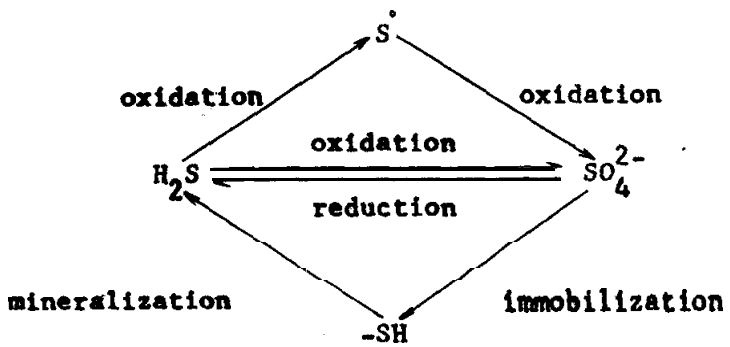
บทปฏิบัติการที่ 20

ออกซิเดชั่นของกำมะถันในดิน

กำมะถันหรือสารประกอบกำมะถันในดิน มีทั้งในรูปสารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์ การออกซิเดชั่นของกำมะถัน จะเกิดการเคลื่อนย้ายของอีเล็กตรอนได้ตั้งแต่จาก −2 ถึง + 6 เป็นรูปต่าง ๆ คือ

	sulphur		tctrathionatc		**sulphite**	
H_2S ⟶	S ⟶	$S_2O_3^{2-}$ ⟶	$S_4O_6^{-}$ --	$S_3O_6^{2-}$ ⟶	SO_3^{2-} ⟶	SO_4^{2-}
sulphide		**thiosulphate**	trithionate			sulphate

ในดินชั้นบน (A และ B) มักจะพบซัลเฟอร์อยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์มากกว่าสารประกอบอนินทรีย์ อยู่ในรูปของกลุ่มซัลฟไฮดริล (− SH) เกาะอยู่กับโมเลกุลของสารประกอบอินทรีย์ เมื่อผ่านขบวนการแปรรูปซากอาหารให้เป็นสารประกอบอนินทรีย์ **(mineralization)** จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปซัลไฟด์ก่อน จึงถูกออกซิไดส์ต่อ ๆ ไปจนอยู่ในรูปซัลเฟต ซึ่งเป็นรูปที่จุลินทรีย์และพืชส่วนใหญ่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้



(organic **sulphur**)

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการซัลเฟอร์ออกซิเดชัน มี 4 กลุ่มคือ

1. บักเตรีจีนัส **Thiobacillus** มีทั้งฟาคัลเททีฟออโตโทรฟ และอ็อบลิเกตออโตโทรฟ สามารถออกซิไดส์ซัลเฟอร์ ซัลไฟด์ และไทโอซัลเฟตได้ เช่น

T. thioparus ใช้ซับส เตรต $S_2O_3^{2-}$, $S_4O_6^{2-}$, $S_3O_6^{2-}$, H_2S

ตัวอย่างของออกซิเดชั่น $5Na_2S_2O_3 + 4O_2 + H_2O \longrightarrow 5Na_2SO_4 + H_2SO_4 + 4S$

T. thiooxidans ใช้ซับสเตรต S°, $S_2O_3^{2-}$

ตัวอย่างของออกซิเดชั่น $2S + 3O_2 + 2H_2O \longrightarrow 2H_2SO_4$

T. novellus ใช้ซับสเตรต S°, $S_2O_3^{2-}$

ตัวอย่างของออกซิเดชั่น $Na_2S_2O_3 + 2O_2 + H_2O \longrightarrow 2NaHSO_4$

T. denitrificans ใช้ซับสเตรต S°, H_2S, $S_2O_3^{2-}$

ตัวอย่างของออกซิเดชั่น $5S + 6KNO_3 + 2H_2O \longrightarrow K_2SO_4 + 4KHSO_4 + 3N_2$

2. เฮเทอโรโทรฟ มีทั้งบักเตรี เชื้อรา และแอคติโนมัยสีท จะออกซิไดส์ซัลเฟอร์หรือไทโอซัลเฟต เมื่อมีซับสเตรตที่เป็นอินทรีย์วัตถุอยู่ด้วย

3. ไตรโคมบักเตรี (trichome bacteria) เป็นบักเตรีที่อาศัยอยู่ในน้ำ จะออกซิไดส์ไฮโดรเจนซัลไฟด์ และสะสมซัลเฟอร์ไว้ในโกล-บูล ภายในเซลล์ ได้แก่ บักเตรีจีนัส **Beggiatoa, Thiothrix, Thioplaca** และ **Sphaerotilus** เป็นต้น

$$2H_2S + O_2 \longrightarrow 2S + 2H_2O$$

4. โฟโตซินทีติกซัลเฟอร์บักเตรี ทำให้เกิดแอนแอโรบิกออกซิเดชั่นของซัลเฟอร์ ได้แก่ กรีนซัลเฟอร์บักเตรี เช่น **Chlorobium**

$$2H_2S + CO_2 \longrightarrow (CH_2O) + H_2O + 2S$$

เพอร์เพิลซัลเฟอร์บัก เตรี เช่น **Chromatium**

$$H_2S + 2H_2O + 2CO_2 \longrightarrow 2(CH_2O) + H_2SO_4$$

Thiobacillus เป็นบักเตรีที่มีบทบาทสำคัญในการออกซิเดชั่นของกำมะถันในดิน เซลล์มีลักษณะเป็นท่อน แกรมลบ เจริญเติบโตแบบแอโรบิกออโตโทรฟ โดยใช้กาซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน บางชนิดทนกรดได้สูง เช่น **T. thiooxidans** บางชนิดเจริญได้ดีในพีเอชเป็นกลางหรือด่างเล็กน้อย เช่น **T. thioparus** มีการใช้ **Thiobacillus** บางชนิดคลุกกับผงกำมะถันใส่ลงในดิน ใช้เป็นปุ๋ยซัลเฟตได้

วัตถุประสงค์

ทดสอบการเกิดซัลเฟอร์ออกซิเดชั่นโดยจุลินทรีย์ในดิน และการแยกบักเตรี Thiobacillus rpp.

อุปกรณ์

1. ดินตัวอย่าง
2. ขวดบรรจุอาหาร Thlorulphate Solution
3. จานอาหารวุ้น **Thiosulphate Agar**
4. หลอดอาหารวุ้นเอียง Thioeulphate Agar

5. ฟีนอลฟทาลีน (phenolphthalein)
6. โซเดียม ไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มาล
7. สไลด์
8. สีย้อมแกรม
9. ปิเปต 10 มล.
10. บิวเรต
11. พีเอชมีเตอร์
12. บีคเกอร์

<u>วิธีปฏิบัติ</u>

1. ชั่งดินตัวอย่าง 1 กรัมใส่ลงในขวดอาหาร **Thiosulphate** Solution
2. ทำขวดคุม 1 ขวดโดยไม่ต้องใส่ดิน
3. บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลเมื่อครบ 7, 14, 21, 28 วัน

<u>การตรวจผล</u>

1. ตรวจดูรูปร่างของเชื้อจุลินทรีย์ในขวดอาหารด้วยวิธีย้อมแกรม
2. วัดพีเอช
3. ตรวจสอบปริมาณกรดด้วยวิธีตริเตรต โดยดูดอาหารจากขวด **Thiosulphate Solution** 5 มล. ใส่ลงในบีคเกอร์ เติมฟีนอลฟทาลีน 2 – 3 หยด ตริเตรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มาล จนได้สีชมพูจางที่ถาวร
4. คำนวณหาปริมาณกรดซัลฟูริกในอาหารต่อปริมาตร 100 มล. ดังนี้

มิลลิกรัมกรดซัลฟูริก (ต่อตัวอย่าง 100 มล.) $= \frac{T \times \text{นอร์มาลของ NaOH} \times \text{น.น.โมเลกุลของ } H_2SO_4/2 \times 100}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$

$$= \frac{T \times 0.1 \times 98.08/2 \times 100}{5}$$

T คือ ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มาลที่ทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริกจริง = a - b

a คือปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มาลที่ใช้ตริเตรตกับตัวอย่าง

a คือปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มาลที่ใช้ตริเตรตกับขวดคุม

<u>การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ **Thiobacillus spp.**</u>

1. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจุ่มของเหลวในขวดที่เกิดการออกซิไดส์ซัลเฟอร์ เมื่อบ่มเชื้อไว้ 14 วัน นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีสตรีค บน **Thiosulphate Agar Plate** เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง 7 – 10 วัน

2. เลือกโคโลนีเดียว ๆ ที่มีขนาดเล็ก ใสแสงทะลุผ่านได้ หรือเหลือบคล้ายสีรุ้ง และอาจมีสีเหลืองจากการตกตะกอนของซัลเฟอร์รอบ ๆ หรือใต้โคโลนี เขี่ยใส่หลอดอาหารวุ้นเอียง **Thiosulphate Agar**

3. ศึกษารูปร่างของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีย้อมแกรม

4. เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ลงเลี้ยงในขวดบรรจุ **Thiosulphate Solution** เพื่อทดสอบการเกิดออกซิเดชั่นของซัลเฟอร์ของจุลินทรีย์ที่แยกได้อีกครั้ง

<u>คำถาม</u>

1. จงกล่าวถึงผลดีและผลเสียของขบวนการออกซิเดชั่นซัลเฟอร์โดยจุลินทรีย์ในดิน?

2. **<u>Thiobacillus</u>** เป็นพวกแอโรบิกแบคเตรีย ทำไมจึงต้องการการซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วย?

3. ฝนกรดเกิดจากอะไร?

รายงานผลปฏิบัติการที่ 20

ชื่อ _____ รหัสประจำตัว _____

วันที่ _____ กลุ่มที่ ___ ผู้ร่วมงาน _____

บันทึกผลการทดสอบการเกิดออกซิเดชั่นของซัลเฟอร์โดยจุลินทรีย์ในดิน

เวลา (วัน)	ย้อมแกรม	พีเอช		ปริมาณ 0.1N NaOH ที่ใช้		T (a-b)	ปริมาณกรดซัลฟูริกที่เกิดต่อตัวอย่าง 100 มล. (มิลลิกรัม)
		ดินตัวอย่าง	ขวดคุม	ดินตัวอย่าง (a)	ขวดคุม (b)		
7							
14							
21							
28							

<u>บันทึกผลการทดสอบการเกิดออกซิเดชั่นของซัลเฟอร์โดยเชื้อบริสทซ์ที่แยกได้</u>

ชนิดที่	ลักษณะโคโลนี	ย้อมสีแกรม	ทดสอบกรด (วัดพีเอช)			
			7 วัน	14 วัน	21 วัน	28 วัน
1						
2						