนกได้ดังนี้

ก. ตลาดต้นพยอม อ. เมือง จ. เชียงใหม่

ข. ตลาดดอยคำ อ. เมือง จ. เชียงใหม่

ค. อ. แม่วาง จ.เชียงใหม่

ง. อ. เวียงแหง จ.เชียงใหม่

จ. อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่

ฉ. อ. เมือง จ. แม่ฮ่องสอน

ช. ถั่วเน่าที่ทำขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ (ตามวิธีการของ รสวิไล, 2526)

1.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

1.1.1 นำตัวอย่างถั่วเน่าที่ได้จากแหล่งต่างๆมาทำ suspension โดยชั่งถั่วเน่า 10 กรัมใส่ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตรใส่ในขวด medical flat ขนาด 150 มล. เขย่าให้เชื้อแยกจากถั่วเน่า ทิ้งไว้สักครู่เพื่อให้ถั่วเน่าตกตะกอน

1.1.2 ทำการเจือจาง suspension ถั่วเน่าจากข้อ 1.1.1 ทีละ 10 เท่าจนได้ระดับความเจือจาง 10^{-5} และ 10^{-6}

1.1.3 ใช้ปิเปตดูด suspension ของถั่วเน่าที่ความเจือจาง 10^{-5} และ 10^{-6} ระดับความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจาน nutrient agar (ภาคผนวก ก) ใช่แท่งแก้วงอรูปสามเหลี่ยมปราศจากเชื้อเกลี่ยจนกระจายทั่วผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

1.1.4 เลือกโคโลนีของแบคทีเรียแล้วนำมาลากซ้ำบนอาหาร NA จานใหม่จนได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำมาเก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียงเป็น stock culture สำหรับการทดลองต่อไป

1.1.5 การให้รหัสเชื้อตามแหล่งที่เก็บตัวอย่างดังนี้

ก. ตลาดต้นพยอม อ. เมือง จ. เชียงใหม่	ให้รหัสเป็น	TP
ข. ตลาดดอยคำ อ. เมือง จ. เชียงใหม่	ให้รหัสเป็น	DK
ค. อ. แม่วาง จ.เชียงใหม่	ให้รหัสเป็น	MV

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

ง. อ. เวียงแหง จ.เชียงใหม่ ให้รหัสเป็น VH

จ. อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่ ให้รหัสเป็น MT

ฉ. อ. เมือง จ. แม่ฮ่องสอน ให้รหัสเป็น MH

ช. ถั่วเน่าที่ทำขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ ให้รหัสเป็น RS

1.2 การทดสอบการเป็นแบคทีเรียทนร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ

1.2.1 นำแบคทีเรียที่เลี้ยงใน nutrient agar ไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 20, อุณหภูมิห้อง, 37, 45 และ 60 องศาเซลเซียส

1.2.2 ดูการเจริญว่าเชื้อสามารถเจริญที่อุณหภูมิต่างๆได้หรือไม่

2 การทดสอบการผลิต PGA (Tahara, personal communication)

2.1 นำแบคทีเรียที่แยกได้มาเลี้ยงใน PGA producing medium (ภาคผนวก ก) โดยเลี้ยงใน flask ก้นจีบขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร 30 มิลลิลิตร นำไปเขย่าใน incubator shaker (Lab Line) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.2 นำ culture broth 1.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออก โดยใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5นาที นำเฉพาะส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) ที่ได้มาทดสอบปริมาณ PGA

2.3 แบ่งน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ หลังจากนั้นเติม

- สารละลาย 0.1 % safranin O (ภาคผนวก ข) 1.0 มิลลิลิตร
- Citrate buffer 0.06 M pH 6.0 (ภาคผนวก ข) 1.0 มิลลิลิตร
- สารละลาย 0.85% sodium chloride (ภาคผนวก ข) 1.0 มิลลิลิตร

2.4 นำสารละลายมาเหวี่ยงที่ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสข้างบนมาทำการเจือจางลง 25 เท่าด้วยสารละลาย 0.85% sodium chloride

2.5 นำสารละลายที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ของ Shimadzu รุ่น UV-120-01 ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

2.6 นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหาปริมาณ PGA โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานปริมาณ PGA (ภาคผนวก ค)

2.7 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิต PGA ได้สูงสุด นำมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PGA และจัดจำแนกชนิดของเชื้อ

3 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PGA ของ *B. subtilis* RS-2

3.1 การศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิต PGA

3.1.1 ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวบน จาน nutrient agar มาเพาะลงในอาหาร nutrient broth (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.1.2 ปีเปตเชื้อปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรใส่ลงใน flask ก้นจีบที่มี PGA producing medium 30 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.1.3 วัดอัตราการเจริญของเชื้อด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พร้อมทั้งนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อด้วยวิธี spread plate

3.1.4 วัดปริมาณ PGA ที่เชื้อผลิตทุกๆ 6 ชั่วโมง ตามวิธีในข้อ 2

3.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต PGA

3.2.1 เลี้ยงเชื้อใน PGA producing medium นำไปเขย่าด้วย incubator shaker ที่อุณหภูมิห้อง , 30, 37, 45 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

3.2.2 วัดปริมาณ PGA ที่เชื้อผลิต ตามวิธีในข้อ 2

3.3 ศึกษาผลของ pH ต่อการผลิต PGA

3.3.1 เตรียม PGA producing medium ที่มีความเป็นกรด-ด่างต่างกันดังนี้ คือ 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 และ 9 โดยใช้ 0.1M HCl และ 0.1 NaOH ในการปรับ pH

3.3.2 เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี pH ต่างกัน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

3.3.3 วัดปริมาณ PGA ที่เชื้อผลิต ตามวิธีในข้อ 2

3.4 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต PGA

3.4.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน 6 ชุด คือ

PGA producing medium ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน	
PGA producing medium ที่มี glucose	2 %
PGA producing medium ที่มี sorbose	2 %
PGA producing medium ที่มี sucrose	2 %
PGA producing medium ที่มี lactose	2 %
PGA producing medium ที่มี fructose	2 %

3.4.2 เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 6.5 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

3.4.3 วัดปริมาณ PGA ที่เชื้อผลิต ตามวิธีในข้อ 2

3.5 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต PGA

3.5.1 เตรียมอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 6 ชุด คือ

PGA producing medium ที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน

PGA producing medium ที่มี NH_4Cl 2%

PGA producing medium ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 2%

PGA producing medium ที่มี $(NH_4)_2PO_4$ 2%

PGA producing medium ที่มี peptone 2%

PGA producing medium ที่มี yeast extract 2%

3.5.2 เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไนโตรเจนต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 6.5 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

3.5.3 วัดปริมาณ PGA ที่เชื้อผลิต ตามวิธีในข้อ 2

3.6 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต PGA

3.6.1 เตรียม PGA producing medium ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่ง ไนโตรเจนโดยใช้ความเข้มข้นต่างๆกันคือ 1%, 2%, 3%

3.6.2 เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

3.6.3 วัดปริมาณ PGA ที่เชื้อผลิต ตามวิธีในข้อ 2

3.7 ศึกษาอัตราการให้อากาศต่อการผลิต PGA

3.7.1 เลี้ยงเชื้อใน PGA producing medium ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 1% เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 6.5 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง โดยใช้อัตราการให้อากาศต่างกันคือ 120, 150, 170 และ 200 รอบต่อนาที

3.7.2 วัดปริมาณ PGA ที่เชื้อผลิต ตามวิธีในข้อ 2

3.8 ศึกษาความเข้มข้นของ sodium L-glutamate ที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA

3.8.1 เตรียม PGA producing medium ที่มี Sodium L-glutamate ความเข้มข้นต่างกัน คือ 0%, 2%, 4%, 6%, 8% และ 10%

3.8.2 เลี้ยงเชื้อใน PGA producing medium ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 1% เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 6.5 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง โดยใช้อัตราการให้อากาศ

200 รอบต่อนาที

3.8.3 วัดปริมาณ PGA ที่เชื้อผลิต ตามวิธีในข้อ 2

4 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี

4.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย (Morphological characteristics)

โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงใน nutrient agar มาย้อมสีกรัม (ภาคผนวก ข)

ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ใช้ oil immersion objective ตรวจดูลักษณะต่างๆดังนี้

4.1.1 การติดสีกรัม

4.1.2 รูปร่างลักษณะของเซลล์

4.1.3 การจัดเรียงตัวของเซลล์

4.1.4 มีหรือไม่มีสปอร์

4.1.5 ขนาด

4.2 ศึกษาลักษณะบางประการทางชีวเคมี (Biochemical characteristics) (ภาคผนวก จ)

4.2.1 Catalase test

4.2.2 Indole test

4.2.3 Voges-Proskauer test (V-P test)

4.2.4 Starch hydrolysis

4.2.5 Egg yolk reaction

4.2.6 Nitrate reduction and denitrification

4.2.7 Carbohydrate fermentation tests

4.2.8 Growth in 5%, 7%, 10%