บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์การทดลอง

1. ชุดเครื่องมือไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC) ประกอบด้วย

   - ชุดควบคุมระบบ (system controller) รุ่น SCL-10A*vp* บริษัท Shimadzu, Japan.
   - ลิควิดโครมาโตกราฟ (liquid chromatograph) รุ่น LC-10AD*vp* บริษัท Shimadzu, Japan.
   - เครื่องกำจัดแก็ส (degasser) รุ่น DGU-14A บริษัท Shimadzu, Japan.
   - เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (oven) รุ่น CTO-10AS*vp* บริษัท Shimadzu, Japan.
   - คอลัมน์ (column) : inertsill® ODS ขนาด 4.6 x 150 มม. บริษัท GL Scientific, Japan
   - เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-10A*vp* บริษัท Shimadzu, Japan.
   - เครื่องฉีดสารอัตโนมัติ (autoinjector) รุ่น SIL-10AD*vp* บริษัท Shimadzu, Japan
   - โปรแกรมซอฟท์แวร์ Class-*VP* Compact 7550
2. เครื่องชั่งสาร รุ่น PG2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
3. เครื่องวัดความค่ากรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 บริษัท Corning, USA.
4. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) บริษัท Kokusan, Japan.
5. ตู้ถ่ายเชื้อแบบ ISSCO larminar flow รุ่น V3-4 บริษัท International Scientific Supply, USA.
6. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunswick Scientific, USA.
7. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ –70 °ซ บริษัท Forma Scientific, USA.
8. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ –20 °ซ บริษัท Sanyo Electric, Japan
9. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys20 บริษัท Thermo spectonic, Japan.
10. ตู้เพาะบ่มเชื้อ (Incubator) ของบริษัท Memmert, Germany.
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น Sorvall® Biofuge Stratos บริษัท Heraeus., Japan.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

12. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น KM-15200 บริษัท Kubota, Japan.
13. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand.
14. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) รุ่น Sonorex RK100 บริษัท Bandelin electronic, Germany.
15. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N-100 บริษัท Eyela, Japan.
16. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น digital water bath SB-1000 บริษัท Eyela, Japan.
17. เครื่องทำความเย็น (cooling) รุ่น CCA-1110 บริษัท Eyela, Japan.
18. เครื่องดูดอากาศ (aspirator) รุ่น A3-S บริษัท Eyela, Japan.
19. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
20. ชุดกรองแบคทีเรีย
21. ชุดเครื่องมือ Mini Sub-Cell GT agarose gel electrophoresis system บริษัท Bio-Rad, USA.
22. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น MylabTH Thermo- Block SLTDB-120 บริษัท SeouLin Bioscience, Korea.
23. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer, USA.
24. เครื่องตรวจสอบเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000™ บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
25. เครื่องวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัส (contact angle measurement) รุ่น DSA-10Mk2 บริษัท KRÜSS GmbH, Germany
26. ไมโครปิเปต ขนาด 20, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France.
27. กระบอกฉีดยาพลาสติกปราศจากเชื้อขนาด 1 และ 5 มล. บริษัท Nissho Nipro, Japan.
28. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มม. บริษัท Chrom tech, Inc. USA.
29. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มม. บริษัท Chrom tech, Inc. USA.
30. แผ่นกรองสารชนิด FH ขนาด 0.5 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 40 มม.บริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

31. แผ่นกรองสารชนิด GS ขนาด 0.5 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 40 มม.บริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
32. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) บริษัท Nalgene, USA.
33. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus optical Co, Ltd., Japan

เคมีภัณฑ์

1. อะซีแนพธิลีน (acenaphthylene) บริษัท Kanto Chemical, Japan
2. อะซีแนพธีน (acenaphthene) บริษัท Sigma, USA
3. ฟีแนนทรีน (phenanthrene) บริษัท Sigma, USA.
4. ฟลูออรีน (fluorene) บริษัท Kanto Chemical, Japan
5. ฟลูออแรนธีน (fluoranthene) บริษัท Kanto Chemical, Japan
6. ไดเบนโซฟูแรน (dibenzofuran) บริษัท Kanto Chemical, Japan
7. ไพรีน (pyrene) บริษัท Kanto Chemical, Japan
8. แอนทราซีน (antracene) บริษัท Kanto Chemical, Japan
9. ไครซีน (chrysene) บริษัท Kanto Chemical, Japan
10. เพอริลีน (perylene) บริษัท Kanto Chemical, Japan
11. เบนโซ (*เอ*)ไพรีน (benzo[*a*]pyrene) บริษัท Kanto Chemical, Japan
12. กลีเซอรอล (glycerol) บริษัท Carlo ERBA, Italy.
13. ไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (CH_3SOCH_3) บริษัท Carlo ERBA, Italy.
14. *เอ็น*-เฮกซะเดกเคน (*n*-hexadecane) บริษัท E. Merck, Germany
15. แบคโตเอการ์ (bacto agar) บริษัท Difco Laboratories, USA.
16. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) บริษัท BDH Chemicals, Australia.
17. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดกคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) บริษัท Carlo ERBA, Italy.
18. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท AJEX Chemicals, Australia.
19. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท AJEX Chemicals, Australia
20. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Carlo ERBA, Italy.
21. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) บริษัท May & Baker, England.
22. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) บริษัท AJEX Chemicals, Australia.
23. ไซโคลเฮกซะไมด์ (cyclohexamide)บริษัท Sigma, USA.

24. ทริปโตน (tryptone) บริษัท Difco Laboratories, USA.
25. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, USA.
26. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท E. Merck, Germany.
27. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท E. Merck, Germany.
28. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia.
29. เมทธานอล (CH_3OH) สำหรับ HPLC บริษัท E. Merck, Germany.
30. เอทธิลอะซีเตท ($CH_3COOC_2H_5$) บริษัท E. Merck, Germany.
31. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) บริษัท E. Merck, Germany.
32. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) บริษัท BDH Chemicals, Australia.
33. ฟีนอล (phenol) บริษัท E. Merck, Germany
34. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue) บริษัท Fluka, Germany.
35. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8{\cdot}2H_2O$) บริษัท Sigma, USA.
36. SDS (sodium dodecyl sulfate; $C_{12}H_{25}OSO_3$) บริษัท Nacalai Tesque, Japan.
37. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide; $C_{16}H_{32}N(CH_3)_3)Br$) บริษัท TCI-EP, Japan
38. 1 kb DNA ladder บริษัท Promega, USA.
39. *Taq* DNA polymerase บริษัท Promega, USA.
40. Ribonuclease A (Rnase A) บริษัท Sigma, USA.
41. Proteinase K บริษัท Sigma, USA.
42. น้ำมันดีเซล บริษัท Esso, Thailand
43. ชุดย้อมสีแกรม (Gram's stain)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1. เตรียมตัวอย่างดินและใบไม้

3.1.1. เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณที่ไม่มีประวัติการปนเปื้อนสารเคมี (สุพินดา ศิริวราศิลป์, 2545) โดยขุดดินลึกจากผิวหน้าประมาณ 15 เซนติเมตร นำมาคัดกรองแยกขนาดอนุภาคดินที่มีขนาดใหญ่กว่า 1.18 มิลลิเมตรออกไป โดยใช้เครื่องคัดกรองขนาดดิน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. จนกว่าจะทำการทดลอง

3.1.2. เก็บตัวอย่างใบไม้ของพืชตระกูลถั่ว (ตารางที่ 3.1) ที่ปนเปื้อนเขม่าควันหรือไอเสียเครื่องยนต์ในบริเวณที่มีการจราจรหนาแน่น โดยเก็บใบไม้ที่ร่วงจากต้นมาผึ่งลมให้แห้ง คัดแยกเอาเฉพาะส่วนของเศษใบไม้ ปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. จนกว่าจะทำการทดลอง

ตารางที่ 3.1. ชนิดของใบไม้สถานที่เก็บตัวอย่างและการเรียกชื่อ

ชนิดของใบไม้	บริเวณที่เก็บ	การเรียกชื่อกลุ่มแบคทีเรีย
มะขาม	ทุ่งนา อ.เมือง จ.ชลบุรี	STK
จามจุรี	พระบรมรูปสองรัชกาล จุฬาฯ กทม.	SSK
นนทรี	ทางเดินเท้าหน้าคณะบัญชีฯ จุฬาฯ กทม.	SPK

3.2. แยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิกและย่อยสลายไพรีนจากปุ๋ยหมักใบพืชตระกูลถั่วโดยใช้แผ่น PTFE

3.2.1. ศึกษาประสิทธิภาพการดูดซับไพรีนบนแผ่น PTFE ที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิก

เคลือบไพรีนบนแผ่น PTFE โดยค่อยๆ หยดสารละลายไพรีนในอะซิโตนลงบนแผ่น PTFE ขนาด 1 ตร.ซม. ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นประมาณ 2 มิลลิกรัมต่อแผ่น วางทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายระเหยจนหมด จากนั้นนำแผ่น PTFE ที่เตรียมได้ไปใส่ในหลอดแก้วฝาเกลียวที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยมีแผ่น PTFE ที่ไม่เคลือบไพรีนเป็นชุดควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีชุดควบคุมเป็นน้ำกลั่นที่มีไพรีน 2 มก. สกัดปริมาณไพรีนที่อยู่ในส่วนน้ำตามวิธีของ Grifoll และคณะ (1992) โดยนำส่วนน้ำ 5 มิลลิลิตรปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 1.0 - 2.0 โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นเติมเอทธิลอะซีเตทปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยกเอาส่วนเอทธิลอะซีเตทเก็บไว้ สกัดซ้ำด้วยวิธีเดิมอีก 2 ครั้ง รวมส่วนเอทธิลอะซีเตทที่ได้เข้าด้วยกัน เติม

แอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟตเพื่อกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ นำเอทธิลอะซีเตทที่ได้ ไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุนจนกระทั่งเอทธิลอะซีเตทระเหยออกจนหมด เติมเมทธานอลปริมาตร 1 มล. ลงไปละลายสารในขวดลดปริมาตร กรองสารละลายที่ได้ผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร

ส่วนไพรีนที่เกาะอยู่กับแผ่น PTFE สกัดโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Juhasz และคณะ (1997) โดยนำแผ่น PTFE ในหลอดทดลองมาเติมไดคลอโรมีเทน 5 มล. นำหลอดทดลองไปวางในอ่างเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนไดคลอโรมีเทนเก็บไว้และสกัดไพรีนที่เหลือบนแผ่น PTFE ซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทนอีก 2 ครั้งตามวิธีการเดิม รวมส่วนที่เป็นไดคลอโรมีเทนทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุนจนกระทั่งไดคลอโรมีเทนระเหยออกจนหมด ละลายไพรีนที่สกัดได้ด้วยเมทธานอลปริมาตร 1 มล. กรองสารละลายที่ได้ผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร

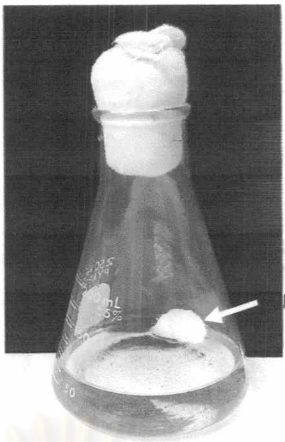
นำสารสกัดทั้งสองส่วนที่ได้นี้ ไปวิเคราะห์หาปริมาณไพรีนที่เหลือด้วยวิธี HPLC โดยสภาวะที่ใช้ในการฉีดตัวอย่างมีดังนี้

คอลัมน์ (column)	inertsill® ODS ขนาด 4.6 x 150 มม.
ตัวชะสาร (Mobile phase)	เมทธานอล 80%
อัตราไหล (Flow rate)	1 มล.ต่อนาที
อุณหภูมิคอลัมน์	40 °ซ
ความยาวคลื่นแสงอุลตร้าไวโอเลต	275 นาโนเมตร
ปริมาตรสารที่ฉีด	10 ไมโครลิตร

3.2.2. แยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิกและย่อยสลายไพรีนได้

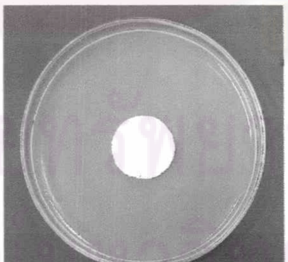
นำตัวอย่างดินที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C 45 นาที 3 ครั้ง เติมสารละลายไพรีนในอะซิโตนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในดินเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อดิน 1 กรัม ผสมให้เข้ากันในขวดฝาเกลียว ตั้งทิ้งไว้ให้อะซิโตนระเหยจนหมด จากนั้นจึงเติมเศษใบไม้ที่เตรียมไว้ลงไป ในอัตราส่วนระหว่างดินกับเศษใบไม้เท่ากับ 9:1 ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ โดยควบคุมความชื้นประมาณ 70 %ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ เป็นเวลา 1 เดือน

จากนั้นทำการคัดแยกแบคทีเรีย โดยชั่งตัวอย่างปุ๋ยหมักที่เตรียมไว้ข้างต้น 0.1 กรัมใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว carbon free mineral medium (CFMM) pH 7.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีแผ่น PTFE เคลือบด้วยไพรีนซึ่งมีความเข้มข้นของไพรีนประมาณ 1-2 มิลลิกรัมต่อแผ่น (Bastiaens และคณะ, 2000) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 เดือน (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 การแยกกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน โดยใช้แผ่น PTFE

จากนั้นนำแผ่น PTFE มาล้างและเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 3 ชม. เพื่อกำจัดอนุภาคดินและแบคทีเรียที่ไม่ยึดเกาะกับแผ่น PTFE จากนั้นวางแผ่น PTFE ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เติมไซโคลเฮกซาไมด์ (20 มก.ต่อลิตร) เพื่อป้องกันการเติบโตของเชื้อรา โรยผลึกของไพรีนลงบนฝาจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 30 $^{\circ}$ซ.นาน 1-2 สัปดาห์ ดังรูปที่ 3.2 สังเกตการเจริญของแบคทีเรีย เมื่อพบการเจริญของแบคทีเรีย จึงเขี่ยโคโลนีดังกล่าวไปทำการเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM จากนั้นจึงพ่นทับด้วยสารละลายไพรีนในไดเอทธิลอีเทอร์ความเข้มข้น 2 % เพื่อให้เกิดฝ้าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ซ. สังเกตวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นล้อมรอบโคโลนี



รูปที่ 3.2 แผ่น PTFE ที่มีกลุ่มแบคทีเรียวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM โดยวางผลึกไพรีนบนฝาจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

ทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีนเตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรีย โดยเขี่ยโคโลนีที่เกิดวงใสลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Lurie-Bertani (LB agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 2 วัน จึงเขี่ยโคโลนีที่เจริญลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM (Omori และคณะ,

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1992) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 มล. และมีไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียงอย่างเดียวของแบคทีเรีย เขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้แบคทีเรียปรับตัวกับสภาวะที่ใช้ในการทดลอง หลังจากนั้นถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 มล.ใส่ลงขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเหลว CFMM ปริมาตร 45 มล.ที่มีไพรีน ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 มก.ต่อลิตร นำไปเลี้ยงโดยเขย่าที่สภาวะเดิม สังเกตการเจริญของแบคทีเรีย โดยดูจากความขุ่นที่เพิ่มขึ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และ/หรือการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวชนิดเดิมที่เตรียมใหม่ ทำเช่นนี้อีก 5 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียมีความคุ้นเคยและเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน จากนั้นจึงทำการศึกษาเปรียบการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้ต่อไป

3.3. ศึกษารูปแบบการเจริญและการย่อยสลายไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้

เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย โดยเขี่ยโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ นำมาถ่ายลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มล. ที่เติมไพรีน ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ นาน 10 นาที นำส่วนเซลล์แบคทีเรียมาล้างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ทำการปั่นเหวี่ยงในสภาวะเดิม โดยทำตามขั้นตอนนี้ 2 ซ้ำ นำส่วนเซลล์มาแขวนลอยในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % นำเซลล์แขวนลอยมาวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.05 นำเซลล์แขวนลอยที่ปรับความเข้มข้นแล้วมาเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้แบคทีเรียใช้อาหารสะสมที่เหลืออยู่ในเซลล์ให้หมดไป หลังจากนั้นนำหัวเชื้อปริมาตร 10 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 90 มล. ซึ่งมีไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยแต่ละเวลามีชุดควบคุม 2 ชุด คือ ชุดควบคุมสำหรับศึกษาการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ได้เกิดการย่อยสลายไพรีน เตรียมโดยเติมหัวเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ที่ไม่มีไพรีนและชุดควบคุมสำหรับตรวจการลดลงของไพรีนที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายของแบคทีเรีย ซึ่งเตรียมโดยใช้อาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีนแต่ไม่เติมหัวเชื้อ วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count โดยนำอาหารมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมา

เกลี่ยบนอาหารแข็ง LB บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 2 วัน สกัดและวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ ตามวิธีการของ Grifoll และคณะ (1992) ดังที่ได้กล่าวไว้ในวิธีการทดลองข้อ 3.2.1.

3.4. **ศึกษาสมบัติไฮโดรโฟบิซิตี้ของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยการวิเคราะห์หาค่ามุมสัมผัส** (contact angle measurement)

เพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาศึกษาสมบัติของผิวเซลล์ โดยเขี่ยโคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB มาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 mM pH 7.0 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อล้างเซลล์และแยกเก็บส่วนเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซ้ำอีก 2 รอบ ละลายเซลล์ในสารละลายดังกล่าว 50 มล. ปรับค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้มีค่าประมาณ 1.0 กรองผ่านแผ่นเซลลูโลสอะซิเตท ที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร วางแผ่นเซลลูโลสอะซิเตทที่ได้บนแผ่นแก้ว อบให้แห้งในภาชนะดูดความชื้น (desicator) เป็นเวลา 0.5-3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัส (contact angle; θ_w) ระหว่างชั้นผิวเซลล์กับหยดน้ำ ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดังแสดงในภาคผนวก ง.1 โดยใช้เครื่องวัดค่า contact angle ที่ต่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนซ์ชนิดโกนิโอเมทริก (goniometric) (ภาคผนวก ง.2) ตามวิธีของ van Loosdrecht และคณะ (1989)

3.5. **การแยกและจำแนกชนิดแบคทีเรียบริสุทธิ์จากกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน**

หลังจากการถ่ายเชื้อหลายๆ ครั้งแล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียและใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ มาเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ที่ความเข้มข้นเหมาะสม เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นจึงนำแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ได้ มาจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานและวิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ 16s rDNA ต่อไป

3.5.1 **ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา** (morphological characteristics)

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกบริสุทธิ์ได้ มาศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง LB และตรวจสอบลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ร่วมกับการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (biochemical characteristics) ตามที่รายงานไว้ใน Burgey's Manual of Systematic Bacteriology (Hensyl, 1994)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.2 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ (16S rDNA)

3.5.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มล.แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชม. ถ่ายเชื้อลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที แขวนลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 567 µl. เติมสารละลาย SDS เข้มข้น 10%ปริมาตร 30 µl.ผสมโดยการกลับหลอดเบาๆ จนเห็นสารแขวนลอยเริ่มหนืดและใสขึ้น เติมสารละลายโปรตีเนส เค (Proteinase K) เข้มข้น 20 มก.ต่อมล. ปริมาตร 3 µl. (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมล. ของโปรตีเนส เคใน 0.5 % SDS) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง เขย่าหลอดเบาๆ ทุก 10 นาที เติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 M ปริมาตร 100 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลาย CTAB/NaCl ปริมาตร 80 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (อัตราส่วนปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย) ปริมาตร 700 µl. ผสมให้เข้ากันจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชั่น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสชั้นบนใส่หลอดไมโครฟิวจ์อันใหม่ เติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 800 µl ผสมให้เข้ากันจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชั่น นำไปปั่นเหวี่ยงให้แยกชั้นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสชั้นบนใส่หลอดไมโครฟิวจ์อันใหม่ เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 0.6 เท่าของน้ำส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาจนกระทั่งเห็นตะกอนสีขาวของดีเอ็นเอปรากฏ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาล้างด้วยสารละลายเอทธานอล 70 % ที่เย็นจัดปริมาตร 1 µl ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยแห้งที่อุณหภูมิห้อง แขวนลอยตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 µl เติมสารละลาย RNase เข้มข้น 10 มก.ต่อมล.ปริมาตร 2 µl เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

3.5.2.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reduction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ในข้อ 3.3.2.1 ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ออกแบบตามวิธีของ Blackall (1999) โดยความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาของสารแต่ละชนิดเป็นดังนี้

สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1.5 mM สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 mM 1x *Taq* DNA polymerase buffer *Taq* DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณปลายทั้ง 2 ด้านของสายดีเอ็นเอแม่แบบ forward primer 27f 5'-AGTTTGATCATGGCTC-3' และ reverses primer 1429r 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3' ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) ดีเอ็นเอแม่แบบ ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.2.1 ปริมาณ 1 พิโคกรัม - 1 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดมีปริมาตรสุทธิ 50 μl ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศและควรเก็บส่วนผสมทั้งหมดในน้ำแข็ง หลังจากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermol Cycler) (Perkin Elmer, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Hot start	อุณหภูมิ 95 $^{\circ}$ซ	เวลา 5 นาที	
Denaturation	อุณหภูมิ 94 $^{\circ}$ซ	เวลา 1 นาที	30 รอบ
Annealing	อุณหภูมิ 46 $^{\circ}$ซ	เวลา 1 นาที	
Extension	อุณหภูมิ 72 $^{\circ}$ซ	เวลา 2 นาที	
Final extension	อุณหภูมิ 72 $^{\circ}$ซ	เวลา 10 นาที	
End	อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายดีเอ็นเอที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ในข้อ 3.3.2.2 โดยใช้วิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ทำการละลายอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0 % ในบัฟเฟอร์ TAE เทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ วางให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 20 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ TAE ให้ท่วมเหนืออะกาโรสเจลประมาณ 2-3 มม. ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม หยอดลงในหลุม โดยช่องแรกจะเติมดีเอ็นเอมาตรฐานผสมกับสีติดตามปริมาตร 3 μl จากนั้นทำอีเลคโตรโฟเรซิส โดยใช้ชุดทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสรุ่น Mini sub-cell GT ใช้ความต่างศักย์ 75 โวลต์ จนกระทั่งสีน้ำเงิน

ของบรอมฟีนอลบลู เคลื่อนที่มาเกือบถึงขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 µl ต่อมล.ในบัฟเฟอร์ TAE เป็นเวลา 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

3.5.2.3. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ

นำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากข้อ 3.3.2.3 ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA โดยหน่วยบริการชีวภาพ (BIOSERVICE UNIT, BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์แบบ forward และ reverse ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	เอกสารอ้างอิง
Forward primer 27f	5'-CATTGTAGCACGTGTGTAGC-3'	Blackall (1999)
Forward primer 350f	5'-TACGGGAGGCAGCAG-3'	Weber และคณะ. (2001)
Reverse primer 1240r	5'-CCATTGTAGCACGTGT-3'	Laurie และคณะ. (2002)
Reverse primer1492r	5'-TTTCCTTAGAGTGCCCAACC-3'	Blackall (1999)

รวบรวมและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม Bioedit เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการรายงานไว้ใน Gen Bank. โดยใช้โปรแกรม BLASTn

หมายเหตุ การเก็บรักษาเชื้อทำได้โดยนำแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ ซึ่งมีความสามารถในการเจริญและย่อยสลายไพรีน มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีไพรีน 100 มก.ต่อลิตร เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญอยู่ในช่วงคงที่ (stationary) นำอาหารเหลวที่มีเชื้อเจริญบรรจุลงในหลอดแช่แข็ง (cryotube) และเติม 30% กลีเซอรอลซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที 3 ครั้ง โดยใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาตรเชื้อในอาหารเหลวต่อปริมาตรของกลีเซอรอลเป็น 50 : 50 และ 70 : 30 ปริมาตรต่อปริมาตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม เก็บเชื้อที่อุณหภูมิ -20 ^{o}ซ หรือ -70 ^{o}ซ ตามลำดับ

3.6. ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายสาร PAHs ชนิดอื่น ๆ

การทดสอบความจำเพาะในการใช้สารตั้งต้นสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย (substrate specificity) โดยนำหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมโดยใช้วิธีเดียวกับการทดลองข้อ 3.3. ปริมาตร 5 มล. ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 95 มล. เติมสาร PAHs ได้แก่ **ฟีแนนทรีน แอนทราซีน อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน ไดเบนโซฟูแรน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธีน ไครซีน เพอริลีน** และเบนโซ [*เอ*] ไพรีน ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างละ 1 ชนิด เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เตรียมชุดควบคุมเช่นเดียวกับข้อ 3.3 เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน จนครบ 21 วัน วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count และวิเคราะห์ปริมาณสาร PAHs ที่เหลือตามวิธีในข้อ 3.2.1.

3.7. การย่อยสลายเบนโซ[*เอ*]ไพรีน โดยการเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) หรือน้ำมันดีเซล (diesel fuel)

3.7.1. ทดสอบการละลายของเบนโซ[*เอ*]ไพรีนในสารลดแรงตึงผิวชนิดต่าง ๆ

เติมสารลดแรงตึงผิวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM โดยใช้สารลดแรงตึงผิว 3 กลุ่ม ดังตารางที่ 3.3. โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2, 4, 6, 8 และ 10 mM ที่มีความเข้มข้นของเบนโซ[*เอ*]ไพรีน 100 มก.ต่อลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน เก็บตัวอย่าง 5 มล. กรองผ่านแผ่นกรองชนิดเซลลูโลสอะซิเตทที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (Barkay และคณะ, 1999) ทำการเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ จากนั้นนำส่วนน้ำที่ได้จากการกรองมาทำการสกัดตัวอย่างและวิเคราะห์ปริมาณของเบนโซ[*เอ*]ไพรีนที่เหลือเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.2.1.

ตารางที่ 3.3. ชนิดและโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในการศึกษา

สารลดแรงตึงผิว	ชนิด	โครงสร้างทางเคมี
Brij35	non ionic	$C_{12}H_{25}O(CH_2CH_2O)_{23}H$
SDS (sodium dodecyl sulfate)	anionic	$C_{12}H_{25}OSO_3^-Na^+$
DDAB (dodecylethyl dimethyl ammonium bromide)	cationic	$C_{16}H_{36}NBr^-$

3.7.2. **ศึกษาการย่อยสลายเบนโซ[*เอ*]ไพรีนเมื่อมีการเติมสารลดแรงตึงผิวหรือน้ำมันดีเซล**

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีในข้อ 3.3 นำสารละลายเซลล์ที่ปรับความขุ่นแล้ว ปริมาตร 5 มล. ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 95 มล. ที่มีเบนโซ[*เอ*]ไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตรและ Brij35 ความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของค่าความเข้มข้นวิกฤตที่ทำให้เกิดไมเซลล์ (critical micelle concentration หรือ CMC) (Tiehm, 1994) หรือน้ำมันดีเซล 300 ไมโครลิตร (Kanaly และคณะ, 2000) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เตรียมชุดควบคุมเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน จนครบ 1 เดือน ติดตามการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count และวิเคราะห์ปริมาณเบนโซ[*เอ*]ไพรีนที่เหลืออยู่ โดยใช้วิธีการในข้อ 3.2.1.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย