อุปกรณ์และวิธีทดลอง

ก. เครื่องมือ

1. หม้อนึ่งอัดไอ
2. ตู้อบ
3. Water bath
4. Environmental chamber Mark III, Lab-Line Instrument
5. เครื่องชั่งอย่างละเอียด
6. ตู้เย็น
7. จานเลี้ยงเชื้อ
8. ปีกเกอร์
9. ขวดรูปชมพู่
10. ขวดแมคคาร์ทนี
11. หลอดทดสอบ
12. ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ
13. ปิเปต
14. ที่วางหลอดทดสอบ
15. Magnetic stirrer
16. กระบอกตวง ขนาด 100 มล.
17. ปากคีบ
18. ห่วงถ่ายเชื้อ
19. เครื่องวัด pH PW.9418, Kallen & Camp

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

20. เครื่องเซนตริฟิวก์ MSE. Miner
21. หลอดฉีดยา ขนาด 50 มล. Top
22. เครื่อง Spectronic 20 Bausch & Lomb
23. เข็มถ่ายเชื้อ
24. dessicator
25. เทอร์โมมิเตอร์
26. กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)
27. แผ่นกระจกสไลด์และกระจกปิด
28. เครื่องทำสุญญากาศ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. ตัวอย่างดินและน้ำ

ตัวอย่างดินและน้ำที่นำมาทำการทดลองนั้น เก็บมาจากบางบริเวณของจังหวัดเชียงใหม่และลำปาง ดังแสดงในตารางที่ 3.

ตารางที่ 3. แสดงชนิดและสถานที่เก็บตัวอย่างดินและน้ำ

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่างและสถานที่เก็บ
1	ดินจากคลองแม่ข่า ตอนถนนลอยเคราะห์ อ. เมือง จ. เชียงใหม่
2	น้ำ ข้างหอพักชายอาคาร 7 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3	น้ำ จากคลองแม่ข่า ตอนถนนซุปเปอร์ไฮเวย์ อ.เมือง จ. เชียงใหม่
4	ดิน จากคูข้างถนนสันติธรรม อ. เมือง จ. เชียงใหม่
5	น้ำ จากคูข้างสนามยิงปืน จ. เชียงใหม่
6	ดิน ข้างหองอาหาร ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
7	ดิน จากแปลงทดลอง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
8	ดิน ข้างคู รร.บุญวาทย์วิทยาลัย จ. ลำปาง
9	น้ำ จากบริเวณที่กำลังก่อสร้างตึกคณิตศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
10	น้ำ จากข้างบันไดหอพักชายอาคาร 2 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
11	น้ำ จากหน้าตลาดสันทราย อ. เมือง จ. เชียงใหม่
12	น้ำ จากหน้า รร.เทศบาล 4 อ. เมือง จ. เชียงใหม่
13	น้ำ จากหน้าวิทยาลัยครูลำปาง อ. เมือง จ. ลำปาง
14	ดิน จากคูข้างถนนเชียงใหม่-ดอยสะเก็ด บริเวณ กม. 13 จ. เชียงใหม่
15	น้ำ จากหน้าโรงพยาบาลนครเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่
16	ดิน จากหน้าโรงพยาบาลนครเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่
17	น้ำ จากหนองสะเรียม อ.สันป่าตอง จ. เชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค. อาหารเลี้ยงเชื้อ

Basal medium (N-freemedium), G_5 และ Glutamate-malate medium

(วิธีเตรียมอยู่ในภาคผนวก)

ง. เชื้อ *Rhodopseudomonas sphaeroides* (B_5)

ได้จาก stock culture ของภาควิชาชีววิทยา ซึ่งได้นำมาจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาประยุกต์ คณะเคมีเกษตร มหาวิทยาลัยโตโฮกุ ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งแยกได้จากกรุงเทพมหานคร โดยความกรุณาของ ศาสตราจารย์ ดร.ฮาจิเม ทากาฮาชิ เชื้อนี้เก็บในอาหาร G_5 โดยจะทำการ sub culture ทุก ๆ 10 วัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง (29-30 °ซ)

จ. สารเคมี

- $(NH_4)_2SO_4$	P-aminobenzoic acid.	Mannose
- Na-DL-malate	Biotin	Manitol
- L-glutamic acid	Nicotinic acid	Sorbitol
- Polypeptone	Thiamine-HCL	di-sodiumtartarate
- Yeast extract	Agar	$NaHCO_3$
- KH_2PO_4	Pyrogallon	Na_2S
- K_2HPO_4	KOH	$Na_2S_2O_3$
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Sodium citrate	สี crystal violet
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Sodium pyruvate	Iodine solution
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Glucose	สี safranin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ชอบอุณหภูมิสูงจากดินและน้ำ

1.1 การเก็บตัวอย่างดินและน้ำ

1.1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

ใช้เสียมมือตักดินโคลนกลางแจ้งให้ลึก 3 นิ้ว ตักดินเป็นรูปสามเหลี่ยม ใส่ขวดแมคคาร์ทนี ปิดฝาแล้วใช้กระดาษ label ทำเครื่องหมายแปะติดข้างขวดไว้

1.1.2 การเก็บตัวอย่างน้ำ

เลือกเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากบริเวณที่สกปรกมาก ๆ โดยใช้ขวดแมคคาร์ทนี ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้มือกดขวดให้จมน้ำ รอจนน้ำเต็มขวด แล้วจึงปิดฝาขณะที่ขวดยังจมอยู่ในน้ำ แล้วใช้กระดาษ label ทำเครื่องหมายไว้ข้างขวด แล้วรีบนำเข้าห้องปฏิบัติการ

1.2 การทำ enrichament

1.2.1 การทำ enrichment จากตัวอย่างดิน

ใช้ stirrer ที่เป็นโลหะตักตัวอย่างดินไปใส่ในหลอดทดสอบที่บรรจุอาหาร G_5 เหลว (ภาคผนวก) ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร ใช้พาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้วเทปิดผิวหน้าอาหารให้หนา 1-2 ซม. ทุกขั้นตอนทำโดยวิธีทำให้ปราศจากเชื้อ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในตู้ environmental chamber ที่มีแสงสว่าง ความเข้ม 8,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 46 °ซ เป็นเวลา 5-7 วัน

1.2.2 การทำ enrichment จากตัวอย่างน้ำ

ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างน้ำ 2 มล. ไปใส่ในหลอดทดสอบที่บรรจุอาหาร G_5 เหลวที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้พาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้วเทปิดผิวหน้าอาหารให้หนา 1-2 ซม. ทุกขั้นตอนทำโดยวิธีที่ทำให้ปราศจากเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แล้วนำไปเพาะเลี้ยงใน environmental chamber เช่นเดียวกับในข้อ 1.2.1

2. การทำเชื้อให้บริสุทธิ์

2.1 การเตรียมเชื้อ

เลือกเก็บตัวอย่างเชื้อจากหลอดที่มีสีแดง น้ำตาล น้ำตาลชมพู เหลือง ส้ม มา sub culture 2-3 ครั้ง ใน Basal medium (ภาคผนวก) ที่เติม sodium-DL-malate 5.34 กรัมต่อลิตร และ $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร

จากนั้น นำมาทำ serial ten fold dilution จนถึงความเจือจางที่ 10^{-4}

2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้บรรยากาศของกาซไฮโดรเจน

2.2.1 นำเชื้อที่มีความเจือจางที่ 10^{-3} และ 10^{-4} อย่างละ 0.1 มล. มาทำการ pour plate ในอาหารแข็ง Basal medium ทำความเจือจางละ 3 ซ้ำ เมื่ออาหารแข็งแล้วนำไปวางเรียงใน dessicator ซึ่งมีหลอดทดลองบรรจุ pyrogallon และ KOH ละลายในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1:1 พร้อมกับใส่เทอร์โมมิเตอร์ลงไปด้วย ปิดฝา dessicator ให้สนิท

2.2.2 นำท่อนำกาซที่มีสามทางต่ออยู่มาต่อเข้ากับ dessicator ต่อสายยางของเครื่องทำสุญญากาศเข้ากับปลายด้านหนึ่งของสามทาง อีกปลายของสามทางที่เหลือต่อเข้ากับท่อนำกาซจากถังกาซไนโตรเจน เปิดสวิตซ์เครื่องทำสุญญากาศปั๊มอากาศใน dessicator ออกจนหมด แล้วปิดสามทางมาให้ตรงกับท่อนำกาซไนโตรเจน ปิดเครื่องทำสุญญากาศ แล้วอัดกาซไนโตรเจนเข้าไปจนเต็ม เมื่อกาซเต็มแล้ว ปิดสามทาง เปิดสวิตซ์เครื่องทำสุญญากาศดูดอากาศใน dessicator ออกจนหมด แล้วอัดกาซไนโตรเจนเข้าไปจนเต็ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำการแลกเปลี่ยนกาซจนครบ 5 ครั้ง จากนั้นนำ dessicator ไปเพาะเลี้ยง ใน environmental chamber เป็นเวลา 5-7 วัน แล้วเลือกเก็บตัวอย่างเชื้อที่มีโคโลนีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มม. โคโลนีเดี่ยวที่มีสีแดง ชมพู น้ำตาล และ ส้มมา stab ในอาหารแข็ง G_5 เก็บไว้เป็น stock culture ต่อไป

3. การวัดอัตราการเจริญใน malate-glutamate medium เปรียบเทียบกับ Rhodopseudomonas sphaeroides (B_5)

3.1 ใช้เข็มถ่ายเชื้อเขี่ยเชื้อใน stock culture ซึ่งทำให้บริสุทธิ์แล้ว และ Rp. sphaeroides (B_5) เขี่ยเชื้อแต่ละเชื้อใส่ลงในหลอดทดสอบที่มี malate-glutamate medium (วิธีเตรียมภาคผนวก) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว บรรจุอยู่หลอดละ 10 มล. ใช้พาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้วเทปิดผิวหน้าอาหาร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงใน environmental chamber เป็นเวลา 3-5 วัน

3.2 เมื่อเชื้อเจริญดีแล้ว นำหลอดแก้วของเครื่อง spectronic 20 มาฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ สปัดจนแห้งแล้วใส่ malate-glutamate medium ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปหลอดละ 5 มล. จากนั้น ใช้พาสเจอร์ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดเชื้อที่เลี้ยงไว้แล้ว หยดลงในหลอดแก้วที่ละหยด นำหลอดแก้วนั้นไปวัด absorbancy ที่ 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectronic 20 ให้ได้ค่า 0.05 เท่า ๆ กันทุกเชื้อ แล้วใช้พาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้วเทปิดผิวหน้าอาหาร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงใน environmental chamber และนำมาวัด absorbancy ที่ 660 นาโนเมตร ทุก ๆ 10 ชม.

4. การวัดความสามารถในการผลิตกาซไฮโดรเจน (Kim et al. 1980)

4.1 เขี่ยเชื้อแต่ละเชื้อจาก stock culture และ Rp. sphaeroides (B_5) ลงในหลอดทดสอบที่บรรจุ malate-glutamate

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

medium ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้พาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้วเทปิดผิวหน้าอาหาร นำเพาะเลี้ยงใน environmental chamber เป็นเวลา 17 ชม.

4.2 นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวก์ที่ 8000 g เป็นเวลา 5 นาที เมื่อเซลล์ตกตะกอนแล้วล้างด้วย Basal medium ที่เตรียมใหม่ 2 ครั้ง

4.3 ใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วดูด malate-glutamate medium ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 5 มล. ใส่ลงในหลอดแก้วของเครื่อง spectronic 20 ที่สะอาด นำเชื้อที่ล้างแล้วใส่ลงในหลอดแก้ว นำไปวัด absorbancy ที่ 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectronic 20 ให้ได้ค่า 0.7

4.4 นำหลอดฉีดยา ขนาด 50 มล. ที่ตัดปลายด้านสำหรับจับของก้านสูบออก ทาวาสลินที่ก้านสูบและปลายกระบอกสูบด้านที่จะสวมเข็มฉีดยา กลับด้านสูบเอาด้านตัดเข้าข้างในกระบอกสูบสวมเข็มฉีดยาเบอร์ 18 ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้หลอดฉีดยาดูด malate-glutamate medium เข้าไปจำนวน 70 มล. โดยไล่ฟองอากาศออกให้หมด ทุกขั้นตอนทำโดยวิธีทำให้ปราศจากเชื้อ

4.5 นำหลอดฉีดยาที่ดูด malate-glutamate mediumไว้แล้ว มาดูดเชื้อที่วัด optical density แล้วทั้งหมด ไล่ฟองอากาศออกให้หมด แล้วใช้จุกยางกดเข้าที่ปลายเข็มฉีดยา นำไปเพาะเลี้ยงใน environmental chamber ทำการวัดปริมาณกาซทุก ๆ 10 ชม. จนครบ 60 ชม.

5. การทดสอบทางชีวเคมีบางประการ

5.1 การทดสอบการใช้สารอินทรีย์ (Kim et al. 1980)

เขี่ยเชื้อจาก stock culture ลงในอาหาร Basal medium ที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร แล้วเติมสารที่ต้องการทดสอบดังต่อไปนี้ sodium citrate, sodium-DL-malate, L-glutamic acid sodium pyruvate, glucose, mannose, manitol, sorbitol,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

di-Sodium tartrate แต่ละสารเติมลงไปจำนวน 5 กรัมต่อลิตร ปิดผิวหน้าอาหารด้วยพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อ นำไปเพาะเลี้ยงใน environmental chamber 3-5 วัน

5.2 การทดสอบการใช้ sulfide และ thiosulfate

เขี่ยเชื้อจาก stock culture ลงในอาหาร Basal medium ที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร แล้วเติม $NaHCO_3$ 2 กรัมต่อลิตร และ Na_2S หรือ $Na_2S_2O_3$ อย่างละ 1 กรัมต่อลิตร ปิดผิวหน้าอาหารด้วยพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเพาะเลี้ยงใน environmental chamber 3-5 วัน

5.3 การทดสอบความต้องการ growth factor

เขี่ยเชื้อจาก stock culture ลงในหลอดทดสอบที่บรรจุอาหาร Basal medium ซึ่งเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร sodium-DL-malate 5.34 กรัมต่อลิตร และสารที่เป็น growth factor คือ thiamine, P-aminobenzoic acid, biotin, nicotinic acid โดยถ้าต้องการจะทดสอบสารใดเป็น growth factor ก็ไม่เติมสารนั้นลงไปในอาหารข้างต้น ปิดผิวหน้าอาหารด้วยพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเพาะเลี้ยงใน environmental chamber 3-5 วัน

5.4 การทดสอบการเจริญในที่มืด

ใช้เข็มถ่ายเชื้อเขี่ยเชื้อจาก stock culture แต่ละเชื้อใส่ในหลอดทดสอบที่บรรจุ malate-glutamate medium ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้พาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้วเทปิดผิวหน้าอาหาร หุ้มหลอดทดสอบด้วยกระดาษดำ แล้วนำหลอดทดสอบไปเพาะเลี้ยงใน environmental chamber เป็นเวลา 3-5 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.5 การย้อมสีแบบกรัม

นำเชื้อที่แยกได้มาย้อมสีแบบกรัม

5.6 การทดสอบการสลายเจลาติน

ใช้เข็มถ่ายเชื้อเชี่ยเชื้อจาก stock culture มา stab ลงในหลอดทดสอบที่บรรจุเจลาติน 12% นน./ปริมาตร นำไปเพาะเลี้ยงในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 3 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved