บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.

2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.

- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น HN-S ของบริษัท DAMON/IEC, Japan.

- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan.

3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น spectronic 21 ของบริษัท Baush&Lomb, USA.

4. เครื่องวิเคราะห์สารกึ่งอัตโนมัติ (semiautomated) รุ่น RA-50 ของบริษัท Byer, Germany.

5. UV-Visible spectrophotometer รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

6. UV-Visible spectrophotometer รุ่น UV-1201 ของบริษัท Shimadzu, Japan.

7. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น F-13 ของบริษัท Horiba, Japan.

8. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 ของบริษัท Eutech cyberscan, Singapore.

9. เครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Eyela, Japan.

10. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงชนิด microtip (ultrasonicator) รุ่น W-385 ของบริษัท Heat System Ultrasonics, USA.

11. เครื่องถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124 ของบริษัท ISSCO, USA.

12. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น VSM-3 ของบริษัท Shelton scientific, USA.

13. เครื่องสูบสลัดจ์ (ProMinent Fluid Cont) รุ่น gamma/4 ของบริษัท Prominent, Germany.

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

15. เครื่องชั่งรุ่น L 2200p และ A 200s ของบริษัท Sartorius, USA.

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

17. กล้องจุลทรรศน์รุ่น CHS ของบริษัท Olympus, Japan.

18. เครื่องวิเคราะห์ค่าออกซิเจนละลาย (DO Meter) รุ่น YSI 52 ของบริษัท YSI Incorporated, USA.

19. เครื่องย่อยสลายเจลดาห์ล (kjeldahl apparatus) ของบริษัท GallenKamp&Co. Ltd., England.

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. แบคโตทริปโตน (Bacto-tryptone) ของบริษัท Difco laboratories, USA.

2. แบคโตซอยโตน (Bacto-soytone) ของบริษัท Difco laboratories, USA.

3. แล็กโทส (Lactose) ของบริษัท Difco laboratories, USA.

4. มอลโทส (Maltose) ของบริษัท Difco laboratories, USA.

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

6. เกลือน้ำดี เบอร์3 (Bile salt No.3) ของบริษัท Difco laboratories, USA.

7. บรอมคลีซอลเพอเพิล (Bromcresol purple) ของบริษัท Fluka chemical, Switzerland.

8. โคแมสซีบริลเลียนท์บลูจี 250 (Comassie brillian blue G-250) ของบริษัท Fluka chemical, Switzerland.

9. นิวเตรียนท์ บรอท (Nutrient broth) ของบริษัท Difco laboratories, USA.

10. มูลเลอร์ฮินตัน (Mueller Hinton agar) ของบริษัท Difco laboratories, USA.

11. เพนนิซิลลินจี (Penicillin G) ของบริษัท M&H Manufacturing, Thailand.

12. คลอแรมฟีนิคอล (Chloramphenicol) ของบริษัท Siam pharmaceutical, Thailand.

13. นอร์ฟลอกซาซิน (Norfloxacin) ของบริษัท Biolab, Thailand.

14. โบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน (Bovine serum albumin) ของบริษัท Sigma, USA.

15. นิโคตินาไมด์ไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (NADP) ของบริษัท Boehringer mannheim, Germany.

16. อะดีนีนนิวคลีโอไทด์โมโนฟอสเฟต (AMP) ของบริษัท Sigma, USA.

17. อะดีนีนนิวคลีโอไทด์ไดฟอสเฟต (ADP) ของบริษัท Boehringer mannheim, Germany.

18. เฮกโซไคเนส (Hexokinase) ของบริษัท Boehringer mannheim, Germany.

19. กลูโคสซิกฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (G-6PD) ของบริษัท Boehringer mannheim, Germany.

20. มายโอไคเนส (Myokinase) ของบริษัท Boehringer mannheim, Germany.

21. โพลีฟอสเฟต (Polyphosphate n=35) ของบริษัท Sigma, USA.

22. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Famitalia Carlo Erba, Italy.

23. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท E. Merck, Germany.

24. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท E. Merck, Germany.

25. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท E. Merck, Germany.

26. เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) ของบริษัท BDH Chemicals, England.

27. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) ของบริษัท E. Merck, Germany.

28. โซเดียมอะซิเตท ($CH_3COONa.3H_2O$) ของบริษัท Famitalia Carlo Erba, Italy.

29. ไดโซเดียมเอทธิลีนไดเอมีนเตตระอะซิเตท (EDTA) ของบริษัท Sigma, USA.

30. แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6MO_7O_{24}.4H_2O$) ของบริษัท J.T.Baker, USA.

31. แอมโมเนียมเมตาวานาเดต (NH_4VO_3) ของบริษัท Famitalia Carlo Erba, Italy.

32. เมอร์คิวริกซัลเฟต ($HgSO_4$) ของบริษัท E. Merck, Germany.

33. โพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ของบริษัท E. Merck, Germany.

34. ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) ของบริษัท E. Merck, Germany.

35. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Famitalia Carlo Erba, Italy.

36. เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$) ของบริษัท E. Merck, Germany.

37. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl) ของบริษัท Famitalia Carlo Erba, Italy.

38. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO4) ของบริษัท J.T.Baker, USA.

39. กรดไนตริกเข้มข้น (HNO_3) ของบริษัท Famitalia Carlo Erba, Italy.

40. กรดฟอสฟอริก ของบริษัท Famitalia Carlo Erba, Italy.

41. เอทิลแอลกอฮอล์ (C_2H_5OH) ของบริษัท BDH Chemicals, England.

42. ชุดตรวจสอบอนินทรีย์ฟอสเฟต (Inorganic phosphate test kit) ของบริษัท Human, Germany.

43. ชุดตรวจสอบเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase test kit) ของบริษัท Human, Germany.

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การพัฒนาวิธีติดตามประชากรของ *Acinetobacter* sp.

1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากถังบำบัดชนิดให้อากาศของระบบ Three-Stage Phoredox

เก็บตัวอย่างน้ำจากถังให้อากาศของระบบ Three-Stage Phoredox ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร นำมาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้มีความเข้มข้นลดลงตามลำดับครั้งละ 10 เท่า (10 - fold serial dilution) ใช้ปิเปตดูดเชื้อในแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มิลลิลิตร มาใส่ในจานเพาะเชื้อซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Herellea plus Pen G ตามสูตรในภาคผนวก ก หมายเลข 1 (Mandel et al., 1964) จากนั้นกระจาย (spread) เชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยวิธีปราศจากเชื้อ (aseptic technique) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีของเชื้อที่เจริญได้มาทำให้บริสุทธิ์ เขี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมและบ่มที่ภาวะเดิม เลี้ยงโคโลนีเดี่ยวที่ได้บนอาหารแข็งเอียงชนิด NA (ตามภาคผนวก ก หมายเลข 4) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อที่ 4 องศาเซลเซียส

1.2 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่แยกได้จากถังให้อากาศและ *Acinetobacter* sp. TISTR 160

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 1 รวมทั้ง *Acinetobacter* sp. TISTR 160 ที่ได้จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวชนิด NB (ตามภาคผนวก ก หมายเลข 5) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจุ่มในอาหารเหลว NB ที่มีเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิดเจริญอยู่ นำมากระจายเชื้อบนผิวหน้าอาหารแข็ง Mueller Hinton agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 6) ให้ทั่วผิวอาหารโดยทำ 3 ระนาบ จากนั้นนำแผ่นยาทดสอบต่างๆมาวางด้วยวิธีปราศจากเชื้อ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาอ่านผลการไวและการต้านต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ

2. การเตรียมหัวเชื้อ *Acinetobacter* sp. สำหรับเติมในระบบบำบัด Three-Stage Phoredox ชนิดทนเค็ม

เตรียมหัวเชื้อโดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อ *Acinetobacter* sp. ที่เจริญอยู่บนอาหารแข็งเอียงชนิด NA 1 ลูป เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที นำเซลล์ที่ได้เจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้มีค่าความขุ่น (optical density) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เป็น 0.2 นำสารละลายเซลล์ 10 มิลลิลิตร ไปเลี้ยงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำ ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีเซลล์เทียบเท่า $7.1x10^{12}$ เซลล์/มิลลิลิตร นำไปเติมในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิก ในปริมาณสารละลายเซลล์ 1 มิลลิลิตรต่อปริมาตรน้ำเสีย 1 ลิตร (Momba and Cloete, 1996)

3. การติดตามประชากร *Acinetobacter* sp. ในระบบบำบัด Three-Stage Phoredox ชนิดทนเค็ม

เก็บตัวอย่างน้ำจากถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิก ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารนำมาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ให้มีความเข้มข้นลดลงตามลำดับครั้งละ 10 เท่า ใช้ปิเปตดูดเชื้อในแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มิลลิลิตร มาใส่จานเพาะเชื้อซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Herellea plus PenG&C (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ทำ 3 ซ้ำ จากนั้นกระจายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยวิธีปราศจากเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่ให้สีม่วง คำนวณกลับเป็นปริมาณเชื้อ *Acinetobacter* sp. CFU/ลิตร

4. การวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตและพารามิเตอร์อื่น ๆ

4.1 เก็บตัวอย่างน้ำจากถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิก มาวิเคราะห์หาค่า pH อุณหภูมิ ออกซิเจนละลาย โดยวิธีมาตรฐาน (APHA AWWA WEF, 1992)

4.2 เก็บตัวอย่างน้ำจากถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังน้ำออก มาวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตด้วยวิธี Vanadomolybdophosphoric Acid Colorimetric Method (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)

4.3 เก็บตัวอย่างน้ำจากถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิก มาวิเคราะห์หาปริมาณ COD ด้วยวิธี Closed Reflux Titrimetric Method (ภาคผนวก ค หมายเลข 3)

4.4 เก็บตัวอย่างน้ำจากถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิก มาวิเคราะห์ค่า MLSS (Mixed Liquor Suspended Solids) (ภาคผนวก ค หมายเลข 4)

5. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของ *Acinetobacter* sp. ในน้ำเสียสังเคราะห์

เลี้ยงเชื้อ *Acinetobacter* sp. ตามวิธีการข้อ 2 หลังจากนั้นปั่นแยกเซลล์เจือจางเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีจำนวนเซลล์เทียบเท่ากับ $100x10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร(Momba and Cloete, 1996) นำสารละลายเซลล์ 1 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีเกลือแร่พื้นฐานตามภาคผนวก ก หมายเลข 7 (ชฎารัตน์ อนันต์, 2540) โดยเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอนเป็น

5.1 กลูโคส (glucose) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.358 กรัม/ลิตร

5.2 โซเดียมอะซิเตท ($CH_3COONa.3H_2O$) ความเข้มข้นสุดท้าย 5.0 กรัม/ลิตร

5.3 คาซามิโนแอซิด (casamino acid) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.6 กรัม/ลิตร

5.4 กลูโคส/ โซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้นสุดท้าย 0.358/5.0 กรัม/ลิตร

5.5 กลูโคส/ คาซามิโนแอซิด ความเข้มข้นสุดท้าย 0.358/0.6 กรัม/ลิตร

เติมสารละลายเซลล์ 1 มิลลิลิตรในน้ำเสียสังเคราะห์ 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญของเชื้อจากค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ง รูปที่ 54) ทำ 3 ซ้ำ

6. ผลของความเป็นกรดด่าง (pH) เริ่มต้นของน้ำเสียสังเคราะห์ต่อการเจริญและการสะสมฟอสเฟต

เลี้ยงเชื้อ *Acinetobacter* sp. ตามวิธีการข้อ 2 หลังจากนั้นปั่นแยกเซลล์นำเซลล์ที่ได้เจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีจำนวนเซลล์เทียบเท่ากับ $100x10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร นำสารละลายเซลล์ 1 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในน้ำเสียสังเคราะห์สูตรดัดแปลง 1 (ภาคผนวก ก หมายเลข 8) ซึ่งมีค่ากรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0, 6.56, 6.87, 7.13, 7.43 ตามลำดับ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญของเชื้อตามวิธีการข้อ 5 พร้อมทั้งวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตด้วยชุดตรวจสอบอนินทรีย์ฟอสเฟต (ภาคผนวก ค หมายเลข 5) ทำ 2 ซ้ำ และค่าความเป็นกรดด่างด้วย pH Meter ทำ 3 ซ้ำ

7. ผลของความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ในน้ำเสียสังเคราะห์ต่อการเจริญและการสะสมฟอสเฟต

เลี้ยงเชื้อ *Acinetobacter* sp. ตามวิธีการข้อ 2 หลังจากนั้นปั่นแยกเซลล์นำเซลล์ที่ได้เจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีจำนวนเซลล์เทียบเท่ากับ $100x10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร นำสารละลายเซลล์ 1 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในน้ำเสียสังเคราะห์สูตรดัดแปลง 2 (ภาคผนวก ก หมายเลข 9) ที่มี pH เริ่มต้น 6.5 และเติมโซเดียมคลอไรด์ให้เข้มข้น 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 % ตามลำดับ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญของเชื้อ วิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต และค่าความเป็นกรดด่าง ตามวิธีการข้อ 6

8. ผลของค่า COD เริ่มต้นในน้ำเสียสังเคราะห์ต่อการเจริญและการสะสมฟอสเฟต

เลี้ยงเชื้อ *Acinetobacter* sp. ตามวิธีการข้อ 2 หลังจากนั้นปั่นแยกเซลล์นำเซลล์ที่ได้เจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีจำนวนเซลล์เทียบเท่ากับ $100x10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร นำสารละลายเซลล์ 1 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในน้ำเสียสังเคราะห์สูตรดัดแปลง 3 (ภาคผนวก ก หมายเลข 10) ที่มี pH เริ่มต้น 6.5 โซเดียมคลอไรด์ 0.5 % และเติมโซเดียมอะซิเตทให้เทียบเท่าค่า COD 400, 500, 600, 700 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญของเชื้อ ปริมาณฟอสเฟต และค่าความเป็นกรดด่างตามวิธีข้อ 6

9. ผลของรอบการเขย่า (RPM) ต่อการเจริญและการสะสมฟอสเฟตของ *Acinetobacter* sp.ในน้ำเสียสังเคราะห์

เลี้ยงเชื้อ *Acinetobacter* sp. ตามวิธีการข้อ 2 หลังจากนั้นปั่นแยกเซลล์นำเซลล์ที่ได้เจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีจำนวนเซลล์เทียบเท่ากับ $100x10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร นำสารละลายเซลล์ 1 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในน้ำเสียสังเคราะห์สูตรดัดแปลง 3 ที่มี pH เริ่มต้น 6.5 โซเดียมคลอไรด์ 0.5 % และเติมโซเดียมอะซิเตทให้เทียบเท่าค่า COD 500 มก./ล. ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแปรผันรอบการเขย่าเป็น 80 120 160 200 240 รอบต่อนาทีตามลำดับ ติดตามการเจริญของเชื้อ ปริมาณฟอสเฟต และค่าความเป็นกรดด่างตามวิธีข้อ 6

10. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อผสมในตะกอนสลัดจ์เทียบกับ *Acinetobacter* sp.

นำตะกอนสลัดจ์จากถังออกซิกประมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่เม็ดลูกแก้ว 5 เม็ด นำไปเขย่าผสมด้วยเครื่องผสมสาร 2 นาที (Kavanaugh and Randall, 1994) หลังจากนั้นนำไม้พันสำลีที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจุ่มหมาดๆ นำมากระจายเชื้อบนผิวหน้าอาหารแข็ง Herellea ให้ทั่วผิวอาหารโดยทำ 3 ระนาบ จากนั้นนำแผ่นยาทดสอบมาวางด้วยวิธีปราศจากเชื้อ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาอ่านผลการไวและการต้านต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ

11. การทดสอบปริมาณยา Norfroxacin ที่มีผลต่อ *Acinetobacter* sp.

เลี้ยงเชื้อ *Acinetobacter* sp. ตามวิธีการข้อ 2 หลังจากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อครั้งละ 10 เท่า นำเชื้อเจือจางที่ 10^{-9} มาทดสอบความด้านทานต่อปริมาณยา Norfroxacin ระดับต่างๆ โดยใช้ปิเปตดูดเชื้อจากหลอดที่เจือจาง 10^{-9} มา 0.1 มิลลิลิตร มาใส่จานเพาะเชื้อซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Herellea ที่มียา Norfroxacin เข้มข้น 10, 20, 30, 40, 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ จากนั้นกระจายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยวิธีปราศจากเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาเปรียบเทียบปริมาณเชื้อในแต่ละความเข้มข้นของยา

12. การประเมินความสามารถของเชื้อ *Acinetobacter* sp. ในการอยู่ร่วมกับเชื้ออื่นในระบบบำบัด Three-Stage Phoredox ชนิดทนเดี่ยมภายใต้ภาวะที่เชื้อ *Acinetobacter* sp. บริสุทธิ์สามารถเจริญได้ดี

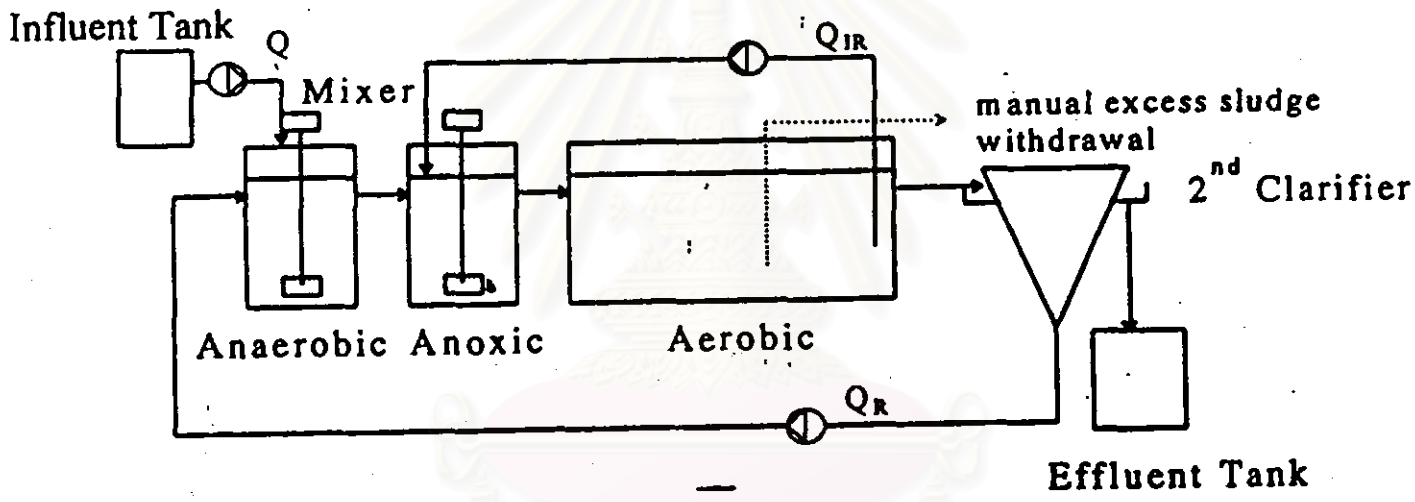
12.1 พารามิเตอร์มีควบคุมให้คงที่และขนาดถังในระบบบำบัด Three-Stage Phoredox

พารามิเตอร์มีควบคุมให้คงที่และขนาดถังในระบบบำบัด Three-Stage Phoredox แสดงดังตารางที่ 2 และรูปที่ 8, 9

ตารางที่ 2 พารามิเตอร์มีควบคุมให้คงที่และขนาดถังในระบบบำบัด Three-Stage Phoredox

Q (ลิตร/วัน)	20
Q_{IR} (ลิตร/วัน)	40
Q_R (ลิตร/วัน)	8
อายุสลัดจ์ (θ_c)	10
MLSS เริ่มต้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	2200
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิห้อง (27-33)
ปริมาตรถังแอนแอโรบิก (ลิตร)	1.7
แอนแอโรบิก HRT (ชั่วโมง)	2
ปริมาตรถังแอน็อกซิก (ลิตร)	1.7
แอน็อกซิก HRT (ชั่วโมง)	2
ปริมาตรถังออกซิก (ลิตร)	10
แอน็อกซิก HRT (ชั่วโมง)	12

รูปที่ 8 ระบบบำบัด Three-Stage Phoredox ชนิดทนเค็มที่ใช้ทดลอง
ถังแอนแอโรบิก (1) ถังแอนอ็อกซิก (2) ถังออกซิก (3)



รูปที่ 9 แผนภูมิของระบบบำบัด Three-Stage Phoredox ชนิดทนเค็มที่ใช้ทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

12.2 การเตรียมหัวเชื้อตะกอนสลัดจ์เพื่อเติมในระบบบำบัด Three-Stage Phoredox

นำเชื้อ *Acinetobacter* sp. บริสุทธิ์ที่มีค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เทียบเท่า $7.1x10^{12}$ เซลล์/มิลลิลิตร จำนวน 1 ลิตร มาเลี้ยงร่วมกับตะกอนสลัดจ์จากบ่อบำบัดน้ำเสียชุมชนรวมสี่พระยาที่มีค่า MLSS ประมาณ 2000 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวน 1 ลิตร นำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณตะกอนสลัดจ์ในโหลแก้วขนาด 10 ลิตรด้วยน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเทียบเท่า COD 250 มิลลิกรัม/ลิตร และโซเดียมอะซิเตทเทียบเท่า COD 250 มิลลิกรัม/ลิตร 1.5% โซเดียมคลอไรด์ pH 6.5 ให้อากาศโดยวัดค่า DO ได้ประมาณ 3.5 มิลลิกรัม/ลิตร หลังเลี้ยง 24 ชั่วโมงหยุดให้อากาศทิ้งให้ตกตะกอนเป็นเวลา 1 ชั่วโมงและเปลี่ยนน้ำเสียสังเคราะห์ใหม่ เมื่อได้ปริมาณตะกอนสลัดจ์เพียงพอ เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่า MLSS และติดตามเชื้อ *Acinetobacter* sp. ด้วยอาหารแข็ง Herellea plus Nor ตามวิธีการข้อ 3

12.3 การเติมเชื้อ *Acinetobacter* sp. ในระบบบำบัด Three-Stage Phoredox ชนิดทนเค็ม

เลี้ยงเชื้อตามวิธีการข้อ 2 นำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีเซลล์เทียบเท่า $7.1x\ 10^{12}$ เซลล์/มิลลิลิตร นำไปเติมในถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิก ในปริมาณสารละลายเซลล์ 1 มิลลิลิตรต่อปริมาตรน้ำเสีย 1 ลิตร

12.4 การติดตามประชากร *Acinetobacter* sp. จากระบบบำบัด Three-Stage Phoredox ชนิดทนเค็ม

เก็บตัวอย่างน้ำจากถังออกซิก ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารนำมาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ให้มีความเข้มข้นลดลงตามลำดับครั้งละ 10 เท่า ใช้ปิเปตดูดเชื้อในแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มิลลิลิตร มาใส่จานเพาะเชื้อซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Herellea plus Nor (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) ทำ 3 ซ้ำ จากนั้นกระจายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยวิธีปราศจากเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่ให้สีม่วง คำนวณกลับเป็นปริมาณเชื้อ *Acinetobacter* sp. CFU/ลิตร

12.5 การวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตและพารามิเตอร์อื่น ๆ

12.5.1 เก็บตัวอย่างน้ำจากถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิกมาวิเคราะห์หาค่า pH อุณหภูมิ ออกซิเจนละลาย

12.5.2 เก็บตัวอย่างน้ำจากถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังน้ำออกมาวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตด้วยวิธี Vanadomolybdophosphoric Acid Colorimetric Method

12.5.3 เก็บตัวอย่างน้ำจากถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิกมาวิเคราะห์หาปริมาณ COD ด้วยวิธี Closed Reflux Titrimetric Method

12.5.4 เก็บตัวอย่างน้ำจากถังแอนแอโรบิก ถังแอน็อกซิก ถังออกซิกมาวิเคราะห์ค่า MLSS

13. การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase) โพลีฟอสเฟตไคเนส (Polyphosphate kinase) โพลีฟอสเฟตเอเอ็มพี ฟอสโฟทรานส์เฟอร์เรส (Polyphosphate : AMP Phospphotransferase) จากเชื้อ *Acinetobacter* sp.

13.1 การเตรียมเซลล์ระยะ starved cell, mid log phase, late log phase, initial declined phase สำหรับนำไปย้อมสี Albert และเตรียมสารสกัดจากเซลล์

เลี้ยงเชื้อ *Acinetobacter* sp. ตามวิธีข้อ 2 หลังจากนั้นปั่นแยกเซลล์นำเซลล์ที่ได้เจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้จำนวนเซลล์เทียบเท่า $100x10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร นำสารละลายเซลล์ 1 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในน้ำเสียสังเคราะห์สูตรดัดแปลง 3 ที่มี pH 6.5 โซเดียมคลอไรด์ 0.5% ค่า COD 500 มิลลิกรัม/ลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ปั่นเก็บเซลล์ชั่วโมงที่ 10, 15 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งเป็นระยะ mid log phase late log phase และ initial declined phase ตามลำดับ สำหรับ phosphate starved cell เลี้ยงเชื้อ *Acinetobacter* sp. ตามวิธีข้อ 2 จากนั้นปั่นแยกเซลล์นำเซลล์ที่ได้เจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้จำนวนเซลล์เทียบเท่า $100x10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร นำสารละลายเซลล์ 1 มิลลิลิตร ปลูกเชื้อลงในน้ำเสียสังเคราะห์สูตรดัดแปลงที่มีฟอสเฟตจำกัด (ภาคผนวก ก หมายเลข 11) ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ปั่นเก็บเซลล์ชั่วโมงที่ 21 ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ส่วนใสนำไปวิเคราะห์โปรตีน (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) และเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ภาคผนวก ค หมายเลข 6) นำเซลล์ไปย้อมสี Albert's stain (Smith et al., 1954) เพื่อดูโพลีฟอสเฟตแกรนูลและเตรียมสารสกัดจากเซลล์

13.2 การเตรียมสารสกัดจากเซลล์

นำเซลล์ที่เตรียมได้จากข้อ 13.1 ประมาณ 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย 0.004 โมลาร์ EDTA ใน 0.05 โมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.6 (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (Bonting et al., 1991) นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง

กำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นานครั้งละ 15 วินาที เป็นเวลา 35 ครั้ง โดยควบคุมให้เซลล์แบคทีเรียแช่อยู่ในน้ำผสมน้ำแข็งตลอดเวลา จากนั้นนำมาแยกส่วนกากเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำด้วยความเร็ว 10500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 นาที ส่วนใสที่ได้คือสารสกัดจากเซลล์ นำสารสกัดจากเซลล์ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และเอนไซม์โพลีฟอสเฟตไคเนส (ภาคผนวก ค หมายเลข 7) เอนไซม์โพลีฟอสเฟตเอเอ็มพี ฟอสโฟทรานส์เฟอร์เรส (ภาคผนวก ค หมายเลข 8)

13.3 หาปริมาณสารสกัดจากเซลล์ที่เหมาะสมในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟอสเฟตไคเนสและเอนไซม์โพลีฟอสเฟตเอเอ็มพี ฟอสโฟทรานส์เฟอร์เรส

นำสารสกัดจากเซลล์ที่สกัดจากเซลล์ในระยะ mid log phase ตามวิธีข้อ 13.2 มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้ปริมาณสารสกัดจากเซลล์ต่างๆกันคือ 5, 10, 15, 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟอสเฟตไคเนสตามวิธีในภาคผนวก ค หมายเลข 7 ปริมาณ 2.5, 5, 10, 15 ไมโครลิตรตามลำดับ ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟอสเฟตเอเอ็มพี ฟอสโฟทรานส์เฟอร์เรส ตามวิธีในภาคผนวก ค หมายเลข 8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย