บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่า (gyrotory shaker) รุ่น G10 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.
2. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubators shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.
3. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO laminar flow รุ่น BVT-124 ของบริษัท International Scientific Supply, USA.
4. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kokusan, Japan.
5. ตู้บ่มเชื้อ (Contherm digital series cooled incubator) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand.
6. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
7. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA.
8. เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
9. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA.
10. ตู้อบแห้ง (Contherm digital series oven) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand.
11. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CHK ของบริษัท Olympus, Japan.
12. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
13. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20, 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France.
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.
15. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น D-7200 ของบริษัท GS, Germany.
16. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
17. กรวยแยก (seporatory funnel) ขนาด 500 มล. ของบริษัท Sibata, Japan.

18. แผ่นอลูมิเนียมทีแอลซี (TLC aluminium sheet) เคลือบด้วย silica gel 60 F_{254} ขนาด 20×20 ซม. ของบริษัท E. Merck, Germany.
19. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13 JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
20. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตต ขนาด 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-25CS ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
21. แผ่นกรองชนิด FH ขนาด 0.5 ไมโครเมตร ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
22. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 และ 10 มล. ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
23. ทีแอลซีแชมเบอร์ (TLC chamber) ของบริษัท Desaga Heidelberg, Germany.
24. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
25. หลอดแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet lamp) รุ่น UVGL-15 ของบริษัท UVP, USA.
26. ชุดเครื่องมือไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC)
    - ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - คอลัมน์ (column): Senshu Pak Pegasil ODS ขนาด 4.6×150 มม. ของบริษัท Senshu Scientific, Japan.
    - เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-2A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - เครื่องบันทึก (recorder) Chromatopac รุ่น C-R1A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, USA.
27. ชุดเครื่องมือแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)
    - เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี รุ่น JMS-Automass 150 ของบริษัท JOEL, Japan.
    - คอลัมน์ (column): DB-5 ขนาด 2.5 มม.×5 ม.; ชั้นฟิมล์หนา 0.25 ไมโครเมตร ของบริษัท J & W Scientific, Germany.
    - กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-10 ของบริษัท Exmire, USA.

I19511590

เคมีภัณฑ์

1. แนพธาลีน (naphthalene) ของบริษัท Sigma, USA.
2. ฟีแนนทรีน (phenanthrene) ของบริษัท Sigma, USA.
3. แอนทราซีน (anthracene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
4. ฟลูออรีน (fluorene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
5. ไดเบนโซฟูแรน (dibenzofuran) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
6. อะซีแนพธิลีน (acenaphthylene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
7. อะซีแนพธีน (acenaphthene) ของบริษัท Sigma, USA.
8. ฟลูออแรนธีน (fluoranthene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
9. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
10. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
11. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \bullet 12H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
12. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
13. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต ($MgSO_4 \bullet 7H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
14. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \bullet 6H_2O$) ของบริษัท May & Baker, England.
15. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \bullet 2H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
16. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
17. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
18. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E. Merck, Germany.
19. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merck, Germany.
20. เมทธานอล (CH_3OH) ของบริษัท E. Merck, Germany.
21. เอทธิลอะซีเตต ($CH_3COOC_2H_5$) ของบริษัท E. Merck, Germany.
22. นอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) ของบริษัท J. T. Baker, USA.
23. ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) ของบริษัท Mallinckrodt, France.
24. โทลูอีน ($C_6H_5CH_3$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
25. 1,4-ไดออกเซน ($OCH_2CH_2O\ CH_2CH_2$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
26. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท E. Merck, Germany.
27. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
28. ไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (CH_3SOCH_3) ของบริษัท Carlo ERBA, France.

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

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

31. แบคโตอการ์ (bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

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

33. ทวีน 80 (tween 80) ของบริษัท E. Merck, Germany.

