บทที่3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1.การแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากกล้วยไม้

1.1 กล้วยไม้ที่นำมาทดสอบ

กล้วยไม้ 19 ชนิด มีรายชื่อดังต่อไปนี้คือ 1.หวายปอมปาดัวร์ (*Dendrobium* sp.) 2.เอื้องตาเหิน (*D. Infundibulum* Lindl.) 3.เอื้องแซะดอยปุย (*D. Bellatulum* Rolfe.) 4.เอื้องปากนกแก้ว (*D. cruentum* Rchb. f.) 5.เอื้องคำกิ่ว (*D. signatum* Rchb. f.) 6.เอื้องผาเวียง (*D. albosanguinium* Lindl.) 7.เอื้องเงินแดง (*D. cariniferum* Rchb. f.) 8.เอื้องคำฝอยปาย (*D. harveyanum* Rchb. f.) 9.เอื้องแซะภูกระดึง (*D. christyanum* Rchb. f.) 10.เอื้องคำป๊อก (*D. capillipes* Rchb. f.) 11.เอื้องคำปอน (*D. dixanthum* Rchb. f.) 12.เอื้องผึ้ง (*D. lindleyi* Steud.) 13.เอื้องมอนไข่ (*D. thyrsiflorum* Rchb. f.) 14.เอื้องสายน้ำผึ้ง (*D. primulinum* Lindl.) 15. พวงหยก (*D. finlayanum* Par.& Rchb.) 16.เอื้องแซะหอม (*D. scabringue* Lindl.) 17.เอื้องคำผักปราบ (*D. ochreatum* Lindl.) 18.เอื้องสายสามสี (*D. crystallinum* Rchb. f.) 19.กล้วยไม้ *Coelogeny sp.*ซึ่งรวบมาจากร้านไม้ดอกไม้ประดับในเขตอำเภอเมืองจังหวัดเชียงใหม่

1.2 การฆ่าเชื้อที่ผิว

คัดเลือกลำลูกกล้วยของกล้วยไม้ที่ทำการทดสอบ โดยเลือกลำลูกกล้วยที่สะอาดปราศจากการทำลายของโรคหรือแมลง ตัดมาเป็นท่อนประมาณ 2 นิ้ว จากนั้นนำไปล้างให้สะอาดโดยผ่านน้ำไหลแล้วซับให้แห้ง นำไปทำความสะอาดต่อในตู้ปลอดเชื้อ โดยล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 3 นาที คลอรอกซ์ 3% นาน 5 นาที แอลกอฮอล์ 70% 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้ออีก 4-5 ครั้ง ใช้ปากคีบผ่านการฆ่าเชื้อคีบลงบน จานเลี้ยงเชื้อเปล่าที่ปลอดเชื้อ ใช้มีผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตัดเป็นท่อนเล็กๆ จากนั้นจึงนำไปบดด้วยโกร่งปลอดเชื้อ แล้วค่อยๆผสมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% เป็นปริมาตร 10 เท่าของน้ำหนัก บดจนละเอียด แล้วนำสารละลายที่ได้ ไปทำการเลี้ยงเพื่อหาเชื้อในอาหารกึ่งแข็ง modified Rennie (Elbelltagy, 2001) มีส่วนประกอบคือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมี	ปริมาณ
Solution A	
K_2HPO_4	0.8g
KH_2PO_4	0.2g
NaCl	0.1g
NaFeEDTA	0.28mg
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25mg
Yeast extract	0.1g
Sucrose	5.0mg
Manitol	3.0g
Sodium Malate	2.0g
Na-Lactate(60%)	0.5mL
Solution B	
$MgSO_4.7H_2O$	0.2g
$CaCl_2.2H_2O$	0.06g
Solution C	
Biotin	5.0μg
Para-aminobenzoic acid(PABA)	10.0μg
Noble agar	2.0g
Distilled water	1000mL
Orchid extract	1.25mL
80% ethanol	1.25mL

เมื่อพบการเจริญของจุลินทีย์ในอาหารแล้ว นำไปทดสอบหาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยเทคนิค Aacetylene Reduction Assay (Elbeltagy, 2001) จากนั้นนำหลอดทดลองที่พบการตรึงไนโตรเจนไปทำการแยกเชื้อในขั้นตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 การแยกเชื้อจากอาหารกึ่งแข็ง Rennie medium

นำหลอดที่มีการตรึงไนโตรเจนจากข้อที่ 1.2 มาทำการแยกเชื้อ โดยเขย่าอาหารและเชื้อในหลอดทดลองเข้ากัน ดูดเชื้อตัวอย่างมาทำการเจือจาง โดยใช้การเจือจางลง 10 เท่า (Ten fold dilution) จนได้ความเจือจางที่ 10^{-6} ดูดสารละลายที่ความเจือจางที่ 10^{-6} จำนวน 100µL. ลงบนอาหารแข็ง NA สำหรับการเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาพที่มีออกซิเจน หรือ VL สำหรับเลี้ยงในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน(ดูภาคผนวก) เกลี่ยตัวอย่างด้วยแท่งแก้วรูปตัว L ที่ปลอดเชื้อจนทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30^{0} C นาน 3- 5 วัน ทำการเก็บเชื้อตัวอย่างที่เจริญทุกโคโลนีที่มีความแตกต่างกันอย่างละ 2-5 โคโลนี เพื่อทำการทดสอบต่อไป

2. การตรวจสอบหาปริมาณเชื้อโดยวิธี Most Probable Number (MPN)

ทำการเจือจางสารละลายเชื้อผสมจากข้อ 1 จนได้ความเจือจางที่ 10^{-5} ดูดสารละลายเชื้อแต่ละความเจือจางมา 100 µL. ใส่ลงในหลอดทดลองซึ่งมีอาหารกึ่งแข็ง modified Rennie 10 mL. จำนวน 5 หลอด จนครบความเจือจางที่ 10^{-5} ปิดจุกแล้วทำการบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30^{0} C นาน 5-7 วัน จากนั้นนำไปตรวจหาปริมาณเชื้อโดยรวม โดยอาศัยตาราง MPN (5ซ้ำ) เป็นมาตรฐาน (Woomer, 1994)

3.การทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อกล้วยไม้

3.1 การทดสอบปริมาณการตรึงไนโตรเจน

นำโคโลนีเชื้อตัวอย่างไปเลี้ยงในอาหาร NB สำหรับเชื้อที่เจริญได้ในสภาพมีออกซิเจน หรืออาหารเหลว VL สภาพที่ไม่มีออกซิเจน ปริมาณ10 mL. เชื้อที่เลี้ยงในสภาพมีออกซิเจนนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 125 รอบต่อนาที เชื้อที่เลี้ยงในสภาพไร้ออกซิเจนไม่ต้องทำการเขย่า จากนั้นนำบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดตัวอย่างเชื้อปริมาณ 100 µL. ลงในอาหารกึ่งแข็ง modified Rennie ในหลอดทดลองซึ่งมีปริมาตร10mL. ปิดด้วยจุกพลาสติก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 5-7 วัน โดยสังเกตการเจริญเติบโต สำหรับเชื้อที่เจริญได้ในสภาพที่มีออกซิเจนทำการเปลี่ยนจุกด้วยจุกยางได้ทันที ในขณะที่เชื้อที่เจริญได้ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนนั้นจะต้องทำการไล่อากาศภายในหลอดออกโดยโดยใช้แก๊สไนโตรเจนแล้วจึงเปลี่ยนเป็นจุกยาง ทำการฉีดแก๊ส acetylene (C_2H_2) เข้าไปในปริมาณ 0.5mL. หรือ 5% ของปริมาตรที่ว่างของหลอด จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24ชั่วโมง ทำการดูดอากาศภายในหลอดมา 0.5 mL ฉีดเข้าไปในเครื่อง gas chromatography (ยี่ห้อ Shimadzu GC-14B และ Shimadzu C-R) สังเกตปริมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แก๊ส acetylene จาก peak ของ gas chromatography กับแก๊ส acetylene มาตรฐาน จากนั้นทำการวิเคราะห์ โดยอาศัยกราฟเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.2 การหาจำนวนเชื้อทั้งหมดในอาหาร

