สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น (Refrigerate centrifuge) รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan และรุ่น Avanti J-30I บริษัท Beckman Coulter, Germany
2. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Digital pH meter) รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Tcledo Co., Ltd., Switzerland
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 บริษัท Thermo Spectronic, USA
4. เครื่องชั่งรุ่น PG 2002-S, รุ่น PB 3002 และรุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
5. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 บริษัท Tomy Seiko, Co., Ltd., Japan, รุ่น MLS 3020 บริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25, บริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan
6. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow cabinet) ISSCO รุ่น BV-124, บริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น Clean, รุ่น V 3-4 บริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120S บริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand
7. เครื่องเขย่า (Orbital shaker) รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA
8. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น Innova 4330 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA
9. ตู้แช่แข็งชนิดจุดเยือกแข็งต่ำ -20 °ซ บริษัท Sanyo Electric, Japan
10. ตู้แช่แข็งชนิดจุดเยือกแข็งต่ำ -70 °ซ บริษัท Forma Scientific, USA
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น W 200 และรุ่น WB 22 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
12. เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบปั่นเหวี่ยง (Centrifugal vaporizer) รุ่น CVE-2000 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd. (Eyela), Japan

13. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
14. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries Inc., USA
15. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, Japan
16. ตู้อบความร้อน รุ่น UE 600 และรุ่น UL 80 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
17. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2 10 20 200 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, Inc, France
18. เครื่องปั่น (Blender) รุ่น SK-380 บริษัท SKG Electric, Thailand
19. เครื่องกวนสารละลาย (Stirrer) Clifton รุ่น CP-1E บริษัท Nickle-Electro Ltd , UK
20. เครื่อง Thin Layer Chromatography ที่มีเครื่องตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector รุ่น Iatroscan™ MK-616s บริษัท Mitsubushi Kagaku Iatron, Inc., Japan
21. อุปกรณ์ทำ DGGE DCode™ system บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
22. เครื่องอ่านเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000™ บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
23. DNA Thermal Cycler รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer Co., Ltd., USA
24. เครื่อง MINI-BEAD BEATER ™ บริษัท Biospec Products, Inc., USA

เคมีภัณฑ์

1. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Bio-Springer, France
2. ทริปโตน (Tryptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
4. แบคโตเพบโตน (Bactopeptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
5. สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract) บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Ireland
6. แบคโตอะการ์ บริษัท Difco Laboratories, USA
7. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) บริษัท J. T. Baker, USA
8. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) บริษัท Merck, Germany
9. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
10. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Merck, Germany
11. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) บริษัท Carlo Erba, France
12. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) บริษัท Merck, Germany
13. สเตียริลแอลกอฮอล์ ($C_{18}H_{38}O$) บริษัท Sigma-Aldrich, USA
14. คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) บริษัท RCI Labscan Co., Ltd., Ireland
15. นอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) บริษัท Merck, Germany
16. ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) บริษัท Merck, Germany
17. เมทานอล (CH_3OH) บริษัท Merck, Germany
18. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
19. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท Merck, Germany
20. ทวีน-80 (Tween-80) บริษัท Merck, Germany
21. กลีเซอรอล (Glycerol) บริษัท Merck, Germany
22. น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ (PTT V-120) บริษัท ปตท.จำกัด (มหาชน), ประเทศไทย
23. นิสเตติน (Nystatin) บริษัท Sigma Chemical, USA
24. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (CH_3SOCH_3) บริษัท Merck, Germany
25. Ribonuclease A (RNase A) บริษัท Fermentas, USA
26. โปรตีเนสเค (Proteinase K) บริษัท US. Biological, USA
27. *Taq* DNA polymerase บริษัท New England Biolabs, USA

28. QIAquick® Gel Extraction Kit บริษัท Qiagen, Germany
29. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_22H_2O$) บริษัท Sigma, USA
30. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) บริษัท Nacalai tesque, Japan
31. Lambda *Hin*dIII บริษัท New England Biolabs, USA
32. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) บริษัท Sigma, USA
33. สารเคมีที่ใช้ทำ DGGE บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA

    ฟอร์มาไมด์

    40% อะคริลาไมด์/บิส

    ยูเรีย

    แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

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

    สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 มก.ต่อมล.

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น

3.1.1 การเก็บตัวอย่างน้ำเสียสถานีบริการน้ำมัน

เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากสถานีบริการน้ำมันปตท.จำนวน 10 แห่ง ในบริเวณกรุงเทพมหานคร (แสดงในตารางที่ 3.1) โดยเก็บตัวอย่างแบบจ้วง (grab sample) ที่ระดับความลึกประมาณ 15 ซม. จากจุดที่น้ำเสียไหลลงบ่อดักไขมัน บันทึกอุณหภูมิของน้ำเสียที่จุดเก็บตัวอย่าง เก็บรักษาตัวอย่างน้ำเสียที่อุณหภูมิ 4 °ซ จนกว่าจะแยกเชื้อ

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้เพื่อคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้

สถานที่เก็บตัวอย่าง	กิจกรรมที่มาของน้ำตัวอย่าง	ชื่อย่อตัวอย่าง
1. สถานีบรรทัดทอง	การล้างพื้น	KP
2. สถานีรามคำแหง	การล้างรถ	RH
3. สถานีกล้วยน้ำไท	การตรวจเช็ครถ	KT
4. สถานีสวนลุมพินี	การล้างรถ	SL
5. สถานีสำนักงานตำรวจ	การล้างพื้น	PL
6. สถานีดาวคะนอง	การซ่อมรถ	DN
7. สถานีเอกชัย	การล้างพื้น	EK
8. สถานีดินแดง	การล้างรถ	DD
9. สถานีสุขุมวิท 62	การล้างรถ	SV-62
10. สถานีศรีเจริญภัณฑ์	การล้างรถ	JJ

3.1.2 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น

นำตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 10 มล. เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปราศจากแหล่งคาร์บอน (carbon free mineral salt medium, CFMM) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มล. ที่มีน้ำมันหล่อลื่น 0.5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) เติมนิสเตตินเข้มข้น 40 มก.ต่อลิตร (ภาคผนวก ข) บรรจุในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. เลี้ยงบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน หรือจนกว่าสังเกตพบว่ามีการเจริญของเชื้อ ซึ่งทราบได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่นมากขึ้น ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมที่เตรียมใหม่และเพาะเลี้ยงที่ลภาวะเดิมซ้ำ 5 ครั้ง เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น จากนั้นจึงคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นมากที่สุดต่อไป

3.1.3 การคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น

3.1.3.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำกลุ่มแบคทีเรียของแต่ละน้ำเสียตัวอย่างที่ได้จากการถ่ายเชื้อซ้ำจำนวน 5 รอบ ตามข้อ 3.1.2 ปริมาตร 5 มล. ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 50 มล. ที่มีน้ำมันหล่อลื่น 0.5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ซึ่งบรรจุในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน นำมาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (ภาคผนวก ข) แล้วแขวนลอยในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% เลี้ยงบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์อีกครั้ง และปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.5

3.1.3.2 การคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.1.3.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 50 มล. ที่มีน้ำมันหล่อลื่น 0.5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้เชื้อมีปริมาตร 2% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ซึ่งบรรจุในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. เลี้ยงบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน โดยมีชุดควบคุม คือ ไม่มีการเติมหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เพื่อดูการลดลงของน้ำมันที่เกิดจากปัจจัยทางกายภาพ ทุกชุดทำ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่าง

ในวันที่ 0 1 3 5 10 และ 14 เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่ลดลง ตามข้อ 3.3.3 จากนั้นเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม แล้วเลือกเพียง 1 กลุ่มที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้มากที่สุดเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน

เมื่อคัดเลือกกลุ่มแบคทีเรียแล้ว นำกลุ่มแบคทีเรียมาเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่ปกคลุมด้วยน้ำมันหล่อลื่น (Huy และคณะ, 1999) ซึ่งเตรียมโดยเกลี่ยน้ำมันหล่อลื่นปริมาตร 20 ไมโครลิตร บนผิวหน้าอาหารที่แห้งให้ทั่ว แล้วผึ่งให้แห้งก่อนเกลี่ยเชื้อ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสังเกตเห็นโคโลนี จากนั้น นำโคโลนีที่สังเกตเห็นความแตกต่างมาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Nutrient Agar, NA) เพื่อแยกให้ได้แบคทีเรียบริสุทธิ์ และสังเกตลักษณะโคโลนีได้ชัดเจนขึ้น ยืนยันอีกครั้งว่าแบคทีเรียสามารถใช้น้ำมันหล่อลื่นเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยนำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ได้มาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีน้ำมันหล่อลื่นปกคลุม

เก็บรักษากลุ่มแบคทีเรียในระยะสั้นโดยถ่ายเชื้อปริมาตร 10 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 100 มล. ที่มีน้ำมันหล่อลื่น 0.5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) เติมนิสเตตินเข้มข้น 40 มก.ต่อลิตร (ภาคผนวก ข) บรรจุในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. เลี้ยงบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมที่เตรียมใหม่

เก็บรักษาแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีน้ำมันหล่อลื่น 0.5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ นำมาผสมกับกลีเซอรอลซึ่งปราศจากเชื้อด้วยเครื่องผสมสาร โดยอัตราส่วนระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวต่อกลีเซอรอลเป็น 50 : 50 และ 70 : 30 (ปริมาตรต่อปริมาตร) บรรจุในหลอดไมโครฟิวจ์ เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ หรือ -70 °ซ ตามลำดับ สามารถเก็บได้เป็นระยะเวลา 1 ปี

3.2 การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของน้ำเสียตัวอย่าง

วิเคราะห์ลักษณะสมบัติน้ำเสียตัวอย่างต่างๆ ดังนี้

1. ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

   วิเคราะห์โดยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Digital pH meter)

2. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total N)

   วิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธี Macro-Kjeldahl

3. ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total P)

วิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธี Vanadomolybdo phosphoric acid colorimetric

4. ปริมาณอินทรีย์คาร์บอน (Organic carbon)

วิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธี Combustion-Infrared

5. ปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน (Total petroleum hydrocarbon)

วิเคราะห์โดยเครื่อง Thin Layer Chromatography ที่มีเครื่องตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector

รายการวิเคราะห์หมายเลข 2 และ 3 วิเคราะห์โดยภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ส่วนหมายเลข 4 วิเคราะห์โดยสถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์

3.3.1 การเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์

เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ (ดัดแปลงจาก Panpanit, 2001) โดยผสมน้ำมันหล่อลื่น (PTT V-120) ปริมาตร 1 มล. 0.1% ทวีน-80 ปริมาตร 100 มล. (ภาคผนวก ข) และน้ำกลั่น ปริมาตร 800 มล. ลงในเครื่องปั่น ปั่นเป็นเวลา 1 นาที ที่ความเร็วรอบสูงสุดของเครื่อง จากนั้น นำน้ำเสียสังเคราะห์ที่ได้มาตั้งบนเครื่องกวนสารละลาย กวนเป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดฟองและช่วยให้น้ำเสียสังเคราะห์ซึ่งมีสภาพเป็นอิมัลชันมีความเสถียรมากขึ้น (Kloet และ Schramm, 2002) ปรับปริมาตรของส่วนผสมให้มีปริมาตร 1 ลิตร น้ำเสียสังเคราะห์ที่ได้นี้มีความเข้มข้นน้ำมันเป็น 994 มก.ต่อลิตร โดยคิดจากค่าความถ่วงจำเพาะของน้ำมัน นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่ต้องการเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.2 การหาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์

3.3.2.1 ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์

เตรียมหัวเชื้อของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ตามข้อ 3.1.3.1 แต่ปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เป็น 1.5 หรือให้มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU ต่อมล. นำเซลล์แขวนลอยเติมลงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่เตรียมตามข้อ 3.3.1 ปริมาตร 50 มล. ที่มีความเข้มข้นน้ำมันหล่อลื่น 100 มก.ต่อลิตร ปรับปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทั้งหมดให้มีอัตราส่วนปริมาณน้ำมัน : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส เป็น 100 : 5 : 1 (Sei และคณะ, 2003) โดยเติมแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัส ให้เชื้อมีปริมาตร 2% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ซึ่งบรรจุในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. เลี้ยงบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน โดยมีชุดควบคุมคือไม่มีการเติมหัวเชื้อลงในน้ำเสียสังเคราะห์ เพื่อดูการลดลงของน้ำมันที่เกิดจากปัจจัยทางกายภาพ ทุกชุดทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุกวัน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่ลดลงตามข้อ 3.3.3 ทั้งปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนแต่ละส่วน (fraction) และตรวจสอบการเจริญด้วยวิธี viable plate count โดยเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่ปกคลุมด้วยน้ำมันหล่อลื่น เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

3.3.2.2 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของแบคทีเรียบริสุทธิ์

เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียบริสุทธิ์ตามข้อ 3.1.3.1 แต่ปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เป็น 1.5 หรือให้มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU ต่อมล. นำเซลล์แขวนลอยเติมลงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่เตรียมตามข้อ 3.3.1 และศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันของแบคทีเรียบริสุทธิ์ตามข้อ 3.3.2.1

3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอน

3.3.3.1 การสกัดน้ำมันหล่อลื่นออกจากน้ำเสียสังเคราะห์

เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ลงในขวดแก้วรูปกรวยที่มีน้ำเสียสังเคราะห์ปริมาตร 50 มล. ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.25 โมลาร์ (Rajesh และ Subramanian, 2005) เพื่อให้การสกัดน้ำมันหล่อลื่นจากน้ำเสียสังเคราะห์สมบูรณ์ขึ้น จากนั้นเติมสเตียริลแอลกอฮอล์

T96877954

6.25 มก. (ใน 1 มล.คลอโรฟอร์ม) แล้วเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 4 มล. (หรืออัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อน้ำที่ต้องการสกัด 1 : 5) เขย่าบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งให้แยกชั้น ชั้นล่างจะเป็นชั้นของคลอโรฟอร์ม ดูดชั้นสารละลายนี้เก็บไว้ สกัดซ้ำอีกครั้งด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตร 4 มล. และสเตียริลแอลกอฮอล์ 6.25 มก. ใน 1 มล.คลอโรฟอร์ม แล้วระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบปั่นเหวี่ยง จนปริมาตรของสารละลายเหลือ 1 มล. เก็บใส่หลอดฝาเกลียว ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จนกว่าจะวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอน

3.3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอน (Maruyama และคณะ ,2003)

นำสารละลายที่สกัดได้จากข้อ 3.3.3.1 ได้จุด (spot) ลงบนแท่งโครมารอด (chromarod) ที่วางในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายเฮกเซน (*n*-hexane) จนตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 10 ซม. (ประมาณ 25 นาที) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) 2 ครั้ง ครั้งแรกให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 6.5 ซม. และครั้งที่สอง 4 ซม. (ประมาณ 12 นาที และ 5 นาที ตามลำดับ) และไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล (dichloromethane/methanol) อัตราส่วน 95 : 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 1 ซม. (ประมาณ 1 นาที) โดยแต่ละครั้งของการเปลี่ยนตัวทำละลาย จะนำแท่งโครมารอดมาทำแห้งในเครื่องอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบปริมาณไฮโดรคาร์บอนโดยใช้ flame ionization detector (FID) ที่มีอัตราการไหลของก๊าซไฮโดรเจน และอัตราการไหลของอากาศเป็น 160 และ 2000 มล.ต่อนาที ตามลำดับ อัตราเร็วของการสแกนคือ 30 วินาที/โครมารอด เวลาที่คงอยู่ (Retention time) โดยประมาณของสเตียริลแอลกอฮอล์ แซททูเรท และอะโรมาติก คือ 0.35 0.13 และ 0.24 นาที ตามลำดับ เทียบหาปริมาณน้ำมันหล่อลื่น ปริมาณส่วนแซททูเรท และปริมาณส่วนอะโรมาติก กับกราฟมาตรฐานน้ำมันหล่อลื่น กราฟมาตรฐานส่วนแซททูเรท และกราฟมาตรฐานส่วนอะโรมาติก ตามลำดับ (ภาคผนวก ค)

คำนวณหาปริมาณน้ำมันหล่อลื่นที่เหลืออยู่เป็นเปอร์เซ็นต์ จากสมการ

ปริมาณน้ำมันหล่อลื่นที่เหลืออยู่ (%) = (ปริมาณน้ำมันหล่อลื่นที่เหลืออยู่ในชุดทดลองในแต่ละวัน / ปริมาณน้ำมันหล่อลื่นในชุดควบคุมในวันที่ 0) x 100

3.4 การจำแนกอนุกรมวิธานของแบคทีเรียบริสุทธิ์จากกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้น ย้อมสีแบคทีเรียโดยวิธี Gram's staining เพื่อศึกษารูปร่าง และลักษณะการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.4.2 การศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา หรือการทดสอบทางชีวเคมี (Physiological characteristics or Biochemical Test)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบสมบัติทางชีวเคมีตามวิธีของคู่มือการจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรีย (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) (Holt และคณะ, 1994)

3.4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ (16S ribosomal DNA) ของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียบริสุทธิ์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยบริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลี

ไพรเมอร์ที่ใช้ได้แก่ 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') และ 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3')

มีโปรแกรมในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

1. Denaturation step	อุณหภูมิ 94°ซ	เวลา 0.5 นาที
2. Annealing step	อุณหภูมิ 55°ซ	เวลา 0.5 นาที
3. Extension step	อุณหภูมิ 72°ซ	เวลา 1 นาที
4. ทำขั้นตอนที่ 1-3 จำนวน 30 รอบ		
5. Final extension	อุณหภูมิ 72°ซ	เวลา 10 นาที

จากนั้น นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับข้อมูลใน Genbank ด้วยโปรแกรม BlastN ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.5 การหาภาวะเหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์

3.5.1 การหาปริมาณน้ำมันหล่อลื่นที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1 แต่แปรผันปริมาณน้ำมันหล่อลื่นเป็น 50 100 200 และ 300 มก.ต่อลิตร ปรับปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทั้งหมดให้มีอัตราส่วนปริมาณน้ำมัน : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส เป็น 100 : 5 : 1 (Sei และคณะ, 2003) โดยเติมแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัส ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 7 วัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่ลดลงตามข้อ 3.3.3 และตรวจสอบการเจริญด้วยวิธี viable plate count โดยเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่ปกคลุมด้วยน้ำมันหล่อลื่นเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

3.5.2 การหาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1 แต่นำผลของปริมาณน้ำมันที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการย่อยสลายสูงสุดตามข้อ 3.5.1 มาใช้ในการทดสอบ โดยแปรผันปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเป็น 5 10 25 50 และ 100 มก.ต่อลิตร ปรับปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทั้งหมดให้มีอัตราส่วนไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส เป็น 5 : 1 โดยเติมแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัส ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 7 วัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่ลดลงตามข้อ 3.3.3 และตรวจสอบการเจริญด้วยวิธี viable

plate count โดยเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่ปกคลุมด้วยน้ำมันหล่อลื่น เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

3.5.3 การหาปริมาณฟอสฟอรัสที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1 แต่นำผลของปริมาณน้ำมัน และปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการย่อยสลายสูงสุดตามข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 มาใช้ในการทดสอบ โดยแปรผันปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดเป็น 0.1 0.5 1 5 และ 10 มก.ต่อลิตร โดยเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัส ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 7 วัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่ลดลงตามข้อ 3.3.3 และตรวจสอบการเจริญด้วยวิธี viable plate count โดยเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่ปกคลุมด้วยน้ำมันหล่อลื่น เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

3.5.4 การหาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1 แต่นำผลของปริมาณน้ำมัน ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณฟอสฟอรัสที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการย่อยสลายสูงสุดตามข้อ 3.5.1 3.5.2 และ 3.5.3 มาใช้ในการทดสอบ โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล หรือกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 นอร์มัล บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 7 วัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่ลดลงตามข้อ 3.3.3 และตรวจสอบการเจริญด้วยวิธี viable plate count โดยเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่ปกคลุมด้วยน้ำมันหล่อลื่น เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

3.5.5 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรีย

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1 แต่นำผลของปริมาณน้ำมัน ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการย่อยสลายสูงสุดตามข้อ 3.5.1 3.5.2 3.5.3 และ 3.5.4 มาใช้ในการทดสอบ โดยแปรผันอุณหภูมิ เป็น 25 30 35 และ 40 °ซ เป็นเวลา 7 วัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่ลดลงตามข้อ 3.3.3 และตรวจสอบการเจริญด้วยวิธี viable plate count โดยเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่ปกคลุมด้วยน้ำมันหล่อลื่น เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

3.5.6 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรียกับแบคทีเรีย SLY ในน้ำเสียสังเคราะห์

เตรียมหัวเชื้อของกลุ่มแบคทีเรีย และแบคทีเรีย SLY ตามข้อ 3.1.3.1 แล้วทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1 แต่นำผลของปริมาณน้ำมัน ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการย่อยสลายสูงสุดตามข้อ 3.5.1 3.5.2 3.5.3 3.5.4 และ 3.5.5 มาใช้ในการทดสอบ เป็นเวลา 7 วัน ทุกชุดทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 1 3 5 7 นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่ลดลงตามข้อ 3.3.3 และตรวจสอบการเจริญด้วยวิธี viable plate count โดยเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่ปกคลุมด้วยน้ำมันหล่อลื่น เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง นอกจากนี้ ติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรียในช่วงเวลาของการทดลองด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ตามข้อ 3.7

3.6 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มแบคทีเรียในน้ำเสียสถานีบริการน้ำมัน

ตัวอย่างน้ำเสียสถานีบริการน้ำมันที่ใช้ในการทดลองเก็บจากสถานีบริการน้ำมันปตท. สถานีสนามเป้า นำมาวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสทั้งหมด แล้วปรับปริมาณน้ำมันเริ่มต้นเป็น 50 มก.ต่อลิตร

แบ่งชุดการทดลองเป็นดังนี้

1) ชุดควบคุม

นำน้ำเสียสถานีบริการน้ำมันที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ปริมาตร 50 มล. บรรจุในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. เพื่อดูการลดลงของน้ำมันจากปัจจัยทางกายภาพ

2) Natural attenuation

นำน้ำเสียสถานีบริการน้ำมันปริมาตร 50 มล. บรรจุในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. เพื่อดูการย่อยสลายน้ำมันที่เกิดจากจุลินทรีย์ประจำถิ่นในน้ำเสียนั้น

3) Bioaugmentation 1

เตรียมหัวเชื้อของกลุ่มแบคทีเรียตามข้อ 3.1.3.1 แต่ปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เป็น 1.5 หรือให้มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU ต่อมล. นำเซลล์แขวนลอยเติมลงในน้ำเสียสถานีบริการน้ำมันปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. ให้เชื้อมีปริมาตร 2% (ปริมาตรต่อปริมาตร)

4) Bioaugmentation 2

เติมกลุ่มแบคทีเรียลงไปโดยเตรียมหัวเชื้อของกลุ่มแบคทีเรียตามข้อ 3.1.3.1 ปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เป็น 1.5 หรือให้มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU ต่อมล. นำเซลล์แขวนลอยเติมลงในน้ำเสียสถานีบริการน้ำมันปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. ให้เชื้อมีปริมาตร 2% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปรับอัตราส่วนปริมาณน้ำมัน : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส เป็นอัตราส่วนที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.5.1 3.5.2 และ 3.5.3 โดยเติมแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัส และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ ตามค่าที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.5.4 และ 3.5.5

5) ชุดทดลองว่าสารในน้ำเสียมีผลกับกลุ่มแบคทีเรียหรือไม่

เตรียมหัวเชื้อของกลุ่มแบคทีเรียตามข้อ 3.1.3.1 ปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เป็น 1.5 หรือให้มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU ต่อมล. นำเซลล์แขวนลอยเติมลงในน้ำเสียสถานีบริการน้ำมันที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. ให้เชื้อมีปริมาตร 2% (ปริมาตรต่อปริมาตร) เพื่อดูว่าสารในน้ำเสียมีผลต่อการย่อยสลายและการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียหรือไม่

เลี้ยงบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ชุดการทดลองที่ 4 เลี้ยงที่อุณหภูมิเหมาะสม ส่วนชุดที่เหลือเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ทุกชุดทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างวันที่ 0 1 3 5 7 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่ลดลงตามข้อ 3.3.3 และตรวจสอบการเจริญด้วยวิธี viable plate count โดยเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่ปกคลุมด้วยน้ำมันหล่อลื่น เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง นอกจากนี้ ติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรียในช่วงเวลาของการทดลองชุดที่ 2 3 4 และ 5 ด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ตามข้อ 3.7

3.7 การติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรียด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

3.7.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรียตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มล. แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาตร 1.5 มล. ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 510 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้เครื่องผสมสาร จากนั้นเติมสารละลายไลโซไซม์เข้มข้น 60 มก.ต่อมล. (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 10% SDS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และโปรตีเนสเค (Proteinase K) (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 10 มก.ต่อมล. ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 120 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้ติดส่วนตะกอน) เติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิล

แอลกอฮอล์ ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมโดยการเขย่า นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอลที่เย็นปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาจนกระทั่งเห็นตะกอนขาวของดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 70% เอธานอล (ภาคผนวก ข) ที่เย็นจัดปริมาตรประมาณ 500 ไมโครลิตร ปั่นล้างตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่มี RNase A (ภาคผนวก ข) เข้มข้น 10 มก.ต่อมล. ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 °ซ จนกระทั่งนำมาใช้

3.7.2 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำเสีย

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำเสียโดยวิธี bead beating separation และฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lemarchand และคณะ (2005) โดยปั่นเหวี่ยงน้ำเสียปริมาตร 250 มล. ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ถ่ายตะกอนที่ได้ใส่หลอดไมโครฟิวจ์แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมไลซิสบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นถ่ายใส่หลอดพลาสติกฝาเกลียวก้นแหลม ขนาดบรรจุ 2 มล. ที่บรรจุเม็ดบีดส์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1 มม. ประมาณ 1 ใน 4 ของหลอด เติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปตีด้วยเครื่อง bead beater ที่ความเร็ว 4,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายส่วนบนใส่หลอดไมโครฟิวจ์ เติม 3 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตต (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใส เติม 99% เอธานอลปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด นำไปแช่แข็งที่ตู้แช่แข็งชนิดจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –80 °ซ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอธานอลที่เย็นจัดปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นล้างตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ระเหยเอธานอลให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

ที่มี RNase A เข้มข้น 10 มก.ต่อมล. ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20°ซ จนกระทั่งนำมาใช้

3.7.3 การแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9% ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 1 เท่า เทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัว วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ให้ท่วมอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายดีเอ็นเอ และดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda *Hin*dIII กับสีติดตามหยอดดีเอ็นเอ และดีเอ็นเอมาตรฐานลงในช่องวิ่ง ทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นานประมาณ 15 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) นาน 5 นาที ล้างสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินในน้ำกลั่นปลอดประจุเป็นเวลา 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดย นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมล.) = A_{260} X 50 X dilution factor

3.7.4 การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ

ตัดส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย QIAquick® Gel Extraction Kit โดยนำชิ้นเจลที่ตัดได้ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ และชั่งน้ำหนักชิ้นเจลโดยหักออกจากน้ำหนักหลอดไมโครฟิวจ์เปล่า เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักชิ้นเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50°ซ 10 นาที สังเกตว่าชิ้นเจลละลายหมด เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักชิ้นเจล ถ่ายสารละลายลง spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสออก เติม บัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสออก แล้วปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง ถ่าย spin column ใส่

หลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมบัฟเฟอร์ elution ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เพื่อชะดีเอ็นเอ ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้น ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20°ซ จนกระทั่งนำมาใช้

3.7.5 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ไพรเมอร์ 314F ซึ่งมี GC clamp (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-3') เชื่อมต่อบริเวณ 5' และ 534R (แสดงในตารางที่ 3.2) ซึ่งผลิตภัณฑ์จะมีความยาวประมาณ 200 bp

โดยความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยา เป็นดังนี้

- 10X บัฟเฟอร์ปราศจากแมกนีเซียม	ความเข้มข้น 1X	บัฟเฟอร์
- สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)	ความเข้มข้น 4	มิลลิโมลาร์
- สารละลาย dNTP	ความเข้มข้น 0.2	มิลลิโมลาร์
- เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase	ความเข้มข้น 2.5	หน่วย (U)
- สารละลาย 314F primer	ความเข้มข้น 20	พิโคโมล
- สารละลาย 534R primer	ความเข้มข้น 20	พิโคโมล
- ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.7.4	ประมาณ 70	นาโนกรัม
- น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปรับให้มีปริมาตรสุดท้าย	30	ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

1. Initial denaturation step	อุณหภูมิ 94°ซ	เวลา 5 นาที
2. Touchdown program จำนวน 20 รอบ		
2.1 Denaturation step	อุณหภูมิ 94°ซ	เวลา 1 นาที
2.2 Annealing step	อุณหภูมิ 65°ซ	เวลา 1 นาที
(อุณหภูมิลดลงทีละ 0.5°ซ ในแต่ละรอบ)		
2.3 Extension step	อุณหภูมิ 72°ซ	เวลา 2 นาที
3. Denaturation step	อุณหภูมิ 94°ซ	เวลา 1 นาที
4. Annealing step	อุณหภูมิ 55°ซ	เวลา 1 นาที
5. Extension step	อุณหภูมิ 72°ซ	เวลา 2 นาที

6. ทำขั้นตอนที่ 3-5 จำนวน 30 รอบ

7. Final extension อุณหภูมิ 72 °ซ เวลา 10 นาที

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยเตรียมอะกาโรสเข้มข้น 2% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ TAE 1 เท่า จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์

ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA เพื่อนำไปติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรียด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	เอกสารอ้างอิง
341F	CCT ACG GGA GGC AGC AG	Watanabe และคณะ (2001)
534R	ATT ACC GCG GCT GCT GG	Watanabe และคณะ (2001)

3.7.6 การวิเคราะห์ดีเอนเอโดย Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

เตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจล ที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 20–70% (ภาคผนวก ข) ซึ่งทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant โดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต เมื่อทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant ลงในชุดเตรียมเจลแล้ว เสียบหวีลงไประหว่างกระจก โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้เจลแข็งตัว นำชุดเจลใส่ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE ปริมาตร 6.8 ลิตร ที่ผ่านการให้ ความร้อนจนอุณหภูมิประมาณ 60 °ซ ผสมผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากข้อ 3.7.5 กับสีติดตามหยอดลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 130 โวลต์ ที่ 60 °ซ นาน 5 ชม. และย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. นาน 20 นาที นำไปดูด้วยเครื่องอ่านเจลโดยใช้โปรแกรม Quantity One version 4.4.1