บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G-10 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc., U.S.A.
2. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G-35 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc.,U.S.A.
3. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น Innova 2100 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc. ,U.S.A.
4. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น R-88 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc, U.S.A.
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (centrikon T42k refrigerator) ของบริษัท Nalge Nunc International, U.S.A.
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น HN-S ของบริษัท DAMON/IEC, Japan.
- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan.

6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/Vis spectrophotometer) รุ่น PR-1 ของบริษัท Shimadzu., Japan.
8. กระดาษกรอง (millipore membrane) รุ่น GF/A pore size 0.45 ไมโครเมตร ของบริษัท Millipore Corporation, USA.
9. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 ของบริษัท Eutechcyberscan, Singapore.
10. เครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Eyela, Japan.
11. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงชนิด microtip (ultrasonicator) รุ่น W-385 ของบริษัท Heat System Ultrasonics, U.S.A.

12. เครื่องถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124 บริษัท International Scientific Supply, Thailand.

13. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น VSM-3 ของบริษัท Shelton scientific, U.S.A.

14. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH-CO1-764604 ของบริษัท Olympus, Japan.

15. หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-35 ของบริษัท Tomy Seiko Co.,Ltd.,Tokyo, Japan.

16. เครื่องชั่งรุ่น L2200p และ A200s ของบริษัท Sartorius, USA.

17. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freeze) อุณหภูมิ -20^{0}C รุ่น FO535 ของบริษัท Sanyo Electric. Co., Ltd., Japan.

18. กาซโครมาโตกราฟี (gas chromatography) model GC-9A splitless mode-Flame Ionization Detector (FID) ของบริษัท Shimadzu Corporation, Japan.

19. เครื่อง Integrator model C-R3A ของบริษัท Shimadzu Corporation, Japan.

20. คอลัมน์ชนิด capillary column model J&W DB-5 (เส้นผ่านศูนย์กลางของคอลัมน์เท่ากับ 0.53 มิลลิเมตร, ความยาว 30 เมตร) ของบริษัท J&W Scientific Incorporated, U.S.A.

21. เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (Vacuum rotary evaporator) ของบริษัท Eyela, Japan.

22. เครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (texsiometer) รุ่น K6 ของบริษัท Kruss , Germany.

ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิส

23. เครื่องกำเนิดไฟฟ้ารุ่น 2301 ของบริษัท LKB, Sweden.

24. เจลแชมเบอร์พร้อมอุปกรณ์เตรียมอะกาโรสเจล

25. เครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา PCR รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin-Elmer, U.S.A.

เอนไซม์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. Pyrobest และบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส
2. Primer สังเคราะห์โดย Bioservice Unit , Thailand
3. ชุดสกัดแยกแถบดีเอ็นเอออกจากเจล GenClean Kit , Bio101, U.S.A.
4. แอมโมเนียมไนเตรท (Ammonium nitrate) NH_4NO_3 ของบริษัท E. Merck, Germany.

5. แบคโต-เปปโตน (Bacto-Peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

6. แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) $CaCl_2$ ของบริษัท E. Merck, Germany.

7. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) $CHCl_3$ ของบริษัท E. Merck, Germany.

8. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate) K_2HPO_4 ของบริษัท E. Merck, Germany.

9. เอทานอล (ethanol) ของบริษัท E. Merck, Germany.

10. กลีเซอรอล (Glycerol) $C_3H_8O_3$ ของบริษัท E. Merck, Germany.

11. กลูโคส (Glucose) ของบริษัท E. Merck, Germany.

12. ก๊าซฮีเลียม (Helium) (99.99%) He ของบริษัท TIG.,Thailand.

13. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Hydrochloric acid) HCl ของบริษัท E.Merck, Germany.

14. ก๊าซไฮโดรเจน (Hydrogen) (99.99%) H_2 ของบริษัท TIG., Thailand.

15. เฟอริกคลอไรด์ (Iron (III) chloride) $FeCl_3$ ของบริษัท Fluka chemical, Switzerland.

16. แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate) $MgSO_4$ ของบริษัท E. Merck, Germany.

17. เมทานอล (methanol) ของบริษัท E. Merck, Germany.

18. ก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen) (99.99%) N_2 ของบริษัท TIG., Thailand.

19. อาหารเหลวนิวเตรียนท์ (nutrient broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

20. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate) KH_2PO_4 ของบริษัท E. Merck, Germany.

21. โพแทสเซียมไนเตรท (Potassium nitrate) KNO_3 ของบริษัท E. Merck, Germany.

22. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) NaCl ของบริษัท E. Merck, Germany.

23. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) NaOH ของบริษัท E. Merck, Germany.

24. โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulphate anhydrous) Na_2SO_4 ของบริษัท E. Merck, Germany.

ไฮโดรคาร์บอน

25. น้ำมันดิบ Tapis (Tapis crude oil) จาก Bangchak oil refinery,Thailand.

26. 1-อิโคซีน (1-Eicosene) $C_{20}H_{40}$ ของบริษัท Sigma, U.S.A.

27. นอร์มอลเฮกเซน (n-Hexane) C_6H_{14} ของบริษัท Sigma, U.S.A.

28. นอร์มอลโดเดกเคน (n-Dodecane) $C_{12}H_{26}$ ของบริษัท Sigma, U.S.A.

29. นอร์มอลเพนตะเดกเคน (n-Pentadecane) $C_{15}H_{32}$ ของบริษัท Sigma, U.S.A.

30. นอร์มอลเฮกซะเดกเคน (n-Hexadecane) $C_{16}H_{34}$ ของบริษัท Sigma, U.S.A.

31. นอร์มอลออกตะเดกเคน (n-Octadecane) $C_{18}H_{38}$ ของบริษัท Sigma, U.S.A.

32. พริสเทน (2,6,10,14-Tetramethylpentadecane) (Pristane) $C_{19}H_{40}$ ของบริษัท Sigma, U.S.A.

33. นอร์มอลเตตระเดกเคน (n-Tetradecane) $C_{14}H_{30}$ ของบริษัท Sigma, U.S.A.

34. ฟีแนนทรีน (Phenanthrene) $C_{14}H_{10}$ ของบริษัท Sigma, U.S.A.

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนของน้ำมันดิบที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 การสกัดน้ำมันดิบออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BH 50 มล. ที่มีน้ำมันดิบ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) ที่เลี้ยงเชื้อจนได้เวลาตามต้องการ เติมสารละลาย 1-อิโคเซน (1-Eicosane) ในคลอโรฟอร์มความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) จำนวน 1 มล.ลงในอาหารก่อนสกัดเพื่อเป็น internal standard(IS) จากนั้นจึงใส่อาหารลงใน separating funnel เติมคลอโรฟอร์ม80 มล. เขย่าเป็นเวลา 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น โดยแยกคลอโรฟอร์มที่มีน้ำมันละลายอยู่ในชั้นล่าง สกัดน้ำมันที่เหลืออยู่อีกครั้งโดยใช้คลอโรฟอร์ม 20 มล. ทำการเขย่าและตั้งทิ้งไว้เช่นเดิม แล้วเทสารละลายน้ำมันในคลอโรฟอร์มที่สกัดได้ผ่านโซเดียมซัลเฟต 20 กรัมบนกระดาษกรอง Whatman No.40 เพื่อดูดน้ำออกจากสารละลาย นำสารละลายที่ได้ไประเหยแยกคลอโรฟอร์มออกในเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ ความดันอากาศ 160 mmHg ในน้ำอุณหภูมิ 35°ซ จนกระทั่งคลอโรฟอร์มระเหยหมด จากนั้นนำน้ำมันดิบที่ได้มาเติมเฮกเซน 10 มล. เพื่อละลายน้ำมันกรองด้วยกระดาษกรอง GF/A ถ่ายเก็บไว้ในขวดที่มีฝาเกลียวปิดสนิทนำไปเก็บไว้ที่ -20°ซ เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบที่เหลือด้วยกาซโครมาโตกราฟี

1.2 การวิเคราะห์ไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบที่สกัดได้โดยใช้ Capillary Gas Chromatography

นำสารละลายน้ำมันดิบในเฮกเซนที่ผ่านกระบวนการจากข้อ 1.1 ปริมาณ 2 ไมโครลิตรฉีดลงในเครื่อง Shimadzu GC-9A splitless mode ซึ่งมี Flame Ionization Detector (FID) เป็นตัวตรวจวัดและบันทึกคำนวณผลด้วย Shimadzu C-R3A Integrator คอลัมน์ใช้ capillary column J&W DB-5 ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์เท่ากับ 0.53 มม. ความยาว 30 เมตรโดยมีการปรับตั้งค่าดังนี้ อุณหภูมิของ Injector และ detector เท่ากับ 300 °ซ อุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์เท่ากับ 50°ซ รักษาอุณหภูมิให้คงที่เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิให้ได้อุณหภูมิสุดท้าย 300°ซ โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 3°ซ ต่อนาที

เมื่อได้อุณหภูมิสุดท้ายเท่ากับ 300°ซ รักษาอุณหภูมิให้คงที่เป็นเวลา 35 นาที ใช้ฮีเลียม (He) เป็น carrier gas ความดันที่หน่วยควบคุมการไหล (flow controller) เป็น 60 kPa ความดันของก๊าซไฮโดรเจนและอากาศที่ไหลผ่าน FID มีความดันเป็น 0.5 ต่อ 0.6 kg/cm ใช้ก๊าซไนโตรเจนเป็น make up gas โดยมีอัตราการไหล 30 มล.ต่อนาที

1.3 การติดตามการเจริญ

โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร กับค่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Viable Cell Count) ของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

ก. การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

นำจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว BH ที่มีน้ำมันดิบ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อติดตามลักษณะการเจริญ บ่มเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. ที่ภาวะความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °ซ โดยเก็บตัวอย่างทุก 3 ชม. จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ถ้าน้ำเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นมากให้เจือจาง 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่นก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

ข. การหาค่าจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (Viable Cell Count)

นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ ก. มาทำการเจือจางให้ได้ค่าที่เหมาะสม นำไปเกลี่ยบนอาหารวุ้นนิวเทรียนท์ (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 30 °ซ จนกระทั่งเห็นโคโลนีขึ้นอย่างชัดเจน จากนั้นนับโคโลนีที่ขึ้นโดยในแต่ละเพลท (Plate) จะต้องมีค่าอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี นำค่าที่ได้มาคำนวณโดยใช้สมการข้างล่างนี้

$$\text{Viable Cell Count (CFU/ml.)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่นับได้} \times \text{ค่าการเจือจาง}}{\text{ปริมาตรที่เกลี่ยบนอาหาร}}$$

1.4 การคำนวณหาปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

งานวิจัยนี้จะแสดงปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในรูปของเปอร์เซ็นต์เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพ ซึ่งคำนวณตามวิธีการคำนวณที่เคยมีรายงานไว้โดย Mueller และคณะ (1992) ทำการคำนวณจากสมการข้างล่างนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของไฮโดรคาร์บอนที่เหลือ} = \frac{\text{ไฮโดรคาร์บอนที่เหลือ ณ ภาวะที่ทำการเลี้ยงเชื้อ} \times 100}{\text{ไฮโดรคาร์บอนที่เหลือ ณ วันที่ 0 ที่มีการควบคุม}}$$

$$\text{โดยที่ ไฮโดรคาร์บอนที่เหลือ ณ ภาวะที่เลี้ยงเชื้อ} = \frac{\text{ผลรวมของพื้นที่ใต้พีค (Peak) ของไฮโดรคาร์บอนในโครมาโตแกรมของจีซี (GC)}}{\text{พื้นที่ใต้พีค (Peak) ของสารมาตรฐานภายใน (Internal Standard) ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีเดียวกัน}}$$

หมายเหตุ ผลรวมของไฮโดรคาร์บอนที่เหลือทั้งหมด คือ สารประกอบทุกอย่างยกเว้นตัวทำละลาย (Solvent : hexane) สารปนเปื้อนอื่นๆ (Impurity) และสารมาตรฐานภายใน (Internal Standard)

และใช้ไฮโดรคาร์บอนที่เป็นอัลเคนมาตรฐานซึ่งมีคาร์บอนอะตอม 9 – 32 อะตอมในโมเลกุลเพื่อเปรียบเทียบกับพีคของไฮโดรคาร์บอนที่มีอยู่ในน้ำมันดิบที่ใช้ในการทดลอง

จากนั้นทำการเปรียบเทียบพีคในโครมาโตแกรมของน้ำมันดิบกับไฮโดรคาร์บอนที่มีองค์ประกอบใกล้เคียงกันโดยการพิจารณาค่า Retention time ของพีคนั้นๆ และให้มีค่า Deviation 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับค่าของโครมาโตแกรมน้ำมันดิบในชุดการทดลองควบคุม ซึ่งจะคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ Deviation ตามสมการข้างล่างนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ Deviation ของพีค A} = \frac{(\text{RT ในชุดควบคุม} - \text{RT ในตัวอย่าง}) \times 100}{\text{RT ในชุดควบคุม}}$$

และ RT = Relative retention time ของพีคไฮโดรคาร์บอน

= (Retention timeของสารมาตรฐานIS - Retention timeของพีคไฮโดรคาร์บอน)

2. การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้

2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินและน้ำจากสถานที่ต่างๆ ในกรุงเทพฯ และปริมณฑลซึ่งคาดว่าจะมีการปนเปื้อนของน้ำมัน เช่น บริเวณที่มีการขนถ่ายน้ำมัน อู่ซ่อมรถ บริเวณที่ตั้งถังน้ำมัน บริเวณโรงซ่อมหัวรถจักร ปั๊มน้ำมัน รวมถึงตัวอย่างน้ำ ตะกอนและสลัดจ์ (Sludge) จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงกลั่นน้ำมันทั้งหมด 11 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1 นำมาแยกเชื้อจุลินทรีย์ทันที หรือ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ แล้วจึงนำมาแยกเชื้อจุลินทรีย์ (Braddock และคณะ, 1995) ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้โดยวิธีการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ (Enrichment culture)

ตารางที่ 3.1 บริเวณที่เก็บตัวอย่างดินและน้ำที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนของน้ำมันดิบ

ลำดับที่	รหัส	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง
1	A1	ดินที่ปนเปื้อนน้ำมันข้างบริเวณอู่ซ่อมรถยนต์
	A2	ดินจากใต้ต้นไม้บริเวณที่มีการวางถังน้ำมัน
2	B1	ดินจากบริเวณคงกล้วยข้างโรงซ่อมหัวรถจักร สถานีรถไฟบางกอกน้อย
	B2	ดินที่ปนเปื้อนน้ำมันข้างโรงซ่อมหัวรถจักร สถานีรถไฟบางกอกน้อย
	B3	ดินจากกองดินที่ขุดลอกจากท่อน้ำทิ้งจากโรงซ่อมหัวรถจักร
3	C1	ดินจากบริเวณปั๊มน้ำมัน ปตท. จ.ฉะเชิงเทรา
	C2	น้ำเสียจากน้ำทิ้งของปั๊มน้ำมัน ปตท. จ.ฉะเชิงเทรา
4	D1	น้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงกลั่นน้ำมันบางจาก
	D2	กากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงกลั่นน้ำมันบางจาก
5	E1	น้ำในบ่อบริเวณปั๊มน้ำมันเอสโซ่ กรุงเทพฯ
	E2	ดินที่มีน้ำมันปนเปื้อนจากบริเวณที่มีการล้างรถ

2.2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์

คัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบจากตัวอย่างต่างๆ ด้วยวิธีการ Enrichment culture โดยนำตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ปริมาณ 1 กรัม หรือ 1 มล.ของตัวอย่างที่เป็นของเหลว เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Bushnell Haas Broth (BH broth) ปริมาตร 100 มล. (ภาคผนวก ก) ใน ฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มี 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ (crude oil) (ภาคผนวก ก) นำไปเลี้ยงบน rotary shaker ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (32 $\pm$2 ^{0}ซ) (Kiyohara และคณะ , 1982) แล้วทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ทุก 7 วันหรือจนสังเกตพบการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งทราบได้จากการที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่นมากขึ้น เป็นจำนวน 3 ครั้ง

2.3 การเจือจางเชื้อ

นำ culture ใน BH broth มาเจือจางให้มีปริมาณจุลินทรีย์ที่เหมาะสมแล้ว นำไปเกลี่ย (spread) บน BH agar ที่มีน้ำมันดิบ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (32 $\pm$2 ^{0}ซ) จนมีเชื้อจุลินทรีย์เจริญขึ้น (Mueller และคณะ , 1992) พบจุลินทรีย์ในรูปของเชื้อผสม (Mixed culture) สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BH broth ที่มีน้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอน หลังจากทำการแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์แล้วได้จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบทั้งหมด 29 สายพันธุ์ นำจุลินทรีย์ที่บริสุทธิ์ที่แยกได้ไปบ่มเลี้ยงในอาหารเหลว BH ปริมาตร 50 มล. ที่มีน้ำมันดิบ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในภาวะเช่นเดียวกับข้อ 2.2 เพื่อยืนยันความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันและติดตามการเจริญของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เป็นเวลา 24 ชม. นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปเก็บรักษาไว้เพื่อทำการทดลองต่อไป

2.4 การคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

การทดลองในขั้นนี้ เป็นการนำจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ได้ 29 สายพันธุ์จากตัวอย่างดิน น้ำและตะกอนที่ได้ดำเนินการคัดเลือกจากข้อ 2.3 มาทำการคัดเลือกอีกครั้งโดยอาศัยหลักการคัดเลือกด้วยวิธีธรรมชาติ (natural selection) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BH broth เพื่อหากลุ่มเชื้อผสม (mixed culture) ที่ดีที่สุด คือ จุลินทรีย์ตัวใดเจริญได้เร็วกว่าก็จะสามารถใช้น้ำมันดิบซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนได้เร็วกว่า ทำให้จุลินทรีย์ที่เจริญช้าไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ และถูกกำจัดออกไปในที่สุด (Venkateswaran และคณะ , 1995)

วิธีการคัดเลือกเริ่มต้นจากการนำเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างที่ 1 เชื้อละ 1 โคโลนีมาเลี้ยงรวมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BH broth ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที วัดค่าความขุ่นโดยใช้ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จนพบว่าเชื้อเริ่มเจริญเข้าสู่ระยะ early stationary จึงนำเชื้อผสมที่ได้จากตัวอย่างที่ 1 ไปผสมกับเชื้อผสมจากตัวอย่างแหล่งที่ 2 ซึ่งเตรียมด้วยวิธีเดียวกัน ผสมด้วยปริมาตรเท่าๆ กันแล้วนำ 1 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่ผสมแล้วถ่ายลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BH broth ที่มีน้ำมันดิบ 1 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเชื้อที่ภาวะเดิม จนเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ early stationary จึงนำไปผสมกับเชื้อผสมจากตัวอย่างแหล่งอื่นๆ ต่อจนกระทั่งได้เชื้อผสมกลุ่มสุดท้าย นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็งนิวเทรียนท์บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ เพื่อแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ที่เหลือจากการคัดเลือกตามธรรมชาติ โดยได้จากโคโลนีเดี่ยวๆ ที่เจริญบนอาหารแข็งนิวเทรียนท์ (ภาคผนวก ก) เก็บรักษาเชื้อไว้เพื่อทำการทดลองต่อไป

3. การจัดจำแนกสกุลของจุลินทรีย์สายพันธุ์ B3-1 C1-2 และD2-1 ทางอนุกรมวิธาน

นำจุลินทรีย์สายพันธุ์ B3-1 C1-2 และD2-1 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดี มาศึกษาลักษณะการเจริญ (cultural characteristics) บนอาหารที่เพาะเลี้ยง ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) และลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (physiological and biochemical characteristics) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ เพื่อเป็นแนวทางในการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานตามหนังสือ Bergey 's Manual of Determinative Bacteriology ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 9 (Holt และคณะ,1994) ตลอดจนการวิเคราะห์ลำดับเบสของจีนที่สังเคราะห์ 16S rRNA ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ B3-1

3.1 ศึกษาลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์สายพันธุ์ B3-1 C1-2 และD2-1 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเทรียนท์

นำจุลินทรีย์สายพันธุ์ B3-1 C1-2และ D2-1 ที่เจริญบนอาหารวุ้นนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก) มาศึกษารูปร่าง ขนาด ความโปร่งใสหรือความทึบแสงของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นนิวเทรียนท์

3.1.1 นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้มาลากเป็นเส้นตรง (streak) บนอาหารวุ้นนิวเทรียนท์

3.1.2 บ่มเชื้อที่ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูลักษณะการขึ้นของเชื้อและบันทึกไว้

3.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.2.1 การติดสีแกรม ใช้จุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารวุ้นนิวเทรียนท์เป็นเวลา 24 ชม. มาย้อมสีแกรม (ตามวิธีในภาคผนวก ค)

3.2.2 การวัดขนาด (ตามวิธีในภาคผนวก ค)

3.2.3 การย้อมพาราสปอรอล - คริสตัล (parasporal crystal) (ตามวิธีในภาคผนวก ค)

3.2.4 ศึกษาการเคลื่อนที่ โดยนำเชื้อจุลินทรีย์มาจิ้ม (stab inoculation) ลงในอาหารกึ่งแข็ง (Semi – solid media , ภาคผนวก ก) จนถึงก้นหลอดเพาะเชื้อบ่มที่ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชม. สังเกตการเจริญและการเคลื่อนที่ ถ้าเชื้อเจริญออกนอกรอยที่ปลูกเชื้อแสดงว่า เชื้อเคลื่อนที่ได้

3.2.5 การย้อมสีเอนโดสปอร์ (Endospore staining) ในกรณีของจุลินทรีย์ที่เป็นรูปแท่งและติดสีแกรมบวกควรตรวจดูเอนโดสปอร์ด้วยหยดน้ำที่อบฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดทดลอง 5 หยด ใส่เชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารวุ้นนิวเทรียนท์ (NA slant) ที่มีอายุ 7 วันลงไปในหลอดแล้วผสมให้เข้ากันโดยให้มีความเข้มข้นของเชื้อมากๆ จากนั้นหยดสี Ziehl carbol fuchsin ลงในหลอดแก้วด้วยปริมาณที่เท่ากับน้ำที่หยดลงไป นำหลอดไปแช่น้ำเดือดประมาณ 10 นาที นำส่วนผสมนี้ไปย้อมสีโดยวิธี Negative stain ด้วยสี Nigrosin ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า

3.2.6 การย้อมสีดูแคปซูล (Capsule staining) ตามวิธีที่แสดงในภาคผนวก ค

3.2.7 การติดสี acid – fast ใช้จุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Nutrient broth , ภาคผนวก ก) ที่มีอายุ 2-3 วันมากระจายบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง หยดสี Ziehl Nelson's carbol fuchsin ให้ท่วมบริเวณที่กระจายไว้ ลนไฟอ่อนๆ ใต้แผ่นสไลด์ พอให้มีควันระเหยออกมาเล็กน้อย เป็นเวลา 5 นาที ระหว่างนั้นคอยเติมสีลงไปอย่าให้สีแห้ง นำไปล้าง

น้ำและล้างสีออกด้วย acid alcohol แล้วล้างน้ำอีกครั้ง ย้อมสี methylene blue 5-10 นาที ล้างและซับน้ำให้แห้ง นำไปดูใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าเซลล์ติดสีแดง แสดงว่า เชื้อนี้เป็นเชื้อที่ทนต่อกรด หรือ เป็น acid-fast และถ้าเซลล์ติดสีฟ้า แสดงว่า เชื้อเป็น non acid-fast

3.2.8 การย้อม Poly-β-hydroxybutyrate กระจายเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำมาผ่านเปลวไฟ หยดด้วยสี Sudan black B ให้ท่วมบริเวณที่กระจายเชื้อทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที เทสีออกแล้วซับให้แห้ง เอียงสไลด์ค่อยๆ หยดไซลอลลงไปเพื่อไล่สี Sudan black B ที่มากเกินไปออก ซับให้แห้งอีกครั้ง ย้อมทับด้วยสี Safranin O 15 วินาที ไม่ควรนานเกินไป ล้างสีออกซับให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เซลล์จะติดสีแดง ส่วนไขมันจะติดสีดำ

3.3 ศึกษาลักษณะเฉพาะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

นำจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารวุ้นนิวเตรียนท์ (Nutrient agar) เป็นเวลา 24 ชม. มาทดสอบปฏิกิริยาต่างๆ ทางชีวเคมีดังนี้

3.3.1 การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate metabolism) ปลูกจุลินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ phenol red agar base (ภาคผนวก ก) คาร์โบไฮเดรตที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ กลูโคส แลคโตส และแมนนิทอลโดยเติมลงไป 1 เปอร์เซ็นต์ สังเกตการสร้างกรด ถ้าจุลินทรีย์ใช้คาร์โบไฮเดรตได้จะสร้างกรดขึ้นมาทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟีนอลเรดเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลือง โดยการเลี้ยงเชื้อใน Fermentation broth ทั้ง 3 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ เป็นเวลา 24 ชม.

3.3.2 การทดสอบการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis) ทำการปลูกจุลินทรีย์แบบจุดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบการย่อยแป้ง (ภาคผนวก ก) ในจานเพาะเชื้อ เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจดูการย่อยแป้งโดยราดสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ข) ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้ บันทึกผลเป็นบวก

3.3.3 การทดสอบความสามารถในการใช้ไขมัน (Lipid metabolism) เลี้ยงเชื้อโดยการปลูกเชื้อเป็นเส้นตรงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BH agar ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ไขมัน และ neutral red เพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (32 $\pm$2^{0}ซ) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูผลการทดลอง

โดยการสังเกตเม็ดกลมสีแดงที่เกิดขึ้นใต้โคโลนีถ้ามีแสดงว่าเชื้อสามารถย่อยสลายไขมันได้ บันทึกผลเป็นบวก

3.3.4 การสร้างเอนไซม์คาตาเลส หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ลงบนโคโลนีของจุลินทรีย์ ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้นแสดงว่า เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ได้ให้บันทึกผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่มีฟองกาซเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อไม่สร้างเอนไซม์ให้บันทึกผลเป็นลบ

3.3.5 การสร้างเอนไซม์เจลาติเนส ทำการปลูกเชื้อแบบแทงใน gelatin deep จนถึงก้นหลอด เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ เป็นเวลา 24 ชม. ดูผลโดยการแช่ในน้ำแข็ง ถ้าเจลาตินมีลักษณะเหลวไม่แข็งตัวแสดงว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้

3.3.6 การทดสอบเมธิลคาร์บินอล (Voges-Proskauer test) ทำการปลูกเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MR-VP (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 2-3 วัน โดยแบ่งอาหารมาประมาณ 2-3 มล. เติมน้ำยาทดสอบสารละลาย ก. และสารละลาย ข. (ภาคผนวก ข) ลงไปอย่างละ 2-3 หยด ถ้าอาหารมีสีชมพูเกิดขึ้นภายใน 10 นาที แสดงว่าเชื้อมีการสร้างเมธิลคาร์บินอล บันทึกผลเป็นบวก ส่วนหลอดที่ไม่เกิดสีชมพูให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (32 $\pm$2^{0}ซ) เพื่อดูผลภายใน 24 ชม. ถ้ายังไม่เกิดสีชมพู บันทึกผลเป็นลบ

3.4 วิธีการทั่วไปสำหรับการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

3.4.1 การสกัดแยกโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการแยกโครโมโซมค้างคืนในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth (ภาคผนวก ก) 5 มล. ปั่นเก็บเซลล์ในหลอด Eppendorf ที่ 10000 รอบต่อนาที 2 นาที ทิ้งส่วน Supernatant ให้หมด กระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 567 ไมโครลิตร แล้วเติม Lysozyme 2 มก./ มล.กับ 10 เปอร์เซ็นต์ SDS ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ 20 มก./ มล. Proteinase K ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาเติม 5M โซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลาย CTAB/NaCl ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65^{0}ซ เป็นเวลา 10 นาที เติม

สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมีลแอลกอฮอล์ปริมาตรเท่าตัวลงไป นำไปปั่นที่ 8000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเอาส่วนน้ำใสไปใส่ในหลอดใหม่แล้วเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมีลแอลกอฮอลให้เท่ากับปริมาตรส่วนน้ำใส นำไปปั่นอีกครั้ง ดูดส่วนใสซึ่งจะมีดีเอ็นเออยู่นำไปใส่หลอดใหม่ และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพพานอล (Isopropanol) ปริมาตร 0.6 เท่า จะเห็นดีเอ็นเอเป็นเส้นใสๆ นำมาล้างด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล ทำให้แห้งและละลายใน TAE 100 ไมโครลิตร

3.4.2 การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิส

เตรียมอะกาโรสเจล 1.0% ซึ่งหลอมในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวี (comb) เสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (tracking dye , ภาคผนวก ข) ในอัตราส่วน 1:5 หยอดตัวอย่างลงในหลุมบนอะกาโรสเจล จากนั้นนำไปทำอิเลคโทรโฟริซิสในเจลแชมเบอร์ โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่มาถึงขอบเจลอีกด้านหนึ่ง ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 2.5 ไมโครกรัมต่อมล. เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตราฐาน คือ แลมป์ดาดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III (λDNA/ *Hind*III)

3.4.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่เป็นรหัสของ 16S rRNA

ขั้นตอนแรกทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งจะประกอบไปด้วยโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 0.4 –1.0 ไมโครกรัมเป็นแม่แบบ ในส่วนผสมให้เกิดปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10.3 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ 2 ไมโครลิตร dNTP 1.6 ไมโครลิตร forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร Pyrobest เข้มข้น 5 U/ไมโครลิตร หลังปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ควบคุมอุณหภูมิดังแสดงในรูปที่ 3.1

- เพิ่มอุณหภูมิจนถึง 96 °ซ
- ทำปฏิกิริยาที่ 96 °ซ เป็นเวลา 1 นาที
- ทำปฏิกิริยาที่ 96 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที
- ทำปฏิกิริยาที่ 50 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที
- ทำปฏิกิริยาที่ 60 °ซ เป็นเวลา 1 นาที
- ทำปฏิกิริยาที่ 4 °ซ เป็นเวลา 7 นาที
- คงอุณหภูมิไว้ที่ 4 °ซ จนหยุดปฏิกิริยา

→30 cycles

รูปที่ 3.1 การควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเพื่อต้องการวิเคราะห์ลำดับเบส

ภายหลังการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแล้วนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม 3M โซเดียมอะซิเตท pH 5.2 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอล ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70%เอทานอล ทำให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย template suppression reagent ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 2 นาที และบ่มในอ่างน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 1 นาที นำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่องอัตโนมัติวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ ABI Prism™ (Perkin-Elmer U.S.A.) วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ด้วยโปรแกรม ClustalX และ Genedoc

3.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA (โดยใช้บริการที่ Bioservice unit)

การจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสที่เป็นรหัสของ 16S rRNA โดยการออกแบบไพร์มเมอร์ (primers) ซึ่งใช้ข้อมูลของลำดับเบสที่เป็นรหัสของ 16S rRNA ของ *Bacillus circulans* X60613 *Bacillus cereus* AF206326 *Bacillus thuringiensis* AF160221 สายพันธุ์ต่างๆ จาก Gen Bank มาใช้ในการออกแบบไพร์มเมอร์ เพื่อใช้ในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Bacillus* สายพันธุ์ B3-1 ที่คัดแยกได้เป็นแม่แบบ (Template) ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่เป็นรหัสของ 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้โครโมโซมของจุลินทรีย์สายพันธุ์ B3-1 ที่

สกัดด้วยวิธีของ Meade และคณะ (1984) ตามวิธีในข้อ 3.4.1 เป็นแม่แบบในส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dNTP mixture , Pyrobest และสารละลาย บัฟเฟอร์โดยมี

forword primer Bsp. 0816 (5'- GAT ACC CTG GTA GTC CAC GC - 3') และ reverse primer Bsp. 1510 (5'- TTC ACC GCG GCA TGC TGA TC -3') เป็น primer

ซึ่งส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ส่วนผสมของรีเอเจนต์ต่างๆ ในปฏิกิริยา PCR เพื่อการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการ

รีเอเจนต์	ปริมาตรที่เติม (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	51.5
10 X PCR บัฟเฟอร์	10
สารผสม dNTP (dNTP mixture)	8
Primer1 (forward) 2 ไมโครโมลาร์	10
Primer 2 (reverse) 2 ไมโครโมลาร์	10
Pyrobest (5 U/ไมโครลิตร)	0.5
Template	10

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสควบคุมอุณหภูมิแสดงดังรูปที่ 3.2

- เพิ่มอุณหภูมิจนถึง 96 °ซ
- Predenature ที่ 96 °ซ เป็นเวลา 1 นาที
- Denature ที่ 94 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที
- Annealing ที่ 55 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที → 30 Cycles
- Extention ที่ 72 °ซ เป็นเวลา 1 นาที
- Cool ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 7 นาที
- คงอุณหภูมิไว้ที่ 4 °ซ จนหยุดปฏิกิริยา

รูปที่ 3.2 การควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่เป็นรหัสของ 16S rRNA

แยกชิ้นยีนที่มีขนาดประมาณ 500 เบส ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิส ตามวิธีในข้อ 3.4.2 และแยกดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุดแยกแถบดีเอ็นเอ (GeneClean Kit) ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA โดยใช้บริการของ Bioservice unit แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสด้วยโปรแกรม BLAST

4. ศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและอนุพันธ์ต่างๆ ของน้ำมันโดยจุลินทรีย์บริสุทธิ์และกลุ่มของจุลินทรีย์ (Nakamura และคณะ , 1996)

4.1 ทดสอบคุณสมบัติที่สำคัญบางประการ

4.1.1 ทดสอบ dioxygenase activity หรือ aromatic ring cleavage enzyme

ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่คาดว่าจะมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของเชื้อจุลินทรีย์ให้สูงขึ้น เนื่องมาจากเอนไซม์นี้จะเข้าไปทำลายพันธะของวงอะโรมาติค โดยการเติมออกซิเจนเข้าไป ทำให้จุลินทรีย์สามารถที่จะนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ดีขึ้นเช่นกัน และพบว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่ในน้ำมันจะประกอบไปด้วยวงอะโรมาติคเสมอ ดังรายงานการวิจัยของ Harayama และคณะ (1989) ทำการทดสอบโดยการปลูกเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทริปโตเฟน (tryptophan medium , ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ ในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 48-72 ชม. สังเกตลักษณะของโคโลนี

และอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณรอบๆ โคโลนี ซึ่งถ้ามีสีน้ำเงิน (Blue pigment) เกิดขึ้นบริเวณรอบๆ โคโลนี แสดงว่าเชื้อนั้นน่าจะผลิตเอนไซม์ dioxygenase และมีเอนไซม์ tryptophanase ด้วย เนื่องจาก เอนไซม์ tryptophanase จะย่อย tryptophan ในอาหารเลี้ยงเชื้อไปเป็น indole จากนั้นจะถูกย่อยสลายต่อไปด้วยเอนไซม์ dioxygenase ไปเป็น indigo ซึ่งจะให้สีน้ำเงิน

รูปที่ 3.3 แสดงลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทริปโตเฟน

4.1.2 ทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้

โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่ปกคลุมด้วยน้ำมันดิบ และด้วยวิธีการวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension) ตามวิธีของ Morikawa และคณะ (1993)

- การทดสอบว่าเชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้

โดยทำการเขี่ยเชื้อที่มีอายุ 24 ชม. ลงบนอาหารวุ้นนิวเทรียนท์ (Nutrient agar) ที่ปกคลุมด้วยน้ำมันดิบ 20 ไมโครลิตร บนจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-7 วัน ถ้าสังเกตเห็นบริเวณใสไม่มีน้ำมันดิบบนผิวหน้าของอาหารรอบๆโคโลนี แสดงว่าเชื้อนั้นสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ (Morikawa และคณะ,1993)

- การวัดค่าแรงตึงผิว (Jain และคณะ,1991)

นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออก โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4°ซ ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring tensiometer K6 ,Kruss,Germany)

4.2 ศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายอนุพันธ์ของจุลินทรีย์

4.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ (Inoculum)

ทำโดยเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์จากหลอดอาหารเอียง (Nutrient agar slant) อายุ 24 ชม. ลงในอาหารเหลว BH broth (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มล. ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (32 $\pm$2 °ซ) เป็นเวลาประมาณ 24 ชม.จนได้ความหนาแน่นของเชื้อที่ต้องการ โดยเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ได้อยู่ในช่วง 1-2 จึงนำมาใช้เป็นหัวเชื้อปริมาตร 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ในการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้ รวมทั้งภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น

4.2.2 ภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและอนุพันธ์บางชนิดที่มีอยู่ในน้ำมันของจุลินทรีย์

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมตามข้อ 4.2.1 ปริมาตร 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BH broth ปริมาตร 50 มล. ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำมันดิบ เตตระเดกเคน พริสเทน และฟีแนนทรีน ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วรูปทรงกรวยขนาด

250 มล. เลี้ยงเชื้อในภาวะอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (32 $\pm$ 2°C) เป็นเวลา 24 ชม. หรือตามเวลาที่ต้องการศึกษา

4.2.3 การวัดการเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ (กรณีที่ใช้เพื่อนำมาทำหัวเชื้อ)

โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ถ้าน้ำเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นมากให้เจือจาง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

4.2.4 ศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายอนุพันธ์บางชนิดของน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่แยกได้

เติมหัวเชื้อของเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่แยกได้แต่ละชนิด โดยเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์จากหลอดอาหารเอียง (nutrient agar slant) อายุ 24 ชม. ลงในอาหารเหลวนิวเทรียนท์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (32 $\pm$2°ซ) เป็นเวลาประมาณ 24 ชม.จนได้ความหนาแน่นของเชื้อที่ต้องการ โดยเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ได้อยู่ในช่วง 1-2 จึงนำมาใช้เป็นหัวเชื้อ ปริมาตร 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BH broth ปริมาตร 50 มล. ที่มีการเติมอนุพันธ์บางชนิดที่มีอยู่ในน้ำมันดิบ (Nakamura และคณะ , 1996) เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ เตตระเดกเคน พริสเทน ฟีแนนทรีน ทีละอย่าง บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (32 $\pm$ 2°C) ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 0-7 วัน และทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 1 3 5 7 วันโดยเก็บตัวอย่างวันละ 1 ฟลาสก์ เพื่อทำการตรวจสอบปริมาณเชื้อโดยการวัดค่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) วัดการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างและวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่ลดลงโดยใช้ก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ แต่ทำการเติมอนุพันธ์ต่างๆ ปริมาณเท่ากันในอาหารชนิดเดียวกัน และบ่มเลี้ยงที่ภาวะเดียวกัน โดยใช้เวลาเท่ากันรายละเอียดวิธีการสกัดอนุพันธ์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลือโดยกาซโครมาโตกราฟี ทำเช่นเดียวกันกับวิธีการสกัดน้ำมันและวิเคราะห์ไฮโดรคาร์บอนที่แสดงในข้อ 1 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มา เปรียบเทียบเพื่อหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายอนุพันธ์บางชนิดที่มีอยู่ในน้ำมันของจุลินทรีย์แต่ละชนิดเมื่อบ่มเลี้ยงที่ภาวะเดียวกัน

4.3 ศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของจุลินทรีย์

4.3.1 ศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้

เติมหัวเชื้อของเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่แยกได้แต่ละชนิดโดยเตรียมตามวิธีข้อ 4.2.1 ปริมาตร 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มล. ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วรูปทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (32 $\pm 2^{\circ}$ซ) ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 0-7 วัน และทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 , 1 , 3 , 5 , 7 วันโดยเก็บตัวอย่างวันละ 1 ฟลาสก์ เพื่อทำการตรวจสอบปริมาณเชื้อโดยการวัดค่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Viable cell count) วัดการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างและวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่ลดลงโดยใช้ก๊าซโครมาโตกราฟี เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ แต่ทำการเติมน้ำมันปริมาณเท่ากันในอาหารชนิดเดียวกัน และบ่มเลี้ยงที่ภาวะเดียวกัน โดยใช้เวลาเท่ากัน รายละเอียดวิธีการสกัดน้ำมันออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลือโดยก๊าซโครมาโตกราฟี แสดงในข้อ 1 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของจุลินทรีย์แต่ละชนิดเมื่อบ่มเลี้ยงที่ภาวะเดียวกัน

4.3.2 ศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสม

เตรียมหัวเชื้อของเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิดโดยแยกกันเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BH broth ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ เลี้ยงเชื้อในภาวะเดียวกับข้อ 4.2.1 จนได้ปริมาณเชื้อมากที่สุด (โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง) จากนั้นนำเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ผสมกันด้วยจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^{6} CFU/มล. แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารชนิดเดิม (อาหารเหลว BH broth ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ) ดำเนินการทดลองตามขั้นตอนและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 4.3.1

5. การหาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น (Dibble และคณะ , 1979)

เลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ผสมกันตามวิธีข้อ 4.2.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BH broth ในภาวะตามวิธีข้อ 4.2.2 แต่เปลี่ยนแปลงภาวะในการเลี้ยงเชื้อต่างบางประการดังนี้

5.1 การหาค่าความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

โดยการเตรียมอาหารที่มีบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ โดยที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0 ใช้ 0.1 โมลาร์อะซิเตตบัฟเฟอร์ ที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ใช้ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ใช้ 0.1 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ เป็นตัวควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรด-ด่างซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 7.0 โดยเตรียมหัวเชื้อที่เหมาะสมตามวิธีข้อ 4.2.1 เลี้ยงเชื้อในภาวะตามวิธีในข้อ 4.2.2 แล้วตรวจสอบความสามารถของเชื้อผสมในการย่อยสลายน้ำมันตามวิธีในข้อ 1

5.2 ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าให้อากาศ

ทำการเตรียมหัวเชื้อที่เหมาะสมตามวิธีในข้อ 4.2.1 แล้วเลี้ยงเชื้อในภาวะตามวิธีข้อ 4.2.2 แต่มีเปลี่ยนแปลงความเร็วรอบของเครื่องเขย่าเป็น 100 , 200 และ 250 รอบต่อนาที ตามลำดับ แล้วตรวจสอบความสามารถของเชื้อผสมในการย่อยสลายน้ำมันตามวิธีในข้อ 1

5.3 อุณหภูมิ

ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BH broth โดยเตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 4.2.1 แล้วเลี้ยงเชื้อในภาวะตามวิธีข้อ 4.2.2 โดยมีการแปรอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อระหว่าง 20 30 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แล้วนำมาตรวจสอบความสามารถของเชื้อผสมในการย่อยสลายน้ำมันตามวิธีในข้อ 1

5.4 อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ(biosurfactant) กับเชื้อผสมที่แยกได้

เนื่องจาก Rocha และคณะ (1997) รายงานว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ได้สูงขึ้น จึงได้ทำการศึกษาโดยการเตรียมหัวเชื้อของจุลินทรีย์บริสุทธิ์แต่ละชนิดโดยการเลี้ยงแยกกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ BH broth ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ เลี้ยงเชื้อในภาวะเดียวกับข้อ 4.2.4 จนได้ปริมาณเชื้อมากที่สุด (โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง) จากนั้นนำเชื้อทั้งหมดมาผสมกันในอัตราส่วนต่างๆ โดยให้มีอัตราส่วนระหว่างเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ในอัตราส่วน 0 :1 , 1 : 1 , 2 :1 และ 4 :1 ตามลำดับ แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม ดำเนินการทดลองตามขั้นตอนและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 5.3

5.5 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

หาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการย่อยสลายสูงสุด โดยการเลี้ยงเชื้อในภาวะตามข้อ 5.1 , 5.2 , 5.3 และ 5.4 ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 7 วัน โดยเตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 4.2.1 เก็บตัวอย่างทุก 0 , 1 , 3 , 5 และ 7 วันตามลำดับ แล้วนำมาตรวจสอบความสามารถของเชื้อผสมในการย่อยสลายน้ำมันตามวิธีในข้อ 1 เพื่อจะได้ทราบระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เกิดการย่อยสลายสูงสุด

6. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นกับจุลินทรีย์แต่ละชนิด

นำข้อมูลทั้งหมดเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและอนุพันธ์ต่างๆ ของน้ำมันโดยจุลินทรีย์บริสุทธิ์และกลุ่มของจุลินทรีย์ รวมทั้งภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น มาเปรียบเทียบกันเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป