อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง และการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ

เก็บตัวอย่างดิน และน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งในบริเวณอำเภอระโนด จังหวัดสงขลา และอำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี จำนวนทั้งสิ้น 36 ตัวอย่าง โดยมีตัวอย่างดิน 18 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำ 18 ตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างโดยทำการสุ่มตัวอย่างในแต่ละบ่อ บ่อละ 2 จุดคือ

จุดที่ 1 เก็บตัวอย่างดิน และน้ำบริเวณทางน้ำออก

จุดที่ 2 เก็บตัวอย่างดิน และน้ำบริเวณกลางบ่อ

ตัวอย่างที่เก็บมาได้จะใส่ขวดแก้วปากกว้างปริมาตร 125 ลบ.ซม พร้อมฝาจุกพลาสติกที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยเก็บมาประมาณ 2 ใน 3 ของ ขวด นำไปเพาะเลี้ยงทันทีหรือเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อไม่สามารถทำได้ทันที วัดอุณหภูมิตามจุดที่เก็บตัวอย่างด้วยเทอร์โมมิเตอร์ชนิดปรอท วัดความเค็มโดยใช้เครื่อง salinity hand refractometer วัด pH ของน้ำโดยตรงโดยใช้ pH meter สำหรับตัวอย่างดินวัดโดยการชั่งตัวอย่างดิน 20 กรัมใส่ในบีกเกอร์แล้วเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ดินตกตะกอน นำน้ำใสไปวัด pH

2. การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดจากตัวอย่างดิน ในบ่อเลี้ยงกุ้ง

เมื่อเก็บตัวอย่างดินและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งแล้วต้องนำมาทำการทดสอบทันที หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างมาทำการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต ทั้งหมดโดยวิธี pour plate technique (APHA , 1975) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Glucose Extract Agar (TGE Agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 1) แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3. การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อตรวจสอบลักษณะ การติดสีแกรม และการสร้างสปอร์

แยกเชื้อแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 2 โดยอาศัยความแตกต่างของสี รูปร่าง และ ลักษณะของโคโลนีมา streak ลงบนอาหารแข็ง TGE เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บเชื้อที่ได้ไว้ในหลอดอาหารแข็ง TGE นำไปตรวจสอบรูปร่าง และการติดสีแกรม

4. การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารอินทรีย์

4.1 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน

4.1.1 การคัดเลือกเชื้อในอาหารแข็ง

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) แตะ เชื้อบริสุทธิ์รหัสต่าง ๆ จากหลอดอาหารแข็ง TGE ซึ่งมีอายุ 18- 24 ชั่วโมง แทงลงตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk agar (ภาคผนวก ก ข้อ 5) ที่มีอาหารอยู่ 20 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการย่อยโปรตีน ซึ่งจะเกิดวงใสรอบ ๆ โคโลนี ใช้ virnia carliper วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี เปรียบเทียบผลต่างระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสกับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี คัดเลือกเชื้อที่มีผลต่างมากที่สุด 3 สายพันธ์เพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในอาหารเหลว

4.1.2 การคัดเลือกเชื้อในอาหารเหลว

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธ์ที่ทำการคัดเลือกมา 3 สายพันธุ์ จากข้อ 4.1.1 จำนวนเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 1 เปอร์เซนต์ ในอาหารเหลว skim milk (ภาคผนวก ก ข้อ 6) pH 7 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารอยู่ 50 มิลลิลตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 มิลลิลิตร ทุก ๆ 6 ชั่วโมง ปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสไปหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนตามวิธีของ Hammerstein (ภาคผนวก ข ข้อ 1) คัดเลือกเชื้อที่สร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้สูงสุด

4.2 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง

4.2.1 การคัดเลือกเชื้อในอาหารแข็ง

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) แตะเชื้อบริสุทธิ์รหัสต่าง ๆ จากหลอดอาหารแข็ง TGE ซึ่งมีอายุ 18-24 ชั่วโมง แทงลงตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar (ภาคผนวก ก ข้อ 7) ที่มีอาหารอยู่ 20 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการย่อยแป้งโดยราดสารละลายไอโอดีนลงไปให้ท่วมจานอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที จะเกิดวงใสรอบๆ โคโลนี ใช้ virnia cariper วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี เปรียบเทียบผลต่างระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสกับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี คัดเลือกเชื้อที่มีผลต่างมากที่สุด 3 สายพันธุ์ เพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งในอาหารเหลว

4.2.2 การคัดเลือกเชื้อในอาหารเหลว

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ที่ทำการคัดเลือกมา 3 สายพันธุ์จากข้อ 4.2.1 จำนวนเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 2 เปอร์เซนต์ ในอาหารเหลว TGE สูตรดัดแปลง (ภาคผนวก ก ข้อ 2) pH 7 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารอยู่ 50 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 มิลลิลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมงปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสไปหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง ตามวิธีของ (Bernfeld, 1955) (ภาคผนวก ข ข้อ 2) คัดเลือกเชื้อที่สร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงสุด

5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารอินทรีย์ของเชื้อที่คัดเลือกได้

5.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ในการเจริญของเชื้อและการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของเชื้อที่คัดเลือกได้ ดังนี้

5.1.1 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1.2 เลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว skim milk บรรจุอยู่ 50 มิลลิลิตร ที่แปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์เป็น 0, 1, 2, 3, 4, และ 5 เปอร์เซนต์ บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนเช่นเดียวกับข้อ 4.1.2 และวัด pH ด้วย pH meter เซลล์ที่ได้นำไปวัดการเจริญของเชื้อโดยปั่นล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปวัดค่าความขุ่น (turbidity) ที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร

5.1.2 พี เอช ที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลว skim milk ที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม จากข้อ 5.1.1 ปรับค่า pH เท่ากับ 5, 6, 7, 8, และ 9 ตามลำดับ บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดการเจริญของเชื้อ pH และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนเช่นเดียวกับข้อ 5.1.1

5.1.3 อุณหภูมิที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอหารเหลว skim milk ที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม จากข้อ 5.1.1 และมี pH ที่เหมาะสมจากข้อ 5.1.2 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200

รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส วัดการเจริญของเชื้อ pH และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนเช่นเดียวกับข้อ 5.1.1

5.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อและการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง

ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งของเชื้อที่คัดเลือกได้ ดังนี้

5.2.1 พีเอช ที่เหมาะสม

นำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2.2 เลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว TGE สูตรดัดแปลงบรรจุอยู่ 50 มิลลิลิตร แปรผันค่า pH เท่ากับ 5, 6, 7, 8, และ 9 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งเช่นเดียวกับข้อ 4.2.2 pH การเจริญโดยวัดค่า OD และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธี Miller *et al* (1960)

5.2.2 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลว TGE สูตรดัดแปลงที่มีค่า pH ที่เหมาะสม จากข้อ 5.2.1 แปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0, 1, 2, 3, 4, และ 5 เปอร์เซนต์ บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง pH การเจริญและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกับข้อ 5.2.1

5.2.3 อุณหภูมิที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลว TGE สูตรดัดแปลงที่มี pH ที่เหมาะสม จากข้อ 5.2.1 และมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมจากข้อ 5.2.2 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง pH การเจริญและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกับข้อ 5.2.1