บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubators shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA.
3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
4. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA.
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น D-7200 ของบริษัท GS, Germany.
7. เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
8. เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบปั่นเหวี่ยง (centrifuge evaporator) ของบริษัท EYELA, Japan
9. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan.
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
11. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CHK ของบริษัท Olympus, Japan.
12. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ "ISSCO" laminar flow รุ่น BVT-124 ของบริษัท International Scinectific supply, USA.
13. กรวยแยก (separatory funnel) ขนาด 1000 มล.ของบริษัท Witeg Wehtheim, Germany.
14. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 5 ไมโครลิตร ของบริษัท Drummond Scientific, USA.

15. แผ่นอะลูมิเนียมทีแอลซี (TLC aluminium sheet) เคลือบด้วย silica gel 60 F_{254} ขนาด 20×20 ซม. ของบริษัท E. Merck, Germany.

16. หัวกรอง ชนิด PTFE ขนาดความกว้างของรู 0.20 และ 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.

17. กระบอกฉีดยาฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มล. ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.

18. ปิเปต (pipette) ขนาด 100, 1000 และ 5000 มล.ของบริษัท Gilson, France.

19. ทีแอลซีแชมเบอร์ (TLC chamber) ของบริษัท Desaga Heidelberg, Germany.

20. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Sciencetific Industris, USA.

21. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.

22. หลอดแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet lamp) รุ่น UVGL-15 ของบริษัท UVP, USA.

23. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น Heraeus type B 5050 E ของบริษัท Herareus, Germany.

24. ชุดเครื่องมือทำไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC) สำหรับตรวจสอบปริมาณของ PAHs

    - ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - คอลัมน์ (column): Senshu Pak Pegasil ODS ขนาด 4.6×150 มล. ของบริษัท Senshu Scientific, Japan.
    - เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-2A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - เครื่องบันทึก (recorder) Chromatopac รุ่น C-R1A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, USA.

25. ชุดเครื่องมือทำไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC) สำหรับการแยกสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์

    - ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) รุ่น Water 600 E ของบริษัท Waters, USA.
    - คอลัมน์ (column): ODS-4253-D ขนาด 10×250 มล. ของบริษัท Senshu Scientific, Japan.

- เครื่องตรวจสอบแบบโฟโตไดโอดแยเรย์ (photodiode array detector) รุ่น Water 996 ของบริษัท Waters, USA.
- กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-R200 ของบริษัท Exmire, USA.

26. ชุดเครื่องมือทำแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตเมตรี (gas chromatography - mass spectrometry, GC-MS) สำหรับพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์
    - เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตเมตรี รุ่น JMS-Automass 150 ของบริษัท JEOL, Japan.
    - คอลัมน์ (column): DB-5 ขนาด 0.258 มม.×15 เมตร; ชั้นฟิล์มหนา 0.25 มม. ของบริษัท J&W Scientific, USA.
    - กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-10 ของบริษัท Exmire, USA.
27. เครื่องมือทำโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (proton nuclear magnetic resonance, ^{1}H-NMR) สำหรับพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ รุ่น JMN-A5000 ของบริษัท JEOL, Japan.
28. ชุดเครื่องมือที่ใช้ในการบ่งชี้ชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดแยกโดยวิธี 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ
    - เครื่องโพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น (polymerase chain reaction, PCR) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer Cetus, USA.
    - อิเลคโตรโฟรีซีสแชมเบอร์ (electrophoresis chamber) ของบริษัท Mupid, Japan.
    - เครื่องหาลำดับเบส (sequencer) รุ่น 373 DNA sequencing system ของบริษัท Applied Biosystem, USA. ติดตั้งกับคอมพิวเตอร์รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล Macintosh R และพริ้นเตอร์ (printer) แบบ Tcktronix phaser TM11

เคมีภัณฑ์

1. แนพธาลีน (naphthalene) ของบริษัท Sigma, USA.
2. พีแนนทรีน (phenanthrene) ของบริษัท Sigma, USA.
3. แอนทราซีน (anthracene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
4. ฟลูออรีน (fluorene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
5. ไดเบนโซฟูแรน (dibenzofuran) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
6. ฟลูออแรนธีน (fluoranthene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
7. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
8. อะซีแนพธีน (acenaphthene) ของบริษัท Sigma, USA.
9. อะซีแนพธิลีน (acenaphthylene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
10. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast Extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
11. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
12. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E. Merck, Germany.
13. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
14. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
15. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
16. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
17. เฟอรัสคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) ของบริษัท May & Baker, England.
18. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
19. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E Merck, Germany.
20. เมทธานอล (CH_3OH) ของบริษัท E Merck, Germany.
21. เอทธิลอะซีเตต ($CH_3COOC_2H_5$) ของบริษัท E Merck, Germany.
22. นอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) ของบริษัท J.T. Baker, USA.

23. ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) ของบริษัท Mallinckrodt, France.

24. โทลูอีน ($C_6H_5CH_3$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.

25. 1,4 ไดออกเซน ($OCH_2CH_2OCH_2CH_2$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.

26. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท E Merck, Germany.

27. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.

28. ไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (CH_3SOCH_3) ของบริษัท Carlo ERBA, France.

29. ไดเอทธิลอีเทอร์ ($(C_2H_5)O$) ของบริษัท E Merck, Germany.

30. อะซีโตน (CH_3COCH_3) ของบริษัท E Merck, Germany.

31. วาโกเจล ซี-300 (Wakogel C-300) ของบริษัท Wako, Japan.

32. เมทธานอล ดี-4 (CD_3OD) ของบริษัท E Merck, Germany.

33. แบคโตอการ์ (bacto agar) ของบริษัท Difco, USA.

34. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท E Merck, Germany.

35. ไซโคลเฮกซามีน (cyclohexamide) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

สารเคมีอื่นๆเป็นสารเคมีในระดับวิเคราะห์ (analytical reagent grade) จากบริษัท E Merck, Germany. และบริษัท Sigma Chemical, USA.

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน

3.1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งดินต่างๆที่มีการปนเปื้อนจากสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมันเครื่อง น้ำมันดีเซล หรือสารเคมีอันตรายเช่นยากำจัดศัตรูพืช โดยขุดดินลึกประมาณ 2-5 ซม.จากผิวหน้าดิน แยกขยะและหินออก เก็บดินไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o} ซ. จนกว่าจะทำการแยกเชื้อ โดยแสดงสถานที่เก็บตัวอย่างดินแต่ละตัวอย่างจำนวน 11 ตัวอย่างดินดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สถานที่เก็บตัวอย่างดินเพื่อนำมาคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนได้

ตัวอย่างดิน	สถานที่เก็บ
1	ดินปนเปื้อนน้ำมันเครื่องข้างโรงซ่อมยานยนต์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ (KO1)
2	ดินปนเปื้อนน้ำมันเครื่องข้างโรงซ่อมยานยนต์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ (KO2)
3	ดินปนเปื้อนน้ำมันเครื่องข้างโรงซ่อมยานยนต์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ (KO3)
4	สลัดจ์ (sludge) จากบ่อเติมอากาศในระบบบำบัดน้ำเสีย โรงกลั่นน้ำมันบางจาก กรุงเทพฯ
5	ตะกอน จากบ่อพักตะกอนในระบบบำบัดน้ำเสีย โรงกลั่นน้ำมันบางจาก กรุงเทพฯ
6	ดินปนเปื้อนยาปราบศัตรูพืช จากสวนผลไม้ จ. ปราจีนบุรี
7	ดินปนเปื้อนยาปราบศัตรูพืช จากสวนผลไม้ จ. ปราจีนบุรี
8	ดินปนเปื้อนน้ำมันเครื่องบริเวณอู่ซ่อมรถยนตร์ จ.ปราจีนบุรี
9	ดินปนเปื้อนยาปราบศัตรูพืชจากบริเวณข้าว จ. สระบุรี
10	สลักจ์ (sludge) จากบ่อเติมอากาศ ในระบบบำบัดน้ำเสีย โรงกลั่นน้ำมันไทยออยล์ กรุงเทพฯ
11	ตะกอน จากบ่อพักตะกอนในระบบบำบัดน้ำเสีย โรงกลั่นน้ำมันบางจาก กรุงเทพฯ

3.1.2 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนจากดิน

เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียโดยการเติมดินที่เก็บมา 20 กรัม (น้ำหนักเปียก) ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. ที่บรรจุอาหารเหลว MM (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.) (Omori et al., 1992) ปริมาตร 100 มล. เขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ ซ. ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้อนุภาคดินขนาดใหญ่ตกตะกอน จากนั้นนำส่วนน้ำใสซึ่งใช้เป็นหัวเชื้อปริมาตร 5 มล. เติมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ซึ่งบรรจุอาหารเหลว MM ปริมาตร 45 มล. และเติมฟีแนนทรีนในรูปสารละลายฟีแนนทรีนในไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.) โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของฟีแนนทรีนเท่ากับ 0.1 มก.ต่อ มล. เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานของแบคทีเรีย เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ ซ. ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที สังเกตการเจริญของแบคทีเรียจากความขุ่นของอาหารเหลวที่เพิ่มขึ้น การเปลี่ยนสีของอาหารเหลว และการลดลงของผลึกฟีแนนทรีนเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ถ่ายอาหารเหลวที่พบการเจริญของแบคทีเรียปริมาตร 5 มล. ลงในอาหารเหลว MM ที่เตรียมใหม่ โดยทำขั้นตอนนี้ซ้ำทั้งหมด 5 ครั้ง เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานให้มากขึ้น

3.1.3 การคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน

นำอาหารเหลว MM ที่มีการเจริญของแบคทีเรียหลังจากการถ่ายเชื้อมา 5 ครั้งมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลาย 0.85%โซเดียมคลอไรด์ และนำไปเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารแข็ง MM (ภาคผนวก ก หมายเลข 2.) จากนั้นทำการพ่นทับผิวหน้าอาหารแข็งด้วยสารละลายฟีแนนทรีนในไดเอทธิลอีเทอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.) (Kiyohara et al., 1982) บ่มอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 ^{o} ซ. จนกระทั่งพบการเจริญของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้จะสร้างบริเวณใสล้อมรอบโคโลนีบนผิวหน้าของอาหารแข็ง นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว MM ที่มีฟีแนนทรีนเข้มข้น 0.1 มก. ต่อ มล. เพื่อยืนยันความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีนอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้มาเลี้ยงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MM เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o} ซ.จนกว่าจะทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

การเก็บเชื้ออีกวิธีหนึ่งทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว MM ที่มีฟีแนนทรีนเข้มข้น 0.1 มก. ต่อ มล. เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญอยู่ในช่วงลอการิทึม นำอาหารเหลวบรรจุลงในหลอดแช่แข็ง (cryotube) และเติมกลีเซอรอลปลอดเชื้อเข้มข้น 30 % ลงในหลอดแช่แข็งในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 ^{o}ซ หรือ –70 ^{o}ซ

3.1.4 การจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ก. ทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็งและลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ร่วมกับการทดสอบการเจริญในแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ และผลการทดสอบทางชีวเคมีตามที่รายงานไว้ใน Bergey's manual of systematic bacteriology (Palleroni, 1984)

ข. จำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอสไรโบไซม์ดีเอ็นเอ ดังแสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ในภาคผนวก ค หมายเลข 4.

3.2 ศึกษาการเพิ่มจำนวนและความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีนและ PAHs ชนิดอื่นของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.21 ศึกษารูปแบบในการเจริญโดยการใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน

เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียโดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่คัดแยกได้นำมาปลูกในอาหารเหลว MM ปริมาตร 50 มล. ที่มีฟีแนนทรีนเข้มข้น 0.1 มก. ต่อ มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ ซ. ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบเวลาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ ซ. เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนเซลล์แบคทีเรียมาล้างในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 5 มล. ทำการปั่นเหวี่ยงที่สภาวะเดิม โดยทำขั้นตอนนี้ซ้ำ 3 ครั้ง นำส่วนเซลล์มาละลายในสารละลาย 0.85%โซเดียมคลอไรด์ นำสารละลายเซลล์มาวัดความขุ่น (turbidity) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและเจือจางให้มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 นำสารละลายเซลล์ที่ปรับความเข้มข้นแล้วมาเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ซ. ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 12 ชั่วโมงเพื่อให้แบคทีเรียใช้อาหารสะสมที่เหลืออยู่ในเซลล์ให้หมดไป

เติมหัวเชื้อปริมาตร 0.1 มล. ลงในอาหารเหลว MM ปริมาตร 5 มล. ที่มีฟีแนนทรีนเข้มข้น 0.1 มก.ต่อ มล. ในหลอดทดลองขนาด 22 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ซ. ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง โดยที่แต่ละเวลาจะมีชุดควบคุม 2 ชุดคือ ชุดควบคุมการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายฟีแนนทรีนซึ่งเตรียมโดยการเติมหัวเชื้อลงในอาหารเหลว MM ที่มีฟีแนนทรีน และชุดควบคุมการลดลงของฟีแนนทรีนที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายของแบคทีเรียซึ่งเตรียมโดยการใช้อาหารเหลว MM ที่มีฟีแนนทรีนแต่ไม่เติมหัวเชื้อ ทุกชุดการทดลองจะทำการทดลอง 2 ซ้ำ วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count โดยการนำอาหารเหลวมาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก ก หมายเลข 3.) บ่มเชื้อที่ 30 $^{\circ}$ซ. เป็นเวลา 3 วัน สกัดฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวตามวิธีการของ Griffoll และคณะ (1992) ดังนี้

ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเหลวเป็น 2 โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นเติมเอทธิลอะซีเตตปริมาตร 5 มล. ลงไปในอาหารเหลว ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสมด้วยความเร็วสูงเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยกส่วนเอทธิลอะซีเตตเก็บไว้ จากนั้นเติมเอทธิลอะซีเตตลงในอาหารเหลวหลอดเดิม และทำการสกัดตามวิธีการเดิมอีก 2 ครั้ง รวบรวมส่วนเอทธิลอะซีเตตที่แยกได้ทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟตเพื่อกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน เติมเมทธานอลปริมาตร 0.5 มล.ลงไปละลายฟีแนนทรีนในขวดลดปริมาตร และนำมาใส่ในขวดแก้วขนาดเล็ก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ. จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือด้วยวิธี HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนโดยวิธี HPLC

เตรียมชุดควบคุมโดยเติมฟีแนนทรีนลงในอาหารเหลว MM ให้มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 มก. ต่อ มล. ตามลำดับ ทำการสกัดด้วยเอทธิลอะซีเตตโดยใช้วิธีการเดียวกับการสกัดฟีแนนทรีนในชุดทดลอง นำชุดควบคุมและชุดทดลองที่ต้องการหาปริมาณฟีแนนทรีนมาวิเคราะห์หาปริมาณฟีแนนทรีนด้วยวิธี HPLC ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟีที่ใช้คอลัมน์ Senshu Pak Pegasil ODS ขนาด 4.6 x 150 มม. ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 40 °ซ. ตรวจสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย 80% เมทธานอล (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.) เป็นสารละลายตัวพาและใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1 มล. ต่อนาที

ฉีดสารละลายที่ต้องการหาปริมาณฟีแนนทรีนปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาดเล็กรุ่น MS-100 นำพื้นที่ได้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่างไปเทียบหาปริมาณของฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายของแบคทีเรียในชุดทดลองโดยใช้กราฟมาตรฐานของฟีแนนทรีนที่สร้างจากชุดควบคุม (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.)

<u>หมายเหตุ</u> ในการฉีดวิเคราะห์โดยวิธี HPLC แต่ละครั้งต้องฉีดสารมาตรฐานจนกว่าจะได้ค่า retention time (Rt) ที่คงที่ ก่อนฉีดสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณฟีแนนทรีน

3.2.2 ทดสอบความจำเพาะในการใช้ PAHs ชนิดอื่นในการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (substrate specificity)

ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการใช้ PAHs ชนิดอื่นเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนในการเจริญนอกเหนือจากฟีแนนทรีน ซึ่งได้แก่ แนพธาลีน* อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน ฟลูออรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนธีน ไพรีน รวมทั้งสารประกอบเฮเตอโรไซคลิกอะโรมาติก (heterocyclic aromatic compound) คือ ไดเบนโซฟูแรน(dibenzofuran)โดยนำแบคทีเรียมาเขี่ยบนอาหารแข็ง MM และพ่นทับผิวหน้าอาหารด้วยสารละลายฟีแนนทรีนในไดเอทธิลอีเทอร์บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ. สังเกตการเจริญของแบคทีเรียจากการสร้างบริเวณใสรอบโคโลนี การเปลี่ยนสีของสารทดสอบ และจากขนาดของโคโลนีที่ปรากฏเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการพ่นทับผิวหน้าอาหารแข็งด้วยสารทดสอบ

ยืนยันผลการทดลองที่ได้จากการทดสอบบนอาหารแข็ง MM โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MM ปริมาตร 5 มล. ในหลอดทดลองขนาด 22 มล. ที่เติมสารทดสอบแต่ละชนิดลงไปเข้มข้น 0.1 มก. ต่อ มล. ตามวิธีของ Grifoll และคณะ (1995) โดยใช้วิธีการเตรียมหัวเชื้อและวิธีในการเลี้ยงเชื้อวิธีเดียวกับที่ใช้ในการทดสอบการย่อยสลายฟีแนนทรีนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในข้อ 3.2.1 เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน นำมาวัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count และวิเคราะห์ปริมาณของสารทดสอบที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC โดยใช้วิธีสกัดและสภาวะในการวิเคราะห์เดียวกันกับที่ใช้ในการหาปริมาณฟีแนนทรีนในข้อ 3.2.1

* <u>หมายเหตุ</u> เนื่องจากแนพธาลีนมีค่าความดันไอสูงทำให้ระเหยได้ง่ายมาก ดังนั้นในการทดสอบโดยวิธีการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MM จำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นของแนพธาลีนเป็น 0.2 มก. ต่อ มล. และเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่เป็นฝาเกลียวและปิดผนึกด้วยพาราฟิล์มเพื่อป้องกันการระเหยของแนพธาลีน

3.2.1 การย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิซึม (co-metabolism)

นำสารทดสอบที่แบคทีเรียไม่สามารถใช้ในการเจริญได้โดยตรงในข้อ 3.2.2 มาทดสอบการย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสมร่วมกับฟีแนนทรีน เพื่อให้แบคทีเรียใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้โดยตรง โดยใช้วิธีการเตรียมหัวเชื้อวิธีเดียวกับการทดลองการย่อยสลายฟีแนนทรีนในข้อ 3.2.1 นำหัวเชื้อที่ได้เติมลงในอาหารเหลว MM ปริมาตร 5 มล.ในหลอดทดลองขนาด 22 มล. ที่มีสารทดสอบชนิดที่แบคทีเรียไม่สามารถใช้ในการเจริญโดยตรง เข้มข้น 0.1 มก. ต่อ มล. และเติมฟีแนนทรีนเข้มข้น 0.1 มก.ต่อ มล. ลงไปด้วย นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ. ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงนำมาวัดการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count และวิเคราะห์ปริมาณสารทดสอบแต่ละชนิดและฟีแนนทรีนด้วยวิธี HPLCโดยใช้วิธีการสกัดและสภาวะในการวิเคราะห์เดียวกับที่ใช้ในการทดลองหาปริมาณฟีแนนทรีนในข้อ 3.2.1 เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับผลการทดลองที่ใช้ฟีแนนทรีนและสารที่นำทดสอบเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียงชนิดเดียว

3.3 การวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.3.1 การแยกสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว MM ปริมาตร 100 มล.ที่มีฟีแนนทรีนเข้มข้น 1 มก. ต่อ มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ. ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเหลวด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ. เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้มาทำการสกัดฟีแนนทรีนและสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลายของฟีแนนทรีนด้วยเอทธิลอะซีเตต ซึ่งแสดงแผนผังในการสกัดในภาคผนวก ค หมายเลข 5.

นำส่วนสกัดที่เป็นกลางและส่วนสกัดที่เป็นกรดมาลดปริมาตรโดยใช้เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุนให้เหลือปริมาตรประมาณส่วนสกัดละ 1 มล. จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการผ่านซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโตกราฟี (silica gel column chromatography) (ภาคผนวก ค. หมายเลข 6.) ละลายแต่ละลำดับส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ด้วยเมทธานอล

ปริมาณเล็กน้อย จากนั้นวิเคราะห์สารมัธยันต์ในแต่ละลำดับส่วนด้วยวิธีธินแลย์โครมาโตกราฟี (thin layer chromatography, TLC) โดยนำตัวอย่างในแต่ละลำดับส่วนมาจุดลงบนแผ่น TLC ขนาดกว้าง 8 x 8 ซม. โดยใช้ระบบตัวทำลาย (solvent system) ซึ่งประกอบด้วย โทลูอีน : 1, 4 ไดออกเซน : กรดอะซีติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90 : 25 : 4 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจหาสารมัธยันต์ในแต่ละลำดับส่วนภายใต้แสง UV ช่วงความยาวคลื่นยาว คัดเลือกลำดับส่วนที่มีสารมัธยันต์สะสมอยู่มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC

การแยกสารมัธยันต์ในแต่ละลำดับส่วนที่ผ่านซิลิกาเจลคอลัมน์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC

นำแต่ละลำดับส่วนที่คัดเลือกไว้มาเจือจางด้วยเมทธานอลให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำไปแยกสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Professor Toshio Omori, Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113, Japan. โดยใช้ส่วนประกอบในการวิเคราะห์ดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟีรุ่น Water 600 E ที่ใช้คอลัมน์ Senshu Pak ODS-4253-D ขนาด 10x250 มม. ตั้งอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 40 ^{o}ซ. ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายตัวพาเป็น 50% เมทธานอลที่มีกรดแกลเซียลอะซีติกผสมอยู่ 1% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ใช้โปรแกรมในการเพิ่มความเข้มข้นของเมทธานอลจาก 50 % จนถึง 95% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ภายใน 30 นาที โดยใช้ปรับอัตราการไหลเป็น 3 มล. ต่อนาที

ฉีดสารที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาดเล็กรุ่น MS-200 สารที่ผ่านจากคอลัมน์ของ HPLC จะถูกเก็บไว้ในหลอดแก้วปริมาณหลอดละ 3 มล.จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบปั่นเหวี่ยง ตรวจสอบสารมัธยันต์ในแต่ละหลอดโดยการพิจารณาจากโครมาโตแกรมที่ได้จาก HPLC และวิธี TLC รวบรวมสารละลายในหลอดที่มีสารมัธยันต์ชนิดเดียวกันสะสมอยู่ไปทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยการฉีดเข้าเครื่อง HPLC ซ้ำที่สภาวะเดิมจนกว่าโครมาโตแกรมของHPLC จะแสดงพีก (peak) ของสารมัธยันต์แต่ละชนิดเพียงพีกเดียว นำสารมัธยันต์ที่บริสุทธิ์แล้วไปทำให้แห้งโดยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 15 ^{o}ซ. จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 ^{o}ซ.

3.3.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์แต่ละชนิด

แก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี้ (gas chromatography -mass spectrometry, GC-MS)

นำสารมัธยันต์ที่บริสุทธิ์แล้วมาทำเป็นอนุพันธ์แบบเมทธิล (methylation) ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ด้วยGC-MSโดยการละลายสารมัธยันต์ด้วยเอทธิลอะซิเตตให้ได้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร นำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายไดอะโซมีเทน(diazomethane) (ภาคผนวก ข. หมายเลข 5) ปริมาณ 1-2 หยดในหลอดแก้วขนาดเล็กที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้แห้งโดยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 15 ^{o}ซ. และวิเคราะห์หามวลโมเลกุลและรูปแบบการแตกตัว(fractionation pattern)ของอนุพันธ์แบบเมทธิลของสารมัธยันต์แต่ละชนิดโดยวิธี GC-MS ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตเมตรี้ที่ใช้คอลัมน์ชนิด DB-5 ขนาด 0.258 มม. ×15 เมตร ที่มีชั้นฟิล์มหนา 0.25 มม. ใช้ฮีเลียมเป็นก๊าซตัวพาโดยตั้งโปรแกรมของอุณหภูมิไว้ดังนี้

อุณหภูมิขณะฉีด (injection temperature)	230 ^{o}ซ.
อุณหภูมิคอลัมน์ (column temperature)	
เริ่มต้น (initial)	80 ^{o}ซ.
อัตราการเพิ่ม (flow rate)	16 ^{o}ซ. ต่อนาที
สุดท้าย (final)	280 ^{o}ซ

ฉีดอนุพันธ์เมทธิลของสารมัธยันต์ที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 มล. โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาดเล็กรุ่น MS-10 เปรียบเทียบมวลโมเลกุลและรูปแบบในการแตกตัวของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟีแนนทรีนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้กับสารมัธยันต์มาตรฐานชนิดต่าง ๆ

โปรตอนนิวเคลียร์ แมกเนติกเรโซแนนซ์ (proton nuclear magnetic resonance, ^{1}H-NMR)

นำสารมัธยันต์ 5 มก. มาละลายใน 10 % เมทธานอล –ดี 4 (CD_3OD)ในคลอโรฟอร์ม-ดี4 (CD_3Cl) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร กรองผ่านใยแก้ว (glass wool) ก่อนบรรจุในหลอดตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ด้วย NMR ขนาดความสูง 8 นิ้ว รุ่น 50Z-PP หลังจากนั้นปรับปริมาตรของสารละลายด้วยคลอโรฟอร์ม-ดี4ให้สารละลายในหลอดตัวอย่างมีความสูงประมาณ 4 ซม. ผนึกฝาหลอดตัวอย่างให้สนิทและปิดทับด้วยเทปพาราฟิล์ม นำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์แต่ละชนิดด้วยเครื่อง NMR โดยใช้ tetramethyl silane เป็น internal standard

3.4 การศึกษาการย่อยสลายฟีแนนทรีนของแบคทีเรียที่คัดแยกในดิน

เก็บตัวอย่างจากบริเวณที่ไม่เคยมีการปนเปื้อนจากสารเคมีมาก่อน เช่น ดินจากป่า หรือดินจากทุ่งนาโดยขุดดินลึกประมาณ 2-5 ซม.จากผิวดิน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ.จนกว่าจะทำการทดลอง

3.4.1 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่นำมาใช้ในการทดลอง

ส่งตัวอย่างดินที่ใช้ในการทดลองไปทำการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดิน ที่ฝ่ายวิจัยดิน กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยมีรายละเอียดในการวิเคราะห์ดังนี้

<u>ค่าความเป็นกรดด่าง</u> (pH) วัดค่าความเป็นกรดด่างของดินโดยการนำดินมาละลายในน้ำและวัดค่าความเป็กรดด่างด้วยเครื่อง pH meter

ลักษณะเนื้อดิน (soil textural) หาปริมาณของ ทราย (sand) ซิลท์ (silt) และดินเหนียว (clay) โดยวิธีไฮโดรมิเตอร์ (hydrometer) นำปริมาณ % ของอนุภาคทั้งสามมาเทียบหาลักษณะเนื้อดินโดยการใช้ไดอะแกรมสามเหลี่ยมมาตรฐาน (ภาคผนวก ค หมายเลข 7.)

ไนโตรเจน หาปริมาณไนโตรเจนโดยวิธีแมคโครเจลดาลห์ (Macro Kjeidahl method)

ฟอสเฟต หาปริมาณฟอสเฟตโดยวิธีการไตเตรต

สารอินทรีย์ (organic matters) หาปริมาณโดยการคำนวณเทียบกับปริมาณไนโตรเจน

สารอินทรีย์คาร์บอน หาปริมาณโดยการคำนวณเทียบกับปริมาณสารอินทรีย์

ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุหรือไอออน (cation exchange capacity) หาปริมาณโดยวิธีการไตเตรต

ความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (maximum water holding capacity) หาโดยการเปรียบเทียบน้ำหนักเปียกกับน้ำหนักแห้ง

การเตรียมดินเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาการย่อยสลายฟีแนนทรีนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในดิน

นำดินมาทำให้แห้งบางส่วนโดยการตากทิ้งไว้ในที่ร่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน นำดินที่แห้งแล้วมาคัดกรองขนาดให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มม. โดยใช้เครื่องคัดกรองขนาดดิน (ภาคผนวก ค หมายเลข 8.) จากนั้นนำมาบรรจุลงในขวดแก้วขนาดเล็ก (vial) ขนาด 6 ซม.ขวดละ 2 กรัม แยกชุดการทดลองออกเป็นสอง ชุดการทดลองดังนี้

1. <u>ชุดการทดลองที่ใช้ดินปลอดเชื้อ</u> นำดินที่บรรจุลงในขวดแก้วขนาดเล็กไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ.) เป็นเวลา 45 นาที โดยทำการนึ่งฆ่าเชื้อวันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน ทดสอบการปลอดเชื้อของดินก่อนนำมาใช้ในการทดลองโดยนำสารละลายดินเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB

2. <u>ชุดการทดลองที่ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อ</u> นำดินบรรจุลงในขวดแก้วขนาดเล็กปลอดเชื้อ

จากนั้นนำดินในชุดการทดลองทั้งสองชุดมาเติมฟีแนนทรีนในรูปของสารละลายฟีแนนทรีนในอะซีโตน (ภาคผนวก ข ข้อ 6.) โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของฟีแนนทรีนเท่ากับ 0.1 มก.ต่อ ดินแห้ง 1 กรัม ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อให้อะซีโตนระเหยหมดไป จากนั้นเติมหัวเชื้อของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ให้มีปริมาณเริ่มต้นประมาณ 10^7 CFU ต่อดินแห้ง 1 กรัม โดยที่หัวเชื้อของแบคทีเรียสามารถเตรียมได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว MM ที่มีฟีแนนทรีนเข้มข้น 0.1 มก. ต่อ มล. เป็นเวลา 2 วัน นำเซลล์แบคทีเรียมาล้างด้วยสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °ซ. ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 12 ชั่วโมงเพื่อให้แบคทีเรียใช้อาหารสะสมที่เหลืออยู่ในเซลล์ให้หมดไป เมื่อครบเวลานำมาปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรให้มีค่าเท่ากับ 0.2 โดยการละลายเซลล์ในอาหารเหลว MM ที่เพิ่มความเข้มข้นเป็น 5 เท่า (5 x MM) ในขั้นตอนนี้สามารถแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลองดังนี้

1. ชุดดินปลอดเชื้อ + ฟีแนนทรีน ใช้เป็นชุดควบคุมปริมาณของฟีแนนทรีน
2. ชุดดินปลอดเชื้อ + ฟีแนนทรีน + หัวเชื้อแบคทีเรีย
3. ชุดดินไม่ปลอดเชื้อ + ฟีแนนทรีน
4. ชุดดินไม่ปลอดเชื้อ + ฟีแนนทรีน + หัวเชื้อแบคทีเรีย

หลังจากเติมหัวเชื้อแบคทีเรียลงในดินแล้วทำการปรับความชื้นของดินให้มีค่าเท่ากับ 80% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (maximum water holding capacity) โดยการเติมน้ำ กลั่นปลอดเชื้อลงไปในดินให้มีน้ำหนักตรงกับค่าที่คำนวณจากความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำที่ได้จากการส่งตัวอย่างดินไปวิเคราะห์ จากนั้นผสมดินในขวดด้วยการปั่นบนเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 5 นาที นำขวด

บรรจุดินไปบ่มไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °ซ. เก็บตัวอย่างทุก 5 วัน โดยชุดทดลองทั้ง 4 ชุด ทำการทดลอง 2 ซ้ำและนำมาวัดการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่ในดินโดยวิธี viable plate count และวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC

3.4.2 การวัดการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในดิน

แบคทีเรีย นับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่มีอยู่ในดินโดยการนำดิน 1 กรัมมาละลายในสารละลาย 0.85%โซเดียมคลอไรด์ เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาเกลี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง LB ซึ่งเติมไซโคลเฮกซามีดเข้มข้น 200 มก.ต่อลิตร เพื่อฆ่าเชื้อรา บ่มเชื้อที่ 30 °ซ.

แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ (phenanthrene-degrading bacteria) นับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนที่มีอยู่ในดินโดยการนำดิน 1 กรัมมาละลายในสารละลาย 0.85%โซเดียมคลอไรด์ เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาเกลี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง MM ซึ่งเติมไซโคลเฮกซามีดเข้มข้น 200 มก.ต่อลิตร เพื่อฆ่าเชื้อรา พ่นทับผิวหน้าอาหารแข็งด้วยสารละลายฟีแนนทรีนในไดเอทธิลอีเทอร์ บ่มเชื้อที่ 30 °ซ. จนกว่าจะพบบริเวณใสเกิดขึ้นรอบโคโลนี

เชื้อรา นับจำนวนเชื้อราโดยการนำดินมาละลายในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ และเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง RB (ภาคผนวก ก หมายเลข 4.) บ่มเชื้อที่ 30 °ซ.

3.4.3 การหาปริมาณฟีแนนทรีนในดินด้วยวิธี HPLC (Juhasz et al., 1997b)

เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส 2 กรัมลงในขวดแก้วบรรจุดิน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อกำจัดน้ำในดินเติมไดคลอโรมีเทนปริมาตร 3 มล. ลงไปปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นผสมด้วยความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำขวดแก้วไปจุ่มในอ่างกำเนิดเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วน

ไดคลอโรมีเทนมาเก็บไว้ และทำการสกัดดินในขวดแก้วด้วยไดคลอโรมีเทนอีก 2 ครั้งที่สภาวะเดิม รวบรวมส่วนไดคลอโรมีเทนทั้งหมดไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน ละลายฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในขวดลดปริมาตรด้วยเมทธานอลปริมาตร 500ไมโครลิตร นำไปวัดปริมาณฟีแนนทรีนด้วยวิธี HPLCโดยใช้ส่วนประกอบและสภาวะในการวิเคราะห์เดียวกับที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือจากการย่อยสลายฟีแนนทรีนของแบคทีเรียในอาหารเหลวในข้อ 3.2.1

3.4.4 การคัดแยกแบคทีเรียและทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในดิน

คัดแยกโคโลนีของแบคทีเรียท้องถิ่นในดินที่นำมาใช้ในการทดลองข้างต้นประมาณ 100 โคโลนีจากชุดการทดลองที่ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อที่เติมฟีแนนทรีน นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยนำแบคทีเรียหล่านี้มาปลูกบนอาหารแข็ง LB ที่เคลือบผิวหน้ามาก่อนด้วย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจหาโคโลนีของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างบริเวณใสล้อมโคโลนี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย