บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1.1 โหลแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 นิ้ว สูง 8 นิ้ว ความจุ 1.5 ลิตร Bormioli Rocco, Italy

1.2 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) รุ่น H1 บริษัท Lab Service LTD, Thailand.

1.3 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (Shaker) รุ่น Gyrotary G10 บริษัท New Brunswick Scientific, U.S.A.

1.4 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (Shaker) รุ่น Innova 2001 บริษัท New Brunswick Scientific, U.S.A.

1.5 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker) รุ่น Psycroterm บริษัท New Brunswick Scientific Edison , N.J. , U.S.A.

1.6 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) รุ่น BKE 60 บริษัท Memmert, U.S.A.

1.7 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) รุ่น D0601 model 500 บริษัท Memmert, U.S.A.

1.8 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) บริษัท Memmert, U.S.A.

1.9 เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด (Analytical Balance) รุ่น AG204 บริษัท Mettller Toledo, Switzerland.

1.10 เครื่องชั่งน้ำหนักหยาบ (Laboratory Balance) รุ่น PB3002 บริษัท Mettller Toledo, Switzerland.

1.11 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น CHS บริษัท Olympus Optical co.,LTD, Japan.

1.12 กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) รุ่น JSM – 541OLV บริษัท JEOL

1.13 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) รุ่น Cyberscan 1000 บริษัท Eutech Cyberscan , Singapore.

1.14 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 401 บริษัท Milton Roy, U.S.A.

1.15 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 401 บริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.

1.16 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Kubota 1920 บริษัท Kubota, Japan.

1.17 เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko co.,LTD,Japan.

1.18 ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot Air Oven) รุ่น UL-60 บริษัท Memmert, U.S.A.

1.19 เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) รุ่น Star 3400cx บริษัท Variance, U.S.A.

สารเคมี

2.1 เอธิลีนบริสุทธิ์ (Pure Ethylene) บริษัท Concoa, U.S.A.

2.2 แคลเซียมคาร์ไบด์ (Calcium Carbide)

2.3 ก๊าซไนโตรเจน (N_2) บริษัท Thai Industrial Gas co. ,Ltd, Thailand.

2.4 Carboxymethylcellulose Sodium Salt บริษัท Fluka, Switzerland.

2.5 Avicel (Microcrystalline Cellulose) บริษัท Fluka, Switzerland.

2.6 α-Cellulose (Alpha Cellulose Fiber) บริษัท Sigma Chemical Company,U.S.A.

2.7 Filter paper (no.1) บริษัท Whattman, England.

2.8 D(+)-Glucose-Monohydrate บริษัท Merck, Germany.

2.9 Congo Red บริษัท Merck, Germany.

2.10 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัทปรุงทิพย์ ประเทศไทย.

2.11 กลูโคส (Food grade)

2.12 แมนนิทอล (Mannitol) บริษัท Merck, Germany.

2.13 ซูโครส (Food grade)

2.14 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) บริษัท Ajax Chemicals, Australia.

2.15 โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) บริษัท Fluka, Switzerland.

2.16 เปปโตน (Peptone) บริษัท Difco, U.S.A.

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสและตรึงไนโตรเจนจากแหล่งต่างๆ

นำตัวอย่างเศษวัสดุกำลังย่อยสลาย วัสดุจากกองปุ๋ยหมัก ดินจากรังปลวก ปุ๋ยหมักและตัวเร่งปุ๋ยหมัก มาเตรียมเป็นสารละลายตัวอย่างโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ใช้ลูปหรือเข็มเขี่ยเชื้อขีดสารละลายตัวอย่างลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Carboxymethylcellulose (CMC), Nitrogen-free medium (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง

สำหรับตัวอย่างปลวก ใช้ลูปหรือเข็มเขี่ยเชื้อ ขีดส่วนที่เป็นลำไส้ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิห้อง

เมื่อมีแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยการย้อมสีอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยสีคองโก เรด ตามวิธีของ Suyama และคณะ (1993) โดยเทสารละลายสีคองโก เรด ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ข) ลงบนโคโลนีในจานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง หลังจากนั้นเทสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร (ภาคผนวก ข) ตามลงไป ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเททิ้ง จะเห็นบริเวณใส (Clear zone หรือ CMC hydrolysis zone) ซึ่ง CMC ถูกย่อยสลายรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ แยกเก็บโคโลนีของเชื้อที่ทำให้เกิดบริเวณใสให้บริสุทธิ์ เก็บแบคทีเรียที่แยกได้บริสุทธิ์บนอาหารแข็ง CMC, Nitrogen-free agar (ภาคผนวก ก) ในหลอดฝาเกลียว ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้เป็นเชื้อทดสอบเพื่อการคัดเลือกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสและตรึงไนโตรเจนต่อไป

3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสและตรึงไนโตรเจนได้

3.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

3.2.1.1 การคัดเลือกขั้นแรก โดยศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ C_x-cellulase หรือ CMCase โดยวัดอัตราส่วนขนาดของบริเวณใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (Ratio of the size of CMC hydrolysis zone to colony diameter) ตามวิธีของ Hankin และ Anagnostakis (1977) โดยนำเชื้อที่ทดสอบซึ่งเจริญอยู่บนอาหารแข็ง CMC, Nitrogen-free agar slant มาทำเป็นสารละลาย ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ หยดสารละลายที่ได้ ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMC, N-free medium ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลทุก ๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี วัดขนาดของบริเวณใส ด้วยการย้อม

สีคองโก เรด ตามวิธีข้างต้น หาอัตราส่วนขนาดของบริเวณใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี คัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ค่าอัตราส่วนขนาดของบริเวณใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีสูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ แสดงว่ามีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส

3.2.1.2 การคัดเลือกขั้นที่สอง วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi,1952)

3.2.1.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ (Inoculum) นำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกขั้นแรก (3.2.1.1) มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง CMC, Nitrogen-free agar slant บ่มที่อุณภูมิห้อง เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ เขี่ยใส่อาหารเหลว CMC, Nitrogen-free medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 100-150 รอบต่อนาที

3.2.1.2.2 การเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เป็น N-free medium ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น กระดาษกรอง (Filter paper no.1) ขนาด 1x1 เซนติเมตรสำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อยกระดาษกรอง (FPase activity) ใช้ N-free medium ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็น Avicel (Microcrystalline cellulose) สำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อย Avicel (Avicelase activity) และอาหารเหลว N-free medium ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น α-Cellulose เพื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อย α-Cellulose (α-Cellulase activity) โดยใส่กล้าเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมจากข้อ 3.2.1.2.1 10 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 90 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 100-150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างของสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ ทุก ๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน เพื่อใช้ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส

3.2.1.2.3 การเตรียม crude enzyme โดยเก็บตัวอย่างสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2.1.2.2 ประมาณ 10-15 มล. มาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ ด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที เก็บสารละลายใสตอนบนซึ่งประกอบด้วย crude enzyme ไว้ใช้ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

3.2.1.2.4 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส ตามวิธีของ Wood และ MacCrae, 1977 อ้างถึงใน วิศิษฐพร เผื่อนพิภพ (2529)

3.2.1.2.4.1 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อยกระดาษกรอง (FPase activity) โดยผสมและบ่มสารละลายของcrude enzyme 0.25 มล. กับสารละลาย 1% กระดาษกรอง เบอร์ 1 ขนาด 1x6 ซม.ใน acetate buffer 0.2 M pH 5.4 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson โดยเติมสารละลาย

อัลคาไลคอปเปอร์ (Alkaline copper reagent) (ภาคผนวก ข) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นทันที หลังจากนั้นเติมสารละลายเนลสัน (Nelson reagent) (ภาคผนวก ข) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มล. ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ข)

1 หน่วย (Unit) ของ FPase activity คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายกระดาษกรองแล้วทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

3.2.1.2.4.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อย Avicel (Avicelase activity) ผสมและบ่ม crude enzyme 0.2 มล. กับ 1% Avicel ใน 0.1 M acetate buffer pH 5.0 ปริมาตร 0.4 มล.แล้วเติม 0.1 M acetate buffer pH 5.0 ลงไปอีก 1.4 มล. บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส 5 นาที กรองเอา Avicel ออก วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson

1 หน่วย (Unit) ของ Avicelase activity คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย Avicel แล้วทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

3.2.1.2.4.3 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อยสลาย α-Cellulose (α-Cellulase activity) ผสมและบ่ม 0.2 มล. crude enzyme กับ 0.4 มล. 1% α-Cellulose ใน 0.1 M acetate buffer pH 5.0 แล้วเติม 0.1 M acetate buffer pH 5.0 ลงไปอีก 1.4 มล. บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส 5 นาที กรองเอา α-Cellulose ออก วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson

1 หน่วย (Unit) ของ α-Cellulase activity คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย α-Cellulose แล้วทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

3.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน

3.2.2.1 วัดความสามารถในการตรึงไนโตรเจน โดยวิธี Acetylene reduction technique (จารุรัตน์ เอี่ยมศิริ, 2541)

นำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.2.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว CMC, N-free medium 9 มล.ที่บรรจุในขวดทดลองขนาด 50 มล. บ่มที่อุณภูมิห้อง 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย หลังจากนั้นวัดการตรึงไนโตรเจน

ของแบคทีเรีย โดยเปลี่ยนจากจุกสำลีเป็นจุกยาง ป้องกันการซึมเข้าออกของก๊าซภายในและภายนอกขวด แลกเปลี่ยนก๊าซภายในขวดทดลองกับก๊าซอะเซทิลีน โดยดูดอากาศในขวดออก 3 มล. และฉีดก๊าซอะเซทิลีน 3 มล. แทนที่อากาศที่ดูดออกไป เพื่อรักษาความดันของก๊าซภายในขวดให้เท่าเดิม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดหาปริมาณก๊าซเอธิลีนที่เกิดขึ้น โดยดูดก๊าซตัวอย่างออกจากขวดทดลอง 1 มล. ฉีดเข้าเครื่อง GC (Gas chromatography) Varians star 3400cx โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้

ชนิดของคอลัมน์ (Column)	:	คอลัมน์สแตนเลส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 มม. ยาว 225 เซนติเมตร ภายในบรรจุ Porapak N ขนาด 80 -100 mesh
ก๊าซตัวพา (Carrier gas)	:	ก๊าซไนโตรเจน (N_2)
ชนิดของเครื่องตรวจ (Detector)	:	Flame Ionization Detector (FID)
อุณหภูมิของคอลัมน์	:	90 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของเครื่องตรวจ	:	150 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของเครื่องฉีด (Injector)	:	110 องศาเซลเซียส
อัตราการไหลของก๊าซ N_2	:	30 มล.ต่อนาที
อัตราการไหลของก๊าซ H_2	:	30 มล.ต่อนาที
อัตราการไหลของอากาศ	:	300 มล.ต่อนาที

และฉีดเอธิลีนมาตรฐาน 1% เทียบทุกครั้ง ซึ่งในการแยกก๊าซอะเซทิลีนและก๊าซเอธิลีนตามวิธีนี้ ก๊าซเอธิลีนจะออกมาก่อนที่ Rentention time ประมาณ 1 นาที ส่วนก๊าซอะเซทิลีนออกมาภายหลัง ที่ Rentention time ประมาณ 1.4 นาที

3.2.2.2 การคำนวณปริมาณเอธิลีนที่สร้างขึ้น (Turner และ Gibson, 1980)

เมื่อฉีดก๊าซเอธิลีนบริสุทธิ์ ปริมาตร Z µl เข้าเครื่อง GC มีปริมาณเอธิลีน เท่ากับ Z/22.4 µmol (0.0446Z µmol) ทำให้เกิดพีค $p_1 x\ a_1$ (p คือ peak area; a คือ Attenuation) และเมื่อฉีดก๊าซตัวอย่างในปริมาตรที่เท่ากันเข้าเครื่อง GC ทำให้เกิดพีค Px A ดังนั้นปริมาณเอธิลีนทั้งหมดที่สร้างขึ้น เท่ากับ

$$\text{Total } C_2H_4\ (\mu\text{mol}) = 0.0446Z \times \left[(P \times A)/(p_1 \times a_1)\right]$$

การคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (การรีดิวซ์ก๊าซอะเซทิลีน) ตามปกติจะคำนวณในหน่วยของนาโนโมล (nmole) หรือไมโครโมล (µmole) ของก๊าซเอธิลีนต่อหน่วยของตัวอย่าง (มล.

ของอาหารเลี้ยงเชื้อ มก.ของโปรตีน มก.ของน้ำหนักเซลล์แห้ง กรัมของน้ำหนักเปียกหรือน้ำหนักแห้งของปมราก) ต่อหน่วยเวลา

3.2.2.3 หาน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย โดยอบกระดาษกรองมิลลิพอร์ ขนาด 0.45 ไมครอน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักกระดาษเปล่าไว้ นำไปกรองเซลล์แบคทีเรียภายหลังจากวัดการตรึงไนโตรเจนแล้ว อบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมงหรือจนน้ำหนักคงที่ ชั่งหาน้ำหนักกระดาษกรองรวมกับเซลล์บนกระดาษกรอง คำนวนหาน้ำหนักเซลล์แห้ง นำน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ไปคำนวณรวมกับปริมาณเอธิลีนที่สร้างขึ้น เพื่อหาอัตราการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูง

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายเซลลูโลสและตรึงไนโตรเจน จากการศึกษาในข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 มาพิจารณาคัดเลือกหาแบคทีเรียที่จะใช้ในการศึกษาสรีรวิทยา และเป็นแนวทางในการใช้เป็นหัวเชื้อทำปุ๋ยหมักจากฟางข้าวต่อไป

3.3 การศึกษาสรีรวิทยาของแบคทีเรียที่แยกและคัดเลือกได้

ศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่าง ที่มีผลต่อการเจริญ ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส และตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2

การเตรียมกล้าเชื้อ

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 มาเลี้ยงในอาหาร Tryptic soy broth (ภาคผนวก ก) เพื่อเพิ่มจำนวน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง จึงนำเซลล์ที่ได้ มาทำเป็นสารละลาย ใน 50 มล.น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ เขย่าบน vortex ให้เซลล์กระจายสม่ำเสมอในสารละลาย แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.2-0.3 ซึ่งเซลล์ของแบคทีเรียที่ได้นี้จะนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป

3.3.1 ศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน

โดยการแปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ เพื่อศึกษาการเจริญ ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส และตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย

3.3.1.1 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญ

วัดอัตราการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปราศจากไนโตรเจน ที่แปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส CMC แมนนิทอล และ ซูโครส ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามวิธีในข้อ 3.2.2.3 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.1.2 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

ใส่กล้าเชื้อแบคทีเรีย 10 มล. ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ซึ่งภายในบรรจุ 90 มล.ของอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจน ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนเป็น กลูโคส CMC แมนนิทอล และ ซูโครส ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CMCase (CMCase activity) ตามวิธีของ Wood และ MacCrae, 1977 อ้างถึงในวิศิษฐพร เผื่อนพิภพ, 2529 โดยผสมและบ่มเอนไซม์ที่สกัดได้ (ตามวิธีในข้อ 3.2.1.2.3) 0.25 มล. กับ 0.5 มล.สารละลาย 1% CMC ใน 0.2 M Acetate buffer pH 5.4 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1 หน่วย (Unit) ของ Carboxymethylcellulase หรือ CMCase activity คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย CMC แล้วทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

3.3.1.3 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

ใส่กล้าเชื้อแบคทีเรีย 1 มล. ลงในฟลาสก์ขนาด 50 มล. ซึ่ง ภายในบรรจุอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจน 9 มล. โดยแปรผันแหล่งคาร์บอนเป็น กลูโคส CMC แมนนิทอล และ ซูโครส ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน โดยวิธี Acetylene reduction technique (ตามวิธีในข้อ 3.2.2.1) คำนวณอัตราการตรึงไนโตรเจน ตามวิธีในข้อ 3.2.2.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.2 ศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน

โดยการแปรผันแหล่งไนโตรเจน เพื่อศึกษาการเจริญ ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสและประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย

3.3.2.1 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญ

วิเคราะห์หาอัตราการเจริญของแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งแปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และเปปโตน (Peptone) ตามลำดับ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (N-free) เป็นชุดควบคุม เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.2.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.3.1.2 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ โซเดียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และเปปโตน โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเป็นชุดควบคุม วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CMCase ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.2.3 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.3.1.3 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ที่แปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ โซเดียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ เปปโตน โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเป็นชุดควบคุม วิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และคำนวณหาอัตราการตรึงไนโตรเจน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส และประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย

โดยการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ เพื่อศึกษาการเจริญ ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสและประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย

3.3.3.1 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ

วิเคราะห์หาอัตราการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CMC, N-free medium ที่แปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ เป็น 30 45 55 และ 65 องศาเซลเซียส เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.3.2 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.3.1.2 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CMC, N-free medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 45 55 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CMCase ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.3.3 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.3.1.3 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CMC, N-free medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 45 55 และ 65 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และคำนวณอัตราการตรึงไนโตรเจน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.4 ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่มีต่อการเจริญ ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส และตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย

โดยการแปรผันความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อศึกษาการเจริญ ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส และประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย

3.4.3.1 ผลของความเป็นกรด-ด่าง ที่มีต่อการเจริญ

วิเคราะห์หาอัตราการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CMC, N-free medium ที่แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 4 5 6 7 และ 8 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.3.2 ผลของความเป็นกรด-ด่าง ที่มีต่อความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.3.1.2 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CMC, N-free medium ที่แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 4 5 6 7 และ 8 วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CMCase ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.3.3 ผลของความเป็นกรด-ด่าง ที่มีต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.3.1.3 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CMC, N-free medium ที่แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 4 5 6 7 และ 8 วิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และคำนวณหาอัตราการตรึงไนโตรเจน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4 ศึกษาลักษณะโครงสร้างของแบคทีเรีย ที่แยกและคัดเลือกได้

3.4.1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

โดยการย้อมสีแกรม กระจายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 บนสไลด์ ทำให้แห้งในอากาศ แล้วผ่านเปลวไฟ ย้อมสีแกรมคริสตัลไวโอเลต (ภาคผนวก ข) 1 นาที ล้างน้ำ ย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ข) 1 นาที ล้างด้วยน้ำ ล้างสีออกด้วย เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 % โดยเอียงสไลด์ให้เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 % ไหลผ่านสังเกตดูสีคริสตัลไวโอเลตที่ถูกชะออกมาพอเริ่มจางลง หยุดปฏิกิริยาโดยจุ่มลงในน้ำ แล้วซับให้แห้ง ย้อมสีซาฟรานินโอ (ภาคผนวก ข) 20-30 วินาที ล้างน้ำ ซับให้แห้ง แล้วตรวจดูลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา Olympus รุ่น CHS

3.4.2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM)

การเตรียมตัวอย่างศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด มีขั้นตอนดังนี้

3.4.2.1 กระบวนการ Fixation

3.4.2.1.1 ตัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีโคโลนีของแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสและตรึงไนโตรเจนเจริญอยู่ให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ (5x5x3 มม.)

3.4.2.1.2 แช่ลงใน 2.5% Glutaraldehyde ใน 0.1 M Phosphate buffer pH 7.2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงหรือข้ามคืนในตู้เย็น

3.4.2.1.3 ล้างด้วย 0.1 M Phosphate buffer pH 7.2 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที

3.4.2.1.4 Fix ด้วย 1% Osmium tetraoxide (OsO_4) ใน 0.1 M Phosphate buffer pH 7.2

3.4.2.1.5 ล้างด้วย 0.1 M Phosphate buffer pH 7.2 1 ครั้ง แล้วตามด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที

3.4.2.2 กระบวนการ Dehydration

ทำตัวอย่างให้ปราศจากน้ำ โดยการแช่ตัวอย่างลงใน Ethyl alcohol series ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังนี้ 30 50 70 90 และ 100% 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที

3.4.2.3 กระบวนการ Drying

ทำตัวอย่างให้แห้ง ณ.จุดวิกฤตด้วยเครื่อง Critical point dryer

3.4.2.4 กระบวนการ Coating

ติดตัวอย่างบน Stub ด้วยเทปสองหน้าหรือกาว ฉาบทองด้วยเครื่อง Sputter 4-5 นาที

3.4.2.5 การศึกษาและตรวจสอบ

ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM : JEOL model JSM-5410cv) บันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูป Mimoya RB67 pro SD120

3.5 ศึกษาการหมักฟางข้าวในโหลหมักโดยใช้แบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสและตรึงไนโตรเจนได้ดี มาใช้เป็นหัวเชื้อในการทำฟางข้าวหมัก เปรียบเทียบกับเมื่อไม่เติมแบคทีเรีย

การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย (Inoculum)

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ที่เจริญเต็มที่บน CMC, N-free agar slant มาเลี้ยงในอาหารเหลว CMC, N-free medium ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญอยู่นี้ มาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ ที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวตอนบนทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง ชั่งน้ำหนักเซลล์เปียกที่ได้ ไว้ใช้สำหรับใส่ลงในวัสดุฟางข้าว เพื่อทำปุ๋ยหมักเปรียบเทียบกับการไม่เติมแบคทีเรีย

การเตรียมวัสดุฟางข้าว

นำฟางข้าวแห้ง ตัดให้เป็นชิ้น ขนาด 2-4 ซม. แช่น้ำ 1 คืน หลังจากนั้นนำฟางข้าวไปสะเด็ดน้ำออก ซึ่งจะทำให้มีความชื้นเหลืออยู่ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์

การหมักฟางข้าวในโหลหมัก

ใส่กล้าเชื้อแบคทีเรียลงในวัสดุฟางข้าวหนัก 100 กรัม ที่อยู่ในโหลแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 นิ้ว สูง 8 นิ้ว โดยใช้น้ำหนักเซลล์เปียกของแบคทีเรียเป็น 10 % ของน้ำหนักฟางข้าวเปรียบเทียบกับชุดควบคุมไม่เติมแบคทีเรีย ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันอย่างสม่ำเสมอ ปิดปากโหลด้วยผ้าขาวบางเพื่อป้องกันแมลงและการระเหยของน้ำ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำโหลหมักฟางข้าวไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส เพื่อควบคุมและรักษาระดับความชื้นในโหลแก้วให้อยู่ในช่วง 60-80 % ตลอดการทดลอง โดยการเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำการคลุกเคล้าวัสดุฟางข้าวในแต่ละโหลทุก ๆ สัปดาห์ และใส่กล้าเชื้อแบคทีเรียเพิ่มลงไปในชุดทดลองทุก ๆ เดือน บ่มเป็นเวลา 3 เดือนครึ่ง

ทำการวิเคราะห์คุณภาพของปุ๋ยหมักที่ได้ โดยนำตัวอย่างฟางข้าวหมักมาศึกษาลักษณะทั่วไปและวิเคราะห์หา

3.5.1 ลักษณะทั่วไปของปุ๋ยหมัก

สังเกตลักษณะของปุ๋ยหมัก โดยการดูสีของฟางข้าวที่เปลี่ยนไป และ ดมกลิ่น

3.5.2 อุณหภูมิ (Temperature)

ใช้เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิในโหลหมักฟางข้าว 3 ตำแหน่ง คือ บริเวณที่ลึกจากผิวหน้า 2-3 นิ้ว บริเวณตรงกลาง และบริเวณที่ลึกที่สุด แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.5.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

นำตัวอย่างปุ๋ยหมักฟางข้าว 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 มล. เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณครึ่งชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter

3.5.4 ปริมาณความชื้น (Moisture)

นำตัวอย่างปุ๋ยหมักฟางข้าว มาชั่งหาน้ำหนักเปียก แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนกระทั่งตัวอย่างปุ๋ยหมักแห้งสนิท นำมาใส่โถดูดความชื้น เมื่ออุณหภูมิของตัวอย่างลดลง นำมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง คำนวณปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักเปียกของปุ๋ยหมัก-น้ำหนักแห้งของปุ๋ยหมัก}}{\text{น้ำหนักเปียกของปุ๋ยหมัก}} \times 100$$

3.5.5 การหาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio)

3.5.5.1 การหาปริมาณอินทรีย์คาร์บอน (Organic carbon) (ประโสด ธรรมเขต, 2540)

ชั่งตัวอย่างปุ๋ยหมักบดละเอียด 0.1 กรัม ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล. เติมสารละลายโปแตสเซียมไดโครเมท 1 นอร์มอล 25 มล. แล้วค่อย ๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป 20 มล. เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน ทิ้งค้างคืน หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น 100 มล. ทิ้งไว้ให้เย็น เติมกรดออร์โธฟอสฟอริกเข้มข้น 5 มล. เติมออร์โธฟีแนนโทรลีนอินดิเคเตอร์ 0.5 มล. แล้วไตเตรตกับเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) 0.5 N สังเกตสีที่เปลี่ยนจากเขียวเป็นฟ้า จากฟ้าเป็นน้ำตาลแดง (End point) จดปริมาตรของเฟอรัสซัลเฟตที่ใช้ ทำ blank โดยวิธีเดียวกันทั้งหมดแต่ไม่ต้องใส่ตัวอย่าง คำนวณหา % organic carbon จากสูตร

$$\% \text{ O.C.} = \frac{(B - T) \times N \times 0.39}{S}$$

B = มล. ของเฟอรัสซัลเฟตที่ไตเตรตblank

T = มล. ของเฟอรัสซัลเฟตที่ไตเตรตตัวอย่าง

S = น้ำหนักเป็นกรัมของตัวอย่าง

N = นอร์มอลิตีของเฟอรัสซัลเฟตที่ใช้

3.5.5.2 การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total N) (ประโสด ธรรมเขต, 2540)

3.5.5.2.1 การย่อยตัวอย่างให้อยู่ในรูปของสารละลาย

ชั่งตัวอย่างหนัก 1.0 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรองใส่ในขวด Kjeldahl ขนาด 800 มล. เติม Mixed catalyst ที่ประกอบด้วย K_2SO_4 $CuSO_4.5H_2O$ และ Se ในอัตราส่วน 100:10:1 (ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน) ประมาณ 5 กรัม เติม conc. H_2SO_4 25 มล. นำไปย่อยด้วยความร้อน โดยใช้อุณหภูมิต่ำ ๆ ก่อน แล้วค่อยปรับให้สูงขึ้น ประมาณ 400-420 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สารละลายใส ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้นทำการเติมน้ำกลั่นลงไป 250-300 มล.

3.5.5.2.2 การกลั่นและการไตเตรทหาปริมาณ total N

โดยแบ่งสารละลายที่ได้จากข้อ 3.5.5.2.1 มา 25 มล. ใส่ในขวดกลั่นในชุดกลั่นด้วยไอน้ำ เติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1:1 (เตรียมจาก NaOH 1 ก.ก. ละลายในน้ำ 1 ลิตร) ปริมาตร 10 มล. แล้วทำการกลั่นด้วยไอน้ำ เก็บก๊าซแอมโมเนีย ที่เกิดขึ้น โดยผ่านลงในสารละลายกรดบอริก 3 % ปริมาตร 50 มล. ซึ่งมี mixed indicator ของ Bromcresol green กับ Methyl red อยู่ เก็บสารละลายที่กลั่นได้จนมีปริมาตร 200-250 มล. นำของเหลวที่กลั่นได้ไปไตเตรตกับสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.1 N จนกระทั่งถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพูม่วง นำปริมาตรของกรดที่ใช้ มาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจากสูตร

$$\% \text{ total N} = \frac{(T - B) \times N \times 1.4}{S}$$

T = จำนวนมล.ของกรดที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง

B = จำนวนมล.ของกรดที่ใช้ไตเตรต blank

N = ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ (Normality)

S = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ (กรัม)

3.5.5.3 การหาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio)

ได้จากการคำนวณเมื่อได้ค่าวิเคราะห์ของไนโตรเจนและอินทรีย์คาร์บอน นำทั้ง 2 ค่ามาเข้าสูตร

$$\text{C/N ratio} = \frac{\% \text{ total N}}{\% \text{ O.C.}}$$

3.5.6 การหาปริมาณธาตุอาหารพืชหลัก

โดยวิเคราะห์หาปริมาณ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โปตัสเซียม

3.5.6.1 การหาปริมาณไนโตรเจน

ตามวิธีในข้อ 3.5.5.2

3.5.6.2 การหาปริมาณฟอสฟอรัส (ประโสด ธรรมเขต, 2540)

วิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (total P) ในปุ๋ยหมักในรูปของสารละลาย(Aliquot) โดยอ่านค่าความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Spectrophotometer ใช้สารละลาย KH_2PO_4 เป็นสารละลายมาตรฐาน

3.5.6.3 การหาปริมาณโปตัสเซียม (ประโสด ธรรมเขต, 2540)

หาปริมาณโปตัสเซียมทั้งหมด ด้วยเครื่อง Flame photometer ใช้สารละลาย KCl เป็นสารละลายมาตรฐาน

3.5.7 การตรวจสอบความอยู่รอดของแบคทีเรียที่ใช้เป็นหัวเชื้อหมักฟางข้าว

นำตัวอย่างปุ๋ยหมักมาเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้นต่าง ๆ ทำ serial dilultion plate count โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMC, N-free medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบความอยู่รอดของแบคทีเรีย โดยการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย