บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองและ เคมีภัณฑ์

3.1.1 สารเคมี

ได-โพแตสเซียม ไฮโดรเจน ออร์โทฟอสเฟต (Di-potassium hydrogen orthophosphate : K_2HPO_4)

แมกนีเซียม ซัลเฟต เฮปาไฮเดรต (Magnesium sulfate hepahydrate : $MgSO_4.7H_2O$)

แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate : $CaCO_3$)

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride : NaCl)

ยีสต์ เอ็กแทรกซ์ (Bacto™ yeast extract)

โพลีเป็ปโตน (Polypeptone)

กรดอะซิติกเข้มข้น (Glacial acetic acid)

โซเดียมอะซิเตท แอนไฮดรัส (Sodium acetate anhydrous)

โซเดียมแลคเตท (60% Sodium lactate)

ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether)

เบนซิน (Benzene)

อะซีโตไนไตรท์ (Acetonitrite)

แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (Absolute ethanol)

แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ (70% Alcohol)

แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Alcohol)

กลีเซอรอล (Glycerol)

น้ำมันพาราฟิน (Paraffin oil)

เมทานอล (Methanol)

อะซีโตน (Acetone)

ดี-กลูโคส (D-glucose)

ซอร์บิทอล (Sorbitol)

ซูโครส (Sucrose)

3.1.2 จุลินทรีย์ทดสอบ

ประกอบด้วยสายพันธุ์อ้างอิงดังนี้

Acetobacter aceti (Beijerinck, 1898) BCC 12455^{T}

Gluconobacter oxydans (Deley, 1961) BCC 12337^{T}

Gluconacetobacter liquefaciens (Yamada *et al*., 1997) BCC 12274^{T}

Asaia bogorensis (Yamada *et al*., 2000) BCC 12264^{T}

Swaminathania salitolerans (Loganathan and Nair, 2004)BCC 17684^{T}

Kozakia ballensis (Lisdiyanti *et al.,* 2002)BCC 12275^{T}

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

กลูโคส-เอทานอล-อะซิติก-แอซิดมีเดียม (Glucose-ethanol-acetic acid medium)

ซอร์บิทอลมีเดียม (Sorbitol medium)

เมทานอลมีเดียม (Methanol medium)

แมนนิทอลมีเดียม (Mannitol medium)

กลูโคส-เอทานอล-แคลเซียมคาร์บอเนตอะการ์เพลท (Glucose-ethanol-calcium carbonate agar plate)

พรีเซอร์เวชั่นมีเดียม (Preservation medium)

เทสต์มีเดียม (Test medium)

ฮิวก์ แอนลิฟสันมีเดียม (Hugh and Leifson's medium)

ออกซิเดชั่นออฟอะซิเตท/แลคเตทมีเดียม (Oxidation of Acetate/Lactate medium)

กลูโคส-เอทานอลมีเดียม (Glucose ethanol medium)

ดิฟฟีเรนกลูโคสมีเดียม (Different glucose medium)

3.1.4 อุปกรณ์อื่น ๆที่ใช้ในการทดลอง

ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (incubater 30 ^{0}C)

เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง (scales meter)

หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

เครื่องอบลมร้อน (hot air oven)

ตู้เขี่ยเชื้อ (lamina flow)

ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (freezer)

เครื่องเขย่าสาร (shaker)

เครื่องฉายแสง UV ความยาวคลื่น 254 nm (UV lamp projecter)

ไมโครปิเปต (micropipette)

3.2 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชู

แหล่งของตัวอย่างที่นำมาคัดแยกเชื้อ ได้แก่ อาหารหมักดองในเขตดุสิต กรุงเทพมหานคร โดยทำการเก็บตัวอย่าง จากตลาดเทเวศร์ ตลาดมหานาค ตลาดศรีย่าน และตลาดราชวัตร ทำการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้งในเดือนมิถุนายนและเดือนสิงหาคม ได้ตัวอย่างรวมทั้งสิ้น 56 ตัวอย่าง ได้แก่ ผักกาดดอง หน่อไม้ดอง หน่อไม้ปี๊บ หัวไฉ่โป๊ว กระเทียมดอง บ๊วยดองเค็ม เต้าเจี้ยว เต้าหู้ยี้ ต้นหอมดอง กระหล่ำปลีดอง ผักบุ้งดอง ผักรวมดอง

3.3. การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชู

3.3.1 นำตัวอย่างมาบดใส่ในอาหาร enrichment culture ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ Glucose-ethanol-acetic acid medium (pH 3.5), Sorbitol medium (pH 3.5), 30% Glucose medium (pH 3.5), Mannitol medium (pH 3.5) และ Methanol medium (pH 3.5)

3.3.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน

3.3.3 นำหลอดที่มีการเจริญของจุลินทรีย์มาคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชู บนอาหาร Glucose-ethanol-calcium carbonate agar plate โดยการ streak plate

3.3.4 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน

3.3.5 คัดเลือกแบคทีเรียที่มีโซนใสรอบโคโลนีซึ่งคาดว่าเป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูมาทำให้เป็นแบคทีเรียบริสุทธิ์ (pure culture) บนอาหาร Glucose-ethanol-calcium carbonate agar plate อีกครั้ง

3.3.6 นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ได้ไปเก็บรักษาในอาหาร maintainent medium ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บรักษาแบคทีเรียไว้ทำการทดสอบต่อไป

3.4 การจัดจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชู

3.4.1 การทดสอบความสามารถในการออกซิไดซ์และการหมัก (Oxidation – Fermentation test, O/F test)

3.4.1.1 เพาะแบคทีเรียบริสุทธิ์ในอาหารฮิวก์แอนลิฟสันมีเดียม (Hugh and Leifson's medium) เชื้อละ 2 หลอด โดยการแทงด้วยเข็มเขี่ยเชื้อลงไปตรงๆ ในหลอด (stab inoculation)

3.4.1.2 หลังจากเพาะแบคทีเรีย เทพาราฟินเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงในหลอดใดหลอดหนึ่งประมาณ 3 มิลลิลิตร เพื่อให้เป็นสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

3.4.1.3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.4.1.4 การอ่านผล : (+/-) หมายถึง หลอดที่ไม่ได้ปิดทับด้วยน้ำมันพาราฟินเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแต่หลอดที่มีน้ำมันพาราฟินเป็นสีเขียว , (+/+) หมายถึง มีการเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้ง 2 หลอด

3.4.2. การทดสอบ Catalase

3.4.2.1 นำแบคทีเรียที่มีอายุ 24 – 48 ชั่วโมงมาทำการป้ายลงบน แผ่นสไลด์ที่สะอาด

3.4.2.2 หยด Hydrogen peroxide ลงบริเวณที่ทำการป้ายเชื้อ

3.4.2.3 การอ่านผล : + หมายถึง แบคทีเรียเกิดปฏิกิริยากับ Hydrogen peroxide , - หมายถึงไม่เกิดปฏิกิริยา

3.4.3. การทดสอบการเจริญบนอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (Growth on 30% Glucose)

3.4.3.1 เพาะแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารกลูโคส-เอทานอล-แคลเซียมคาร์บอเนต อะการ์ (Glucose-ethanol-calcium carbonate agar plate) เป็นเวลา 2-3 วัน

3.4.3.2 นำแบคทีเรียมา streak ลงบนอาหารกลูโคส (Glucose medium) ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 30 เปอร์เซ็นต์

3.4.3.3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน

3.4.3.4 ถ้าแบคทีเรียสามารถเจริญบนอาหารได้แสดงว่าเป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูในสกุล *Asaia* , *Gluconobacter* และ *Gluconacetobacter*

3.4.3.5 อ่านและบันทึกผลโดย : + หมายถึงแบคทีเรียสามารถเจริญได้, - หมายถึงแบคทีเรียไม่สามารถเจริญ

3.4.4. การทดสอบการออกซิไดซ์อะซิเตทและแลคเตท (Oxidation of Acetate and Lactate)

การทดลองในครั้งนี้ใช้วิธีของ Leifson's method ซึ่งปฏิบัติดังนี้

3.4.4.1 เจือจางแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.4.4.2 ถ่ายสารละลายเซลล์แขวนลอยปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในอาหารทดสอบการออกซิไดซ์อะซิเตทและแลคเตท

3.4.4.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบผล ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

3.4.4.4 อ่านและบันทึกผลโดย : + หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีน้ำเงิน, - หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง, w หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีน้ำเงินแกมเขียว

3.4.5. การตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรีย

3.4.5.1 เจือจางแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.4.5.2 ถ่ายสารละลายเซลล์แขวนลอยปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในอาหารทดสอบ ได้แก่ อาหารกลูโคส-เอทานอลที่เติมกรดอะซิติก เข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 3.5 (Glucose-ethanol with 0.3% acetic acid medium) อาหารกลูโคส-เอทานอล พีเอช 3.5 (Glucose-ethanol) , อาหารซอร์บิทอล พีเอช 3.5 (Sorbitol medium), อาหารซูโครสที่เติมกรดอะซิติก เข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 3.5 (Sucrose with 0.3% acetic acid medium)

3.4.5.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียทุก 24 ชั่วโมง โดยสังเกตความขุ่นของอาหาร เป็นเวลา 7 วัน

3.4.5.4 อ่านและบันทึกผลโดย : +++ หมายถึง เจริญดีมาก , ++ หมายถึง เจริญดี , + หมายถึง เจริญเล็กน้อย, - หมายถึง แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้

3.4.6. ทดสอบการเจริญบนอาหารที่ พีเอชต่างๆ (Growth on different pH)

3.4.6.1 เจือจางแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.4.6.2 ถ่ายสารละลายเซลล์แขวนลอยปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในอาหารกลูโคส-เอทานอล (Glucose-ethanol medium) ที่มีพีเอชต่างๆ กัน คือ 3.0 , 3.5 , 4.0 , 4.5 , 5.0 , 5.5 และ 6.0

3.4.6.3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

3.4.6.4 ตรวจสอบผลการเจริญของแบคทีเรียโดยสังเกตความขุ่นของอาหาร

3.4.6.5 อ่านและบันทึกผลโดย : +++ หมายถึง เจริญดีมาก , ++ หมายถึง เจริญดี , + หมายถึง เจริญเล็กน้อย, - หมายถึงแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้

3.5. การเก็บรักษา

เมื่อตรวจสอบพบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ คือ แบคทีเรียกลุ่ม acetic acid bacteria ให้นำแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวเก็บในอาหาร Preservation medium ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส