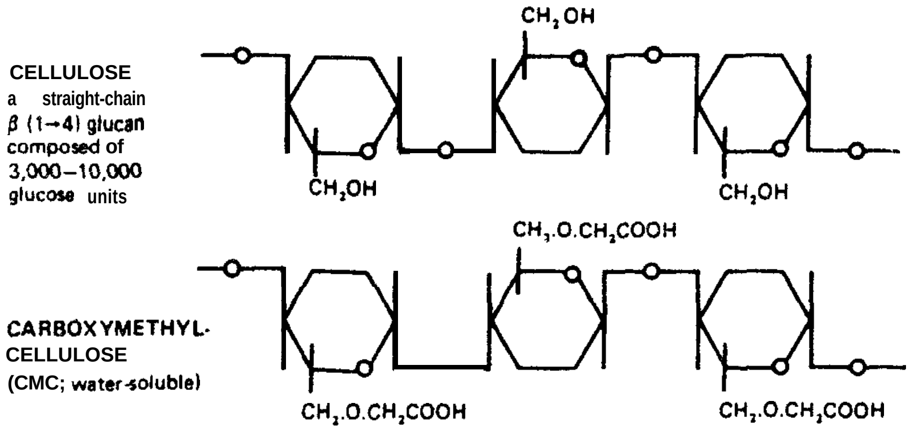
บทปฏิบัติการที่ 14

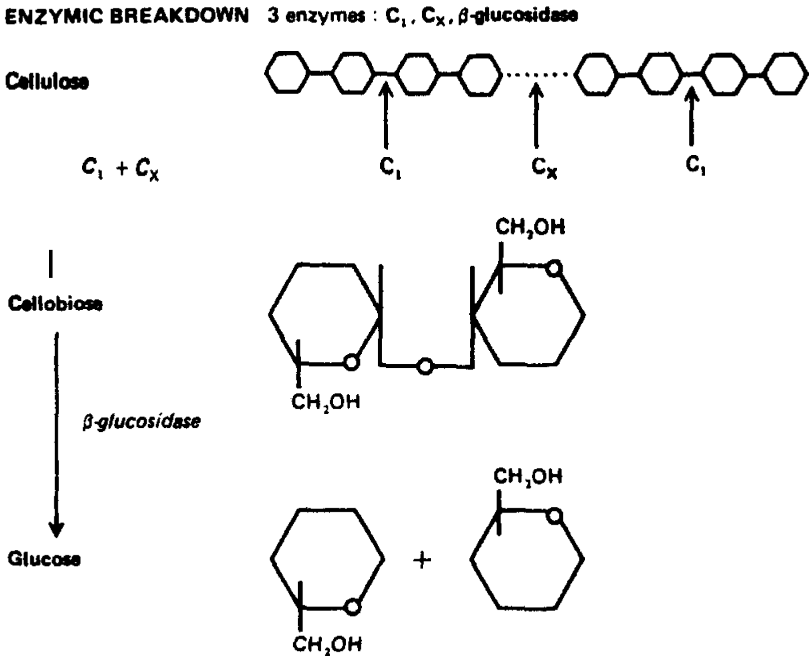
การย่อยสลายเซลลูโลสโดยจุลินทรีย์ในดิน

เซลลูโลส (cellulose) เป็นโพลีแซ็กคาไรด์ที่พบมากในธรรมชาติ ประกอบด้วยหน่วยของเบต้า–กลูโคส (β-glucose) เชื่อมกันด้วย 1, 4 – กลูโคซิดิกบอนด์ (1, 4 – glucosidic bond), ถ้ากลูโคส 2 โมเลกุลเชื่อมกันด้วยเบต้า – 1, 4 กลูโคซิดิกบอนด์ได้เป็นเซลโลไบโอส (cellobiose) โมเลกุลของเซลลูโลสประกอบด้วยเซลโลไบโอส 1,000 – 10,000 หน่วยเชื่อมต่อกัน ซึ่งมักจะไม่ละลายน้ำ พวกที่ละลายน้ำได้อยู่ในรูปคาร์บอกซิเมธิวเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose)



จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ มีทั้งพวกแอโรบ, แอนแอโรบ, มีโซฟิลิกและเทอร์โมฟิลิกบักเตรี, ฟังไจ และแอคติโนมัยสีท จุลินทรีย์เหล่านี้จะย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีในสภาวะแวดล้อมแตกต่างกัน โดยผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลส (cellulase) ซึ่งเป็นอะแด็ปทีฟเอ็นไซม์ (adaptive enzyme) ถูกสร้างเมื่อมีเซลลูโลสมากระตุ้น จึงสามารถตรวจหาเซลลูเลสที่มีอยู่ในดินเพื่อแสดงว่ามีการสลายเซลลูโลสในดินหรือไม่

เอ็นไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างในการย่อยสลายเซลลูโลสมีหลายชนิด เรียกรวมว่า เซลลูเลส ได้แก่ C_1 หรือเอ็กโซกลูคาเนส (exoglucanase) จะสลายเบต้า – 1, 4 กลูโคซิดิกบอนด์จากปลายด้านนอกของสายเซลลูโลสเข้ามาทีละ 2 โมเลกุล, C_x หรือ เอ็นโดกลูคาเนส (endoglucanase) จะสลายเบต้า – 1, 4 กลูโคซิดิกบอนด์แบบสุ่ม ภายในสายของเซลลูโลส และเบต้า–กลูโคซิเดส (B-glucosidase) จะสลายเบต้า –1, 4 กลูโคซิดิกบอนด์ของเซลโลไบโอส เป็นต้น



<u>วัตถุประสงค์</u>

ตรวจหาการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลสที่มีอยู่ในดินด้วยวิธีไดไนโตรซาลิ ซิลิก (dinitrosalicylic) และหาปริมาณจุลินทรีย์พวกแอโรบิกมีโซฟิลิกในดินที่สลาย เซลลูโลสด้วยวิธีเอ็ม–พี–เอ็น

<u>อุปกรณ์</u>

1. ดินตัวอย่าง
2. น้ำกลั่นฆ่าเชื้อในขวดฝาเกลียว 90 มล.. 3 ขวด, 100 มล. 2 ขวด
3. น้ำกลั่น
4. ปิเปต 1 มล., 10 มล.
5. หลอดทดสอบ
6. สไลด์
7. กล้องจุลทัศน์
8. เครื่องปั่น (blender)
9. เครื่องปั่นตกตะกอนที่มีอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifugation)
10. เครื่องวัดความขุ่น (spectrophotometer)
11. อ่างต้มน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (water bath)
12. กลูโคส
13. หลอดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์พวกเซลลูโลไลติกซึ่งมีกระดาษกรองขนาด 1 x 6 ซม.^{2} อยู่
14. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) 0.01 โมลาร์ (M) พีเอช 7
15. กรด 3, 5 ไดไนโตรซาลิซิลิก
16. เอธานอล 95%
17. สีฟีนอล-อีริโทรซิน (phenol-erythrocin)
18. สีคริสตอลไวโอเลต (crystal violet)

วิธีปฏิบัติ

การหาการทำงานของเซลลูเลสในดินด้วยวิธีไดไนโตรซาลิซิลิก

1. เตรียมน้ำละลายดินความเจือจาง 1 : 2 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ พีเอช 7

2. นำมาปั่นให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันในเครื่องปั่นนาน 5 นาที

3. ปั่นแยกตะกอนและน้ำใสออกจากกันด้วยเครื่องเซนติฟิวจ์ความเร็ว 15,000 x G อุณหภูมิ 4 °ซ. นาน 1 ชม. รินส่วนน้ำใสแยกออกมา

4. หาการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส โดยดูดส่วนน้ำใสจากข้อ 3. ใส่หลอดทดสอบ 1 มล. เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์พีเอช 7 1 มล. ลงไปผสมกัน และใส่กระดาษกรองขนาด 1 x 6 ซม.^{2} 1 ชิ้น (ทำ 2 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ. 1 ชม.

5. วัดปริมาณรีดิวซิงก์ซูการ์ (reducing sugar)

   5.1 เติมกรด 3, 5 ไดไนโตรซาลิซิลิก 3 มล. ลงในหลอดทดสอบจากข้อ 4.

   5.2 ต้มในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 °ซ. นาน 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

   5.3 ดูดสารละลายจากข้อ 5.2 1 มล. ใส่ในหลอดทดสอบ เติมน้ำกลั่น 8 มล. เขย่าให้เข้ากันสม่ำเสมอ วัดความขุ่นด้วยสเปกโทรนิก 20 ที่ 550 นาโนมิเตอร์ โดยใช้บัฟเฟอร์เป็นสารละลายที่ไม่มีความขุ่นเทียบ

   5.4 เปรียบเทียบความขุ่นเพื่อหาค่ารีดิวซิงก์ซูการ์จากเส้นกราฟมาตรฐาน

6. การทำเส้นกราฟมาตรฐาน

   6.1 ละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (100 – 3,000 ไมโครกรัม) แต่ละความเข้มข้นในบัฟเฟอร์ 1.5 มล.

6.2 เติมกรด 3, 5 ไดไนโตรซาลิซิลิก ลงไปผสมกับสารละลายกลูโคส หลอดละ 3 มล.

6.3 ต้มในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 °ซ. 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

6.4 ดูดสารละลายจากข้อ 6.3 1 มล. ใส่ในหลอดทดสอบ เติมน้ำกลั่น 9 มล. เขย่าให้เข้ากันสม่ำเสมอ วัดความขุ่นด้วยสเป็กโทรนิก 20 ที่ 550 นาโนมิเตอร์ ใช้บัฟเฟอร์เป็นสารละลายที่ไม่มีความขุ่นเทียบ

6.5 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสกับความขุ่น

<u>การหาปริมาณจุลินทรีย์พวกแอโรบิกมีโซฟิลิกในดินที่สลายเซลลูโลสด้วยวิธี เอ็ม–พี–เอ็น</u>

1. เตรียมน้ำละลายดินเจือจาง 1 : 10, 1 : 10^2, 1 : 10^3, 1 : 10^4, 1 : 10^5

2. ดูดน้ำละลายดินความเจือจางละ 1 มล. ใส่ลงในหลอดบรรจุอาหารสำหรับเซลลูโลไลติกที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งของเซลลูโลส ทำทุกความเจือจาง ความเจือจางละ 5 ซ้ำ

3. ทำหลอดคุมเปรียบเทียบ 3 หลอด

4. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 4 สัปดาห์

5. บันทึกผลหลอดที่มีการเจริญเติบโต และคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ที่สลายเซลลูโลสต่อดิน 1 กรัม จากตาราง เอ็ม–พี–เอ็น ดังนี้

ปริมาณจุลินทรีย์ที่สลายเซลลูโลสในดิน $= \frac{x}{b}$

x = ค่าจากตาราง เอ็ม-พี-เอ็นที่นำผลจากการทดลองไปเทียบได้

b = ค่าความเจือจางของน้ำละลายดินลำดับกลางใน 3 ความเจือจางที่ใช้ผลไปอ่านในตาราง

<u>การตรวจสอบการเจริญเติบโต</u>

1. เขย่าหลอดอาหารที่มีน้ำละลายดินอยู่แรง ๆ ดูลักษณะความยุ่ยของกระดาษกรอง เปรียบเทียบกับในหลอดคุม

2. นำกระดาษกรองวางบนแผ่นสไลด์ แช่ในเอธานอล 95 เปอร์เซนต์

3. ย้อมสีฟีนอล-อีริโทรซิน 2 - 3 นาที

4. ล้างน้ำให้สะอาด

5. ย้อมทับด้วยสีคริสตอลไวโอเลต 5 - 10 นาที

6. ศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อที่เจริญอยู่บนกระดาษกรองด้วยกล้องจุลทัศน์และวาดภาพแสดงลักษณะไว้

<u>คำถาม</u>

1. จงเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการตรวจสอบจุลินทรีย์ในดินที่ย่อยสลายเซลลูโลสของทั้ง 2 วิธี?

2. จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสในดิน มีอะไรบ้าง?

3. เอ็นไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ทุกชนิดจะทำงานได้ดีที่พีเอช 7 ใช่หรือไม่?

ตารางแสดงปริมาณจุลินทรีย์ในดินที่มีโอกาสพบได้มากที่สุด (เอ็ม–พี–เอ็น)

Code			X	P	Code			X	P	Code			X	P
10	10	10	100.0	100.0	10	10	0	2.40	3.4	10	9	0	1.70	5.30
10	10	9	23.0	38.7	10	9	9	6.07	0.01	10	8	7	3.10	0.01
10	10	8	16.2	30.2	10	9	8	5.26	0.04	10	8	6	2.78	0.14
10	10	7	12.0	26.2	10	9	7	4.58	0.27	10	8	5	2.49	0.56
10	10	6	9.18	25.0	10	9	6	3.98	0.85	10	8	4	2.21	1.64
10	10	5	7.02	24.2	10	9	5	3.46	2.25	10	8	3	1.96	4.50
10	10	4	5.42	23.4	10	9	4	2.98	4.80	10	8	2	1.71	8.46
10	10	3	4.28	21.7	10	9	3	2.63	8.57	10	8	1	1.50	10.83
10	10	2	3.49	17.3	10	9	2	2.28	11.77	10	8	0	1.30	7.21
10	10	1	2.75	10.2	10	9	1	1.97	11.02	10	7	6	2.19	0.01
10	7	5	1.95	0.20	10	6	3	1.25	0.59	10	4	5	1.073	0.01
10	7	4	1.74	0.80	10	6	2	1.09	2.73	10	4	4	0.943	0.07
10	7	3	1.53	2.57	10	6	1	0.933	8.42	10	4	3	0.818	0.48
10	7	2	1.33	6.17	10	6	0	0.792	10.73	10	4	2	0.700	2.26
10	7	1	1.16	10.01	10	5	5	1.30	0.02	10	4	1	0.589	7.97
10	7	0	1.01	9.33	10	5	4	1.15	0.14	10	4	0	0.493	14.99
10	6	6	1.75	0.01	10	5	3	1.02	0.91	10	3	4	0.773	0.02
10	6	5	1.57	0.08	10	5	2	0.872	3.30	10	3	3	0.662	0.24
10	6	4	1.41	0.11	10	5	1	0.742	8.94	10	3	2	0.561	1.60
10	6	3	1.25	0.59	10	5	0	0.622	12.68	10	3	1	0.474	6.93
10	3	[illegible]	.399	17.67	10	0	2	.314	0.15	9	5	1	.372	0.86
10	2	4	.631	0.01	10	0	2	.268	1.44	9	5	0	.334	1.78
10	2	3	.534	0.12	10	0	0	.231	7.95	9	4	3	.408	0.02
10	2	2	.455	0.98	9	8	0	.499	0.03	9	4	2	.365	0.22
[illegible]	[illegible]	[illegible]	.368	5.30	9	7	1	.488	0.02	9	4	1	.324	1.13
10	2	0	.329	18.14	9	7	0	.435	0.17	9	4	0	.290	3.58
10	[illegible]	3	.442	0.04	9	6	2	.474	0.06	9	3	3	.362	0.04
10	1	2	.376	0.60	9	6	1	.425	0.23	9	3	2	.324	0.26
10	1	[illegible]	317	3.71	9	6	0	.381	0.56	9	3	1	.288	1.77
10	[illegible]	[illegible]	.275	15.14	9	5	2	.416	0.10	9	3	0	.255	6.23
9	2	[illegible]	[illegible]	0.03	8	6	0	.270	0.11	8	2	2	.210	0.14
9	2	2	[illegible]	0.26	8	5	1	.267	0.11	8	2	1	.188	1.24
9	2	1	.253	2.19	8	5	0	.242	0.46	8	2	0	.169	7.12
9	2	0	.223	9.53	8	4	2	.266	0.04	8	1	2	.187	0.11
9	1	2	.249	0.19	8	4	1	.240	0.33	8	1	1	.166	1.46
9	1	1	.221	1.84	8	4	0	.217	1.47	8	1	0	.147	9.31
[illegible]	[illegible]	0	.193	9.03	8	3	2	.239	0.06	8	0	2	.166	0.06
9	[illegible]	2	.217	0.07	8	3	1	.214	0.77	8	0	1	.146	0.88
9	0	1	.191	0.79	8	3	0	.193	3.73	8	0	0	.128	6.41
9	[illegible]	0	.164	5.02	8	2	3	.233	0.01	7	6	0	.212	0.02
[illegible]	[illegible]	1	.209	0.09	7	2	0	.133	5.49	6	4	0	.139	0.32
[illegible]	[illegible]	[illegible]	.191	0.16	7	1	2	.149	0.08	6	3	2	.153	0.01
[illegible]	[illegible]	2	[illegible]	[illegible]	7	1	1	.132	1.10	6	3	1	.138	0.20
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	7	1	0	.116	8.98	6	3	0	.123	1.35
[illegible]	[illegible]	[illegible]	.171	0.68	7	0	2	.132	0.03	6	2	2	.137	0.03
[illegible]	[illegible]	2	.188	0.03	7	0	1	.116	0.80	6	2	1	.122	0.45
[illegible]	[illegible]	[illegible]	169	0.35	7	0	0	.101	7.92	6	2	0	.107	4.12
[illegible]	[illegible]	[illegible]	.152	2.44	6	5	0	.155	0.08	6	1	2	.121	0.06
[illegible]	[illegible]	[illegible]	167	0 04	6	4	2	.171	0.00	6	1	1	.106	0.87
[illegible]	[illegible]	[illegible]	.150	0.78	6	4	1	.155	0.04	6	1	0	.092	8.73
[illegible]	[illegible]	[illegible]	.106	0.04	5	2	0	.086	3.36	4	3	0	.080	0.43
[illegible]	0	2	.092	0.83	5	1	2	.099	0.03	4	2	1	.080	0.16
6	0	0	.078	9.77	5	1	1	.086	0.58	4	2	0	.068	2.16
[illegible]	[illegible]	[illegible]	126	0.04	5	1	0	.073	8.28	4	1	2	.080	0.01
[illegible]	[illegible]	1	.127	0.02	5	0	2	.085	0.01	4	1	1	.068	0.50
[illegible]	[illegible]	[illegible]	.114	0.14	5	0	1	.072	0.79	4	1	0	.056	7.21
[illegible]	[illegible]	1	.113	0.08	5	0	0	.060	12.10	4	0	2	.067	0.02
[illegible]	3	0	.100	0.79	4	5	0	.106	0.02	4	0	1	.056	0.76
5	2	2	.113	0.01	4	4	0	.093	0.06	4	0	0	.045	14.62
[illegible]	2	1	.099	0.28	4	3	1	.092	0.03	3	4	0	.076	0.04
3	3	2	.086	0.00	3	0	0	.032	18.64	1	2	1	.038	0.02
3	3	1	.075	0.02	2	4	0	.062	0.02	1	2	0	.029	0.53
3	3	0	.064	0.23	2	3	0	.051	0.11	1	1	1	.028	0.12
3	2	1	.064	0.09	2	2	0	.041	3.95	1	1	0	.019	4.76
3	2	0	.053	1.53	2	1	1	.040	0.02	1	0	1	.019	0.34
3	1	2	.064	0.04	2	1	0	.030	6.01	1	0	0	.110	34.58
3	1	[illegible]	.055	0.31	2	0	2	.040	0.01	0	2	0	.018	0.21
[illegible]	[illegible]	[illegible]	.042	7.00	2	0	1	.030	0.41	0	1	1	.018	0.04
[illegible]	[illegible]	2	.052	0.02	2	0	0	.020	24.13	0	1	0	.009	3.05
[illegible]	[illegible]	[illegible]	.042	0.51	1	3	0	.038	0.04	0	0	1		0.26

รายงานผลปฏิบัติการที่ 14

ชื่อ ______________________ รหัสประจำตัว __________

วันที่ ______________ กลุ่มที่ ____ ผู้ร่วมงาน __________

จง เขียนเส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับความขุ่น

<u>การทำงานของเซลลูเลสในดิน</u>

	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
การวัดความขุ่นของรีดิวซิงก์ซูการ์			

เทียบความขุ่นที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐานจะมีรีดิวซิงก์ซูการ์ ________________

<u>บันทึกผลหลอดอาหารที่มีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่สลายเซลลูโลส</u>

หลอดที่ / ความเจือจาง	1	2	3	4	5	รวม	คูณด้วย 2
1 : 10							
1 : 10^2							
1 : 10^3							
1 : 10^4							
1 : 10^5							

X = ____________ b = ____________

ปริมาณจุลินทรีย์ที่สลายเซลลูโลสในดิน 1 กรัม = $\frac{X}{b}$ = ____________