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินสำหรับการแยกเชื้อแบคทีเรียจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมัน น้ำมันเครื่อง หรือสารเคมีอันตราย เช่น ยากำจัดศัตรูพืช ที่มีการสะสมอยู่เป็นเวลานานในประเทศไทย โดยเก็บลึกจากผิวหน้าดินประมาณ 2-5 ซม. เก็บดินตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ. จนกว่าจะนำมาแยกเชื้อ โดยแสดงสถานที่เก็บตัวอย่างดินแต่ละตัวอย่าง จำนวน 13 ตัวอย่าง ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สถานที่เก็บตัวอย่างดินเพื่อนำมาแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายอะซีแนพธิลีนได้

ตัวอย่างดิน	สถานที่เก็บ
1	ดินปนเปื้อนน้ำมันเครื่องข้างโรงซ่อมยานยนต์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ (KO1)
2	ดินปนเปื้อนน้ำมันเครื่องข้างโรงซ่อมยานยนต์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ (KO2)
3	ดินปนเปื้อนน้ำมันเครื่องข้างโรงซ่อมยานยนต์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ (KO3)
4	ดินปนเปื้อนยาปราบศัตรูพืช จากสวนผลไม้ จ. ราชบุรี
5	ดินปนเปื้อนยาปราบศัตรูพืช จากสวนผลไม้ จ. สมุทรสงคราม
6	ดินปนเปื้อนน้ำมันข้างโรงซ่อมสถานีรถไฟบางกอกน้อย กรุงเทพฯ
7	ดินจากรอบต้นกล้วยมีหญ้าขึ้นที่สถานีรถไฟบางกอกน้อย กรุงเทพฯ
8	ดินจากกองดินที่ขุดลอกจากท่อที่สถานีรถไฟบางกอกน้อย กรุงเทพฯ
9	ดินบริเวณลานกล้วยข้างโรงซ่อมที่สถานีรถไฟบางกอกน้อย กรุงเทพฯ
10	ดินจากกองดินใหม่ใต้ต้นมะยมที่สถานีรถไฟบางกอกน้อย กรุงเทพฯ
11	ดินจากโคลนเปียกที่สถานีรถไฟบางกอกน้อย กรุงเทพฯ
12	ดินปากบ่อแยกน้ำที่ล้างหัวรถจักรที่สถานีรถไฟบางกอกน้อย กรุงเทพฯ
13	สลัดจ์ (sludge) จากบ่อเติมอากาศ ในระบบบำบัดน้ำเสีย โรงกลั่นน้ำมันบางจาก กรุงเทพฯ

3.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

3.2.1 การเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากตัวอย่างดิน

เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียโดยการนำตัวอย่างดินที่ต้องการแยกเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 22 มล. ที่บรรจุอาหารเหลว CFMM (carbon free mineral medium) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) (Omori และคณะ, 1992) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 24 ชม. เมื่อครบเวลาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้อนุภาคดินขนาดใหญ่ตกตะกอน จากนั้นนำส่วนน้ำใส ซึ่งใช้เป็นหัวเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 10 มล. ที่มีอะซีแนพธิลีน 0.06 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °ซ. สังเกตการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยดูจากความขุ่นที่เพิ่มขึ้นของอาหารเหลว การเปลี่ยนสีของอาหารเหลว หรือการลดลงของผลึกอะซีแนพธิลีน เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม หลอดทดลองใดที่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในลักษณะดังกล่าว ให้ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวใหม่ โดยทำขั้นตอนนี้ซ้ำ 5 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียมีความคุ้นเคยกับอะซีแนพธิลีน และเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนให้มากขึ้น

3.2.2 การคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

นำอาหารเหลว CFMM ที่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียหลังจากถ่ายเชื้อมา 5 ครั้งแล้ว มาทำการเจือจางในสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสม มาเกลี่ยบนอาหารแข็ง CFMM (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ที่มีอะซีแนพธิลีนวางบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. จนกระทั่งพบการเจริญของแบคทีเรีย นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มายืนยันความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนอีกครั้ง โดยถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธิลีนในรูปสารละลายอะซีแนพธิลีนในไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. จนเชื้อเจริญ

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ โดยนำมาเจือจางในสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) สังเกตดูลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร จนกระทั่งได้เชื้อที่บริสุทธิ์

3.2.3 การเก็บเชื้อ เมื่อได้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์แล้ว นำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธิลีน เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญอยู่ในช่วงลอการิทึม นำเชื้อมาเก็บโดยนำอาหารเหลวที่มีเชื้อเจริญบรรจุลงในหลอดแช่แข็ง (cryotube) และเติมกลีเซอรอลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ลงในหลอดแช่แข็งในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม เก็บเชื้อที่อุณหภูมิ –20 °ซ. หรือ -70 °ซ.

3.3 การจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.3.1 ทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง และลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ร่วมกับสมบัติทางสรีรวิทยา (physiological characteristics) ตามที่รายงานไว้ใน Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology (Palleroni, 1994)

3.3.2 จำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ (16S ribosomal DNA) ตามวิธีของ Altschun และคณะ (1997)

3.4 ศึกษาการเพิ่มจำนวนและความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน และสาร PAHs ชนิดอื่น ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.4.1 เปรียบเทียบรูปแบบในการเจริญโดยการใช้อะซีแนพธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ที่ความเข้มข้นของอะซีแนพธิลีน 300, 600 และ 900 มก.ต่อลิตร

เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรีย โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากจานอาหารแข็ง CFMM ที่วางอะซีแนพธิลีนบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมาถ่ายลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มล. ที่มีซักซิเนต (succinate) เข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 24 ชม. เมื่อครบเวลาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนเซลล์แบคทีเรียมาล้างในสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ ทำการปั่นเหวี่ยงที่สภาวะเดิม โดยทำตามขั้นตอนนี้ซ้ำ 3 ครั้ง นำส่วนเซลล์มาละลายในสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ นำสารละลายเซลล์มาวัดความขุ่น (turbidity) ที่ความยาวคลื่น 600

นาโนเมตร และเจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 นำสารละลายที่ปรับความเข้มข้นแล้วมาเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ. เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้แบคทีเรียใช้อาหารสะสมที่เหลืออยู่ในเซลล์ให้หมดไป

เติมหัวเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีอะซีแนพธิลีนเข้มข้น 300, 600 และ 900 มก.ต่อลิตร ในหลอดแก้วขนาด 22 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ. เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน โดยที่แต่ละเวลาจะมีชุดควบคุม 2 ชุด คือ ชุดควบคุมการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ได้เกิดการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน ซึ่งเตรียมโดยการเติมหัวเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ที่ไม่มีอะซีแนพธิลีน และชุดควบคุมการลดลงของอะซีแนพธิลีนที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายของแบคทีเรีย ซึ่งเตรียมโดยการใช้อาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธิลีนแต่ไม่เติมหัวเชื้อ ทุกชุดการทดลองจะทำ 2 ซ้ำ วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count โดยนำอาหารเหลวมาเจือจางด้วยสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ. เป็นเวลา 3 วัน และวัดปริมาณอะซีแนพธิลีนที่เหลืออยู่โดยการสกัดด้วยเอทธิลอะซีเตตตามวิธีการของ Grifoll และคณะ (1992) ดังนี้

นำอาหารเหลวมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 2.0-3.0 โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นเติมเอทธิลอะซีเตตปริมาตร 5 มล. ลงไปในอาหารเหลว ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสมด้วยความเร็วสูงเป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยกส่วนเอทธิลอะซีเตตเก็บไว้ จากนั้นเติมเอทธิลอะซีเตตลงในอาหารเหลวหลอดเดิม และทำการสกัดตามวิธีการเดิมอีก 2 ครั้ง รวบรวมส่วนเอทธิลอะซีเตตที่แยกได้ทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อกำจัดน้ำส่วนที่เหลืออยู่ จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน เติมเมทธานอลปริมาตร 1.0 มล. ลงไปละลายอะซีแนพธิลีนในขวดลดปริมาตร นำมากรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่ในขวดแก้วขนาดเล็ก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}ซ. จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพธิลีนโดยวิธี HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพธิลีนโดยวิธี HPLC

เตรียมชุดควบคุม โดยเติมอะซีแนพธิลีนลงในอาหารเหลว CFMM ให้มีความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1000 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ ทำการสกัดด้วยเอทธิลอะซีเตตโดยใช้วิธีการเดียวกันกับการสกัดอะซีแนพธิลีนในชุดทดลอง นำชุดควบคุมและชุดทดลองที่ต้องการหาปริมาณอะซีแนพธิลีน มาวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพธิลีนโดยวิธี HPLC ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟีที่ใช้คอลัมน์ Senshu Pak Pegasil ODS ขนาด 4.6×150 มม. ตั้งอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 40 °ซ. ตรวจสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายตัวพาเป็น สารละลาย 80 % เมทธานอลในน้ำ (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) และใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1 มล.ต่อนาที

ฉีดสารละลายที่ต้องการหาปริมาณอะซีแนพธิลีน ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาดเล็กรุ่น MS-100 นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่างไปเทียบหาปริมาณของอะซีแนพธิลีนที่เหลือจากการย่อยสลายของแบคทีเรียในชุดทดลอง โดยใช้กราฟมาตรฐานของอะซีแนพธิลีนที่สร้างจากชุดควบคุม (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)

3.4.2 ผลของทวีน 80 ต่อรูปแบบการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยการใช้อะซีแนพธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

เติมหัวเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามการทดลองข้อ 3.4.1 ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 หลอด ที่แต่ละเวลา ดังแสดงในตารางที่ 3.2 จากนั้นนำเชื้อไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 7 วัน ทุกการทดลองทำ 2 ซ้ำ วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count และวัดปริมาณอะซีแนพธิลีนที่เหลืออยู่โดยวิธี HPLC โดยใช้วิธีการสกัดและสภาวะในการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการหาปริมาณอะซีแนพธิลีน ในข้อ 3.4.1

ตารางที่ 3.2 การตรวจสอบผลของทวีน 80 ต่อรูปแบบการเจริญของเชื้อ โดยการใช้อะซีแนพธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

	ชุดควบคุมการเจริญ		ชุดควบคุมปริมาณอะซีแนพธิลีน		ชุดทดลอง	
	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3	หลอดที่ 4	หลอดที่ 5	หลอดที่ 6
แบคทีเรีย	+	+	-	-	+	+
อะซีแนพธิลีน	-	-	+	+	+	+
ทวีน 80	-	+	-	+	-	+

หมายเหตุ + เติมลงในหลอดทดลอง

- ไม่เติมลงในหลอดทดลอง

3.4.3 ทดสอบความจำเพาะในการใช้สาร PAHs ชนิดอื่น ในการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (substrate specificity)

ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการใช้สาร PAHs ชนิดอื่นเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญนอกเหนือจากอะซีแนพธิลีน ซึ่งได้แก่ แนพธาลีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน ฟีแนนทรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนธีน ไพรีน รวมทั้งสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกอะโรมาติก (heterocyclic aromatic compound) คือ ไดเบนโซฟูแรน (dibenzofuran) โดยเติมหัวเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่เติมสารทดสอบแต่ละชนิดลงไป 100 มก.ต่อลิตร (ยกเว้นแนพธาลีนใช้ 200 มก.ต่อลิตร เนื่องจากมีค่าความดันไอสูงทำให้ระเหิดได้ง่าย และเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่เป็นฝาเกลียวและปิดผนึกด้วยพาราฟิล์มเพื่อป้องกันการระเหิดของแนพธาลีน) ตามวิธีของ Grifoll และคณะ (1995) โดยใช้วิธีการเตรียมหัวเชื้อและวิธีในการเลี้ยงเช่นเดียวกับที่ใช้ในการทดสอบการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในข้อ 3.4.1 เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน จนครบ 7 วัน วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count และวัดปริมาณอะซีแนพธิลีนที่เหลืออยู่โดยวิธี HPLC โดยใช้วิธีการสกัดและสภาวะในการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการหาปริมาณอะซีแนพธิลีน ในข้อ 3.4.1

3.4.4 การย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสม

นำสารทดสอบที่แบคทีเรียไม่สามารถใช้ในการเจริญได้โดยตรงในข้อ 3.4.3 มาทดสอบการย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสมร่วมกับอะซีแนพธิลีน โดยใช้วิธีการเตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับที่ใช้ในการทดลองข้อ 3.4.1 นำหัวเชื้อที่ได้เติมลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีสารทดสอบชนิดที่แบคทีเรียไม่สามารถใช้ได้โดยตรงเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร และอะซีแนพธิลีนเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน จนครบ 7 วัน วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count และวัดปริมาณอะซีแนพธิลีนที่เหลืออยู่โดยวิธี HPLC โดยใช้วิธีการสกัดและสภาวะในการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการหาปริมาณอะซีแนพธิลีน ในข้อ 3.4.1

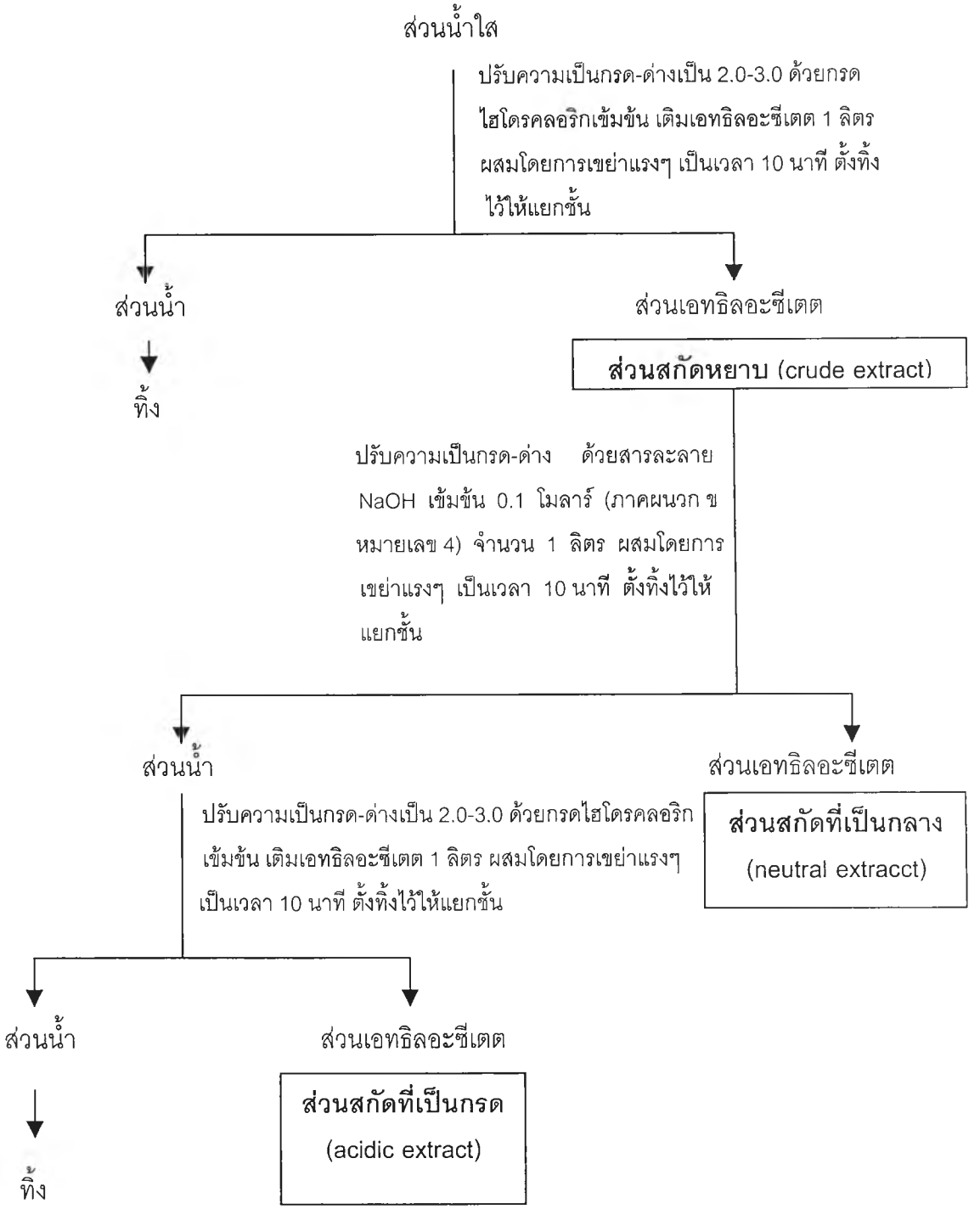
3.5 การวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.5.1 การแยกสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 100 มล. ที่มีอะซีแนพธิลีนเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 4 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาแยกเซลล์และอะซีแนพธิลีนที่เหลือออกมาจากอาหารเหลวด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้มาทำการสกัดอะซีแนพธิลีนด้วยเอทธิลอะซีเตต ดังแสดงในรูปที่ 3.1

นำส่วนสกัดที่เป็นกลางและส่วนสกัดที่เป็นกรดมาลดปริมาตร โดยใช้เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุนให้เหลือปริมาตรประมาณส่วนละ 1 มล. จากนั้นนำส่วนสกัดทั้ง 2 มาตรวจหาสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีธินแลย์โครมาโตกราฟี (thin layer chromatography, TLC) โดยนำตัวอย่างในแต่ละลำดับส่วนมาลงบนแผ่น TLC ขนาดกว้าง 8×8 ซม. โดยใช้ระบบตัวทำละลาย (solvent system) เป็นโทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซีติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90:25:4 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจหาสารมัธยันต์ในแต่ละลำดับส่วนภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตช่วงความยาวคลื่นยาว จากนั้นนำส่วนสกัดที่เป็นกรดมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการผ่านซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี (silica gel column chromatography) ดังนี้

เตรียมคอลัมน์ โดยละลายซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.063-0.2 มม. ปริมาณ 10 กรัม ลงในเฮกเซน แล้วนำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มม. ยาว 300 มม. หลังจากการบรรจุทำการล้างคอลัมน์ด้วยเฮกเซนปริมาตร 60 มล. 2 ครั้ง



รูปที่ 3.1 การสกัดสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ก่อนที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์

การเตรียมตัวอย่าง โดยการนำส่วนสกัดที่เป็นกรดมาผสมกับซิลิกาเจล 3 กรัม เติมเอทธิลอะซีเตตลงไปเล็กน้อยเพื่อให้ผสมดีขึ้น จากนั้นนำไประเหยแห้งโดยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน เติมเฮกเซนปริมาตรเล็กน้อยลงไปละลาย แล้วนำมาบรรจุลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายปริมาตร 60 มล. ตามลำดับดังนี้คือ

100 % เฮกเซน
90 % เฮกเซนในเอทธิลอะซีเตต
80 % เฮกเซนในเอทธิลอะซีเตต
70 % เฮกเซนในเอทธิลอะซีเตต
60 % เฮกเซนในเอทธิลอะซีเตต
50 % เฮกเซนในเอทธิลอะซีเตต
40 % เฮกเซนในเอทธิลอะซีเตต
30 % เฮกเซนในเอทธิลอะซีเตต
20 % เฮกเซนในเอทธิลอะซีเตต
10 % เฮกเซนในเอทธิลอะซีเตต
100 % เอทธิลอะซีเตต

เก็บสิ่งที่ชะได้ลงในขวดรูปชมพู่ แล้วนำไประเหยแห้งโดยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุนจนแห้ง แล้วละลายด้วยเมทธานอล จากนั้นนำมาวิเคราะห์สารมัธยันต์ในแต่ละลำดับส่วนด้วยวิธีธินแลย์โครมาโตกราฟีตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น คัดเลือกลำดับส่วนที่พบสารมัธยันต์สะสมอยู่เป็นจำนวนมากนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 ^{o}ซ. เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

3.5.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์

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

นำสารมัธยันต์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทำอนุพันธ์เมทธิล (methylation) โดยการละลายสารมัธยันต์ด้วยเอทธิลอะซีเตตให้ได้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร และนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายไดอะโซมีเทน (diazomethane) (ภาคผนวก ข. หมายเลข 7) ปริมาณ 1-2 หยดในหลอดแก้วขนาดเล็กที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้แห้งโดยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 20 ^{o}ซ. และวิเคราะห์หามวลโมเลกุลและรูปแบบการแตกตัว (fractionation pattern) ของอนุพันธ์เมทธิลของสารมัธยันต์โดยวิธี GC-MS ดังนี้

เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีที่ใช้คอลัมน์ DB-5 ขนาด 2.5 มม.×15 ม. มีชั้นฟิมล์หนา 0.25 ไมโครเมตร ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพา ตั้งโปรแกรมของอุณหภูมิไว้ดังนี้

อุณหภูมิขณะฉีด (injection temperature)	230 °ซ.
อุณหภูมิคอลัมน์ (column temperature)	
เริ่มต้น (initial)	80 °ซ. (2 นาที)
อัตราการเพิ่ม (flow rate)	16 °ซ. ต่อนาที
สุดท้าย (final)	280 °ซ. (5 นาที)

เปรียบเทียบมวลโมเลกุลและรูปแบบในการแตกตัวของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ กับสารมัธยันต์มาตรฐานชนิดต่างๆ