บทที่ 3
วิธีการดำเนินวิจัย

อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี

สารเคมี

1. สารละลายคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet)
2. สารละลายไอโอดีน (Gram's iodine)
3. สารละลายซาฟรานิน (Safranin)
4. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% (0.85% NaCl)
5. สารละลายมาตรฐานแมคฟาร์แลนด์ 0.5 (0.5 Mcfarland standards)
6. สารรีเอเจนต์ R1 (R1 reagent) (แสดงองค์ประกอบในภาคผนวก ค)
7. กรดแอสคอร์บิก 1% (1% Ascorbic) (แสดงองค์ประกอบในภาคผนวก ค)
8. แอลกอฮอล์ 95% (95% Ethanol)

อุปกรณ์

1. พลั่ว (Shovel)
2. ถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง (Plastic bags)
3. กล่องน้ำแข็ง (Ice box)
4. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
5. เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
6. ช้อนตักสาร (Spatula)
7. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
8. ปากคีบ (Forcep)
9. หลอดหยด (Dropper)
10. สไลด์ (Slide)

สถาบันวิทยบริการ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

11. กระดาษกรอง เบอร์ 0.25 (Filter papers no. 0.25)
12. กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium foil)
13. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp stainless)
14. ปิเปตต์ (Measuring pipette) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
15. เครื่องดูดจ่ายสารละลายแบบอัตโนมัติ (Autopipette) ขนาด 10 – 100 ไมโครลิตร และ 100 – 1000 ไมโครลิตร

16. ทิป (Tip) สำหรับเครื่องดูดจ่ายสารละลายแบบอัตโนมัติ
17. บีกเกอร์ (Beaker)
18. กระบอกตวง (Graduated cylinder)
19. หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร
20. หลอดเซนติฟิวจ์ (Centrifuge tube)
21. ที่ตั้งหลอด (Rack)
22. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
23. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งสาร 2 ตำแหน่ง (Precision balance) รุ่น MS 1602S ยี่ห้อ Mettler Toledo
2. เครื่องชั่งสาร 3 ตำแหน่ง (Digital balance) รุ่น CG1003 ยี่ห้อ Metter Toledo
3. เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง (Analytical balance) รุ่น XT 220 ยี่ห้อ Precis
4. เตาให้ความร้อน (Hot plate) ยี่ห้อ Rommelsbacher
5. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) ยี่ห้อ Vortex genie 2
6. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น S20-K ยี่ห้อ Toledo
7. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น Eclipse E200 ยี่ห้อ Nikon
8. กล้องสเตอริโอ (Stereo microscope) รุ่น SMZ-10 DIA STAND ยี่ห้อ Binocular
9. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave) รุ่น HVE-50 ยี่ห้อ Hirayama
10. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) รุ่น 88 – 500 ยี่ห้อ Memmert
11. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น SHO – 2D ยี่ห้อ Wiseshake
12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV – VIS Spectrophotometer) ยี่ห้อ Labomed รุ่น SPEKOL 1300 SA
13. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ Thermo Sciencetific รุ่น Legend Mach 1.6R
14. ตู้เย็นแช่อาหารเลี้ยงเชื้อ (Deep freezer) รุ่น SBC – 3DB ยี่ห้อ Sanyo
15. ตู้เย็นแช่เชื้อจุลินทรีย์ (Deep freezer) รุ่น MDF – 053V ยี่ห้อ Sanyo
16. ตู้เย็นแช่เชื้อจุลินทรีย์ (Deep freezer) รุ่น R – Z400R ยี่ห้อ Hitachi
17. ตู้ดูดควันสารเคมี (Ductless fume hood) รุ่น SPD – 3A1 ยี่ห้อ ESCD
18. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) รุ่น Model BV. 124 ยี่ห้อ ISSCO

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏราไพพรรณี

อาหารเลี้ยงเชื้อ (สูตรอาหารและวิธีการเตรียมแสดงดังภาคผนวก ก)

1. Pikovskaya's agar (PVK)
2. Pikovskaya's broth
3. Nutrient agar (NA)

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (สูตรอาหารและวิธีการเตรียมแสดงดังภาคผนวก ข)

1. การผลิตเอนไซม์แคตาเลส (Catalase test)
2. การผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test)
3. การเคลื่อนที่ (Motility test)
4. การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (Urease test)
5. การผลิตอินโดล (Indole production test)
6. การใช้น้ำตาลกลูโคส (Glucose test)
7. การใช้ซิเตรท (Citrate utilization test)
8. การหมักน้ำตาล 3 ชนิด (Triple sugar iron agar (TSI) test)
9. สภาวะที่มีออกซิเจน – ไม่มีออกซิเจน (Oxidative - Fermentative test)
10. การย่อยสลายไลซีน (Lysine test)
11. การย่อยสลายเจลาติน (Gelatin hydrolysis)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การกำหนดจุดเก็บตัวอย่างดิน

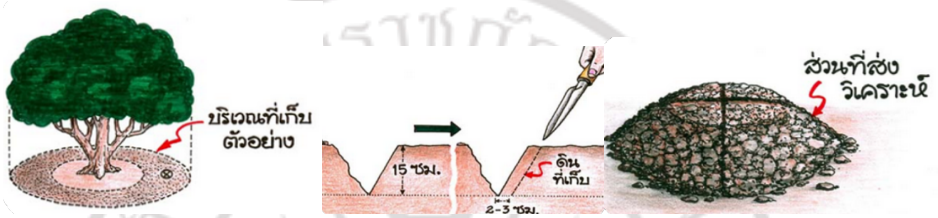
เก็บตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่สวนผลไม้บ้านโป่งแรด ตำบลพลับพลา อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี ทั้งหมด 5 หมู่บ้าน รวมเป็นจำนวน 10 ตัวอย่างดิน โดยกำหนดจุดเก็บตัวอย่างด้วยโปรแกรม Google Earth และใช้เครื่องระบุพิกัดภูมิศาสตร์ (Global Position System; GPS) ในการระบุจุดเก็บตัวอย่างดินในแต่ละพื้นที่สวน (กรมพัฒนาที่ดิน, 2557)

2. การเก็บตัวอย่างดิน

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

วิธีการเก็บตัวอย่างดินเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียย่อยสลายฟอสเฟตโดยวิธีการแบบสุ่ม (Random sampling) ตามวิธีการรายงานโดยกรมพัฒนาที่ดิน (2557) ในแต่ละพื้นที่สวน ทำการเก็บตัวอย่างดินรอบทรงพุ่ม (ภาพที่ 3.1ก) ต้นละ 5 จุด ใช้พลั่วขุดดินเป็นรูปตัววีที่ความลึกประมาณ 15 เซนติเมตร โดยแซะดินข้างหลุมให้เรียบ ใช้พลั่วขุดดินหนาประมาณ 2 – 3 เซนติเมตร จนถึงก้นหลุม (ภาพที่ 3.1ข) เก็บดินรวบรวมใส่ถุง จากนั้นนำดินที่เก็บมาเทลงบนผ้าพลาสติกคลุกเคล้าให้เข้ากันอีกครั้งโดยยกมุมผ้าพลาสติกขึ้นทีละ 2 มุม ที่อยู่ตรงข้ามกัน ทำหมุนสลับกัน 3 – 4 ครั้ง กองดินเป็นรูปฝาชีแล้วใช้มือตบให้แบนราบ หลังจากนั้นใช้นิ้วมือขีดเป็นรูปกากบาทบนยอดกองจะได้ดินที่ถูกแบ่ง

ออกเป็น 4 ส่วน (ภาพที่ 3.1ค) เลือกเก็บดินหนึ่งส่วนใส่ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เขียนป้ายระบุแปลงที่เก็บตัวอย่าง เก็บดินในกล่องน้ำแข็งเพื่อรักษาสภาพตัวอย่างก่อนนำมาคัดแยกเชื้อที่ห้องปฏิบัติการและศึกษาลักษณะทางกายภาพของดิน ได้แก่ ลักษณะสีของดิน เนื้อดิน อุณหภูมิ และพีเอช



ก. ข. ค.

ภาพที่ 3.1 การเก็บตัวอย่างดิน
ก. การเก็บตัวอย่างดินรอบทรงพุ่ม
ข. ขุดดินเป็นรูปตัววีลึก 15 ซม.
ค. กองดินเป็นรูปฝาชีแบ่งออกเป็น 4 ส่วน นำ 1 ส่วนมาวิเคราะห์
ที่มา : กรมพัฒนาที่ดิน, 2557

3. **การคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟต**

การทดสอบในขั้นนี้ดัดแปลงจากสุภาพร จันรุ่งเรือง เบญจมาส รสโสภา และกรรณิการ์ สัจจาพันธ์ (2553) รวมทั้งรายงานวิจัยของ Keneni, Assefa & Prabu (2010) โดยนำตัวอย่างดินปริมาณ 5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ที่บรรจุอาหารเหลว Pikovskaya's broth (PVK) (สูตรกรัม/ลิตร: yeast extract 0.5, glucose 10.0, $Ca_3(PO_4)_2$ 5.0, $(NH_4)_2SO_4$, 0.5, $MgSO_4$ 0.1, $MnSO_4$ 0.002, $FeSO_4$ 0.002, NaCl 0.2, KCl 0.2, Agar 15) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มฟลาสก์บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียให้มีปริมาณมากขึ้นโดยถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ 3 ครั้ง จนสังเกตพบว่าเชื้อมีความขุ่นเพิ่มมากขึ้น จึงแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PVK บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7-14 วัน สังเกตการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตได้จากบริเวณโซนใสรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะแตกต่างกันมาทำให้บริสุทธิ์โดยการขีดเชื้อซ้ำบนอาหารแข็ง PVK เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง PVK ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

4. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟต

นำเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PVK มาเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ (Cell suspension) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 Mcfarland (มีปริมาณเชื้อ 1.5 x 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร) จากนั้นหยดสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนดิสก์มาตรฐาน นำแผ่นดิสก์ไปวางบนผิวหน้าอาหารแข็ง PVK บ่มเพลทที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน วัดความกว้างวงใสที่เกิดขึ้น แล้วคำนวณค่าดัชนีการละลาย (Solubilization Index; SI) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Karpagam & Nagalakshmi (2014) คำนวณค่าดัชนีการละลายดังสมการ SI = (Disk diameter + Clear zone)/ Disk diameter หลังจากนั้นคัดเลือกแบคทีเรีย PSB ที่มีค่าดัชนีการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟตสูงที่สุด 2 อันดับแรก สำหรับการทดสอบขั้นตอนต่อไป

5. การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถละลายฟอสเฟต

นำแบคทีเรียไอโซเลทที่ละลายฟอสเฟตได้ในปริมาณสูงจากข้อ 4 มาวิเคราะห์ผลทางชีวเคมีเบื้องต้นเพื่อจำแนกในระดับจีนัส ดังนี้

5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยวิธีการย้อมสีแบบแกรม

นำแบคทีเรียไอโซเลทที่ละลายฟอสเฟตได้ในปริมาณสูงมาตรวจดูรูปร่างลักษณะการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

5.2 ทดสอบผลทางชีวเคมี

จัดจำแนกจีนัสของแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกจากข้อ 4 โดยใช้ผลทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นตามคู่มือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) ร่วมกับหนังสือการจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมลบของสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ (2552)

6. การศึกษาปริมาณการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟตของแบคทีเรีย PSB

การทดสอบในขั้นนี้ดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Atekan และคนอื่น ๆ (2014) โดยหยดสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ในอาหารเหลว PVK (ชุดที่ 1 เติมแคลเซียมฟอสเฟต 0.5 กรัม/ลิตร ชุดที่ 2 เติมเฟอร์ริกฟอสเฟต 5 กรัม/ลิตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน (ทำ 3 ซ้ำ) โดยมีชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ (uninoculated control) เก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ทุกวัน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตโดยนำตัวอย่างมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เพื่อกรองฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำออก และนำส่วนที่ได้จากการกรองมาปั่นแยกตะกอนเซลล์ (13,000 รอบ/นาที 15 นาที 4 องศาเซลเซียส) วิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสโดยวิธีมาตรฐาน Molybdenum blue method โดยนำส่วนใสปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาผสมกับ Barton's reagent 2.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรของ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

สารด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 50 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างสารนาน 10 นาที จึงนำสารทดสอบไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร พร้อมกันนี้วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดพีเอช

7. การพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตพร้อมใช้

งานวิจัยในขั้นนี้เป็นการนำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงจากการคัดเลือกในข้อ 6 มาพัฒนาให้อยู่ในรูปหัวเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสูตรน้ำ (Liquid formulation) โดยเตรียมหัวเชื้อพร้อมใช้ในรูปของเซลล์ที่มีชีวิตจำนวนมาก (~ 10^8 cfu/ml) เก็บรักษาหัวเชื้อในสูตรน้ำ (Liquid formulation) ที่แตกต่างกัน 5 สูตร ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ชนิดของหัวเชื้อสูตรน้ำที่ทดสอบในงานวิจัย

Liquid formulation	องค์ประกอบ	อ้างอิง
1	Phosphate Buffer (PB) (KH_2PO_4)	Goljanian-Tabrizi, S. et al., 2016
2	Diluted nutrient broth containing 4% glycerol (DNB+G)[a]	Goljanian-Tabrizi, S. et al., 2016
3	PVK Broth + PVP 2.5% (v/v) (PVK+P)[b]	Surendra Gopal & Baby, 2016
4	Beef extract + Molasses (BM)[c]	พัชรีญา ไพรบึง และสุมินตรา แซงบุญเรือง, 2561
5	Phosphate Buffer containing molasses (PBM)[d]	บุษราคัม ภูธรมิตร, 2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

[a]เตรียมโดยเจือจางอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ด้วยน้ำกลั่นที่มีปริมาตรเป็น 3 เท่า และเติม Glycerol 4% (v/v)

[b]เตรียมอาหารเหลว Pikovskaya (PVK broth) และเติม Polyvinylpyrrolidone (PVP) 2.5% (v/v)

[c]เตรียมอาหาร BM โดยใช้สูตรกรัมต่อลิตร : Beef extract 3 กรัม, Molasses 20 กรัม, K_2HPO_4 0.05 กรัม, KH_2PO_4 0.15 กรัม

[d]เตรียมอาหาร PBM โดยใช้กากน้ำตาล : ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 5 : 20

ทำการทดลองโดยปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ความขุ่นเท่ากับ 0.5 Mcfarland) วิธีการเตรียมตามข้อ 4 ลงในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 99 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ (0.85% NaCl) ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ให้เท่ากับ OD_{540} = 0.5 และเติมหัวเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน Liquid formulation ทั้ง 5 สูตร นำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บรักษาหัวเชื้อแต่ละสูตรในภาชนะขวดแก้วปิดผนึกปลอดเชื้อหุ้มด้วยฟอยล์เพื่อป้องกันแสง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 เดือน เพื่อจำลองสภาวะการเก็บรักษาในสภาพการใช้งานจริงของผู้จำหน่ายและเกษตรกรผู้ใช้งาน เก็บผลการทดลองโดยการนับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตทุกเดือน เป็นเวลา 3 เดือน และทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตบนอาหาร PVK ในเดือนที่ 3 (Goljanian-Tabrizi et al., 2016)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี