บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
2. หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 16 x 150 และ 18 x 150 มิลลิลิตร
3. เมมเบรนฟิลเตอร์ (membrance filter and filter holder) ขนาด 0.2 ไมครอน
4. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
5. paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
6. ปิเปต (measuring pipette) ขนาด 1, 5 และ10 มิลลิลิตร
7. กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 5 มิลลิลิตร
8. พาราฟิล์ม (parafilm)
9. หลอดเซนติฟิวจ์ (centrifuge tube)
10. ทิป (tip) ขนาด 0.5 – 10, 20 – 200 และ 100 – 1000 ไมโครลิตร

เครื่องมือ

1. เครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ยี่ห้อ BRUKER
2. เครื่องอบความร้อนแห้ง (hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น 600
3. ตู้ปลอดเชื้อ (larminar air flow) ยี่ห้อ ISSCO รุ่น Model Bv.124
4. ตู้ปลอดเชื้อ (larminar air flow) ยี่ห้อ BossTech รุ่น HVB120SE
5. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator) ยี่ห้อ Wise Cube
6. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (microscope) ยี่ห้อ Nikon รุ่น ECLIPSE E200
7. เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Mettle รุ่น S20-K
8. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ METTLE รุ่น NS 1602S
9. เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Precisa รุ่น XT 220A
10. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) ยี่ห้อ Mecasys รุ่น Optizen POP
11. เครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader) ยี่ห้อ Metertech รุ่น $M965^{+}$
12. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ยี่ห้อ Thermo sciencetific รุ่น Legend mach 1.6R

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

อาหารเลี้ยงเชื้อ (สูตรอาหารและวิธีการเตรียมแสดงดังภาคผนวก ก)

1. Mineral Salt Medium (MSM)
2. 30% Luria Bertani Agar (30% LB)
3. Nitrogen-Free Agar (NFA)
4. Pikovskaya Agar (PVK)
5. Tryptone water
6. Nutrient Agar (NA)

สารเคมี (สูตรอาหารและวิธีการเตรียมแสดงดังภาคผนวก ก)

1. สารกำจัดวัชพืชชนิดไกลโฟเสท มีสารออกฤทธิ์ (active ingredient) 48% (w/v) และทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่าน membrane filter ที่มี pore size 0.2 ไมครอน เติมลงในอาหาร MSM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (Moneke Okapala & Anyanwu, 2010 : 4068)
2. สารละลายนอร์มัลซาไลน์ (0.85% NaCl)
3. 0.5 McFarland standard
4. Kovac's indole reagent
5. Salkowski's reagent

วิธีการทดลอง

1. แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 62 ไอโซเลท แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ซึ่งคัดแยกจากดินสวนผลไม้จังหวัดจันทบุรี แสดงข้อมูลและรหัสไอโซเลทดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชที่ทำการทดลอง

กลุ่มแบคทีเรีย	จำนวน (ไอโซเลท)	รหัสไอโซเลท	คัดแยกโดย
แบคทีเรียย่อยสลายสารกำจัดวัชพืช	16	KaH01-5, KhH02-6, ThH02-1, ThH02-3, NaH01-1, NaH02-2, NaH02-4, MaH01-1, MaH01-5, MaH02-3, MaH02-7, MuH01-4, SoH01-1, SoH02-4, LaH02-1, LaD02-2	จิราพร ทำเนียบ, ปิยมาศ คงศรี และศุภรัตน์ สมตระกูล ,2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชที่ทำการทดลอง (ต่อ)

กลุ่มแบคทีเรีย	จำนวน (ไอโซเลท)	รหัสไอโซเลท	คัดแยกโดย
แบคทีเรียทนแล้ง	19	KaD01-2, KaD02-1, KlD01-2, KlD02-6, KhD02-1, ThD01-4, ThD02-2, NaD01-2, NaD02-1, PoD01-2, PoD02-4, MaD01-7, MaD02-7, MuD01-2, MuD02-5, SoD01-1, SoD02-3, LaD01-2, LaD02-2	ปิยนันท์ อภิบาลศรี, ภัทรนันท์ อารีเพื่อน และ สิทธิพงษ์ ธรรมมุทิศ, 2558
แบคทีเรียปฏิปักษ์	18	KaB02-2, KlB01-4, KlB01-7, KlB02-2, ThB01-5, ThB02-2, NaB01-6, NaB01-7, NaB01-8, PoB02-5, MaB01-6, MaB01-12, MaB02-1, MuB02-3, SoB01-7, SoB02-3, SoB02-4, LaB01-4	นภัสกร นาคสกุล, นิภาพร ทองพลู และอัสรัศมิ์ แสงน้อย, 2558
แบคทีเรียละลายฟอสเฟตทนร้อน	9	RB1-4-1, RB1-4-2, RB1-4-3, RB4-1-2, RB5-1-1, RB5-1-2, RB5-3-1, RB5-3-3, RB5-3-4	จิรภัทร จันทมาลี และ อัจฉรา เจริญรูป, 2559

2. การคัดเลือกแบคทีเรียพีจีพีอาร์ที่สามารถเจริญบนอาหารแข็งที่เติมไกลโฟเสท

การเตรียมหัวเชื้อทำโดยขีดโคโลนีเดี่ยวของแต่ละไอโซเลทที่เจริญบนอาหารแข็ง Luria Bertani ที่มีความเข้มข้น 30% (w/v) (การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียย่อยสลายสารกำจัดวัชพืชโดยใช้สารอาหารที่ไม่ครบสมบูรณ์จะช่วยรักษาคุณสมบัติในการย่อยสลายสารทดสอบของเชื้อ) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

งานวิจัยขั้นแรกเป็นการทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียพีจีพีอาร์ทั้ง 62 ไอโซเลท ในอาหารที่เติมไกลโฟเสทเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก โดยขีด (streak) เชื้อบนผิวหน้าอาหารแข็ง MSM ที่เติมไกลโฟเสทความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตผลการเจริญของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท

3. การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียพีจีพีอาร์ในอาหารเหลวที่เติมไกลโฟเสท

การทดสอบในขั้นนี้ทำโดย inoculate โคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย (เพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA อายุ 24 ชั่วโมง) ที่ได้คัดเลือกจากข้อ 2 ลงในขวดแก้วขนาดเล็กที่บรรจุอาหารเหลว MSM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมไกลโฟเสทความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญของเชื้อ ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

4. การทดสอบลักษณะการเจริญของแบคทีเรียพีจีพีอาร์ในอาหารเหลวที่เติมไกลโฟเสท

การทดสอบลักษณะการเจริญของแบคทีเรียพีจีพีอาร์ไอโซเลทที่คัดเลือกจากข้อ 2 และ 3 ในอาหารเหลวที่เติมไกลโฟเสทเป็นแหล่งคาร์บอน เตรียมสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standards (มีปริมาณเซลล์ 1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร) ถ่ายเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว MSM ที่เติมไกลโฟเสท 0.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง เพื่อวัดค่าการเจริญที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

5. การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไกลโฟเสทของแบคทีเรียพีจีพีอาร์ไอโซเลทที่คัดเลือก ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

การทดสอบในขั้นตอนนี้เป็นการวิเคราะห์การย่อยสลายไกลโฟเสทของพีจีพีอาร์จากข้อ 4 โดยการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำ culture broth มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนใส (culture supernatant) ถ่ายลงในหลอดใหม่และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ทำซ้ำเช่นเดิม 2 รอบ เพื่อเก็บเฉพาะส่วน supernatant ไปวิเคราะห์การลดลงของไกลโฟเสทด้วยเครื่อง FTIR คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไกลโฟเสทสำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป

6. การศึกษาความสามารถในการใช้ไกลโฟเสทในการเป็นแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งฟอสฟอรัสของแบคทีเรียพีจีพีอาร์ไอโซเลทที่คัดเลือก

การทดสอบในขั้นนี้ ทำตามวิธีของ Moneke และคนอื่น ๆ (2010) ที่มีการดัดแปลงบางส่วน โดยถ่ายเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่ปรับความขุ่นแล้ว ลงในอาหารเหลว MSM ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ที่ดัดแปลงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแบ่งเป็นสภาวะต่าง ๆ ได้แก่ 1) ทดสอบการใช้ไกลโฟเสทเป็นแหล่งคาร์บอน (MSM ที่เติมไกลโฟเสทความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร) 2) ทดสอบการใช้ไกลโฟเสทเป็นแหล่งฟอสฟอรัส (MSM ที่เติมไกลโฟเสทความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร และกลูโคส แต่ไม่เติมฟอสเฟต) 3) ชุดควบคุม (MSM ที่เติมไกลโฟเสทความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อ

ลิตร แต่ไม่เติมฟอสเฟตและกลูโคส) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง เพื่อวัดค่าการเจริญที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

7. การเพิ่มศักยภาพการย่อยสลายไกลโฟเสทของแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือก

7.1 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียพีจีพีอาร์ไอโซเลทที่คัดเลือกในสภาวะที่เติมแหล่งคาร์บอนร่วมกับไกลโฟเสท

การทดสอบในขั้นตอนนี้ ได้ทำตามวิธีของ Benslama และ Boulahrouf (2013) ที่มีการดัดแปลงบางส่วน โดยถ่ายเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว MSM ที่เติมไกลโฟเสทความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 90 มิลลิลิตร และเติมแหล่งคาร์บอนร่วมชนิดต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ กลูตาเมท (glutamate) ยีสต์สกัด (yeast extract) และกลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้น 0.1% (w/v) จากนั้น นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง เพื่อวัดค่าการเจริญที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

7.2 การทดสอบความสามารถในการทนต่อไกลโฟเสทที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของไอโซเลทที่คัดเลือก

การทดสอบความสามารถในการทนต่อระดับความเข้มข้นของไกลโฟเสทที่แตกต่างกัน ของไอโซเลทที่คัดเลือก โดยปิเปตอาหารเหลว MSM ที่เติมแหล่งคาร์บอนร่วมที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ (จากการคัดเลือกข้อ 7.1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate จากนั้นเติมไกลโฟเสทความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 และ 16 กรัมต่อลิตร โดยการเจือจางแบบ 2-fold dilution จากสารที่มีความเข้มข้นสูงสุด แล้วจึงเติมสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อทดสอบ (2×10^5 CFU/มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ 96 well plate บ่มเพลทที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดการเจริญของเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate readers

8. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียพีจีพีอาร์ไอโซเลทที่คัดเลือก

การทดสอบในขั้นนี้เป็นการศึกษาลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียพีจีพีอาร์ไอโซเลทที่คัดเลือก โดยการศึกษา ขนาด การสร้างรงควัตถุ รูปร่างโคโลนี ลักษณะขอบโคโลนี ลักษณะการยกตัวของผิวโคโลนี จากนั้นศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรีย ได้แก่ ชนิดแกรม และรูปร่างเซลล์แบคทีเรีย

9. การทดสอบผลของแบคทีเรียพีจีพีอาร์ไอโซเลทที่คัดเลือกต่อการเจริญของเมล็ดข้าว

9.1 การเตรียมเมล็ดข้าว

ในงานวิจัยนี้ใช้เมล็ดข้าวหอมมะลิพันธุ์ 105 โดยนำเมล็ดข้าว 5 กรัม แช่น้ำ 24 ชั่วโมง เลือกเฉพาะเมล็ดข้าวที่จมน้ำมาฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีของ Andriani et al. (2017) อ้างถึงโดย กนกวรรณ สิงห์ศรีกาญจน์ (2560 : 35) ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าว โดยแช่โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium

hypochlorite) ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) จากนั้นล้างด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 5 นาที ผึ่งเมล็ดข้าวให้แห้งในตู้ปลอดเชื้ออีกครั้ง และนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

9.2 การเคลือบเมล็ดข้าว

การเคลือบเมล็ด ทำตามวิธีของ กนกวรรณ สิงห์ศรีกาญจน์ (2560 : 36) เตรียมหัวเชื้อ โดยนำแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA อายุ 24 ชั่วโมง ขูดโคโลนีใส่ในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปิเปตต์หัวเชื้อแบคทีเรียพีจีพีอาร์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไกลโฟเสท (จากการคัดเลือกในข้อ 5) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงอาหารเหลว TSB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเขย่า 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4°C 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ ปิเปตต์ใส่ในฟลาสก์ที่มีสารละลายนอร์มัลซาไลน์ปริมาตร 45 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 (หรือเทียบเท่าปริมาณเชื้อ 1×10^{10} เซลล์/มิลลิลิตร)

นำหัวเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีการเติม 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) CMC และใส่เมล็ดข้าว 5 กรัมที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ/ฟลาสก์ บ่มเขย่า 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทอาหารเหลว TSB และผึ่งเมล็ดข้าวที่ผ่านการเคลือบแบคทีเรียให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ

9.3 ทดสอบผลของสารละลายไกลโฟเสทต่อความงอกและการเจริญของเมล็ดข้าว

การทดลองในขั้นนี้ดัดแปลงวิธีมาจาก Andriani, Aini & Hadiastono (2017 : 996) โดยใช้สารละลายไกลโฟเสทความเข้มข้น 0.5 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร แบ่งชุดทดลองนี้

(1) ชุดควบคุม (เมล็ดข้าวไม่เคลือบแบคทีเรีย ไม่แช่ไกลโฟเสท)

(2) ชุดทดลอง (เมล็ดข้าวไม่เคลือบแบคทีเรีย แช่ไกลโฟเสท)

(3) ชุดทดลอง (เมล็ดข้าวเคลือบแบคทีเรีย แช่ไกลโฟเสท)

นำเมล็ดข้าวในแต่ละชุดทดลองวางเรียงในกล่องพลาสติกใสขนาด 9×11×13 นิ้ว ที่รองด้วยกระดาษทิชชู 5 แผ่น และเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 40 มิลลิลิตร วางเรียงเมล็ดข้าวจำนวน 60 เมล็ดต่อ 1 กล่อง บ่มกล่องพลาสติกที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

บันทึกผลการเจริญของเมล็ดข้าวในวันที่ 14 ของแต่ละชุด โดยวัดความยาวปลายยอด ความยาวปลายราก ในหน่วยมิลลิเมตร นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD)