บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต , ประเทศ
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker) รุ่น G-27 แบบ rotary	New Brunswick Scientific , USA
เครื่องเขย่า (Orbital inubator Shaker) รุ่น Gyromax 707R	Amerex Instruments , USA
เครื่องเขย่า (Controlled environment incubator Shaker)	New Brunswick Scientific , USA
เครื่องเขย่า (Gid gyroty Shaker) รุ่น G 10	New Brunswick Scientific , USA
เครื่องชั่งละเอียด รุ่น PC 220E	Mettler Instruments , Switzerland
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectronic 21)	Baush & Lomb , Germany
ตู้อบแห้ง (Hot air oven) รุ่น UL 60	Memmert , Germany
ตู้ถ่ายเชื้อแบบ Larmina flow รุ่น dwyer Mark II	Dwyer Instruments , USA
เครื่องกรองน้ำ EHEIM รุ่น 221305	EHEIM , Germany
กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น Unillux - 12	Kyowa , Japan
เครื่องเขย่า (Vortex) รุ่น Giene 2	Scientific , USA
เครื่องกลั่นน้ำบริสุทธิ์รุ่น 3904	Elga Ltd , England

เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต , ประเทศ
แอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$	E.Merck Damnstadt , Germany
แคลเซียมคลอไรด์ $(CaCl_2)$	E.Merck Damnstadt , Germany
แมกนีเซียมแฮปตะไฮเดรต $(MgSo_4 \cdot 7H_2O)$	E.Merck Damnstadt , Germany
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	E.Merck Damnstadt , Germany
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต $(CaCl_2 \cdot 2H_2O)$	E.Merck Damnstadt , Germany
โซเดียมคลอไรด์ $(NaCl)$	E.Merck Damnstadt , Germany
แคลเซียมไฮดรอกไซด์ $(NaOH)$	E.Merck Damnstadt , Germany
แคลเซียมคาร์บอเนต $(CaCO_3)$	E.Merck Damnstadt , Germany
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NaH_2PO_4 \cdot H_2O)$	E.Merck Damnstadt , Germany
โซเดียมไนไตรท์ $(NaNO_2)$	E.Merck Damnstadt , Germany
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแฮปตะไฮเดรต $(Na_2HPO_4 \cdot H_2O)$	E.Merck Damnstadt , Germany
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส (Na_2HPO_4)	E.Merck Damnstadt , Germany
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	E.Merck Damnstadt , Germany
คอปเปอร์ซัลเฟต $(CuSO_4 \cdot 5H_2O)$	E.Merck Damnstadt , Germany
ทริสไฮดรอกซีเมธิลอะมิโนมีเธน $(C_4H_{11}NO_3)$	E.Merck Damnstadt , Germany
กรดซัลฟุริกเข้มข้น (H_2SO_4)	E.Merck Damnstadt , Germany
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl)	E.Merck Damnstadt , Germany
ซัลฟานิลิคเอซิด $(C_6H_7NO_3S)$	E.Merck Damnstadt , Germany
ซัลฟานิลาไมด์ $(C_6H_8N_2O_2S)$	J.T. Baker , USA
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	J.T. Baker , USA
กรดอะซิติกเข้มข้น (CH_3COOH)	Fluka Chemical , Switzerland
บรูซีนซัลเฟตไฮเดรต $[(C_{23}H_{26}N_2O_4)_2H_2SO_4]$	BHD Laboratory , USA
เอธานอล (C_2H_5OH)	BHD Laboratory , USA
phenol red	Difco Laboratory , USA
Noble agar	Carlo erba , Italy
โซเดียมโมลิบเดต $(Na_2MoO_4.2H_2O)$	Carlo erba , Italy

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต , ประเทศ
เฟอรัสฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	Carlo erba , Italy
โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl)	The Clorox Company , USA
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	May & Baker , England
เอธิลลีนไดอะมีน เตตระอะซีติกแอซิด ($C_{10}H_{11}N_2O_8Na_2.2H_2O$)	Sigma Chemical , USA
ไนตราไพริน 24 อี (N-Serve 24E)	Dow Elanco , USA

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย

การศึกษาคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียมีขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัยดังต่อไปนี้

1.1 การแยกคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียจากธรรมชาติ

ในการแยกคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียจากธรรมชาติ จำเป็นต้องเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่สมบูรณ์ก่อน เนื่องจากปริมาณเชื้อในธรรมชาติมีปริมาณค่อนข้างต่ำ แล้วจึงนำมาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในภายหลัง ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1.1.1 การเพิ่มจำนวนแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย

นำน้ำตัวอย่าง ตะกอน หรือเปลือกหอยในบ่อกรองน้ำที่ใช้เลี้ยงสัตว์น้ำจากแหล่งต่างๆ ดังตารางที่ 2 มาใส่ในอาหารเหลวที่เป็น enrichment medium ตามสูตรของ Skinner และ Walker (1961) (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1) ซึ่งประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม โพแตสเซียมไดฟอสเฟต 0.2 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ 0.02 กรัม แมกนีเซียมเฮปตะไฮเดรต 0.04 กรัม สารละลาย FeNaEDTA 0.1 มิลลิลิตร ฟีนอล เรด 2.0 มิลลิลิตร และเติมน้ำกร่อยโดยเตรียมจาก การผสมของน้ำทะเลสังเคราะห์ 400 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปลอดประจุ 600 มิลลิลิตร ตามวิธีของ Koops Harms และ Wehrmann (1976) ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 8.5 ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมไว้เบื้องต้นจำนวน 50 มิลลิลิตรลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างน้ำจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเลปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตัวอย่างตะกอน 10 มิลลิลิตร หรือ เศษเปลือกหอย 1 ชิ้น ลงในอาหารดังกล่าว เลี้ยงเขย่าที่อัตรา 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ถึง 4 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนสีของฟีนอลเรดในอาหารเลี้ยงเชื้อถ้ามีการเจริญของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย จะมีการสร้างกรด ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความ

เป็นกรดด่างต่ำ สีของอินดิเคเตอร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง น่าฟลาสก์ที่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองศึกษาต่อในข้อ 1.1.2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างและแหล่งที่มาของตัวอย่าง

ตัวอย่างในบ่อกรองน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงสัตว์ทะเล	แหล่งที่มา		
	บ่อเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเล ชลบุรี	บ่อเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเล ภาควิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	บ่อเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเล สุราษฎร์ธานี
น้ำ	✓	✓	✓
ตะกอน		✓	✓
เศษเปลือกหอย		✓	✓

1.1.2 **แยกแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียจากตัวอย่างในข้อ 1.1.1 ให้เป็นโคโลนีเดี่ยว**

นำอาหารเหลวที่มีการเปลี่ยนเป็นสีเหลืองในข้อ 1.1.1 มาเขี่ยลาก (streak) บนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งตามวิธีของ MacDonald และ Spoke (1980) (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2) ซึ่งประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม โพแตสเซียมไดฟอสเฟต 0.2 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ 0.02 กรัม แมกนีเซียมเฮปตะไฮเดรต 0.04 กรัม สารละลาย FeNaEDTA 0.1 มิลลิลิตร ฟีนอล เรด 2.0 มิลลิลิตร แคลเซียมคาร์บอเนต 25 กรัม ยาปฏิชีวนะไซโคลเฮกซิไมด์ 0.05 กรัม วุ้นโนเบิลอาการ์ 15 กรัม และเติมน้ำกร่อยโดยเตรียมจากการผสมของน้ำทะเลสังเคราะห์ 400 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปลอดประจุ 600 มิลลิลิตร ตามวิธีของ Koops Harms และ Wehrmann (1976) ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 8.5 บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 3 ถึง 4 สัปดาห์จนกระทั่งมีการสร้างโคโลนีเดี่ยวเกิดขึ้นบนจานเลี้ยงเชื้อ

1.1.3 **ทำให้เชื้อบริสุทธิ์**

เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีขนาดเล็กใส เจริญในจานเลี้ยงเชื้อในข้อ 1.1.2 มาเขี่ยลากซ้ำบนอาหารสูตรเดียวกัน บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 2 ถึง 4 สัปดาห์ และยืนยันความบริสุทธิ์โดยตรวจสอบด้วยการย้อมสีแกรม และศึกษาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.1.4 **ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในข้อ 1.1.3 ในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย**

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 1.1.3 มา 1 ลูป เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 3 ตามวิธีของ Skinner และ Walker (1968) ที่มีส่วนประกอบคือ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม โพแตสเซียมไดฟอสเฟต 0.2 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ 0.02 กรัม แมกนีเซียมเฮปตะไฮเดรต 0.04 กรัม สารละลาย FeNaEDTA 0.1 มิลลิลิตร 0.05 กรัม และเติมน้ำกร่อยโดยได้เตรียมจาก การผสมของน้ำทะเลสังเคราะห์ 400 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปลอดประจุ 600 มิลลิลิตร ตามวิธีของ Koops Harms และ Wehrmann (1976) เตรียมอาหารในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิลิตรให้มีปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร โดยเตรียม 2 ชุด บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วทดสอบการสร้างไนไตรท์ทุก 2 วันหลังจากใส่เชื้อ ใช้ปิเปตดูดมาหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานหลุม แล้วหยดสารละลาย Griess - Ilosvay reagent ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย A และ สารละลาย B อย่างละ 1 หยด (ภาคผนวก ช) ตามวิธีของ Schmidt และ Belser (1982) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อหยด Greiss - Ilosvay reagent หากมีการเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือแดง แสดงว่าเชื้อมีการสร้างไนไตรท์เกิดขึ้น

1.1.5 **ตรวจสอบคัดเลือกหาคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย**

1.1.5.1 **ทดสอบความสามารถในการเจริญในอาหารอินทรีย์**

นำเชื้อที่สามารถสร้างไนไตรท์ได้จากข้อ 1.1.4 ได้แก่แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A1, A3, A4 และ A7 มาเตรียมเป็นหัวเชื้อ (Inoculum) โดยเขี่ยโคโลนีบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร 2 มา 1 ลูป (loop) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเขย่าที่อัตรา 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วจึงปิเปตหัวเชื้อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิลตรที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่มีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบชนิดต่างๆ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนิวเตรียนท์ (nutrient broth) เจือจาง 10 เท่า อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมารีน (marine broth) เจือจาง 10 เท่า อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวฟลูอิดไธโอไกลคอลเลต (fluid thioglycollate) เจือจาง 2 เท่า อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติเคสซอย (tryptcase soy broth) เจือจาง 4 เท่า ตามวิธีของ Suwa และ คณะ (1994) และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวออร์แกนนิค (organic medium) ที่มีส่วนประกอบดังแสดงในภาคผนวก ก เจือจาง 10 เท่า ทำการบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30 วัน ตรวจสอบการเจริญโดยนำมาเขี่ยลากบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง หากไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แสดงว่า เป็นจุลินทรีย์จำพวกคีโมออโตโทรฟิคแบคทีเรีย

1.1.5.2 **ทดสอบด้วยไนตราไพริน**

นำเชื้อที่สามารถสร้างไนไตรท์ได้จากข้อ 1.1.4 ได้แก่ แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A1, A3, A4 และ A7 มาเตรียมเป็นหัวเชื้อ (Inoculum) โดยเขี่ยโคโลนีบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร 2 มา 1 ลูป (loop) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเขย่าที่อัตรา 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วจึงบีเปตหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ที่ผสมด้วยไนตราไพรินเข้มข้น 21.9 เปอร์เซ็นต์ปริมาณ 2 มิลลิลิตรต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ตามวิธีของ Smorezewski และ Schmidt (1991) จำนวน 11 ฟลาสก์ และเตรียมชุดควบคุมที่ทดลองเช่นเดียวกันแต่ไม่ผสมด้วยไนตราไพริน จำนวน 11 ฟลาสก์เช่นเดียวกัน เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker) 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน ครั้งละ 1 ฟลาสก์ เป็นระยะเวลา 30 วัน เพื่อวัดปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้น โดยวิธีไดอาโซไทเซชัน (diazotization) โดยบีเปตตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร จำนวน 4 ซ้ำ แล้วหยดซัลฟานิลาไมด์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วหยดสารละลายเอนอีดีไดไฮโดรคลอไรด์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องเช่นเดียวกัน หลังจากนั้นจึงนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข) เปรียบเทียบผลการสร้างไนไตรท์ของเชื้อกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมไนตราไพริน

1.2 **คัดเลือกหาคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์**

นำเชื้อที่ถูกยับยั้งการสร้างไนไตรท์ได้จากข้อ 1.1.5.2 ได้แก่คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A3 A4 และ A7 มาเตรียมเป็นหัวเชื้อ (Inoculum) โดยเขี่ยโคโลนีบริสุทธิ์ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร 2 มา 1 ลูป (loop) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเขย่าที่อัตรา 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วจึงบีเปตหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 8.5 ในฟลาสก์เตรียมให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30

องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน ในระยะเวลา 30 วัน เพื่อวัดปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีไดอาโซไทเซชัน ตามวิธีในข้อ 1.1.5.2

1.3 **ศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนียของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด**

ทดสอบปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนียของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียดังนี้

1.3.1 **เตรียมหัวเชื้อ (Inoculum)**

เขี่ยโคโลนีบริสุทธิ์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงจากข้อ 1.2 คือ คีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 มา 1 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

1.3.2 **ผลกระทบของแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีต่อการสร้างไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7**

บีเปตหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 1.3.1 มาปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เตรียมจำนวน 15 ฟลาสก์ โดยแปรผันปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 3 มิลลิโมลาร์ 4 มิลลิโมลาร์ และ 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 8.5 เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน ครั้งละ 1 ฟลาสก์ ในระยะเวลา 30 วัน เพื่อวัดปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีไดอาโซไทเซชัน(ภาคผนวก ข)

1.3.3 **ผลกระทบของโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อการสร้างไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7**

บีเปตหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 1.3.1 มาปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 15 ฟลาสก์ ที่เติมปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ แปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร 25 กรัมต่อลิตร และในสภาวะที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 8.5 เลี้ยง

เขย่าด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน ครั้งละ 1 ฟลาสก์ ในระยะเวลา 30 วัน เพื่อวัดปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีไดอาโซไทเซชัน (ภาคผนวก ข)

1.3.4 **ผลกระทบของความเป็นกรดด่างที่มีต่อการสร้างไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7**

ปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 1.3.1 มาปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 15 ฟลาสก์ ที่เติมปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่าแตกต่างกัน คือ 6, 7, 8 และ 9 เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน ครั้งละ 1 ฟลาสก์ ในระยะเวลา 30 วัน เพื่อวัดปริมาณไนไตรท์โดยวิธีไดอาโซไทเซชัน (ภาคผนวก ข)

1.3.5 **ผลกระทบของอุณหภูมิที่มีต่อการสร้างไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิลแบคทีเรียสายพันธุ์ A7**

ปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 1.3.1 มาปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 15 ฟลาสก์ ที่เติมปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ 8.5 แปรผันอุณหภูมิ โดยเลี้ยงเขย่าด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส ด้วย Psycrotherm Shaker รุ่น G-27 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องเขย่า Controlled environment incubator Shaker และที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่องเขย่า Gid gyroty Shaker รุ่น G 10 เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน ครั้งละ 1 ฟลาสก์ ในระยะเวลา 30 วัน เพื่อวัดปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีไดอาโซไทเซชัน (ภาคผนวก ข)

1.3.6 **ผลกระทบของอัตราการเขย่าที่มีต่อการสร้างไนไตรท์ของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7**

ปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 1.3.1 มาปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 15 ฟลาสก์ ที่เติมปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต 4 มิลลิโมลาร์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ 8.5 ซึ่งเปลี่ยนแปลงอัตราการเขย่าต่างกัน คือ 100 200 300 รอบต่อ

นาที และสภาวะที่ไม่ได้เขย่า ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน ครั้งละ 1 ฟลาสก์ ในระยะเวลา 30 วัน เพื่อวัดปริมาณไนไตรท์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีไดอาโซไทเซชัน (ภาคผนวก ข)

1.4 **ศึกษาโครงสร้างของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)**

นำคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 มาปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที ด้วย Microcentrifuge เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดเอาส่วนใสทิ้งไป ส่วนตะกอนนำมาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 3 ครั้ง นำตัวอย่างเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร กรองผ่าน millipore filter ขนาด 0.22 ไมครอน ซึ่งสามารถที่จะกรองแบคทีเรียไว้ได้ แล้ว นำแผ่น millipore filter ที่ผ่านการกรองมาทำขั้นตอน fixation เพื่อรักษาคุณสมบัติของเซลล์ไว้ โดยแช่ในกลูตารอลดีไฮด์ 1 % ที่เตรียมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 โมลาร์ แล้วผ่านกระบวนการ dehydration เพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์แบคทีเรียโดยแช่ในเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังนี้ 70 % , 80 % และ 90 % แต่ละช่วงใช้เวลา 15 นาที ต่อจากนั้น นำไปแช่ในแอบซาลูทแอลกอฮอล์ เพื่อรอที่จะทำขั้นตอนต่อไป แล้วนำแผ่นกรองที่ผ่านกระบวนการ dehydration มาทำให้เซลล์แห้งด้วยเครื่อง critical point drying machine เพื่อไม่ให้เสียรูปร่าง นำเซลล์ที่แห้งแล้วบนกระดาษกรองมาตัดบน specimen holder ด้วยเทปกาวสองหน้า แล้วเคลือบด้วยทองคำ ตรวจดูลักษณะของเซลล์ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope รุ่น JSM - T 220A

2 ศึกษาคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย

การศึกษาคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย มีขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัยดังต่อไปนี้

2.1 **การแยกคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียจากธรรมชาติ**

ในการแยกคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียจากธรรมชาติ จำเป็นต้องเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่สมบูรณ์ก่อน เนื่องจากปริมาณเชื้อในธรรมชาติมีปริมาณค่อนข้างต่ำ แล้วจึงนำมาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในภายหลัง ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

2.1.1 **การเพิ่มจำนวนคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย**

นำน้ำตัวอย่าง และตะกอน ที่เก็บจากบ่อเพาะเลี้ยงดังตารางที่ 3 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ตามวิธีของ Schmidt (1973) ซึ่งประกอบด้วย โซเดียมคลอไรด์ 1.4 กรัม โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัม แมกนีเซียมเฮปตะไฮเดรต 0.02 กรัม FeNaEDTA

5.0 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) และเติมน้ำกร่อยโดยเตรียมจากการผสมของน้ำทะเลสังเคราะห์ 400 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปลอดประจุ 600 มิลลิลิตร ตามวิธีของ Koops Harms และ Wehrmann (1976) ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 7.5 ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมไว้เบื้องต้น จำนวน 50 มิลลิลิตรลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร หรือตัวอย่างตะกอน 10 มิลลิลิตร เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 วัน แล้วนำไป เขี่ยลากบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 4 ที่เติมวุ้นบริสุทธิ์โนเบิลปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว

2.1.2 **การทำให้เชื้อบริสุทธิ์**

เขี่ยโคโลนีเดี่ยวที่มีขนาดเล็ก มาเขี่ยลากซ้ำบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร 4 บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 2 ถึง 4 สัปดาห์ เพื่อให้ได้เชื้อที่มีความบริสุทธิ์ และยืนยันความบริสุทธิ์โดยตรวจสอบด้วยการย้อมสีแกรม และศึกษาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์

ตารางที่ 3 ตัวอย่างและแหล่งที่มาของตัวอย่าง

ตัวอย่างใน บ่อกรองที่ใช้เพาะเลี้ยง สัตว์ทะเล	แหล่งที่มา	
	บ่อเพาะเลี้ยง สัตว์ทะเล สุราษฎร์ธานี	บ่อเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเล ภาควิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
น้ำ	✓	✓
ตะกอน		✓
เศษเปลือกหอย		✓

2.2 **ตรวจสอบคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรีย**

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 2.1.2 ได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์ N1 และ N2 มาทดสอบความสามารถในการสร้างไนเตรทโดยใช้จุลเขี่ยโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 3 สัปดาห์ แล้วทดสอบการสร้างไนเตรททุก 2 วัน ด้วยวิธีไนเตรทสปอตเทสต์ (nitrate spot test) โดยใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อจากหลอดทดลอง

มาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานหลุม แล้วหยดไนเตรทสปอตเทสต์ รีเอเจนต์ 1 หยด ถ้าสีของอาหารเลี้ยงเชื้อในจานหลุมเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าเชื้อมีการสร้างไนเตรทเกิดขึ้น

2.3 **เปรียบเทียบคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูง**

นำแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์ไนเตรทได้ จากข้อ 2.2 ได้แก่ N1 และ N2 มาเตรียมเป็นหัวเชื้อ (Inoculum) โดยเขี่ยโคโลนีบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร 4 มา 1 ลูป ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่เตรียมปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเขย่าที่อัตรา 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงปิเปตหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 15 ฟลาสก์ เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 2 วันหลังจากใส่หัวเชื้อ ครั้งละ 1 ฟลาสก์ ในระยะเวลา 30 วัน เพื่อวัดปริมาณไนเตรทที่เกิดขึ้นโดยวิธีบรูซีน (Brucine) (ภาคผนวก ข)

2.4 **ศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูง**

ทดสอบปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนียของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียดังนี้

2.4.1 **เตรียมหัวเชื้อ (Inoculum)**

นำคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์ไนไตรท์ให้เป็นไนเตรทสูงสุด จากข้อ 2.3 ได้แก่ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 มาเตรียมเป็นหัวเชื้อ (Inoculum) โดยเขี่ยโคโลนีบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร 4 มา 1 ลูป (loop) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

2.4.2 **ผลกระทบของโซเดียมไนไตรท์ที่มีต่อการสร้างไนเตรทของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1**

ปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 2.4.1 มาปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 15 ฟลาสก์

ที่เติมปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร แปรผันปริมาณของโซเดียมไนไตรท์ที่ 10 มิลลิโมลาร์ 15 มิลลิโมลาร์ 20 มิลลิโมลาร์ 25 มิลลิโมลาร์ และ 30 มิลลิโมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 8.5 เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน ครั้งละ 1 ฟลาสก์ เป็นระยะเวลา 30 วัน เพื่อวัดปริมาณไนเตรทที่เกิดขึ้นโดยวิธีบรูซิน (ภาคผนวก ข)

2.4.3 **ผลกระทบของโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อการสร้างไนเตรทของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1**

ปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 2.4.1 มาปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร จำนวน 15 ฟลาสก์ เติมโซเดียมไนไตรท์ปริมาณ 20 มิลลิโมลาร์ แปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่ 10 กรัมต่อลิตร 25 กรัมต่อลิตร และในสภาวะที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 8.5 เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน ครั้งละ 1 ฟลาสก์ ในระยะเวลา 30 วัน เพื่อวัดปริมาณไนเตรทที่เกิดขึ้นโดยวิธีบรูซิน (ภาคผนวก ข)

2.4.4 **ผลกระทบของความเป็นกรดด่างที่มีต่อการสร้างไนเตรทของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1**

ปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 2.4.1 มาปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 15 ฟลาสก์ เติมโซเดียมไนไตรท์ปริมาณ 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร แปรผันค่าความเป็นกรดด่างที่ 6 7 8 และ 9 เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน ครั้งละ 1 ฟลาสก์ ในระยะเวลา 30 วัน เพื่อวัดปริมาณไนเตรทที่เกิดขึ้นโดยวิธีบรูซิน (ภาคผนวก ข)

2.4.5 **ผลกระทบของอุณหภูมิที่มีต่อการสร้างไนเตรทของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1**

ปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 2.4.1 มาปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 15 ฟลาสก์

เติมโซเดียมไนไตรท์ปริมาณ 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 8.5 เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยเลี้ยงเขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส ด้วย Psycrotherm Shaker รุ่น G-27 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ Controlled environment incubator Shaker และที่อุณหภูมิห้องด้วย เครื่องเขย่า Gid gyroty Shaker รุ่น G 10 เก็บตัวอย่างทุก 2 วันครั้งละ 1 ฟลาสก์ ในระยะเวลา 30 วัน เพื่อวัดปริมาณไนเตรทที่เกิดขึ้นโดยวิธีบรูซิน (ภาคผนวก ข)

2.4.6 **ผลกระทบของอัตราการเขย่าที่มีต่อการสร้างไนเตรทของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1**

ปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 2.4.1 มาปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 15 ฟลาสก์ เติมโซเดียมไนไตรท์ปริมาณ 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 8.5 แปรผันอัตราการเขย่าที่ 100 200 300 รอบต่อนาที และสภาวะที่ไม่ได้เขย่า ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน ครั้งละ 1 ฟลาสก์ ในระยะเวลา 30 วัน เพื่อวัดปริมาณไนเตรทที่เกิดขึ้นโดยวิธีไดอาโซไทเซชัน (ภาคผนวก ข)

2.5 **ศึกษาโครงสร้างของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)**

นำคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด มาปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที ด้วย Microcentrifuge เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดเอาส่วนใสทิ้งไป ส่วนตะกอนนำมาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 3 ครั้ง นำตัวอย่างเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร กรองผ่าน millipore filter ขนาด 0.22 ไมครอน ซึ่งสามารถที่จะกรองแบคทีเรียไว้ได้ แล้วนำแผ่น millipore filter ที่ผ่านการกรองมาทำขั้นตอน fixation เพื่อรักษาคุณสมบัติของเซลล์ไว้ โดยแช่ในกลูตารอลดีไฮด์ 1 % ที่เตรียมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 โมลาร์ แล้วผ่านกระบวนการ dehydration โดยแช่ในเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังนี้ 70 % , 80 % และ 90 % แต่ละช่วงใช้เวลา 15 นาที ต่อจากนั้น นำไปแช่ในแอบซาลูทแอลกอฮอล์ เพื่อรอที่จะทำขั้นตอนต่อไป แล้วนำแผ่นกรองที่ผ่านกระบวนการ dehydration มาทำ drying proeess เพื่อทำให้เซลล์แห้งด้วยเครื่อง critical point drying machine เพื่อไม่ให้เสียรูปร่าง นำเซลล์ที่แห้งแล้วบนกระดาษกรองมาตัดบน

specimen holder แล้วเคลือบด้วยทองคำ ตรวจดูลักษณะของเซลล์ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope รุ่น JSM - T 220A

3. ทดสอบประสิทธิภาพของคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในระบบรีเซอคูเลชัน (re-circulation system)

เพื่อเป็นการทดสอบประสิทธิ์ของคีโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในการเปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็นไนเตรท โดยทำการทดลองในระบบรีเซอคูเลชัน ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.1 **ทดสอบประสิทธิภาพของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในระบบรีเซอคูเลชัน**

การทดสอบประสิทธิภาพของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ในระบบรีเซอคูเลชัน มีขั้นตอนดังนี้

3.1.1 **การเตรียมหัวเชื้อ (Inoculum)**

นำคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 ที่มีประสิทธิภาพสูงโดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร 2 มา 1 ลูป ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 80 ฟลาสก์ เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

3.1.2 **การเตรียมวัสดุตรึงซีโอไลท์**

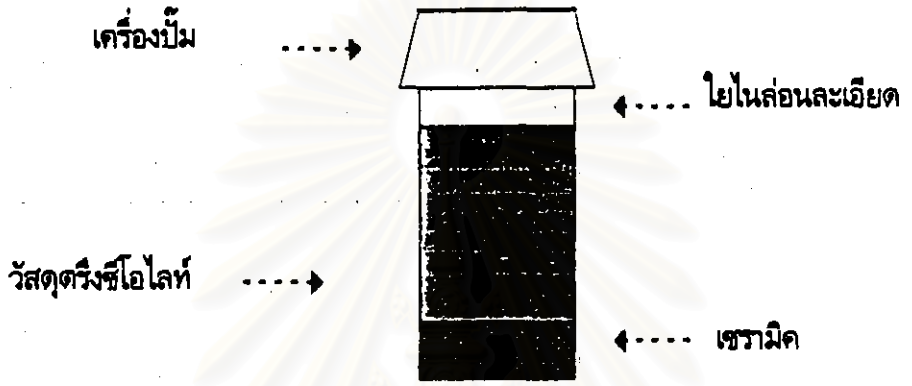
วัสดุตรึงซีโอไลท์ EHFISUBSTRATE ของบริษัท EHIM มาปริมาตร 500 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 2000 มิลลิลิตร เตรียมจำนวน 32 ฟลาสก์ แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 30 นาที

3.1.3 **การตรึงเซลล์ (Immobilization)**

นำคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ที่ได้จากการเตรียมใน ข้อ 3.1.1 มาถ่ายลงในฟลาสก์ขนาด 2000 มิลลิลิตรที่มีวัสดุตรึงซีโอไลท์ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ จากข้อ 3.1.2 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในอัตราส่วนของวัสดุตรึงซีโอไลท์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1 ขวดต่อหัวเชื้อที่เตรียมในข้อ 3.1.1 จำนวน 5 ฟลาสก์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในระยะเวลา 8 วัน เพื่อให้เชื้อเกาะติดกับวัสดุตรึงซีโอไลท์ เรียกว่าอิมโมบิไลซ์เซลล์ (Immobilized cell)

3.1.4 **บรรจุอิมโมบิไลซ์เซลล์ในเครื่องกรองน้ำ**

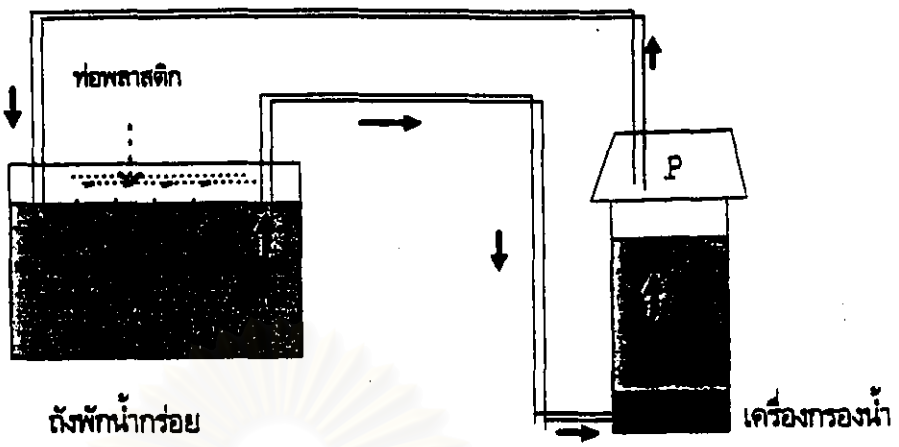
นำอิมโมบิไลซ์เซลล์ ที่ได้จากข้อ 3.1.3 บรรจุลงในเครื่องกรองน้ำ ยี่ห้อ EHIM รุ่น2213 ซึ่งมีปริมาตร 4242.85 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยบรรจุเซรามิคอยู่ชั้นล่าง ถัดขึ้นมาชั้นกลาง บรรจุด้วยเซลล์แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุตรึงซีโอไลท์ ปริมาตร 4000 มิลลิลิตร และชั้นบนเป็นเส้นใยไนล่อนละเอียด ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 การจัดเรียงวัสดุตรึงในเครื่องกรองน้ำ

3.1.5 **การทดลองระบบรีเซอคูเลชัน**

เตรียมน้ำกร่อยซึ่งมีปริมาตร 40 ลิตร ได้จากการผสมของน้ำทะเลสังเคราะห์ และน้ำประปา ในอัตรา 400 มิลลิลิตรต่อ 600 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีความเค็มประมาณ 10 กรัมต่อลิตร ใส่ลงในถังพักน้ำที่มีความจุ 52 ลิตรแล้วเติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 8.5 ติดตั้งระบบดังรูปที่ 14 โดยต่อสายพลาสติกจากถังพักน้ำกร่อยเข้ากับเครื่องกรองน้ำ ซึ่งบรรจุด้วยซีโอไลท์ที่ตรึงด้วยโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 เมื่อเดินเครื่องปั๊มทำงาน น้ำจากถังพักน้ำจะถูกดูดผ่านเข้าเครื่องกรองน้ำแล้วจะไหลวนกลับสู่ถังพักน้ำหมุนเวียนด้วยอัตราการไหลของน้ำ 440 ลิตรต่อชั่วโมง น้ำที่ไหลจะวนกลับสู่ถังพักน้ำกร่อย โดยพ่นออกทางรูเล็ก ๆ เรียงเป็นแนวระยะห่าง 3 เซ็นติเมตร บนท่อพลาสติกขนาด 30 เซ็นติเมตร ทำการทดลองในระยะเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ในขณะเดียวกันทำการทดลองในชุดควบคุมที่สภาวะเดียวกัน แต่ไม่ได้อิมโมบิไลซ์เซลล์กับวัสดุตรึงซีโอไลท์ ทำการทดลอง 2 ซ้ำของชุดทดลองและชุดควบคุม



รูปที่ 14 การหมุนเวียนของน้ำในระบบรีเซอคูเลชัน

3.1.6 **วัดการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ในน้ำดังต่อไปนี้**

เก็บตัวอย่างน้ำทุก 2 วัน ในระยะเวลาเวลา 30 วัน เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงในน้ำดังนี้

3.1.6.1 วัดปริมาณแอมโมเนียโดยวิธีฟีเนต (APHA, 1992) (ภาคผนวก ข)

3.1.6.2 วัดปริมาณไนไตรท์โดยวิธีไดอาโซไทเซชัน (APHA, 1992) (ภาคผนวก ข)

3.1.6.3 วัดค่าความเป็นกรดด่าง โดย pH meter

3.1.6.4 วัดการละลายของออกซิเจนในน้ำโดย DO meter

3.1.7 **ตรวจสอบลักษณะเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงซีโอไลท์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)**

ภายหลังการทดลอง 30 วัน ทำการตรวจสอบวัสดุตรึงซีโอไลท์ทำในชุดทดลองและชุดควบคุม เพื่อศึกษาดูเซลล์แบคทีเรียที่ถูกตรึงอยู่บนวัสดุตรึงซีโอไลท์ โดยทำขั้นตอน fixation เพื่อรักษาคุณสมบัติของเซลล์ไว้ ดึงน้ำออกจากเซลล์โดยแช่ในเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังนี้ 70 % , 80 % และ 90 % แต่ละช่วงใช้เวลา 15 นาที ต่อจากนั้น นำไปแช่ในแอบซาลูทแอลกอฮอล์ เพื่อรอที่จะทำขั้นตอนต่อไป แล้วนำแผ่นกรองที่ผ่านกระบวนการ dehydration มาทำ drying proeess เพื่อทำให้เซลล์แห้งโดยวิธี critical point dry (CPD) เพื่อไม่ให้เสียรูปร่าง นำเซลล์ที่แห้งแล้วมาวางบน specimen holder แล้วเคลือบด้วยทองคำ ภายใต้เครื่อง ตรวจดูลักษณะของเซลล์ในตริฟายอิงแบคทีเรียด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope รุ่น JSM - T 220A

3.2 **ทดสอบประสิทธิภาพของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในระบบรีเซอคูเลชัน**

การทดสอบประสิทธิภาพของคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในระบบรีเซอคูเลชัน มีขั้นตอนดังนี้

3.2.1 **การเตรียมหัวเชื้อ (Inoculum)**

นำคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ที่มีประสิทธิภาพสูงโดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร 4 มา 1 ลูป ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 80 ฟลาสก์ เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

3.2.2 **การเตรียมวัสดุตรึงซีโอไลท์**

วัสดุตรึงซีโอไลท์ EHFISUBSTRATE ของบริษัท EHIM ซึ่งมีลักษณะเป็นรูพรุนมาปริมาตร 500 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 2000 มิลลิลิตร เตรียมจำนวน 32 ฟลาสก์ แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 30 นาที

3.2.3 **การตรึงเซลล์ (Immobilization)**

นำคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่ได้จากการเตรียมใน ข้อ 3.2.1 มาถ่ายลงในฟลาสก์ขนาด 2000 มิลลิลิตรที่มีวัสดุตรึงซีโอไลท์ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ จากข้อ 3.2.2 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในอัตราส่วนของวัสดุตรึงซีโอไลท์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1 ฟลาสก์ต่อหัวเชื้อที่เตรียมในข้อ 3.2.1 จำนวน 5 ฟลาสก์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในระยะเวลา 8 วัน เพื่อให้เชื้อเกาะติดกับวัสดุตรึงซีโอไลท์ เรียกว่าอิมโมบิไลซ์เซลล์ (Immobilized cell)

3.2.4 **บรรจุอิมโมบิไลซ์เซลล์ในเครื่องกรองน้ำ**

นำอิมโมบิไลซ์เซลล์ ที่ได้จากข้อ 3.2.3 บรรจุลงในเครื่องกรองน้ำ ยี่ห้อ EHIM รุ่น 2213 ซึ่งมีปริมาตร 4242.85 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยบรรจุเซรามิคอยู่ชั้นล่าง กั้นขึ้นมาชั้นกลางบรรจุด้วยเซลล์แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุตรึงซีโอไลท์ ปริมาตร 4000 มิลลิลิตร และชั้นบนเป็นเส้นใยไนล่อนละเอียด ดังรูปที่ 13

3.2.5 **การทดลองระบบรีเซอคูเลชัน**

เตรียมน้ำกร่อยซึ่งมีปริมาตร 40 ลิตร ได้จากการผสมของน้ำทะเลสังเคราะห์ และน้ำประปา ในอัตรา 400 มิลลิลิตรต่อ 600 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีความเค็มประมาณ 10 กรัมต่อลิตร ใส่ลงในถังพักน้ำที่มีความจุ 52 ลิตรแล้วเติมโซเดียมไนไตรท์ปริมาณ 20 มิลลิโมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 7.0 ติดตั้งระบบดังรูปที่ 14 โดยต่อสายพลาสติกจากถังพักน้ำกร่อยเข้ากับเครื่องกรองน้ำ ซึ่งบรรจุด้วยซีโอไลท์ที่ตรึงเชื้อคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 เมื่อเดินเครื่องปั๊มทำงาน น้ำจากถังพักน้ำจะถูกดูดผ่านเข้าเครื่องกรองน้ำแล้วจะไหลวนกลับสู่ถังพักน้ำหมุนเวียนด้วยอัตราการไหลของน้ำ 440 ลิตรต่อชั่วโมง ทำการทดลองในระยะเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ในขณะเดียวกันทำการทดลองในชุดควบคุมที่สภาวะเดียวกันแต่ไม่ได้อิมโมบิไลซ์เซลล์กับวัสดุตรึงซีโอไลท์ ทำการทดลอง 2 ซ้ำของชุดทดลองและชุดควบคุม

3.2.6 **วัดการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ในน้ำดังต่อไปนี้**

เก็บตัวอย่างน้ำทุก 2 วัน ในระยะเวลา 30 วัน เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงในน้ำทะเลดังนี้

3.2.6.1 วัดปริมาณไนไตรท์โดยวิธีไดอาโซไทเซชัน (APHA, 1992) (ภาคผนวก ข)

3.2.6.2 วัดปริมาณไนเตรทโดยวิธีบรูซีน (APHA, 1992)(ภาคผนวก ข)

3.2.6 3 วัดค่าความเป็นกรดด่าง โดย pH meter

3.2.6.4 วัดการละลายของออกซิเจนในน้ำโดย DO meter

3.2.7 **ตรวจสอบลักษณะเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงซีโอไลท์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)**

ภายหลังการทดลอง 30 วัน ทำการตรวจสอบวัสดุตรึงซีโอไลท์ทำในชุดทดลองและชุดควบคุม เพื่อศึกษาดูเซลล์แบคทีเรียที่ถูกตรึงอยู่บนวัสดุตรึงซีโอไลท์ โดยทำขั้นตอน fixation เพื่อรักษาคุณสมบัติของเซลล์ไว้ โดยแช่ในกลูตารอลดีไฮด์ 1 % ที่เตรียมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 โมลาร์ แล้วผ่านกระบวนการ dehydration ดึงน้ำออกจากเซลล์โดยแช่ในเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังนี้ 70 % , 80 % และ 90 % แต่ละช่วงใช้เวลา 15 นาที ต่อจากนั้น นำไปแช่ในแอบซาลูท แอลกอฮอล์ เพื่อรอที่จะทำขั้นตอนต่อไป แล้วนำแผ่นกรองที่ผ่านกระบวนการ dehydration มาทำ drying proeess เพื่อทำให้เซลล์แห้งด้วยเครื่อง critical point drying machine เพื่อไม่ให้เสียรูปร่าง นำเซลล์ที่แห้งแล้วมาติดบน specimen holder แล้วเคลือบด้วยทองคำ ภายใต้เครื่อง ตรวจดูลักษณะของเซลล์ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope รุ่น JSM - T 22CA 3.2.7

3.3 **ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อผสมคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียและคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในระบบรีเซอคูเลชัน**

การทดสอบประสิทธิภาพของคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ในระบบรีเซอคูเลชัน ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.3.1 **การเตรียมหัวเชื้อ (Inoculum)**

นำคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร 2 มา 1 ลูป ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรจำนวน 40 ฟลาสก์ และ คีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร 4 มา 1 ลูป ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 40 ฟลาสก์ เช่นเดียวกัน เลี้ยงเขย่าด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารี่ที่ควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Shaker รุ่น G-27) 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

3.3.2 **การเตรียมวัสดุตรึงซีโอไลท์**

วัสดุตรึงซีโอไลท์ EHFISUBSTRATE ของบริษัท EHIM ซึ่งมีลักษณะเป็นรูพรุนมาปริมาตร 500 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 2000 มิลลิลิตร เตรียมจำนวน 32 ฟลาสก์ แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 30 นาที

3.3.3 **การตรึงเซลล์ (Immobilization)**

นำคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 3 ที่ได้จากการเตรียมใน ข้อ 3.3.1 มาถ่ายลงในฟลาสก์ขนาด 2000 มิลลิลิตรที่มีวัสดุตรึงซีโอไลท์ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ จากข้อ 3.3.2 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในอัตราส่วนของวัสดุตรึงซีโอไลท์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1 ฟลาสก์ต่อหัวเชื้อที่เตรียมในข้อ 3.3.1 จำนวน 5 ฟลาสก์ และนำคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 4 ที่ได้จากการเตรียมใน ข้อ 3.3.1 มาถ่ายลงในฟลาสก์ขนาด 2000 มิลลิลิตรที่มีวัสดุตรึงซีโอไลท์ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ จากข้อ 3.3.2 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในอัตราส่วนของวัสดุตรึงซีโอไลท์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1 ฟลาสก์ต่อหัวเชื้อที่เตรียมในข้อ 3.3.1 จำนวน 5 ฟลาสก์เช่นเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในระยะเวลา 8 วัน เพื่อให้เชื้อเกาะติดกับวัสดุตรึงซีโอไลท์เรียกว่าอิมโมบิไลซ์เซลล์ (Immobilized cell) โดยเตรียมคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิง

แบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 ที่ตรึงกับวัสดุตรึงในฟลาสก์ขนาด 2000 มิลลิลิตร สายพันธุ์ละ 8 ฟลาสก์

3.3.4 **บรรจุอิมโมบิไลซ์เซลล์ในเครื่องกรองน้ำ**

นำอิมโมบิไลซ์เซลล์ ที่ได้จากข้อ 3.3.3 บรรจุลงในเครื่องกรองน้ำ ยี่ห้อ EHIM รุ่น 2213 ซึ่งมีปริมาตร 4242.85 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยบรรจุเซรามิคอยู่ชั้นล่าง ถัดขึ้นมาชั้นกลางบรรจุด้วยเซลล์แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุตรึงซีโอไลท์ ปริมาตร 4000 มิลลิลิตร โดยผสมคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 สายพันธุ์ละ 2000 มิลลิลิตรในเครื่องกรองน้ำ และชั้นบนเป็นเส้นใยไนล่อนละเอียด ดังรูปที่ 13

3.2.5 **การทดลองระบบรีเซอคูเลชั่น**

เตรียมน้ำกร่อยซึ่งมีปริมาตร 40 ลิตร ได้จากการผสมของน้ำทะเลสังเคราะห์ และน้ำประปา ในอัตรา 400 มิลลิลิตรต่อ 600 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีความเค็มประมาณ 10 กรัมต่อลิตร ใส่ลงในถังพักน้ำที่มีความจุ 52 ลิตรแล้วเติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 8.5 ติดตั้งระบบดังรูปที่ 14 โดยต่อสายพลาสติกจากถังพักน้ำกร่อยเข้ากับเครื่องกรองน้ำ ซึ่งบรรจุด้วยซีโอไลท์ที่ตรึงเชื้อคีโมออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ A7 และคีโมออโตโทรฟิคไนไตรท์ออกซิไดซิงแบคทีเรียสายพันธุ์ N1 เมื่อเดินเครื่องปั๊มทำงานน้ำจากถังพักน้ำจะถูกดูดผ่านเข้าเครื่องกรองน้ำแล้วจะไหลวน กลับสู่ถังพักน้ำหมุนเวียนด้วยอัตราการไหลของน้ำ 440 ลิตรต่อชั่วโมง ทำการทดลองในระยะเวลา 60 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ในขณะเดียวกันทำการทดลองในชุดควบคุมที่สภาวะเดียวกันแต่ไม่ได้อิมโมบิไลซ์เซลล์กับวัสดุตรึงซีโอไลท์ ทำการทดลอง 2 ซ้ำของชุดทดลองและชุดควบคุม

3.3.6 **วัดการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ในน้ำดังต่อไปนี้**

โดยเก็บตัวอย่างน้ำทุก 2 วัน ในระยะเวลา 60 วัน เพื่อ วัดการเปลี่ยนแปลงในน้ำดังนี้

3.3.6.1 วัดปริมาณแอมโมเนียโดยวิธีฟีเนต (APHA, 1992) (ภาคผนวก ข)

3.3.6.2 วัดปริมาณไนไตรท์โดยวิธีไดอาโซไทเซชัน (APHA, 1992) (ภาคผนวก ข)

3.3.6.3 วัดปริมาณไนเตรทโดยวิธีบรูซิน (APHA, 1992) (ภาคผนวก ข)

3.3.6.4 วัดค่าความเป็นกรดด่าง โดย pH meter

3.3.6.5 วัดการละลายของออกซิเจนในน้ำโดย DO meter

3.3.7 **ตรวจสอบลักษณะเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุตรึงซีโอไลท์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)**

ภายหลังการทดลอง 60 วัน ทำการตรวจสอบวัสดุตรึงซีโอไลท์ทำในชุดทดลองและชุดควบคุม เพื่อศึกษาดูเซลล์แบคทีเรียที่ถูกตรึงอยู่บนวัสดุตรึงซีโอไลท์ โดยทำขั้นตอน fixation เพื่อรักษาคุณสมบัติของเซลล์ไว้ โดยแช่ในกลูตารอลดีไฮด์ 1 % ที่เตรียมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 โมลาร์ แล้วผ่านกระบวนการ dehydration ดึงน้ำออกจากเซลล์โดยแช่ในเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังนี้ 70 % , 80 % และ 90 % แต่ละช่วงใช้เวลา 15 นาที ต่อจากนั้น นำไปแช่ในแอบซาลูท แอลกอฮอล์ เพื่อรอที่จะทำขั้นตอนต่อไป แล้วนำแผ่นกรองที่ผ่านกระบวนการ dehydration มาทำ drying proeess เพื่อทำให้เซลล์แห้งโดยวิธี critical point drying machine เพื่อไม่ให้เสียรูปร่าง นำเซลล์ที่แห้งแล้วมาติดบน specimen holder แล้วเคลือบด้วยทองคำ ตรวจดูลักษณะของเซลล์คิโมออโตโทรฟิคไนตริฟายอิงแบคทีเรียด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope รุ่น JSM - T 220A

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย