บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร บริษัท ไพเร็ก (Pyrex), USA
2. เครื่องชั่ง P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
3. เครื่องตอกยาเม็ดสากเดียว บริษัท Fhasai Engineering Ltd., Part., ประเทศไทย
4. เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพ (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2909^{TM} บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Kakusa, Japan
6. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Mikro20 บริษัท Hettich zentrifuge, Germany
9. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA – Thermal Cycle) รุ่น UV-160 บริษัท Shimadzu, Japan เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 บริษัท Corning, USA
10. เครื่องวัดดูดกลืนแสง (spectophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu, Japan
11. เครื่อง Thin-layer Chromatography ที่มีเครื่องตรวจวัด Flame Ionization Detector รุ่น Latroscan^{TM} MK-6/65 บริษัท Mitsubushi Kagaku latron, INC., Japan
12. เครื่อง MiniOpticon Real-Time PCR detector บริษัท Bio-Rad, USA
13. ชุดเครื่องเจลอิเล็คโทรโฟเรซิส Mini Gel migration through รุ่น i-mupid บริษัท COSMO BIO, Japan
14. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO laminar flow รุ่น HT-122.5 บริษัท International Scientific Supply, Japan
15. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U332 บริษัท Sanyo Electric, Japan
16. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส รุ่น ULT1786 บริษัท Forma, USA
17. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany
18. แท่งโครโมหลอด (chromarod) บริษัท Mitsubishi Kagaku latron, INC., Japan
19. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 2, 10, 20, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France

20. หลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร บริษัท ไพเร็ก (Pyrex), USA
21. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น digital water bath SB-1000 บริษัท Eyela, Japan

เคมีภัณฑ์ สารเคมีทั้งหมดเป็นสารเคมีเกรดงานวิเคราะห์ (analytical reagent)

1. กรดโบริก (H_3BO_4) บริษัท Merck, Germany
2. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany
3. กลีเซอรอล (glycerol) บริษัท Reserach organics, Inc., USA
4. คลอโรฟอร์ม (chloroform) บริษัท RCI Labscan, Thailand
5. คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO4{\cdot}5H_2O$) บริษัท Merck, Germany
6. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2{\cdot}2H_2O$) บริษัท Merck, Germany
7. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit บริษัท Qiagen, Germany
8. ชุดเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI บริษัท Promega, USA
9. ชุดเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase บริษัท New England Biolabs, USA
10. ชุดเอนไซม์ T4 DNA Ligase บริษัท Bio-Rad, USA
11. ชุด PCR cloning kit pGEM-T Easy Vector System II บริษัท Promega, USA
12. ชุด PCR purification kit QIAquick PCR purification kit บริษัท Qiagen, Germany
13. ซิงค์ (II) ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4{\cdot}7H_2O$) บริษัท Merck, Germany
14. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
15. โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) บริษัท Merck, Germany
16. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS, $C_{12}H_{25}OSO_3$) บริษัท Nacalai Teque, Japan
17. โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($MoNa_2O_4{\cdot}2H_20$) บริษัท Merck, Germany
18. ทริปโตน (tryptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
19. แบคโตอะการ์ (bacto agar) บริษัท Difco Laboratories, USA
20. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
21. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
22. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
23. โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
24. ฟีนอล (phenol) บริษัท Merck, Germany
25. เฟอร์รัสคลอไรด์ 6 น้ำ ($FeCl_3{\cdot}6H_2O$) บริษัท Merck, Germany
26. เฟอรัส (II) ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4{\cdot}7H_20$) บริษัท Merck, Germany

27. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Carlo, ERBA, France
28. แมงกานีส (II) ซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot H_2O$) บริษัท Carlo, ERBA, France
29. ไรโบนิวคลีเอสเอ (Rnase A) บริษัท Promega, USA
30. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillin) บริษัท Nacalal tesque, Japan
31. หางนม (skim milk) บริษัท Merck, Germany
32. อะกาโรสเจล (agarose gel) บริษัท IUAI, Japan
33. ไอโซโพรพานอล (isopropanol) บริษัท Merck, Germany
34. Proteinase K บริษัท US. Biological, US
35. 100 base pair DNA ladder บริษัท Bio-Rad, UK
36. 1 kb DNA ladder บริษัท Bio-Rad, UK
37. IPTG (Isopropyl thio- β-D-galactoside) บริษัท BIO BASIC INC, Canada
38. Lambda *Hin*dIII บริษัท Bio-Rad, UK
39. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) บริษัท Sigma, USA
40. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β-D-galactoside) บริษัท BIO BASIC INC, Canada
41. น้ำมันถั่วเหลือง ตราองุ่น
42. น้ำมันปาล์ม ตราแวว
43. น้ำมันรำข้าว ตราคิง
44. น้ำมันดอกทานตะวัน ตรามรกต
45. น้ำมันมะกอก ตรา Monini
46. น้ำมันหมู จำหน่ายในท้องตลาด
47. สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค DGGE บริษัท Bio-Rad, USA

    Formamide (Deionized)

    40% Acrylamide/Bis solution, 37.5:1 (2.6% C)

    Urea

    Ammonium persulfate

    APS

    TEMED (N,N,N′,N′-Tetra-methyl-ethylenediamine)

    50X TAE

    Ethidium bromide solution เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' – 3')	อ้างอิง
M13F (-20)	GTAAAACGACGGCCAGT	Muyzer และ คณะ, 1993
M13R (-20)	GCGGATAACAATTTCACACAGG	
968F*	AACGCGAAGAACCTTAC	Jiang และคณะ, 2011
1401R	CGGTGTGTACAAGACCC	

หมายเหตุ * มี GC clamp เชื่อมต่อบริเวณ 5' (5'- CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGG-3')

ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไลเปส (ยีน *lip*A)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' – 3')	ขนาดที่คาดหวัง (bp)	อ้างอิง
lipF	ACTCATATGGGCATCTTTAGCTATAAGGATCT	1,860	Long และคณะ, 2007
lipR	TGCAAGCTTTTAGGCCAACACCACCTGATCGGT		
SlLipF	AT(C/T)GC(A/C/T/G)TTTCGCGGCACCAG	500	Yao และคณะ, 2008
SlLipR	TCGTTGAA(G/A)(A/C/T/G)T(G/A)ACGATGTTGT		
lipA_rF	TAGTCGCGGATATTGCCGCTG	407	งานวิจัยนี้
lipA_rR	ATTACGCTGGCGGACGACATCAG		

ตารางที่ 3.3 แบคทีเรียที่ใช้ในงายวิจัย

สายพันธุ์แบคทีเรีย	รหัสเชื้อฝากเก็บ	แหล่งที่มา	สารตั้งต้น	อ้างอิง
Serratia sp. สายพันธุ์ W4-01	TISTR 2061	ดินปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม กรุงเทพฯ	3% (v/v) น้ำมันถั่วเหลือง	วัลย์วสันต์ ว่องวงศ์ศรี, 2551

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของ Serratia sp. สายพันธุ์ W4-01

3.1.1 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของ *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 ลงในอาหารเหลว 0.25X Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ในสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โซเดียมคลอไรด์ ทำซ้ำขั้นตอนดังกล่าว 2 รอบ นำเซลล์ที่ได้แขวนลอยใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โซเดียมคลอไรด์ หลังจากนั้นนำเซลล์ที่แขวนลอยมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร

3.1.2 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์

ศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลืองต่อการประสิทธิภาพย่อยสลายโดย *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 โดยเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ W4-01 ตามวิธีข้อที่ 3.1.1 แล้วเติมหัวเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ (Matsumiya และคณะ, 2007) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 10, 25 และ50 กรัมต่อลิตร จากนั้นเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และวันที่ 7 โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองแต่ไม่เติมแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่เหลืออยู่ด้วยคลอโรฟอร์มและวิธี TLC-FID ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.8 (Striby และคณะ, 1999) และนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีดรอปเพลท (drop plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนี เพื่อคำนวณหาปริมาณแบคทีเรียต่อมิลลิลิตร

จากนั้นคัดเลือกความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลือง 1 ความเข้มข้น มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย เพื่อศึกษาระยะเวลาย่อยสลายที่เหมาะสม โดยเติมหัวเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน โดยมีชุดควบคุม คือ ชุดที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองแต่ไม่เติมแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่เหลืออยู่ด้วยคลอโรฟอร์มและวิธีวิธี TLC-FID ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.8 และนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีดรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB

3.1.3 ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันอื่นๆ

เติมหัวเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีไขมันต่างๆ ได้แก่ น้ำมันหมู น้ำมันรำข้าว น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มและน้ำมันดอกทานตะวัน ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จากนั้นเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และวันที่ 3 โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดทีเติมน้ำมันถั่วเหลืองแต่ไม่เติมแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ด้วยคลอโรฟอร์มและวิธี TLC-FID ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.8 และนับจำนวน

แบคทีเรียด้วยวิธีดรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB โดยข้อมูลที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบประสิทธิภาพย่อยสลายกับแบคทีเรียอื่นที่เคยมีรายงาน

3.1.4 ตรวจหายีนประมวลรหัสเอนไซม์ไลเปส

3.1.4.1 สกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองไมโครฟิวจ์ ปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงระดับความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นแขวนลอยเซลล์ในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 517 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติมเอนไซม์ไลโซไซม์ ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate: SDS) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เติมเอนไซม์โปรตีนเนสเค (proteinase K) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 120 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา แล้วเติมสารละลาย CTAB/NaCl ปริมาตร 250 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมคลอโรฟอร์ม ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าแรงๆ ปั่นเหวี่ยงที่ระดับความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25-30 นาที ดูดส่วนน้ำใสใสในหลอดทดลองไมโครฟิวจ์อันใหม่ เติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของส่วนน้ำใส ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยงที่ระดับความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนน้ำใสใสในหลอดทดลองไมโครฟิวจ์อันใหม่ จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติมสารละลายไอโซโพรพานอลในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรสุดท้ายของส่วนน้ำใส ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เป็นเวลา 1 นาที จะเห็นตะกอนของดีเอ็นเอ จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ระดับความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง คงไว้แต่ตะกอนของดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ระดับความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เหลือแต่ตะกอนของดีเอ็นเอ ระเหยเอทานอลจนตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อตะกอนดีเอ็นเอแห้งแล้ว เติมบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

ตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า (ภาคผนวก ข) นำสารละลายดีเอ็นเอผสมกับสีย้อม หยอดลงในช่องวิ่งบนแผ่นอะกาโรสเจล เข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) โดยช่องวิ่งแรกจะหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda *Hin*dIII ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ขนาดของดีเอ็นเอ จากนั้นทำอิเลคโทรโฟเรซิส ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีย้อมเคลื่อนที่ได้ในระยะทางที่เหมาะสม ย้อมอะกาโรสเจล

ด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

3.1.4.2 การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ไลเปส นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.1.3.1 มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ดังตารางที่ 3.1 โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยา ดังนี้ ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารละลายในปฏิกิริยามีดังนี้ สารละลายบัฟเฟอร์ 10X ความเข้มข้น 1 เท่า สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ ความเข้มข้นชนิดละ 20 พิโคลโมลต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีข้อ 3.1.3.1 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo cycle) โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ ดังนี้

ไพรเมอร์ lipF และ lipR ใช้สภาวะ

1.	Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	5	นาที
2.	Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1	นาที
3.	Annealing	ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1	นาที
4.	Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1	นาที
5.	ทำขั้นที่ 2 – 4 ซ้ำเป็นจำนวน 30 รอบ				
6.	Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	7	นาที
	ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้คือ 1,860 คู่เบส				

ไพรเมอร์ SlLipF และ SlLipR ใช้สภาวะ

1.	Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	5	นาที
2.	Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1	นาที
3.	Annealing	ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1	นาที
4.	Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1	นาที
5.	ทำขั้นที่ 2 – 4 ซ้ำเป็นจำนวน 30 รอบ				
6.	Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	7	นาที
	ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้คือ 500 คู่เบส				

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้แผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder (ภาคผนวก ข)

3.1.4.3 การทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR เพื่อการโคลน ด้วย QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 5 เท่าของผลิตภัณฑ์ PCR ผสมให้เข้ากันแล้วดูดลงใน QIAprep spin column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ จากนั้นย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์อันใหม่ เติมน้ำปลอดประจุ

ปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะส่งวิเคราะห์ลำดับเบส

3.1.4.4 การโคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR

1.) ไลเกทชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 1.2.3 เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA) ด้วยเอนไซม์ไลเกส (ligase) (Promega, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยส่วนผสมของปฏิกิริยา ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มีดังนี้

2X ไลเกชันบัฟเฟอร์	5	ไมโครลิตร
พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy (50 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
ผลิตภัณฑ์ PCR	3	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (3 หน่วยต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร

ไลเกชันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง

2.) ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 และคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นยีนที่ต้องการ เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์โดยวิธี Calcium chloride โดยเลี้ยงเชื้อ E. coli สายพันธุ์ JM109 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Ψb (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Ψb ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.3-0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Ψb ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน arm flask นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 0.5 แล้วจึงถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อ แช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาทีปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงระดับความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมสารละลาย TfbI (ภาคผนวก ข) ที่เย็นปริมาตร 40 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์ กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย TfbI (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตะกอนเซลล์และสารละลาย TfbI ในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงระดับความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย TfbII (ภาคผนวก ข) ที่เย็นปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์อีกครั้ง กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย TfbII แช่ในน้ำแข็งนาน 15 นาที หรือมากกว่านั้น แบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่เย็น ปริมาตรหลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บคอมพีเทนต์เซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.) คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ (transformant) คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการด้วยวิธี Blue/White selection โดยนำสารละลายแขวนลอยของ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ซึ่งผ่านการเกลี่ยด้วย X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG (Isopropyl thio-β-

D-galactoside) เข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์ หลังจากเกลี่ยเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-24 ชั่วโมง

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ด้วยวิธี heat shock โดยนำคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาแช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ ใส่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไลเกทไว้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำแข็งนาน 20 นาที heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45-50 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในน้ำแข็งทันที นาน 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเหลว SOC (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 950 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

3.1.4.5 การสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy สกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงระดับความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แขวนลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมกันโดยการกลับหลอดไปมาจนกระทั่งสารแขวนลอยเริ่มหนืดและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที เติมสารละลาย N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดไปมาจนเกิดตะกอนขาว นำไปปั่นเหวี่ยงระดับความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนน้ำใสลงใน QIAprep spin column ปั่นเหวี่ยงระดับความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงระดับความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงระดับความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงระดับความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บสารละลายพลาสมิดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.1.4.6 การตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดภายในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยส่วนผสมของปฏิกิริยา ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มีดังนี้

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T EASY	1	ไมโครลิตร
10X บัฟเฟอร์	1	ไมโครลิตร
เอนไซม์ *Eco*RI	0.5	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	7.5	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2-4 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟเรซิส ในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า

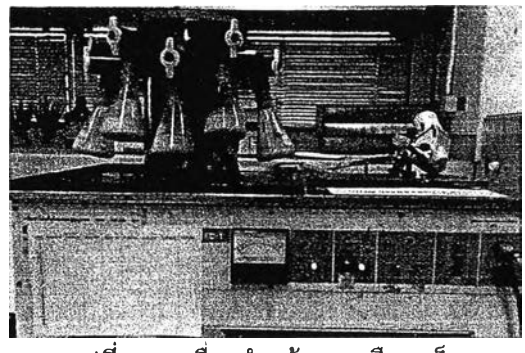
โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอด โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

3.1.4.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy โดยส่งวิเคราะห์ที่บริษัทไบโอดีไซน์ จำกัด (BioDesign Co., Ltd.) ประเทศไทย วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ M13F (-20) (5' GTAAAACGACGGCCAGT 3') และ M13R (-20) (5' GCGGATAACAATTTCACACAGG 3') วิเคราะห์ลำดับเบสและจัดจำแนกชนิดของยีนโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTx (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

3.2 พัฒนาวิธีการผลิต เก็บรักษา และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ของแบคทีเรียอัดเม็ด *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01

3.2.1 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียอัดเม็ด

ทำโดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงวิธีมาจาก Klayraung และคณะ (2009) โดยเขี่ยโคโลนีสายพันธุ์ W4-01 จำนวน 2 ลูป ลงในอาหารเหลว 0.25X LB ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ล้างเซลล์ในสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โซเดียมคลอไรด์ ทำซ้ำขั้นตอนดังกล่าว 2 รอบนำเซลล์ที่ได้แขวนลอยในสารป้องกันความเย็น ได้แก่ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) หางนม และ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) หางนมที่เติม 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โมโนโซเดียมกลูตาเมท (Monosodium glutamate; MSG) ให้ได้ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer) (แสดงดังรูปที่ 3.1) และนับจำนวนแบคทีเรียทั้งก่อนและหลังทำให้แห้งด้วยระบบสุญญากาศด้วยวิธีดรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB โดยเก็บรักษาแบคทีเรียรูปแบบแห้งในสภาวะมีออกซิเจนและอุณหภูมิห้อง และทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรีย เป็นเวลา 1 เดือน เก็บตัวอย่างทุก 1 สัปดาห์ และนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีการดรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB จากนั้นคัดเลือกสารป้องกันความเย็นได้แก่ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) หางนม และ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) หางนมที่เติม 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) MSG ที่ทำให้แบคทีเรียมีจำนวนแบคทีเรียเหลือรอดสูงที่สุดภายหลังผ่านการเก็บเป็นเวลา 1 เดือน เก็บเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาข้อ 3.2.2



รูปที่ 3.1 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง
(Freeze Dryer รุ่น FD-1 ยี่ห้อ EYELA ผลิตโดยบริษัท Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น)

3.2.2 ผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด

แปรผันปริมาตรหัวเชื้อแบคทีเรียไลโอฟิไลซ์เริ่มต้นและส่วนผสมอัดเม็ดโดยน้ำหนักของเม็ดแบคทีเรียอัดเม็ด ทำโดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงวิธีมาจาก Fazeli และคณะ (2006) ผสมหัวเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ W4-01 ที่มีสารป้องกันความเย็นที่ได้รับคัดเลือกจากข้อ 3.2.1 และผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ (w/w) แอมโมเนียมซัลเฟต 7, 8.5, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 18.5, 20, 21, 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ (w/w) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนซัลเฟต 5, 7, 8.5, 9, 10, 11, 12, 17, 18.5, 21, 22, และ 32 เปอร์เซ็นต์ (w/w) น้ำตาลทราย 5.1 และ 10.1 เปอร์เซ็นต์ (w/w) แมกนีเซียมสเตรียเลต 0.9 เปอร์เซ็นต์ (w/w) และแป้งข้าวโพด 2 เปอร์เซ็นต์ (w/w) (แสดงดังตารางที่ 3.4) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปตอกเม็ดด้วยเครื่องตอกยาเม็ดแบบสากเดี่ยว (รูปที่ 3.2) นับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีดรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB และเลือกสูตรแบคทีเรียอัดเม็ดที่ทำให้แบคทีเรียอัดเม็ดมีคุณสมบัติที่ดี 2 สูตร โดยมีความสามารถในการละลายน้ำได้รวดเร็วและหมดภายใน 24 ชั่วโมง และมีจำนวนแบคทีเรียเหลือรอดมากภายหลังการอัดแบคทีเรียอัดเม็ด เพื่อใช้ในการศึกษาข้อ 3.2.3.1 และ 3.2.3.2 ต่อไป

ตารางที่ 3.4 สารประกอบและคุณสมบัติของส่วนผสมที่นำมาอัดเม็ด

สารประกอบ	คุณสมบัติ
เชื้อรูปแบบแห้ง	*Serratia* sp. W4-01 + สารป้องกันความเย็น
แอมโมเนียมซัลเฟต	แหล่งไนโตรเจน
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	แหล่งฟอสฟอรัส
ซูโครส	สารยึดเกาะ/สารอาหาร
แมกนีเซียมสเตียเรต	สารช่วยลื่น/สารกันติด/สารช่วยไหล
แป้งข้าวโพด	สารช่วยแตกตัว

ตารางที่ 3.5 อัตราส่วนของสารประกอบที่ใช้ในการอัดเม็ดแบคทีเรียสูตรสำเร็จ

สารประกอบ	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5	สูตร 6	สูตร 7	สูตร 8
เชื้อรูปแบบแห้ง	70%	70%	70%	70%	50%	50%	50%	50%
แอมโมเนียมซัลเฟต	11%	13%	15%	17%	21%	30%	10%	25%
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	11%	9%	7%	5%	21%	12%	32%	17%
ซูโครส	5.1%	5.1%	5.1%	5.1%	5.1%	5.1%	5.1%	5.1%
แมกนีเซียมสเตียเรต	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%
แป้งข้าวโพด	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%

สารประกอบ	สูตร 9	สูตร 10	สูตร 11	สูตร 12	สูตร 13	สูตร 14	สูตร 15	สูตร 16
เชื้อรูปแบบแห้ง	70%	70%	70%	70%	50%	50%	50%	50%
แอมโมเนียมซัลเฟต	8.5%	10%	7%	12%	18.5%	25%	20%	15%
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	8.5%	7%	10%	5%	18.5%	12%	17%	22%
ซูโครส	10.1%	10.1%	10.1%	10.1%	10.1%	10.1%	10.1%	10.1%
แมกนีเซียมสเตียเรต	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%
แป้งข้าวโพด	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%

3.2.2.1 ทดสอบหาปริมาณแบคทีเรียในสูตรสำเร็จ

นำแบคทีเรียอัดเม็ดที่ผลิตได้จากแต่ละสูตรสำเร็จมาตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียที่มีอยู่ในเม็ดด้วยวิธีการดรอปเพลทบนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในสูตรสำเร็จ คำนวณเป็น CFU ต่อกรัม

3.2.2.2 ชั่งน้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ด และความหนาของเม็ดแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียอัดเม็ดที่ผลิตได้จากแต่ละสูตรสำเร็จมาชั่งน้ำหนัก และวัดความหนาด้วยคาลิปเปอร์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักและความหนาของเม็ดแบคทีเรีย

3.2.2.3 ทดสอบความสามารถในการละลายน้ำของแบคทีเรียอัดเม็ด

นำเม็ดแบคทีเรีย 1 เม็ด ใส่ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำมาละลายโดยใช้แท่งแม่เหล็กคน ตั้งความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งเม็ดแบคทีเรียละลายน้ำจนเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ บันทึกระยะเวลาในการละลายน้ำแต่ละสูตรสำเร็จ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยของเวลาในการละลายน้ำของแบคทีเรียอัดเม็ด

3.2.3 คัดเลือกสูตรที่เหมาะสมและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียอัดเม็ดในการย่อยสลายไขมัน

3.2.3.1 คัดเลือกสูตรหัวเชื้อแบคทีเรียอัดเม็ด

คำนวณน้ำหนักแบคทีเรียอัดเม็ดที่ใช้ทดสอบการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อในอัตราส่วน 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแบคทีเรียอัดเม็ดที่ได้รับเลือกจากข้อ 3.2.2 ต่อน้ำประปา 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย โดยมีแนวคิดวิธีการใช้คือ ใช้แบคทีเรียอัดเม็ด 1 เม็ดต่อระบบเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย 1 ลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0 และ 24 นับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีดรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB เพื่อให้ทราบปริมาณแบคทีเรียที่ได้จากการขยายส่วน

3.2.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียอัดเม็ดในการย่อยสลายไขมัน

เติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่ได้ผ่านการขยายส่วนตามวิธีข้อ 3.2.3.1 ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ต่อน้ำเสียสังเคราะห์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองแต่ไม่เติมแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่เหลืออยู่ด้วยคลอโรฟอร์มและวิธี TLC-FID ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.8 และนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีดรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB จากนั้นเลือกสูตรแบคทีเรียอัดเม็ดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการย่อยสลายไขมัน 1 สูตร เพื่อใช้ในการศึกษาในข้อต่อไป

3.2.4 ทดสอบวิธีเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ด

นำแบคทีเรียอัดเม็ดที่ได้รับเลือกจากข้อ 3.2.3.2 มาทดสอบวิธีเก็บรักษา โดยการเก็บรักษามี 4 สภาวะ ได้แก่ 1) สภาวะที่มีออกซิเจนและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2) สภาวะที่มีออกซิเจนและอุณหภูมิห้อง 3) สภาวะไม่มีออกซิเจนและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 4) สภาวะไม่มีออกซิเจนและอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน เก็บตัวอย่างทุก 2 สัปดาห์ โดยการเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนด้วยเครื่องซีลสุญญากาศยี่ห้อ SIN BO รุ่น DZ-280/2SD ในการปิดถุงพลาสติก และนับจำนวนแบคทีเรียด้วย

วิธีดรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.3.2

3.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันระหว่างแบคทีเรียอัดเม็ด W4-01 กับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด

นำแบคทีเรียอัดเม็ด W4-01 และผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดได้แก่ ผลิตภัณฑ์ A และผลิตภัณฑ์ B นับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีดรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ด้วยการเพิ่มจำนวนหัวเชื้อแบคทีเรียตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ และเติมลงในชุดทดลอง โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุดทดลองได้แก่ ชุดทดลองที่หนึ่ง เติมปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากันด้วยการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดทดลองที่สอง เติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียลงในน้ำเสียสังเคราะห์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองแต่ไม่เติมแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่เหลืออยู่ด้วยคลอโรฟอร์มและวิธี TLC-FID ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.8 และนับจำนวนของแบคทีเรียด้วยวิธีดรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB

3.4 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียอัดเม็ด *Serratia* sp.สายพันธุ์ W4-01 ในน้ำเสียปนเปื้อนไขมัน

3.4.1 วิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียก่อนบำบัด

นำตัวอย่างน้ำจากบ่อดักไขมันร้านกาแฟอเมซอน สถานีบริการน้ำมัน ปตท วิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้งเพื่อหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในตารางที่ 3.5 โดยเก็บตัวอย่าง 3 ครั้งได้แก่ ครั้งที่ 1 วันที่ 27 มีนาคม 2556 ครั้งที่ 2 วันที่ 2 เมษายน 2556 และครั้งที่ 3 วันที่ 9 เมษายน 2556

ตารางที่ 3.6 วิธีวิเคราะห์ลักษณะสมบัติต่างๆ ของน้ำเสีย

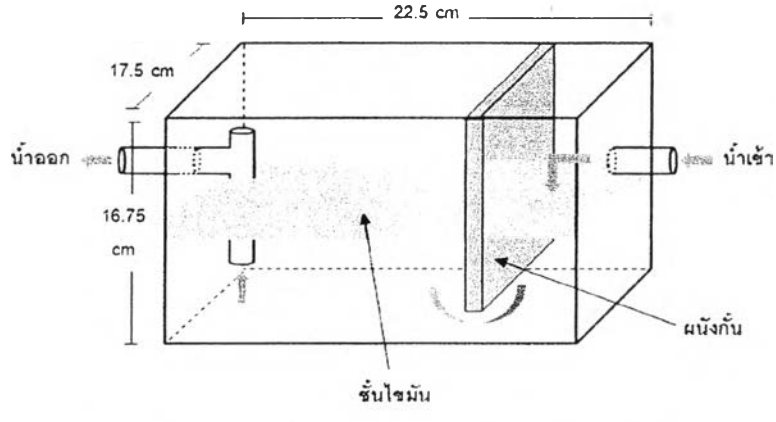
พารามิเตอร์	วิธีวิเคราะห์
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	pH meter
ค่าไขมันและน้ำมัน (FOG)	สกัดด้วยตัวทำละลาย แล้วแยกหาน้ำหนักของน้ำมันและไขมัน
ค่าซีโอดี (COD)	Potassium Dichromate Digestion
การละลายน้ำออกซิเจน (DO)	เครื่องวัด DO
ปริมาณน้ำมันที่มีอยู่	TLC-FID
ไนโตรเจนทั้งหมด (Total N)	Macro Kjedahl
ฟอสฟอรัสทั้งหมอ (Total P)	Ascorbic acid method

3.4.2 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันระดับห้องปฏิบัติการ

นำน้ำเสียจากร้านอาหารได้แก่ ร้านอาหาร ร้านกาแฟ และร้านอาหารทอดเคเอฟซีของสถานีบริการน้ำมัน บางปะอิน มาวิเคราะห์ปริมาณไขมันด้วยวิธี TLC-FID ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.8 เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลาย จากนั้นเติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการเพิ่มจำนวนตามวิธีข้อ 3.2.3.2 ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ต่อน้ำเสียจากร้านอาหาร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง ตามระยะเวลาที่เหมาะสม โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดน้ำเสียที่ไม่เติมแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ด้วยคลอโรฟอร์มและวิธี TLC-FID ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.8 และนับจำนวนของแบคทีเรียด้วยวิธีดรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB

3.4.3 สร้างระบบบำบัดจำลอง (ถังดักไขมัน)

สร้างระบบบำบัดแบบจำลอง ซึ่งได้ต้นแบบจากถังดักไขมันที่จำหน่ายตามท้องตลาด เป็นถังกระจกสี่เหลี่ยม มีแผ่นผนังกั้นกลางระหว่างสองถังบำบัด กว้าง 17.6 เซนติเมตร ยาว 22.5 เซนติเมตร สูง 16.75 เซนติเมตร ปริมาตร 4 ลิตร และต่อเข้ากับปั๊มนำ เพื่อป้อนน้ำเข้า ซึ่งทิศทางการไหลของน้ำ แสดงดังรูปที่ 3.2 โดยนำระบบบำบัดนี้ไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากบ่อดักไขมันของสถานีบริการน้ำมัน ซึ่งน้ำเสียนี้ได้ผ่านการแยกชั้นไขมันและขยะ แต่ยังคงพบปัญหาการปนเปื้อนไขมันในน้ำทิ้ง



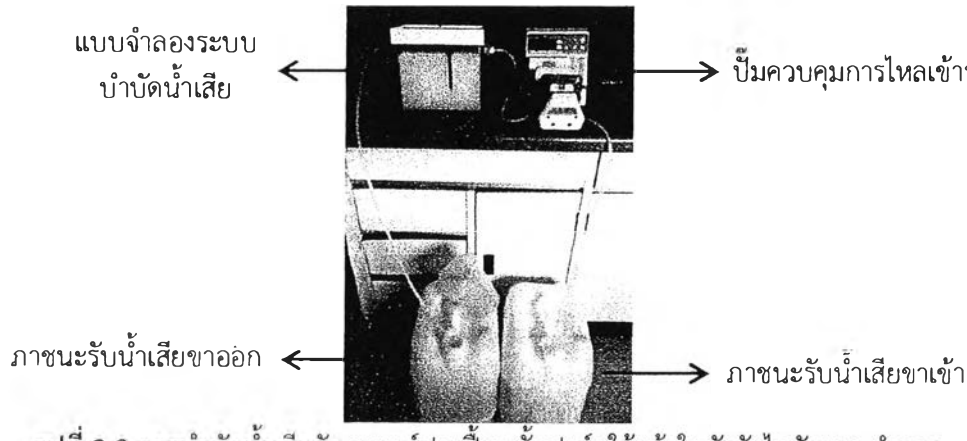
รูปที่ 3.2 รูปภาพจำลองระบบบำบัดจำลอง (ถังดักไขมัน)

3.4.4 ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนไขมันโดยระบบบำบัดขนาดจำลองระดับห้องปฏิบัติการ

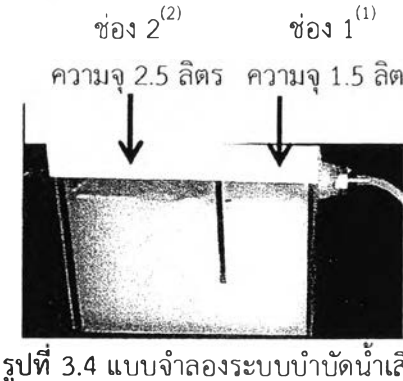
บำบัดน้ำปนเปื้อนไขมันในถังบ่อดักไขมัน ปริมาตร 4 ลิตร โดยใช้น้ำมันในน้ำอิมัลชันเป็นแบบจำลองเตรียมจากน้ำประปา ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำยาล้างจานความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และน้ำมันปาล์มใช้แล้วความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 2 นาที ด้วยเครื่องปั่นยี่ห้อ SKG มีความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที หลังจากนั้นนำไปกวนโดยใช้เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดฟองและทำ

ให้น้ำเสียอยู่ในรูปอิมัลชันมีความเสถียร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยมีระยะเวลาเก็บกักน้ำเสีย (HRT) 12 ชั่วโมง และเป็นระบบน้ำล้น ดังรูปที่ 3.3

เติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการเพิ่มจำนวนตามวิธีข้อ 3.2.3.2 ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ต่อปริมาตรของน้ำในถัง 4 ลิตร ลงในช่อง 1 โดยเติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการขยายส่วนทุกวัน และติดปั๊มให้อากาศที่ช่องสองในวันที่ 7 ของการทดลอง เก็บตัวอย่างน้ำเข้าและน้ำออกวันเว้นวัน เป็นเวลา 21 วัน โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมน้ำมันปาล์มใช้แล้วแต่ไม่เติมแบคทีเรีย วิเคราะห์ค่า pH ค่า COD ปริมาณน้ำมันปาล์มใช้แล้วที่เหลือด้วยวิธี TLC-FID และนับจำนวนของแบคทีเรียด้วยวิธีดรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB เก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียในช่อง 1 และช่อง 2 โดยเก็บหลังจากเติมเชื้อแบคทีเรียลงในช่อง 1



รูปที่ 3.3 การบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนน้ำมันปาล์มใช้แล้วในถังดักไขมันแบบจำลอง



รูปที่ 3.4 แบบจำลองระบบบำบัดน้ำเสีย

หมายเหตุ [1] เติมหัวเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ต่อปริมาตรของน้ำในถัง 4 ลิตรในช่อง 1 ทุกวัน

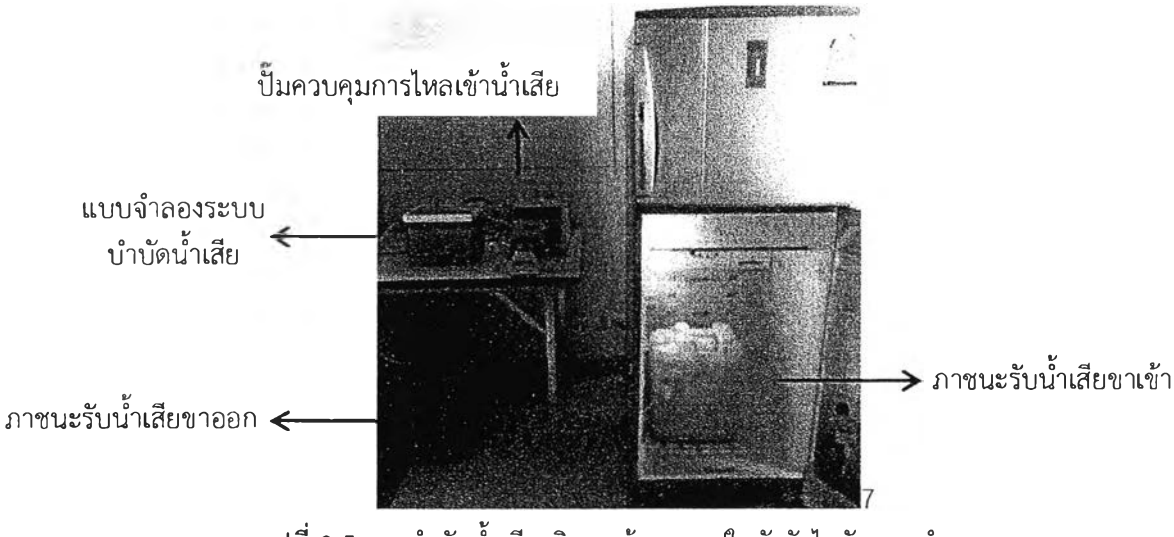
[1),(2)] เก็บเชื้อแบคทีเรียในช่องที่ 1 และช่องที่ 2 โดยเก็บหลังจากเติมหัวเชื้อแบคทีเรียลงไป

3.4.5 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำเสียร้านกาแฟระดับห้องปฏิบัติการ

เติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการขยายส่วนตามวิธีข้อ 3.2.3.2 ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ต่อน้ำเสียจากร้านกาแฟอเมซอน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดน้ำเสียที่ไม่เติมแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณไขมันที่เหลือด้วยวิธี TLC-FID ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.8 และนับจำนวนของแบคทีเรียด้วยวิธีดรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB

3.4.6 ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟด้วยระบบบำบัดขนาดจำลอง

บำบัดน้ำปนเปื้อนไขมันในถังดักไขมัน ปริมาตร 4 ลิตร โดยใช้น้ำเสียจริงจากร้านกาแฟที่ผ่านการเจือจาง 5 เท่า และติดปั๊มให้อากาศ เพื่อเพิ่มการหมุนวนของน้ำ เติมหัวเชื้อแบคทีเรียรูปแบบเซลล์อิสระให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10^{13} CFU ต่อมิลลิลิตร โดยเติมหัวเชื้อแบคทีเรียในช่องที่ 1 และ 2 เติมวันละ 2 ครั้ง ให้มีระยะเวลาห่างกัน 8-10 ชั่วโมงของทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน และเก็บตัวอย่างแบคทีเรียทั้งสองช่องภายหลังเติมเชื้อแบคทีเรียลงไป เพื่อให้มีจำนวนแบคทีเรียมากเกินพอในการย่อยสลายไขมัน จากนั้นเติมหัวเชื้อแบคทีเรียในช่องที่ 1 และ 2 ในช่วงกลางวัน เพียงครั้งเดียว ตั้งแต่วันที่ 11-21 เก็บตัวอย่างแบคทีเรียทั้งสองช่องก่อนจะเติมเชื้อแบคทีเรียครั้งต่อไป เพื่อหาจำนวนแบคทีเรียที่เหลือรอดภายหลังการบำบัดไขมัน เก็บตัวอย่างน้ำเข้าและน้ำออกวันเว้นวัน เป็นเวลา 21 วัน โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่น้ำเสียจริงจากร้านกาแฟ เจือจาง 5 เท่าแต่ไม่เติมแบคทีเรีย วิเคราะห์ค่า pH ค่า COD ปริมาณไขมันที่เหลือด้วยวิธี TLC-FID และนับจำนวนของแบคทีเรียด้วยวิธีดรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB จากนั้นตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี PCR-DGGE ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.5 ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *lip* A ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี real-time qPCR ในตัวอย่างน้ำเสียจากร้านกาแฟตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.8 และทดสอบความเป็นพิษ ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.7



รูปที่ 3.5 การบำบัดน้ำเสียจริงจากร้านกาแฟในถังดักไขมันแบบจำลอง

3.5 การตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียในระบบบำบัดด้วยวิธี PCR-DGGE

3.5.1 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำเสีย

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำเสียด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจาก Lemarchand และคณะ (2005) นำตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 20 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงด้วยระดับความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนตะกอนใส่ในหลอดทดลองไมโครฟิวจ์ เติม lysis buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารแล้วดูดใส่หลอด screw cap ที่มีเม็ดบีด (glass bead) เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1 มิลลิเมตร (Biospec Products, Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา) เติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยไปเข้าเครื่อง beaten เป็นเวลา 30 วินาที นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยระดับความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนน้ำใสใส่ในหลอดทดลองไมโครฟิวจ์อันใหม่ จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติมสารละลายไอโซโพรพานอลในปริมาณ 2 เท่าของปริมาตรสุดท้ายของส่วนน้ำใส นำไปแช่เย็นที่ -80 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และละลายที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยระดับความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง คงไว้แต่ตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ระดับความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง คงไว้แต่ตะกอนดีเอ็นเอ ระเหยเอทานอลจนตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อได้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งแล้ว เติมบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเอนไซม์อาร์เอนเอส ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

3.5.2 ติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

นำดีเอ็นเอของตัวอย่างน้ำเสียและสายพันธุ์ W4-01 ที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนบริเวณ V6-V8 region ของแบคทีเรียด้วยคู่ไพรเมอร์ 968F-GC ซึ่งมี GC clamp เชื่อมต่อบริเวณ 5' และ 1401R (Jiang และคณะ, 2011) ผลิตภัณฑ์มีความยาวประมาณ 433 คู่เบส โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยา ดังนี้ ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารละลายในปฏิกิริยามีดังนี้ สารละลายบัฟเฟอร์ 10X ความเข้มข้น 1 เท่า สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ ความเข้มข้นชนิดละ 20 พิโคลโมลต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อรวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และมีสภาวะดำเนินปฏิกิริยาดังนี้

1.	Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	5 นาที
2.	Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	30 วินาที
3.	Annealing	ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	20 วินาที
4.	Extension	ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	40 วินาที
5.	ทำขั้นที่ 2 – 4 ซ้ำเป็นจำนวน 30 รอบ			
6.	Final extension	ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	7 นาที

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้คือ 433 คู่เบส

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้แผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ภาคผนวก ข)

วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธี DGGE โดยเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย 30-70 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) (100 เปอร์เซ็นต์ denaturant ประกอบด้วย 7 M urea และ 40 เปอร์เซ็นต์ formamide) ซึ่งทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant โดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ เมื่อใส่แกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant ลงในชุดแชนวิชเตรียมเจลแล้วให้เสียบหวีลงไประหว่างกระจกแชนวิช ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ปล่อยให้พอลิอะคริลาไมด์แข็งตัว นำชุดเจลแชนวิชใส่ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 7 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนจนอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ผสมผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับสีติดตามหยอดลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง ย้อมพอลิอะคริลาไมด์เจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 20 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

3.6 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *lip*A ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี real-time qPCR

3.6.1 การออกแบบไพรเมอร์ยีน *lip*A สำหรับ real-time qPCR

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับ real-time qPCR ใช้โปรแกรม FastPCR version 5.2.2.1 ซึ่งออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *lip*A ของแบคทีเรีย *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 จากนั้นนำคู่ไพรเมอร์มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับดีเอ็นเอต้นแบบ (*Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01) โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยา ดังนี้ ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารละลายในปฏิกิริยามีดังนี้ สารละลายบัฟเฟอร์ 10X ความเข้มข้น 1 เท่า สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ ความเข้มข้นชนิดละ 20 พิโคลโมลต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และมีสภาวะดำเนินปฏิกิริยาดังนี้

1.	Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	5	นาที
2.	Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1	นาที
3.	Annealing	ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1	นาที
4.	Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1	นาที
5.	ทำขั้นที่ 2 – 4 ซ้ำเป็นจำนวน 30 รอบ				
6.	Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	7	นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้แผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

จากนั้นทำบริสุทธิ์เพื่อการโคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR เข้าพลาสมิดเวกเตอร์ ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.1.4.3 และ 3.1.4.4 เมื่อได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.1.4.5 พร้อมทั้งตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.1.4.6 และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.1.4.7

3.6.2 การทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์ยีน *lip*A สำหรับ real-time qPCR

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ lipA_rF และ lipA_rR ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากแบคทีเรียดังนี้ แบคทีเรียย่อยสลายไขมันได้แก่ *Serratia* sp. สายพันธุ์ W4-01 และ *Gordonia* sp. สายพันธุ์ GY40, แบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้แก่ *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ R2 (สิทธิ ทาทอง, 2550), แบคทีเรียย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; PAHs) ได้แก่ *Novosphingobium pentaromativorans* สายพันธุ์ PCY (Wongwongsee และคณะ, 2013), *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402, *Diophorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB (Klankeo และคณะ, 2009) และ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 (Kouzuma และคณะ, 2006) และแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายทั้ง PAHs และน้ำมันปาล์มได้แก่ *Sphingobium* sp. สายพันธุ์ P2 (Pinyakong และคณะ, 2003) โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาดังนี้ ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารละลายในปฏิกิริยามีดังนี้ สารละลายบัฟเฟอร์ 10X ความเข้มข้น 1 เท่า สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ ความเข้มข้นชนิดละ 20 พิโคลโมลต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และมีสภาวะดำเนินปฏิกิริยาและตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.6.1

3.6.3 เตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับ real-time qPCR

นำผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ของยีน *lip*A จากสายพันธุ์ W4-01 โคลนเข้าพลาสมิดเวกเตอร์ ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.1.4.3 จากนั้นสกัดพลาสมิด ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.1.4.5 และนำพลาสมิดที่รู้ความเข้มข้นมาเจือจางด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้มีระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10^2 – 10^{10} gene copies number ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำพลาสมิดที่เจือจางระดับความเข้มข้นต่างๆ มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

สำหรับ real-time qPCR เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง ค่า cycle threshold (Ct) และปริมาณเชื้อ (gene copies number ต่อมิลลิลิตร)

3.6.4 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มียีน *lip*A ด้วยวิธี real-time qPCR

โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 3.5.1 มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาเป็นดังนี้ 1x Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas) สารละลายไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมล ดีเอ็นเอแม่แบบ 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรน้ำด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อรวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วย MiniOpticon Real-Time PCR detector (Bio-Rad) ประมวลผลโดยโปรแกรม MJ Opticon Monitor Analysis Software version 3.1 (Bio-Rad) โดยมีโปรแกรมดังนี้

1.	Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	10 นาที
2.	Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	30 วินาที
3.	Annealing	ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	30 วินาที
4.	Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	30 วินาที

5. ทำขั้นที่ 2 – 4 ซ้ำเป็นจำนวน 40 รอบ
6. Melting curve analysis ที่อุณหภูมิ 65-95 องศาเซลเซียส

(โดยอ่านสัญญาณตามอุณหภูมิเพิ่มขึ้นทีละ 0.5 องศาเซลเซียส ทุกๆ 10 วินาที จนถึง 95 องศาเซลเซียส)

3.6.5 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (ยีน 16S rRNA) ด้วยวิธี real-time qPCR

โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 3.5.1 มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาเป็นดังนี้ 1x Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas) สารละลายไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมล ดีเอ็นเอแม่แบบ 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรน้ำด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อรวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วย MiniOpticon Real-Time PCR detector (Bio-Rad) ประมวลผลโดยโปรแกรม MJ Opticon Monitor Analysis Software version 3.1 (Bio-Rad) โดยมีโปรแกรมดังนี้

1.	Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	10 นาที
2.	Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	30 วินาที
3.	Annealing	ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	30 วินาที
4.	Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	30 วินาที

5. ทำขั้นที่ 2 – 4 ซ้ำเป็นจำนวน 40 รอบ
6. Melting curve analysis ที่อุณหภูมิ 65-95 องศาเซลเซียส

(โดยอ่านสัญญาณตามอุณหภูมิเพิ่มขึ้นทีละ 0.5 องศาเซลเซียส ทุกๆ 10 วินาที จนถึง 95 องศาเซลเซียส)

3.7 ทดสอบความเป็นพิษโดย phytotoxicity assay (ดัดแปลงจาก Silva และคณะ, 2010)

โดยประเมินจากอัตราส่วนการงอกของเมล็ดและการยืดยาวของราก นำเมล็ดพืชได้แก่ เมล็ดหัวไชเท้า เมล็ดแตงกวา และเมล็ดถั่วงอกที่แช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรต์ จำนวน 10 เมล็ด วางลงในจานเพาะเลี้ยงที่มีกระดาษกรองเบอร์ 1 ใส่น้ำที่ผ่านการบำบัดจากข้อ 3.4.6 ซึ่งเป็นน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในที่มืด เป็นเวลา 5 วัน และคำนวณค่าจำนวนเมล็ดที่งอก (seed germination) ความยาวของราก (root elongation) (≥5 มิลลิเมตร) และดัชนีการงอกของเมล็ด (germination index; GI) ตามสมการ โดยใช้น้ำประปาเป็นชุดควบคุม

$$\text{จำนวนเมล็ดที่งอก (\%)} = \left(\frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอกในชุดทดลอง}}{\text{จำนวนเมล็ดที่งอกในชุดควบคุม}} \right) \text{X } 100$$

$$\text{ความยาวของราก (\%)} = \left(\frac{\text{ความยาวของรากในชุดทดลอง}}{\text{ความยาวของรากในชุดควบคุม}} \right) \text{X } 100$$

$$\text{GI} = \frac{(\text{\%จำนวนเมล็ดที่งอก}) \times (\text{\%ความยาวของราก})}{100\%}$$

3.8 สกัดไขมันและวิเคราะห์ปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค TLC-FID

3.8.1 สกัดไขมันจากตัวอย่าง

นำตัวอย่างมาสกัดไขมันโดยเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดชั้นล่างที่เป็นส่วนของคลอโรฟอร์มลงในหลอดทดลองใหม่ จากนั้นสกัดซ้ำอีกครึ่งด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบปั่นเหวี่ยงจนเหลือปริมาตรคลอโรฟอร์มประมาณ 1 มิลลิลิตร และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไขมันด้วยวิธี TLC-FID โดยใช้เครื่อง IATROSCAN MK-6 TLC/FID Analyzer (IATRON LABORATORIES, INC. Tokyo, Japan) ตามวิธีของ Maruyama และคณะ (2003)

3.8.2 วิเคราะห์ปริมาณไขมันที่เหลือด้วยวิธี TLC-FID

นำแท่งซิลิกาเคลือบด้วยกรดบอริกความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำเข้าตู้อบความร้อน 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปทำ blank scan และนำตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตรหยดลงบนแท่งซิลิกาที่มีกรดบอริกเคลือบ นำแผงแทงซิลิกาแช่ในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยไอของคลอโรฟอร์ม จนตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 8 เซนติเมตร (ประมาณ 25 นาที) จากนั้นนำไปวางในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยไอของคลอโรฟอร์ม:เมทานอล/แอมโมเนีย (8:2) จนตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 10 เซนติเมตร (ประมาณ 30 นาที) โดยแต่ละครั้งของการเปลี่ยนตัวทำละลาย จะนำแผงซิลิการะเหยแห้งในเครื่องอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปหาปริมาณไขมันด้วยเครื่อง TLC-FID ใช้ความเร็วในการสแกนต่อแท่งเท่ากับ 30 วินาที อัตราการไหลของก๊าซไฮโดรเจน 160 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราการไหลของอากาศเป็น 2,000 มิลลิลิตรต่อนาที โดย retention time ของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอ

ไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์เท่ากับประมาณ 0.10, 0.15 และ 0.38 นาทีตามลำดับ คำนวณหาปริมาณไขมันโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน