บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker) รุ่น G-27 แบบโรตารี่	New Brunswick Scientific	USA.
เครื่องเขย่า (Orbital Incubator Shaker) รุ่น Gyromax 707R	Amerex Instruments	USA.
เครื่องเขย่า (Controlled Environment Incubator Shaker)	New Brunswick Scientific	USA.
เครื่องเขย่า (Gid Gyroty Shaker) รุ่น G 10	New Brunswick Scientific	USA.
เครื่องชั่งละเอียด รุ่น PC 220E	Mettler Instrument	Switzerland
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Novaspec II	Pharmacia	England
ตู้อบแห้ง (Hot Air Oven) รุ่น UL 60	Memmert	Germany
ตู้ถ่ายเชื้อแบบ Larmina Flow	Dwyer Instruments	USA.
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	Kyowa	Japan

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์	Kubota	Japan
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง(pH meter)	PH Scan 1	Singapore
เครื่องเขย่า (Vortex) รุ่น Giene 2	Scientific	USA.

เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)2SO_4$	E.Merck Damnstadt	Germany
แคลเซียมคลอไรด์ $(CaCl_2)$	”	”
แมกนีเซียมแฮบตะไฮเดรต $(MgSO_4.7H_2O)$	”	”
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	”	”
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต $(CaCl_2.2H_2O)$	”	”
โซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH)	”	”
ไดโปแดสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	”	”
กรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4)	”	”

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
เฟอรัสฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	Carlo erba	Italy
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	May&Baker	England
พาราไนโตรฟีนอล ($NO_2\ C_6H_4OH$)	Carlo erba	Italy
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(Na_2HPO_4)	Carlo erba	Italy
แอมโมเนียมไนเตรต(NH_4NO_3)	J.T Baker	USA.

วิธีการดำเนินการทดลอง

1. การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสียและตะกอน เพื่อหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล

1.1 การเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอน

เก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนจากถังเติมอากาศระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของโรงงานฟอกย้อมและโรงงานฟอกหนังที่มีการใช้สารพารา ไนโตรฟีนอลในพื้นที่จังหวัดสมุทรปราการ โดยเก็บตัวอย่างจากบริเวณที่กำหนดใส่ขวดที่ปราศจากเชื้อและแช่ตัวอย่างไว้ในถังน้ำแข็ง อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส

1.2 วิเคราะห์สมบัติทางเคมีของตัวอย่างน้ำ ดังต่อไปนี้

1.2.1 วัดค่าความเป็นกรดด่าง โดย pH meter

1.2.2 วัดปริมาณสารอินทรีย์ด้วยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด (มั่นสิน ตัณฑุลเวศน์, 2540) ดังแสดงในภาคผนวก ก

1.2.3 วัดความเข้มข้นของสารพาราไนโตรฟีนอล (Heitkamp et al., 1990) ดังแสดงในภาคผนวก ก

1.3 แยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล

1.3.1 ผสมตัวอย่างน้ำและตะกอนให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (Vortex Mixer) ทำการเจือจางตัวอย่าง 10 เท่าโดยปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดบรรจุน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร

1.3.2 ถ่ายตัวอย่างที่เจือจางแล้วในข้อ 1.3.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MBH (Modified Bushnell & Haas Minimal Salts medium) ดังแสดงในภาคผนวก ข ซึ่งผสมเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น ปรอท (Brain Heart Infusion Broth) 3.7 มิลลิกรัมต่อลิตรและพาราไนโตรฟีนอล 0.1 มิลลิโมลาร์ บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที หลังจากที่ทำการตรวจวัดความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียโดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อการดูดกลืนแสงมีค่าตั้งแต่ 0.5 ขึ้นไป แสดงว่ามีการเจริญของแบคทีเรีย

1.3.3 แยกแบคทีเรียจากตัวอย่างในข้อ 1.3.2 ให้เป็นโคโลนีเดี่ยว

1.3.3.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเจริญเติบโตของเชื้อดังที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 1.3.2 มาเขี่ยลาก (Streak) บนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MBH ที่ผสมเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น ปรอท (Brain Heart Infusion Broth) 3.7 มิลลิกรัมต่อลิตรและพาราไนโตรฟีนอล 0.1 มิลลิโมลาร์ บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง

1.3.3.2 ในระยะเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ เมื่อมีการสร้างโคโลนีเดี่ยวบนจานเลี้ยงเชื้อ เลือกโคโลนีเดี่ยวนั้นมาเขี่ยลากซ้ำ บนอาหารสูตรเดียวกัน บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ ทำการถ่ายเชื้อหลาย ๆ ครั้ง เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่แยกไว้ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ตามวิธีการในข้อ 1.3.3.1 คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล โดยการสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จากสีเหลืองเปลี่ยนไปเป็นไม่มีสี ภายในระยะเวลา 1 สัปดาห์

1.3.3.3 เก็บรักษาเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย (Trypic soy agar slant) สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

1.4 คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลสูงสุด

นำแบคทีเรียที่แยกจนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MBH ที่ผสมเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่นและพาราไนโตรฟีนอล ตามข้อ 1.3.3.1 มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล

1.4.1 เตรียมหัวเชื้อ(Inoculum) แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล

นำเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้ตามข้อ1.3.3.2 ประมาณ 5 สายพันธุ์มาเตรียมเป็นหัวเชื้อ (Inoculum) โดยเขี่ยโคโลนีลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB (สูตรอาหารแสดงในภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

1.4.2 ทดสอบการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ที่แยกได้

1.4.2.1 นำหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 1.4.1 มาปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MBH ซึ่งผสมเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น 3.7 มิลลิกรัมต่อลิตรและพาราไนโตรฟีนอล ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0, 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 30 วัน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

1.4.2.2 ตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของพาราไนโตรฟีนอลที่ลดลงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 402 นาโนเมตร ตามวิธีการของ Heitkamp และคณะ(1990) พร้อมทั้งวัดค่าความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยทำการเก็บตัวอย่างด้วยวิธีปลอดเชื้อทุก ๆ 3 วันเป็นระยะเวลา 30 วัน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง คัดเลือกหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้สูงสุด 2 สายพันธุ์

2. ศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และสายพันธุ์ AS217

นำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล จำนวน 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ AS107 และสายพันธุ์ AS217 มาทดสอบผลกระทบของสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิต่อการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์

2.1 เตรียมหัวเชื้อ (Inoculum) แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ที่มีความสามารถในการย่อยพาราไนโตรฟีนอลสูงสุด

นำแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้สูงสุดจากข้อ 1.4.2.2 จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ AS107 และ สายพันธุ์ AS217 มาเตรียมเป็นหัวเชื้อ (Inoculum) ตามวิธีการในหัวข้อ 1.4.1

2.2 ศึกษาผลกระทบของความเป็นกรดด่างที่มีต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS 107 และ AS 217

ปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 2.1 มาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้แตกต่างกัน คือ 3, 5 7 และ 9 เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาทีบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycotherm Shaker) รุ่น G-27 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดความขุ่นของเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือก ตามวิธีการในข้อ 1.4.2.2

2.3 ผลกระทบของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์AS107 และสายพันธุ์ AS217 ที่คัดเลือก

ปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 2.1 มาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ 7 แปรผันอุณหภูมิ โดยเลี้ยงเขย่าด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส ด้วย Psycrotherm Shaker รุ่น G-22 และที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องเขย่า Controlled Environment Incubator Shaker เก็บตัวอย่างทุก 6

ชั่วโมง ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อวัดความขุ่นของเชื้อสายพันธุ์สายพันธุ์ AS107 และสายพันธุ์ AS217

3. ศึกษาการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และสายพันธุ์ AS217 ในภาวะที่มีการเติมพาราไนโตรฟีนอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่ไม่มีการเติมพาราไนโตรฟีนอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการบ่มเพาะ

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และ AS217 มาทดสอบการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลในภาวะที่มีการเติมพาราไนโตรฟีนอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่ไม่มีการเติมพาราไนโตรฟีนอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลในภาวะที่การเตรียมเซลล์แบคทีเรียต่างกัน

3.1 เตรียมหัวเชื้อ (Inoculum)

เขี่ยเชื้อโคโลนีบริสุทธิ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และสายพันธุ์ AS217 จากโคโลนีที่เจริญบนอาหารเชื้อแข็ง MBH ที่ผสมเบรนฮาร์ท อินฟิวชัน 3.7 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 1 ลูป (loop) เลี้ยงในอาหารเชื้อเหลว MBH ที่ผสมเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น 3.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวนสายพันธุ์ละ 10 ขวด เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycotherm Shaker รุ่น G-70) 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมพาราไนโตรฟีนอลโดยวิธีปลอดเชื้อลงในขวดหัวเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้น สายพันธุ์ละ 5 ขวด โดยให้มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์แต่ละขวด ส่วนที่เหลืออีกสายพันธุ์ละ 5 ขวดไม่มีการเติมพาราไนโตรฟีนอลลงไป จากนั้น นำขวดหัวเชื้อทั้ง 20 ขวดเลี้ยงเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.2 เตรียมสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรีย (Cell suspension) สำหรับทำการทดสอบการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และ สายพันธุ์ AS217 ไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และล้างเซลล์อีกครั้งด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MBH โดยแยกเซลล์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ออกเป็น 2 จำพวก ได้แก่ เซลล์ที่มีการเติมพาราไนโตรฟีนอลลงไปในระหว่างเตรียมหัวเชื้อและเซลล์ที่ไม่มีการเติมพาราไนโตรฟีนอลลงไป

ในระหว่างการเตรียมหัวเชื้อ เก็บรักษาเซลล์ทั้งสองจำพวกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MBH ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้น นำเซลล์แต่ละชนิดที่เก็บรักษาไว้ในข้อ 3.3 เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MBH ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 250 มิลลิลิตรที่ผสมพาราไนโตรฟีนอล 0.1 มิลลิโมลาร์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้ได้ 1.0

3.3 ตรวจวัดความเข้มข้นของพาราไนโตรฟีนอลที่ลดลง

ทำการตรวจวัดความเข้มข้นของพาราไนโตรฟีนอลที่ลดลง ตามวิธีการในข้อ 1.4.3 โดยทำการตรวจวัดทุก ๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งระดับความเข้มข้นของพาราไนโตรฟีนอลเป็น 0 มิลลิโมลาร์

4. จำแนกและตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และสายพันธุ์ AS217

ในการจำแนกแบคทีเรียใช้หลักการจำแนกตาม Bergy's Manual of Systematic Bacteriology ซึ่งได้ตรวจสอบ ดังนี้

4.1 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยา

สังเกตลักษณะขอบ รูปร่างและลักษณะของโคโลนีเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSB

4.2 การย้อมติดสีแกรม

ใช้แบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง อายุ 24 ชั่วโมง นำไปย้อมติดสีแกรมและศึกษาดูรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์(สูตรสีย้อมแสดงในภาคผนวก ค)

4.3 ลักษณะทางชีววิทยาและชีวเคมี

นำแบคทีเรียทั้งสองมาตรวจสอบทางชีววิทยาและชีวเคมี โดยการ

4.3.1 การทดสอบการเคลื่อนที่

ปลูกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และ AS217 บนอาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility Test Medium) (สูตรแสดงในภาคผนวก ค)โดยแทงเข็มเขี่ยเชื้อลงไปจนสุดหลอดทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ถ้าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้จะมีรอยการเจริญออกจากรอยที่แทงไว้

4.3.2 การสร้างคะตะเลส

ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และ AS217 ที่เจริญในอาหารแข็ง อายุ 24 ชั่วโมง มากระจายลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 % ลงบนเชื้อ ถ้ามีฟองกาซเกิดขึ้น แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างคะตะเลสได้ ให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่เกิดฟองกาซ แสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างคะตะเลสได้ ให้ผลเป็นลบ

4.3.3 การสร้างออกซิเดส

หยดสารเตตระเมธิลพาราฟีนิลไดเอมินไดไฮโดรคลอไรด์ (Tetramethyl Paraphenyl diamine dihydrochloride) เข้มข้น 1% ลงบนกระดาษกรองจนชุ่ม แล้วใช้ลวดแพลตินัมเขี่ยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และ AS217 จากอาหารแข็ง ป้ายบนกระดาษกรอง ถ้าเกิดสีม่วงขึ้นภายใน 10 วินาที แสดงว่าให้ผลเป็นบวก สีที่เกิดขึ้นเนื่องจากแบคทีเรียมีการสร้างไซโตโครมออกซิเดส (Cytochrome oxidase) โดย N,N,N,N-Tetramethyl paraphenyl diamine dihydrochloride ถูกออกไซด์โดย Oxidized Cytochrome C จะเกิดสีม่วงของ Wurster's blue ถ้าไม่เกิดสีม่วง แสดงว่าแบคทีเรียไม่สร้างเอนไซม์ไซโตโครม ออกซิเดส (Cytochrome Oxidase)

4.3.4 การทดสอบการสร้างอินโดล (Indole)

ถ่ายแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และ AS217 ลงในอาหารเหลวทริปโตเฟน (Trytophane Broth) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง(สูตรแสดงในภาคผนวก ค) ทดสอบการสร้างอินโดลโดยหยดสารละลายโคแวคส์ (Kovacs Reagent) 1-2 หยด ถ้าเกิดสีชมพูขึ้นแสดงว่าแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ทริปโตฟานเนส (Trytophanase) ย่อยสลายทริปโตเฟนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อินโดล ถ้าไม่เกิดสีแสดงว่าให้ผลเป็นลบ

4.3.5 การสร้างยูรีเอส

ถ่ายแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และ AS217 ลงในอาหารคริสเตนส์ยูเรีย (Christensen's Urea) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-4 วัน(สูตรแสดงในภาคผนวก ค) ถ้าปรากฏสีชมพูเข้มบนอาหาร แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างยูรีเอสย่อยสลายยูเรียให้แอมโมเนียออกมา ทำให้อาหารมีสภาพเป็นด่าง จึงเปลี่ยนสีฟีนอลเรดจากสีส้ม (พีเอช 6.8) กลายเป็นสีชมพูเข้ม (พีเอช 8.1) ให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีอาหารให้ผลเป็นลบ

4.3.6 การใช้ไนเตรท

ถ่ายแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และ AS217 ลงในอาหารเหลวไนเตรท (Nitrate Broth) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (สูตรแสดงในภาคผนวก ค)ตรวจสอบไนไตรท์ที่เกิดขึ้นโดยการเติมกรดซัลฟานิลิค(Sulfanilic Acid) 2-3 หยด และแอลฟาแนพทิลลามีน (α-Naphthylamine) ลงไปตามลำดับ ถ้าเกิดสีแดง ภายใน 30 วินาทีให้ผลเป็นบวก สีแดงที่เกิดขึ้นเนื่องจากไนไตรท์ที่เกิดขึ้นทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟานิลิก (Sulfanilic Acid) ได้สารประกอบประเภทเกลือไดโซเนียม (Dizonium) และเกลือที่เกิดขึ้นนี้จะรวมตัวกับแนพทิวลามีน (Napthylamine) ทำให้เกิดสีแดงของอะโซดาย (Azodye) ที่ละลายน้ำได้ แต่ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงให้ผลเป็นลบ บางครั้งไนไตรท์ที่เกิดขึ้นทั้งหมดจะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย อาหารจึงไม่เปลี่ยนสี ดังนั้นจึงต้องใส่ผงสังกะสีลงไปทดสอบ ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดงเนื่องจากสังกะสีไปดึงออกซิเจนออกจากไนเตรทให้กลายเป็นไนไตรท์ แสดงว่าเชื้อไม่สามารถใช้ไนเตรทได้ ให้ผลเป็นลบ ถ้าไม่เกิดสีแดง แสดงว่าไนไตรท์เปลี่ยนเป็นแอมโมเนียหมด ให้ผลเป็นบวก

4.3.7 การใช้ซิเตรท

ถ่ายแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และ AS217 ลงในอาหารซิมมอนส์ซิเตรท (Simmon's Citrate Agar) (สูตรแสดงในภาคผนวก ค) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-7 วัน เชื้อที่สามารถใช้ซิเตรทได้ จะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ บนอาหารจากสีเขียวกลายเป็นสีน้ำเงิน เนื่องจากเชื้อสามารถใช้โซเดียมซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แอมโมเนียฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ทำให้ได้แอมโมเนียที่มีคุณสมบัติเป็นเบส ทำให้บรอมไทมอลบูลเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน ถ้าเชื้อไม่สามารถใช้โซเดียมซิเตรทได้ อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีเขียวไม่เปลี่ยนแปลง

4.3.8 การสร้างเจลาติเนส

ถ่ายแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และ AS217 ลงในหลอดอาหารเจลาติน บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (สูตรแสดงในภาคผนวก ค) แล้วนำหลอดเลี้ยงเชื้อไปแช่เย็น 30 นาที ทำการเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ถ้าหลอดที่ใส่เชื้อสูญเสียการแข็งตัว แสดงว่าเชื้อสร้างเจลาติเนสย่อยเจลาตินได้ ให้ผลเป็นบวก

4.3.9 การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์

ถ่ายแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และ AS217 ที่ต้องการทดสอบลงในอาหารแข็งทีเอสไอ (TSI Agar) (สูตรแสดงในภาคผนวก ค)2 ครั้งต่อ 1 หลอด ครั้งที่สอง ลากไปบนผิวอาหารที่เอียง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตดูการเปลี่ยนสีของอาหารเชื้อที่ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้จะให้สีดำของเฟอรัสซัลไฟด์ตามรอยที่ปลูกเชื้อ ให้ผลเป็นบวก นอกจากนี้ อาหาร TSI Agar ยังสามารถทดสอบได้ 2 ชนิด คือการทดสอบการใช้น้ำตาลและการทดสอบการเกิดกาซ เพราะในอาหารมีน้ำตาล 3 ชนิด คือ กลูโคส 1 ส่วน แลกโตส 10 ส่วน และซูโครส 10 ส่วน มีฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ ดังนั้นถ้าแบคทีเรียใช้น้ำตาลในขบวน

I19002907

การหมัก(Fermentation) ได้จะเจริญที่ก้นหลอด แต่ถ้าใช้น้ำตาลในขบวนการออกซิเดชั่น (Oxidation) จะเกิดการเจริญที่ผิวหน้าของอาหาร แบคทีเรียที่ใช้กลูโคสได้อย่างเดียวในกระบวนการหมัก จะทำให้มีกรดเกิดน้อยจึงมีสีเหลืองเฉพาะที่ก้นหลอด ส่วนที่ผิวจะมีสีแดง ถ้าใช้ซูโครสหรือแลกโตสด้วยจะมีสีเหลืองที่ผิวอาหาร เพราะมีกรดเกินจำนวนมาก ถ้าไม่มีสีเลย แสดงว่าไม่มีการหมัก และถ้ามีกาซเกิดขึ้นจากการใช้น้ำตาล ฟองกาซจะอยู่บนวุ้นอาหาร

4.3.10 การทดสอบความสามารถของการใช้น้ำตาล

ถ่ายแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และ AS217 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทดสอบการใช้น้ำตาล (Phenol Red Broth Base) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลที่ใช้ทดสอบ 1% (สูตรแสดงในภาคผนวก ค)บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง สังเกตการสร้างกรด ถ้าเชื้อสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้ จะสร้างกรดขึ้นมา ทำให้อินดิเคเตอร์ฟีนอลเรดในอาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง ให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีให้ผลเป็นลบ

5. นำแบคทีเรียสายพันธุ์ AS 107 และ AS 217 มาทดลองใช้กับน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม

5.1 เตรียมหัวเชื้อ (Inoculum) สำหรับเติมในน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม

เขี่ยเชื้อโคโลนีบริสุทธิ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และ AS217 จากโคโลนีที่เจริญบนอาหารเชื้อแข็ง MBH ที่ผสมเบรนฮาร์ท อินฟิวชัน 3.7 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 1 ลูป (loop) เลี้ยงในอาหารเชื้อเหลว MBH ที่ผสมเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น 3.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวนสายพันธุ์ละ 10 ขวด เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycotherm Shaker รุ่น G-70) 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีและปั่นล้างเซลล์อีกครั้งด้วย Phosphate-buffered Saline(PBS) (ภาคผนวก ข) การเตรียมแบคทีเรียสำหรับการเติมในน้ำทิ้งทำได้โดยการนำเซลล์แต่ละสายพันธุ์ที่ปั่นแยกได้มาเติม PBS ผสมส่วนเซลล์ให้เข้ากับ PBS นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับค่าการดูดกลืนแสงให้ได้ 1.0 ด้วย PBS นำสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดมาใช้เป็นหัวเชื้อ (seed)เพื่อเติมในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่อไป

5.2 ศึกษาผลของการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107, AS217 และสายพันธุ์ผสม AS 107 และ AS 217 ต่อคุณภาพน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม

เติมน้ำทิ้งจากบ่อเติมอากาศของโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อมปริมาตร 8 ลิตร ลงในตู้กระจกขนาด 25 x 50 x 50 เซนติเมตร จำนวน 4 ถัง โดยถังที่ 1 เป็นชุดควบคุม ไม่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และ AS217 ถังที่ 2 และ 3 ใส่หัวเชื้อแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่ได้เตรียมไว้ตามข้อ 5.1 อย่างละถัง และในถังที่ 4 ใส่เชื้อผสมแบคทีเรียสายพันธุ์ AS107 และ AS217 ที่เตรียมไว้ เก็บตัวอย่างน้ำในแต่ละถังทุกวัน ตลอด 2 สัปดาห์ นำมาวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าความสกปรกในรูปซีโอดี และพาราไนโตรฟีนอลที่ตกค้างอยู่ในน้ำทิ้ง