นำหลอดที่มีการตรึงไนโตรเจนมาหาปริมาณเชื้อ โดยดูดเชื้อตัวอย่างที่ได้ ทำการเจือจางจนได้ความเจือจางที่ 10^{-7} ดูดสารละลายที่เจือจาง10^{-5} - 10^{-7} ปริมาตร 100 µL ลงในจานแก้วที่มีอาหารแข็ง NAสำหรับเลี้ยงเชื้อในสภาพที่ใช้ออกซิเจน หรือ อาหาร VL สำหรับเลี้ยงเชื้อสภาพที่ไม่มีออกซิเจน(ดูภาคผนวก) เกลี่ยด้วยแท่งแก้วรูปตัว L ที่ปราศจากเชื้อ จนทั่วจานอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C หรืออุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-4 วัน สังเกตุการเจริญและลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ นับจำนวนเชื้อที่ได้แล้วคำนวณกลับเป็นปริมาณเชื้อทั้งหมดที่มีการตรึงไนโตรเจน

$$\text{คำนวณโดย} \quad \text{ปริมาณเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนเชื้อที่นับได้จากอาหารแข็ง}}{\text{ความเจือจางของเชื้อ} \times \text{ปริมาตรที่ใส่ในอาหาร}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์

นำตัวอย่างไอโซเลทเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ส่งไปทำการวิเคราะห์ทางชีววิทยาโมเลกุล โดยใช้เทคนิค 16s rDNA ณ ห้องปฏิบัติการ DNA TECHNOLOGY มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencer (ABI 377) ซึ่งใช้หลักการติดฉลากเบสของดีเอ็นเอทั้ง 4 ชนิดคือ อะดีนีน (A) กัวนีน (G) ไซโตซีน (C) และ ไทมีน (T) ด้วยสารเรืองแสงที่แตกต่างกัน เบสทั้ง 4 นิวคลีโอไทด์เหล่านี้จะถูกนำเข้าไป (incorporate) ในสายดีเอ็นเอที่สร้างใหม่โดยใช้เอ็นไซม์ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (DNA polymerase) จากนั้นจึงนำไปเคลื่อนที่ผ่านเจลด้วยความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้า ด้วยหลักการของอิเล็กโตรโฟลีซีส (electrophoresis) ทำให้เกิดแถบสีของสารเรืองแสงเรียงกันตามลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ ซึ่งจะถูกตรวจจับด้วยเครื่องรับสัญญาณแสงแล้วแปลงเป็นสัญญาณดิจิตอลส่งไปวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ โดยขบวนการทั้งหมดจะเกิดขึ้นอย่างอัตโนมัติภายใต้การทำงานของเครื่องดีเอ็นเอซีเควินเซอร์ (DNA Sequencer) เมื่อได้ข้อมูลที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อจุลินทรีย์แล้ว ทำการนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาชนิดจุลินทรีย์โดยอาศัยฐานข้อมูลจากอินเทอร์เนต ของ National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม BLAST ในการค้นหาและวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ เชื้อที่นำไปจำแนกด้วยเทคนิค 16s rDNA ได้แก่ไอโซเลท Dthy102, Dthy0205, Dthy0206, Dthy0413, Dthy0515, Dthy0621, Dthy0717, DSCA0102, และ DSCA0103 โดยใช้ primer 9F, 339F, 785F 1099F ในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดย primer เหล่านี้จะใช้ในกระบวนการ PCR amplification โดยทำในเครื่อง thermocycler (Astec PC800) โดยมีโปรแกรมการทำงานคือ denaturation 94^{0}C เป็นเวลา 3 นาที และกระบวนการเหล่านี้อีก 30 รอบคือ denaturation ที่ 94^{0}C 30วินาที primer annealing 53^{0}C 30 วินาที primer extention 72^{0}C 1นาที และ final extention reaction 72^{0}C 10นาที โดยชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์จะถูก ลำดับ โดยอาศัยเครื่องอัตโนมัติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved