บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือในการวิจัยและการตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือ

อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
2. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge)
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. Vortex Mixer
6. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
7. กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Compound Microscope)
8. อุปกรณ์เครื่องแก้ว

สารเคมี

1. Dipotassium Phosphate (K_2HPO_4)
2. Potassium Dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)
3. Magnesium Sulfate Heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$)
4. Sodium Chloride (NaCl)
5. Calcium Chloride ($CaCl_2$)
6. lron(lll) Chloride hexahydrate ($FeCl_3$)
7. Sodium Molybdate ($NaMoO_4$)
8. Glucose
9. Agar
10. Beef Extract
11. Peptone
12. Nessler’s Reagent

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างรากข้าว และดินรอบรากข้าว ในนาข้าว 5 จังหวัด ได้แก่ กรุงเทพฯ ฉะเชิงเทรา ราชบุรี ชัยนาท และสุพรรณบุรี โดยเก็บรากข้าว และดินใส่ถุงพลาสติก และติดฉลากโดยกำหนดสถานที่ ดังนี้

กรุงเทพฯ (เขตหนองจอก) เก็บที่นาบ้านสินอนันต์ (Bsin) นาคู้คลองสิบ (Bku) และนาบ้านลำไทรฟาร์ม (Blam)

ฉะเชิงเทรา เก็บที่นาในตำบลคู้ยายหมี (CSku) ตำบลหนองแหน (CShang) บ้านซ่อง (CSban)

ราชบุรี เก็บที่นาในตำบลวันดาว (Rwan)

ชัยนาท เก็บที่นาในตำบลนางลือ (Cnang)

สุพรรณบุรี เก็บที่นาในตำบลหนองผักนาก (Spak) ตำบลหนองสะเดา (Ssadoa) ตำบลกระเสี่ยว (Ska) ตำบลหัวเขา (Shua)

2. การคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

แยกดินรอบรากข้าวออกจากรากข้าว นำรากข้าวมาล้างทำความสะอาด ใช้ใบมีดโกนตัดเป็นชิ้นยาวประมาณ 1.5 - 3.0 เซนติเมตร นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrogen-Free Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน

นำดินรอบรากข้าว และดินนาข้าว 1 กรัม มาเจือจางด้วยวิธี Serial Dilution ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1}- 10^{-4} ใช้ปิเปตปราศจากเชื้อดูดสารละลายดินความเข้มข้นที่ 10^{-4} มา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร (Spread Plate) Nitrogen-Free Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน คัดแยกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน มาทำให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนต่อไป

3. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นจากลักษณะสี ขอบ ขนาด และผิวหน้าของโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ การติดสีแกรม และรูปร่างของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4. การทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

การทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยการวัดปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ทำการเลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลตในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว Nitrogen-Free Broth ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อในฟลาสก์ที่ความยาวคลื่น 600 nm เพื่อบ่งบอกถึงปริมาณของเชื้อและปรับปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้เท่ากัน (Yadav et. al., 2012) ที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว Nitrogen-Free Broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำส่วนใส (Crude Enzyme) ไปวิเคราะห์แอมโมเนีย–ไนโตรเจน โดย Nessler's Reagent นำสารส่วนใสปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Nessler's Reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนของแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียที่ความเข้มข้นต่างๆ

การเตรียมสารละลายมาตรฐานสต็อกแอมโมเนีย ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำโดยละลาย NH_4Cl 3.819 กรัม (อบให้แห้งที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง) ในน้ำปราศจากไอออน (Deionized) เติมน้ำปราศจากไอออนจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

1.00 มิลลิลิตร = 1 มิลลิกรัมไนโตรเจน = 1.22 มิลลิกรัมแอมโมเนีย

การเตรียมสารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นำ 10.00 มิลลิลิตร ของสารละลายสต็อกแอมโมเนีย (1,000 ppm) มาเจือจางด้วยปราศจากไอออน (Deionized) จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

การทำ Calibration Curve ปิเปตสารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (100 ppm) ปริมาตร 0, 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00,8.00 และ 10.00 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้อนุกรมของสารละลายมาตรฐาน ซึ่งมีความเข้มข้นของแอมโมเนีย 0, 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00 และ 10.00 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ (ALS environmental, 2014)

5. การศึกษาการเจริญเติบโตที่ภาวะเป็นกรด

คัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนสูง 25 ตัว ถ่ายเชื้อแบคทีเรียจำนวน 1 โคโลนี ใส่ในอาหารเหลว Nitrogen Free Broth (ภาคผนวก) ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อในฟลาสก์ที่ความยาวคลื่น 600 nm เพื่อบ่งบอกถึงปริมาณของเชื้อและปรับปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้เท่ากัน (Yadav et. al., 2012) ที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว Nitrogen-Free Broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ปรับค่า pH ต่างๆ คือ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ7.0 ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์แอมโมเนียที่แบคทีเรียผลิตออกมา

6. การศึกษาการเจริญเติบโตที่ภาวะมีโลหะหนักละลายอยู่

คัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนสูง 25 ตัว ถ่ายเชื้อแบคทีเรียจำนวน 1 โคโลนี ใส่ในอาหารเหลว Nitrogen-Free Broth (ภาคผนวก ก) ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อในฟลาสก์ที่ความยาวคลื่น 600 nm เพื่อบ่งบอกถึงปริมาณของเชื้อและปรับปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้เท่ากัน (Yadav et. al., 2012) ที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว Nitrogen-Free Broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีโลหะหนักคอปเปอร์ ความเข้มข้น 0.75–12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นิกเกิล ความเข้มข้น 0.65–10.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตะกั่ว ความเข้มข้น 0.35–2.8 มิลลิกรัมต่อลิตร โครเมี่ยม ความเข้มข้น 0.5–4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคดเมี่ยมความเข้มข้น 0.02–0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และสังกะสีความเข้มข้น 3.5-28 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมา วิเคราะห์แอมโมเนียที่แบคทีเรียผลิตออกมา

7. การระบุชนิดของแบคทีเรีย โดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rDNA

คัดเลือกไอโซเลตของแบคทีเรียที่ให้ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนสูงในภาวะที่เป็นกรด และภาวะที่มีโลหะหนัก ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rDNA ที่สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

8. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

8.1 ค่าข้อมูลตัวแทนกลุ่ม

การวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) ใช้สูตร $x = (\sum X)/n$

โดยที่ $\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ย $\sum x$ = ผลรวมของคะแนนทั้งหมด n = จำนวนตัวอย่างในกลุ่มตัวอย่าง

8.2 การวัดการกระจายของข้อมูล

ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation: S.D.)

ใช้สูตร S.D. = $\{[\sum (x- \bar{x})]/ n\}^{1/2}$

โดยที่ S.D. = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน x = ค่าข้อมูล $\bar{x}$ =ค่าเฉลี่ย n= จำนวนตัวอย่างในกลุ่มตัวอย่าง

8.3 การเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณแอมโมเนียในแต่ละชุดการทดลอง โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ Multi- Factor ANOVA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05