บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย
(Research Methodology)

1. การเพิ่มประชากรของแบคทีเรียในกลุ่มที่ต้องการศึกษาจากน้ำเสียโรงงานผลิตแป้งขนมจีน

ในขั้นต้น นำน้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งขนมจีนระดับอุตสาหกรรมชุมชนโรงงานทำขนมจีนในพื้นที่ตำบลแก่งละว้า อำเภอชนบท จังหวัดขอนแก่น และบ้านหนองกุง ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่นในปริมาตร 10 มล. ถ่ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Rice Starch Broth (RSB) ในปริมาตร 100 มล. บรรจุใน Erlenmyer flask ขนาด 250 มล.จำนวน นำไปบ่มที่ 37^{o}C พร้อมเขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. การคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการศึกษาจากจากน้ำเสียโรงงานผลิตแป้งขนมจีน

นำอาหารเหลวที่บรรจุใน flask ที่ผ่านการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย มาทำการเจือจางเพื่อให้ได้ค่าความเจือจางที่ 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ ทำการแยกเชื้อด้วยเทคนิค spread plate technique ลงบนอาหารแข็ง Rice Starch Agar (RSA) โดยทำเป็น triplicate นำ ไปบ่มที่อุณหภูมิ37^{o}C

นำจานอาหารทุกจานมาทำการคัดเลือกโคโลนีบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย โดยนำแต่ละโคโลนีมาทำ cross-streak ลงในอาหาร Rice Starch Agar plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^{o}C ตามที่กำหนดมาแล้วในตอนต้น ปฏิบัติเช่นนี้กับทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษา เพื่อให้ได้เชื้อ isolate ที่บริสุทธิ์เป็นโคโลนีเดี่ยว

3. การเตรียมเชื้อราทดสอบ

เลี้ยงเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici* และเชื้อรา *Colletotrichum anthracnose* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่ 30^{o}C เป็นเวลา 5 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดเส้นใยของเชื้อราที่เจริญบริเวณรอบนอกของโคโลนี นำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA slant บ่มที่ 30^{o}C เป็นเวลา 5 วัน เตรียมสปอร์และ mycelium suspension ด้วยอาหารเหลว potato dextrose broth ผสม 0.1% tween 80 ปริมาตร 3 ml. ใส่ลงในหลอดอาหาร PDA slant แล้วใช้แท่งแก้วงอ ปลอดเชื้อขูดเส้นใยราที่สร้างสปอร์เบาๆ เพื่อให้สปอร์หลุดกระจาย ปรับความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นให้ได้สปอร์ประมาณ 10^{7} สปอร์ นับจำนวนสปอร์จากเครื่อง Haemacytometer ด้วยการใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อในการเจือจาง นำสปอร์ที่เจือจางแล้วไปทำ spread plate ลงบน PDA agar plate ปล่อยให้หน้าวุ้นในจานอาหารแห้ง ใช้ cork borer ขนาด

เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะวุ้นจากผิวอาหารทะลุถึงก้นจานอาหารเป็นหลุมเพื่อเตรียมไว้สำหรับการหยอดสารออกฤทธิ์ของแบคทีเรียต้านเชื้อรา

4. การเตรียมสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียแต่ละ isolate ที่คาดว่าสามารถสร้างสารออกฤทธิ์มาทำการ inoculate ลงในอาหารเหลว Rice Starch Broth (RSB) ปริมาตร 100 ml บรรจุใน Erlenmyer flask นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^{o}C พร้อมเขย่าเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อ ให้ทำการตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4^{o}C ส่วนใสที่ได้จะใช้สำหรับการทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี well diffusion method

5. การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสารต้านเชื้อรายับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยวิธี well diffusion method (Mckeen, 1986)

นำสปอร์ suspension ของเชื้อราภายใต้การทดสอบมาเพาะลงบนอาหาร PDA ด้วยวิธี spread plate technique ทิ้งจานอาหารให้ผิวหน้าแห้ง ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำ spread plate แล้ว ใช้ Autopipette ดูด supernatant ของเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 100 µl หยดลงในหลุมที่เตรียมไว้ โดยมีจำนวน 1 หลุม เป็นหลุมควบคุม (control) ด้วยการหยดอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30^{o}C เป็นเวลา 4-6 วัน สังเกตการณ์เกิด Inhibition zone และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้น

6. การคำนวณความสามารถในการต้านเชื้อราโดยใช้ค่า Percentage Fungal Inhibition (%)

การคำนวณความสามารถในการต้านเชื้อรา (Antifungal Assay)โดยใช้ค่า Percentage Fungal Inhibition (%) ค่าการคำนวณมาจากวิธีของ Grover and Moore (1962) และปรับปรุงมาจาก Rahman และคณะ (2010) เป็นดังบ่งชี้ความสามารถในการต้านเชื้อราก่อโรคพืชภายใต้การศึกษา เมื่อนำ spores ของเชื้อราภายใต้การทดสอบมาทำ spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะลงบนอาหาร ใช้ Autopipette ดูด supernatant ของเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 100 µl หยดลงในหลุมที่เตรียมไว้ โดยมีจำนวน 1 หลุมเป็นหลุมควบคุม (control) ด้วยการหยดอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30^{o}C เป็นเวลา 4-6 วัน สังเกตการณ์เกิด Inhibition zone และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone จากจานที่ทำการศึกษาและจานที่มีหลุมควบคุม การทดลองนี้ทำสามซ้ำ

ค่าเปอร์เซ็นการยับยั้ง fungal mycelia ตามค่าของ Percentage Inhibition of Mycelia Growth สามารถคำนวนจากสูตรข้างล่าง

$$I = [(C-T)/C] \times 100$$

ในที่นี้ I = Percentage inhibition

C = Diameter of clear zone on fungal mycelia in treatment

T = Diameter of punched well on the test plate

7. ทดสอบการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียภายใต้การศึกษาในอาหาร RSB เพื่อการปลดปล่อยสารชีวภาพ bioactive metabolites ที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียภายใต้การทดสอบจำนวน 1 โคโลนีลงในอาหารเหลว nutrient broth, นำไปบ่มแบบเขย่าทที่ความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิ 35°C นาน 18 ชั่วโมง ใช้ปิเปตดูดเชื้อในปริมาตร 1 ml ใส่ลงในอาหารเหลว Rice Starch Broth (RSB) โดยเติมสารอาหาร peptone และ glucose ที่คงความเข้มข้นที่ 0.2% ในปริมาตร 30 ml นำไปบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิ 35°C นาน 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ใช้ micro-pipette ดูดเชื้อใน ปริมาตร 1.5 ml ลงในหลอด Eppendorf และปั่นเหวี่ยงในเครื่อง microfuge นาน 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี well diffusion technique โดยใช้เชื้อราก่อโรคพืช *Fusarium oxyspourm* f.sp. lycopersici และ เชื้อรา *Colletotrichum anthracnose* เป็นเชื้อทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 3-4 วัน สังเกตุผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในรูปของ clear zone

8. ศึกษาการหาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อราจากเพาะเลี้ยงแบคทเรียภายใต้การศึกษา

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารต้านเชื้อรา ปริมาตร 1 loopfull ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 30 ml เจือจางความเข้มข้นของแบคทีเรียให้ได้ค่า optical density ที่ absorbance 600 nm เท่ากับ 0.5 ดูดเชื้อปริมาตร 10 ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Rice Starch Broth (RSB) ปริมาตร 100 ml บ่มที่อุณหภูมิ 35°C บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm จากแต่ละช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียตามช่วงเวลาที่เพาะเลี้ยงปั่นเหวี่ยงในเครื่อง microfuge นาน 5 นาที นำส่วนใสของแต่ละช่วงเวลาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี well diffusion method โดยใช้เชื้อราก่อโรคพืช *Fusarium oxyspourm* f.sp. lycopersici เป็นเชื้อทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 3-4 วัน สังเกตุผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในรูปของ clear zone.

9. ศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิของสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคพืชที่ผลิตจากแบคทีเรียภายใต้การศึกษา

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารต้านเชื้อรา ปริมาตร 1 loopfull ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 50 ml เจือจางความเข้มข้นของแบคทีเรียให้ได้ค่า optical density ที่ absorbance 600 nm เท่ากับ 0.5 ดูดเชื้อปริมาตร 10 ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Rice Starch Broth (RSB) ปริมาตร 100 ml บ่มที่อุณหภูมิ 35^{0}C บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมาปั่นเหวี่ยงในเครื่อง microfuge นาน 5 นาที นำส่วนใสไปแช่ในอ่างปรับอุณหภูมิ (waterbath) ที่อุณหภูมิ 40^{0}C, 50^{0}C, 60^{0}C, 70^{0}C และ 90^{0}C หลังจากนั้นนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี well diffusion method โดยใช้เชื้อราก่อโรคพืช *Fusarium oxyspourm* f.sp. lycopersici เป็นเชื้อทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 30^{0}C นาน 3-4 วัน สังเกตุผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในรูปของ clear zone

10. การศึกษาลักษณะและเทียบเคียงบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสาร bioactive metabolites ในระดับสกุล (Genus)

ทำการศึกษาทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับปฏิกิริยาทางชีวเคมี ในการช่วยบ่งชี้ในรดับ genus โดยจะอ้างอิงควบคู่ไปกับเอกสาร Burgey's Manual of Determinative Bacteriology ในการวินิจฉัยกลุ่มของแบทีเรียภายใต้การศึกษา เริ่มต้นจากการศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียในระดับกายภาพ คือ การย้อมสี Gram staining การย้อมสี endospore การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีตามหนังสือ Bergey Mnaual of Determinative Bacteriology

การทดสอบทางชีวเคมี มีดังนี้ ทดสอบ catalase test, mobility test, indole test, starch hydrolysis, nitrate reduction, gelatin liquefaction, urease test, citrate utilization, litmus milk test และ การ fermentation ของน้ำตาลชนิดต่างๆ

11. ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานทำแป้งขนมจีนด้วยการการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสร้างสารชีวภาพออกฤทธิ์หมักแบบกะ (batch fermentation)

นำน้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งขนมจีนระดับชุมชนในปริมาตร 300 ml บรรจุลงใน Erlenmyer flask ขนาด 500 ml เพาะเลี้ยงเชื้อพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (≈27-29^{0}C)โดยกำหนดสถาวะการบำบัดน้ำเสียดังนี้

1. น้ำเสีย (ไม่ปลอดเชื้อ)
2. น้ำเสีย (ปลอดเชื้อ)
3. น้ำเสีย (ไม่ปลอดเชื้อ + 0.2% glucose และ 0.2% peptone)
4. น้ำเสีย (ปลอดเชื้อ + 0.2% glucose และ 0.2% peptone)

5. น้ำเสีย (ไม่ปลอดเชื้อ + เชื้อแบคทีเรียภายใต้การศึกษา)
6. น้ำเสีย (ปลอดเชื้อ + เชื้อแบคทีเรียภายใต้การศึกษา)
7. น้ำเสีย (ไม่ปลอดเชื้อ + 0.2% glucose และ 0.2% peptone + เชื้อแบคทีเรียภายใต้การศึกษา)
8. น้ำเสีย (ปลอดเชื้อ + 0.2% glucose และ 0.2% peptone + เชื้อแบคทีเรียภายใต้การศึกษา)

เริ่มต้นด้วยการนำแบคทีเรียภายใต้การศึกษาที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเหลว nutrient broth เป็น inoculums size ที่ 5% นำมา inoculate ลงในน้ำเสียตามสภาวะการเพาะเลี้ยง/บำบัดตรวจหาปริมาณแป้งเริ่มต้นและปริมาณแป้งที่ลดลงหลังช่วงเวลาการศึกษาและสภาวะการศึกษา ด้วยการวิเคราะห์หาค่า COD เมื่อผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อการบำบัดน้ำเสียเป็นเวลา 7 วัน ความสามารถในการบำบัดน้ำเสียด้วยเชื้อแบคทีเรียจะหมายถึงค่าปริมาณเนื้อแป้งที่ลดลง พร้อมกับค่า COD ที่ลดลง