บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch&Lomb, USA

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)รุ่น ϕ70 ของบริษัท Beckman ,USA

เครื่องบ่ม อุณหภูมิ 37°C และ 55°C ของบริษัท Memmert, เยอรมันตะวันตก

Vortex Mixer

เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี Hewlett Packard Series 2

กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสงฟลูออเรสเซนต์ติด รุ่น Labophot 2 ของบริษัท NIKON ประเทศญี่ปุ่น

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจากกากตะกอน

หลอดฉีดยาขนาด 1มิลลิลิตร, 15มิลลิลิตร และ 20 มิลลิลิตร

เข็มเบอร์ 18 และ 23

หลอดฉีดยาเก็บความดันขนาด 1 มิลลิลิตร

ขวดทนความดันขนาด 60 มิลลิลิตร สำหรับเก็บเชื้อบริสุทธิ์

หลอดแก้วทนความดันขนาด 20 มิลลิลิตร สำหรับเลี้ยงเชื้อ

จุกยาง, ฝาอลูมิเนียม และที่ปิดฝาอลูมิเนียม แสดงดังรูปที่ 3.1

แก๊สไนโตรเจนที่ปราศจากออกซิเจน (OFN) ของบริษัท TIG

แก๊สไฮโดรเจน:คาร์บอนไดออกไซด์ในอัตราส่วน 80:20 ของบริษัท TIG

ท่อทองแดงสำหรับดูดแก๊สออกซิเจน แสดงดังรูป 3.2 และ 3.3 โดยมีวิธีเตรียมดังภาคผนวก ข หน้า 97

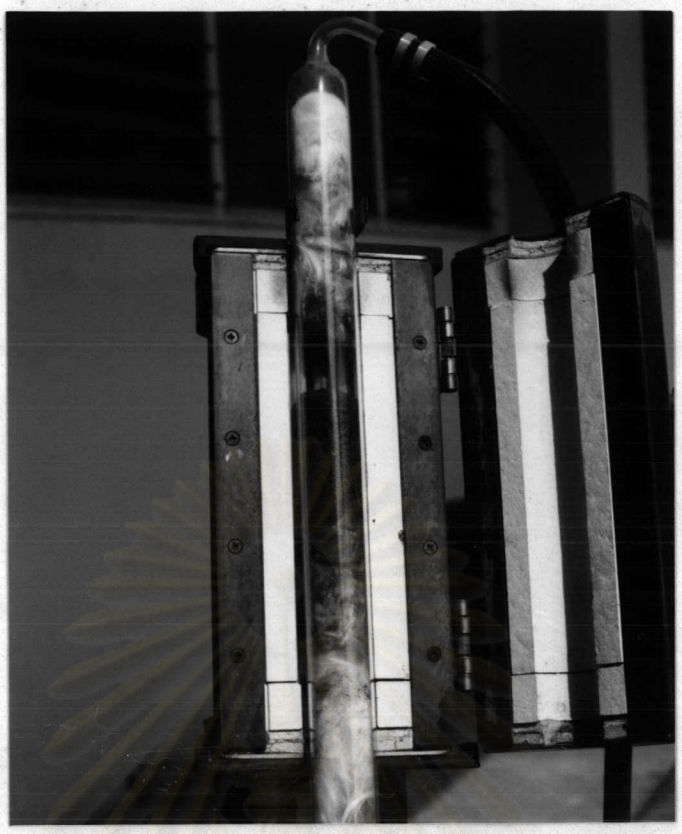
เครื่องเคลือบวุ้นโดยเทคนิคของฮังเกต (Hungate, 1969) แสดงดังรูป 3.4 (เครื่องนี้ช่วยในการเคลือบวุ้นเข้ากับผิวด้านในของหลอดทดลอง โดยความหนาของวุ้นสม่ำเสมอทั้งหลอด ใช้เลี้ยงเชื้อโดยหลักการเดียวกับการ Pour Plate)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงดังรูปที่ 3.5

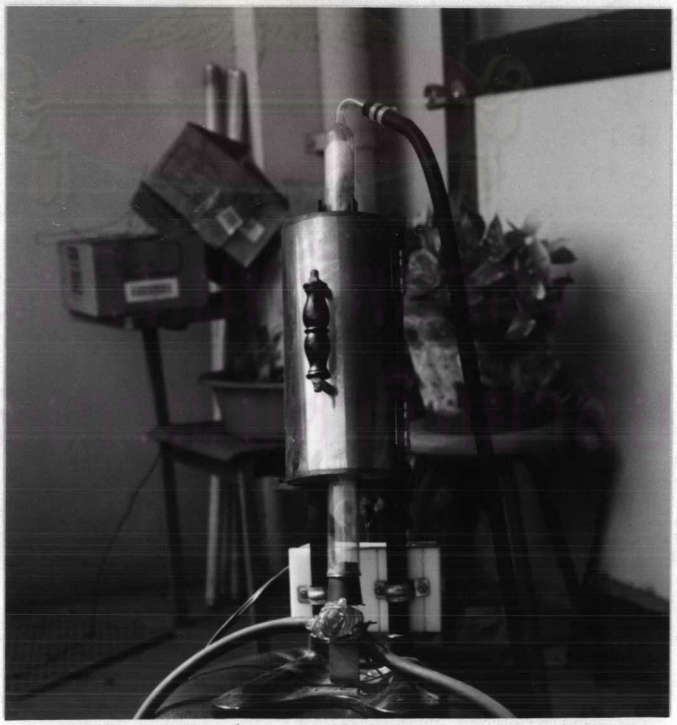
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำหลอดเลี้ยงเชื้อแบบไร้อากาศ

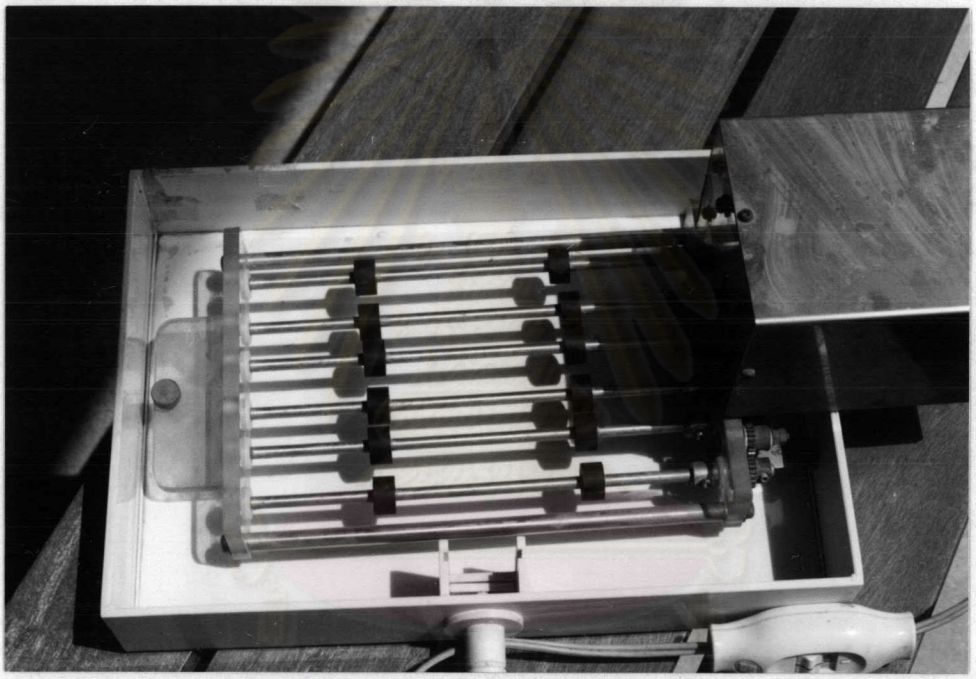
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.2 ลักษณะภายในของท่อทองแดงสำหรับดูดออกซิเจนซึ่งใช้ในกระบวนการทำหลอดเลี้ยงเชื้อแบบไร้อากาศ



รูปที่ 3.3 ลักษณะภายนอกของท่อทองแดงสำหรับดูดออกซิเจนซึ่งใช้ในกระบวนการทำหลอดเลี้ยงเชื้อแบบไร้อากาศ



รูปที่ 3.4 เครื่องเคลือบวุ้นเข้ากับผิวด้านในของหลอดทดลองของฮังเกต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

นำตัวอย่างกากตะกอน ที่ได้จากเครื่องปฏิกรณ์ในการบำบัดน้ำเสียแบบ UASB (Upflow Anerobic Sludge Blanket) ของโรงงานอุตสาหกรรมนมในประเทศญี่ปุ่น ที่บรรจุในขวดทนความดันที่มีแก๊สไฮโดรเจน:คาร์บอนไดออกไซด์ (80:20) และมีการตรวจพบแก๊สมีเธนเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 15วัน ในสภาพที่มีการเติมสารละลายรีดิวซ์ 0.1-0.2 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ลักษณะเป็นเม็ดกลมสีขาวครีม (รูปที่ 3.6) ก่อนนำมาใช้ต้องไปเขย่าอย่างแรงบนวอร์เทกซ์มิกเซอร์ จนเปลือกสีขาวหลุดออก จะได้เชื้อภายในสีดำซึ่งเป็นเชื้อผสมของแบคทีเรียหลายกลุ่มและทำการเขย่าต่อจนกว่าเชื้อที่ได้จะกระจายอย่างสม่ำเสมอ

ใช้เข็มเบอร์ 18 ดูดสารละลายกากตะกอน มาถ่ายลงหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ก่อนนำมาใช้

3.4 การหาปริมาณที่นับได้ของแบคทีเรียในกากตะกอน(Hungate, 1969)

นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เตรียมไว้ ไปหลอมที่อุณหภูมิ 100° C เมื่อวุ้นละลาย นำมาเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.03 มิลลิลิตร, สารรีดิวซ์ 0.03 มิลลิลิตร, สารละลายวิตามิน 0.03 มิลลิลิตร และซับสเทรต ความเข้มข้น 1000 mM 0.06 มิลลิลิตร

จากนั้นนำมาเติมสารละลายกากตะกอน ปริมาตร 0.03 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่หลอม จะได้เชื้อที่มีความเจือจาง 10^{-2} แล้วนำไปวางบนเครื่องมือของฮังเกตซึ่งจะหมุนตลอดเวลาในขณะเดียวกับน้ำเย็นไหลผ่าน วุ้นจะแข็งตัวเคลือบผิวด้านในของหลอดอย่างสม่ำเสมอ ดังรูปที่ 3.7 นำไปบ่มที่ 37°C จากนั้นนำมานับจำนวนโคโลนีของเชื้อทุกสัปดาห์

ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จะต้องมีการเติมซับสเทรตต่างๆ คือ เมธานอล กรดฟอร์มิค กรดแลคติค กรดอะซิติค กรดโพรพิโอนิค ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ ส่วนซับสเทรตไฮโดรเจน:คาร์บอนไดออกไซด์ เติมโดยต่อจากถังแก๊สโดยตรงผ่านเข็มฉีดยาเบอร์ 23 โดยใช้ความดัน 1 atm เป็นเวลา 5 นาทีโดยเทคนิคปลอดเชื้อ (รูปที่ 3.8)

3.5 <u>การวัดการเจริญของแบคทีเรียในกากตะกอนโดยการวัดค่าความขุ่น</u>

ใช้ไซริงจ์ และเข็มฉีดยาเบอร์ 23 ดูดสารละลายกากตะกอน ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆ จะได้เชื้อที่มีความเจือจาง 10^{-2} นำไปบ่มที่ 37°C แล้วนำมาทำการวัดค่าความขุ่นโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 nm ทุกสัปดาห์

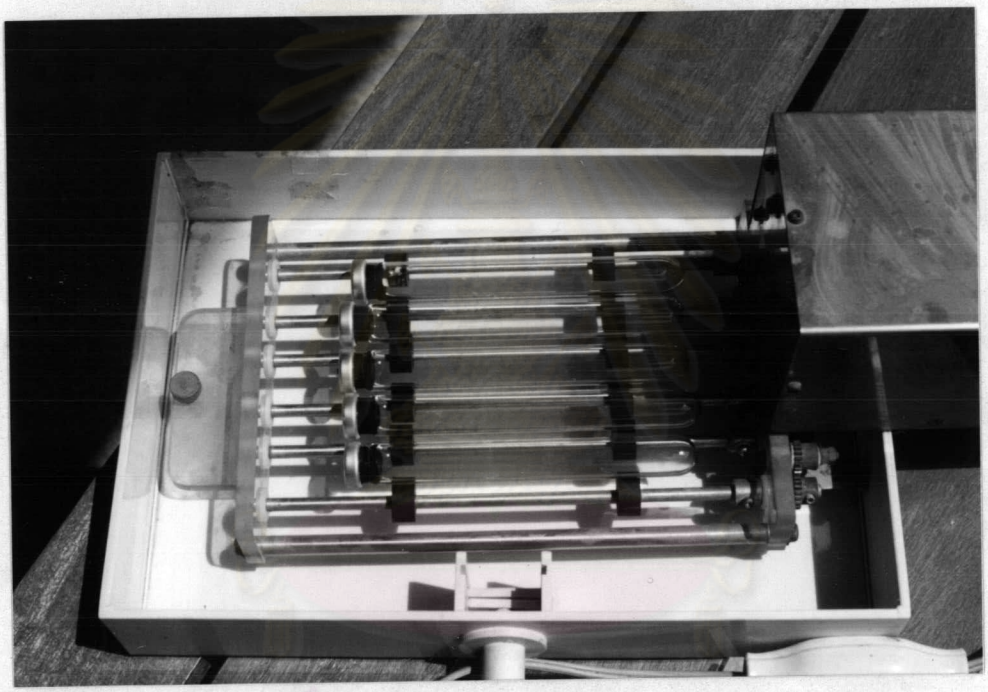
3.6 <u>การหาปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากการทำงานร่วมกันของเชื้อผสมตามธรรมชาติ</u>

ใช้หลอดฉีดยาและเข็มเบอร์ 23 ดูดสารละลายกากตะกอนปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆ จะได้เชื้อที่มีความเจือจาง 10^{-2} นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ทำการตรวจวัดแก๊สมีเธนที่เกิดจากการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียทุกสัปดาห์ โดยใช้หลอดฉีดยาเก็บความดันขนาด 1 มิลลิลิตรดูดแก๊สจาก Headspace ของหลอดเลี้ยงเชื้อ ดังภาพที่ 3.9 โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีภาวะเดียวกับเมื่อทำกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค หน้า 99) แล้วจึงคำนวณเปอร์เซ็นต์ของแก๊สมีเธนในตัวอย่าง โดยอาศัยกราฟมาตรฐานของมีเธน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

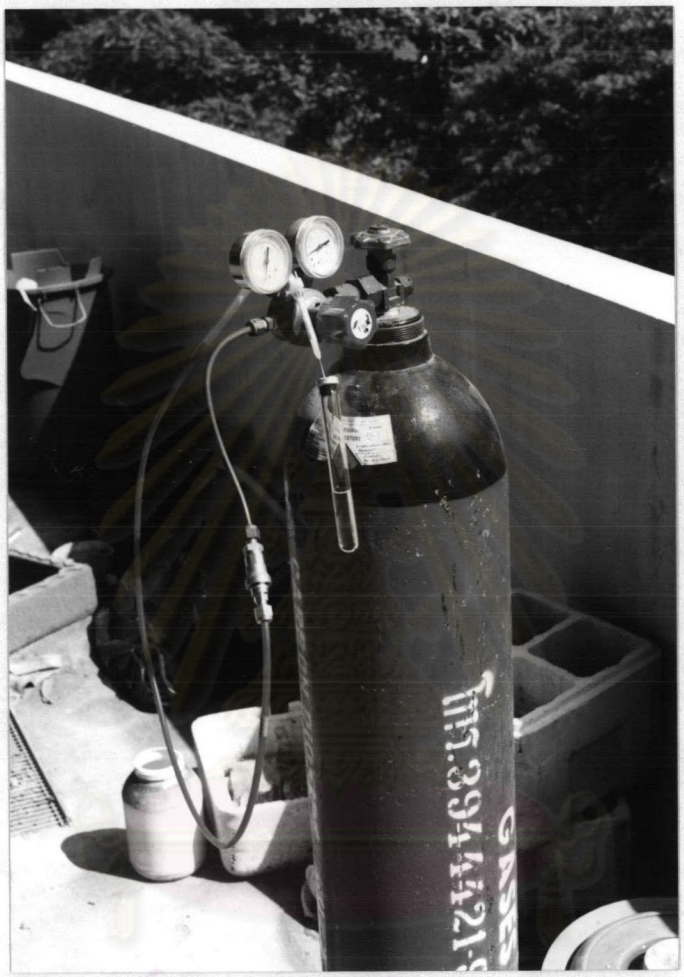
รูปที่ 3.6 ลักษณะกากตะกอนที่ได้รับจากโรงงานอุตสาหกรรมนม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.7 แสดงการเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งโดยวิธีของฮังเกต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.8 การเติมซับสเทรตไฮโดรเจน:คาร์บอนไดออกไซด์ (80:20)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.9 แสดงการเก็บตัวอย่างแก๊สมีเธนจากหลอดเลี้ยงเชื้อโดยใช้หลอดฉีดยาเก็บความดัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7 การคัดกรอง(SCREENING)เชื้อแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนและเมธาโนเจน

3.7.1 การคัดเลือกเมธาโนเจนที่มีความสามารถในการใช้แก๊สไฮโดรเจน:แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นซับสเทรต

ก. ลงเชื้อจากกากตะกอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพื้นฐานให้ได้ความเจือจางของเชื้อ 10^{-2} จากนั้นจึงเติมแก๊สไฮโดรเจน:แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (80:20) เพื่อใช้เป็นซับสเทรต โดยใช้ความดัน 1 atm เป็นเวลา 5 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° C

เมื่อครบ 14 วัน ดูดสารละลายเชื้อจากหลอดเริ่มต้น (โดยใช้หลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มเบอร์ 23) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่มีซับสเทรตชนิดเดิม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อครบ 14วัน ดูดสารละลายเชื้อจากหลอดดังกล่าวปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ลงอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่มีซับสเทรตชนิดเดิม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อครบ 14 วันทำซ้ำเช่นเดิมจนครั้งสุดท้ายที่ปริมาตรของสารละลายเชื้อเป็น 0.1 มิลลิลิตร หลังจากบ่มครบ 14วันให้ดูดสารละลายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโดยวิธีของอ้งเกต เพื่อตรวจดูความบริสุทธิ์ของเชื้อกลุ่มที่สามารถใช้ แก๊สไฮโดรเจน:แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นซับสเทรตได้

ข. หรืออีกวิธีหนึ่ง โดยการลงเชื้อจากกากตะกอนในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งพื้นฐาน จากนั้นจึงเติมไฮโดรเจน:แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (80:20) เพื่อใช้เป็นซับสเทรตโดยใช้ความดัน 1 atm เป็นเวลา 5 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ37° C

เมื่อมีโคโลนีเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งพื้นฐานแล้ว จึงเปิดฝาอลูมิเนียมและจุกยาง จากนั้นจึงใช้หลอดฉีดยา และเข็มเบอร์23 ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาณเล็กน้อย ฉีดไปบริเวณโคโลนีที่ต้องการจะแยก แล้วจึงดูดกลับมาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวใหม่ นำไปบ่มที่ 37°C ประมาณสองสัปดาห์ แล้วจึงนำสารละลายเชื้อนี้มาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ทำซ้ำขั้นตอน จนกว่าโคโลนีที่ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จะเป็นโคโลนีที่มีลักษณะเดียวกัน ซึ่งแสดงถึงความบริสุทธิ์ของเชื้อ

การใช้วิธีนี้ มีข้อดีตรงที่ สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้เร็วกว่าวิธีในข้อ ก แต่ก็มีข้อควรระวัง กล่าวคือ เมธาโนเจนเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความไวต่อการปนเปื้อนโดยแก๊สออกซิเจนมาก ดังนั้นทุกขั้นตอนภายหลังการเปิดจุกยางจะต้องทำอย่างรวดเร็วภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน (ภาพที่ 3.10)

รูปที่ 3.10 การเก็บโคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7.2 <u>การคัดเลือกเชื้อเมธาโนเจนที่มีความสามารถในการใช้เมธานอลเป็นซับสเทรต</u>

ลงเชื้อจากกากตะกอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพื้นฐาน ที่มีการเติมเมธานอลเป็นซับสเทรต โดยความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20mM แล้วทำเช่นเดียวกับข้อ ก หรือ ข จนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์

3.7.3 <u>การคัดเลือกเชื้อเมธาโนเจนที่มีความสามารถในการใช้อะซิเตทเป็นซับสเทรต</u>

ลงเชื้อจากกากตะกอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพื้นฐาน ที่มีการเติมกรดอะซิติคเป็นซับสเทรต โดยความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20mM แล้วทำเช่นเดียวกับข้อ ก หรือ ข จนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์

3.7.4 <u>การคัดเลือกเชื้อเมธาโนเจนที่มีความสามารถในการใช้กรดอินทรีย์เป็นซับสเทรต</u>

ลงเชื้อจากกากตะกอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพื้นฐาน ที่มีการเติมกรดฟอร์มิค หรือกรดโพรพิโอนิค หรือกรดแลคติคเป็นซับสเทรต โดยความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20mM แล้วทำเช่นเดียวกับข้อ ก หรือ ข จนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์

3.8 <u>การทดสอบชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้</u>

3.8.1 เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแล้ว ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไปชะโคโลนีในหลอด แล้วจึงดูดกลับมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว บ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 1 เดือน แล้วจึงนำไปตรวจดูว่าเป็นอะซิโตเจนหรือเมธาโนเจน โดยการตรวจสอบแก๊สมีเธน โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี ถ้าเป็นอะซิโตเจนจะตรวจไม่พบแก๊สมีเธนและตรวจพบแก๊สมีเธนถ้าเป็นเมธาโนเจน

3.8.2 เพิ่มปริมาณของเชื้อแต่ละกลุ่ม โดยดูดสารละลายเชื้อจากหลอดที่มีเชื้อบริสุทธิ์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดเลี้ยงเชื้อที่ขนาดใหญ่ขึ้น เก็บไว้เป็นstock ของเชื้อต่อไป (ภาพที่ 3.11)

I17163079

รูปที่ 3.11 ขวดเก็บเชื้อบริสุทธิ์ขนาด 60มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.9 <u>การทดสอบยืนยันแบคทีเรียกลุ่มเมธาโนเจน</u>

นำเมธาโนเจนที่ได้ ไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์ พบว่าเมธาโนเจนจะเกิดการเรืองแสงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรโดยคุณสมบัติของโคเอ็นไซม์F_{420} ซึ่งการวิเคราห์นี้ต้องรีบทำเพราะ F_{420} จะสลายตัวอย่างเร็วเมื่อสัมผัสอากาศ

3.10 <u>การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สมีเธนของแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนและเมธาโนเจน</u>

ทำการผสมเชื้อในกลุ่มอะซิโตเจน ที่แยกได้จากการเลี้ยงในกรดโพรพิโอนิค และกรดแลคติค กับเมธาโนเจนที่แยกได้จากการเลี้ยงในเมธานอล หรือแก๊สไฮโดรเจน:คาร์บอนไดออกไซด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพื้นฐาน ในอัตราส่วน 3:1 (อะซิโตเจน 0.9 มิลลิลิตรและเมธาโนเจน 0.3 มิลลิลิตร) และ2: 1(อะซิโตเจน 0.8 มิลลิลิตรและเมธาโนเจน 0.4 มิลลิลิตร) และ 1:1 (อะซิโตเจน 0.6 มิลลิลิตร และ เมธาโนเจน 0.6 มิลลิลิตร) และ 1:2(อะซิโตเจน 0.4 มิลลิลิตรและเมธาโนเจน 0.8 มิลลิลิตร) และ 1:3 (อะซิโตเจน 0.3 มิลลิลิตรและเมธาโนเจน 0.9 มิลลิลิตร) และ1:11 (อะซิโตเจน 0.1 มิลลิลิตรและเมธาโนเจน 1.1 มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปบ่มที่ภาวะต่างๆ

ก. <u>ผลของอุณหภูมิ</u>

นำเชื้อที่ผสมแล้ว ไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คืออุณหภูมิห้อง, 37°C และ 55°C เมื่อครบ 42 วัน นำไปตรวจหาแก๊สมีเธนโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี และวัดค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อ

ข. <u>ผลของความเข้มข้นซับสเทรต</u>

แปรผันความเข้มข้นของซับสเทรต ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อผสม คือ 5mM 10mM 20mM และ 30mM จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อครบ 42 วัน นำไปตรวจหาแก๊สมีเธนโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี และวัดค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อ

ค. ผลของชนิดซับสเทรต

แปรผันชนิดของซับสเทรตที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อผสม คือกรดแลคติค และกรดโพรพิโอนิค จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อครบ 42 วัน นำไปตรวจหาแก๊สมีเธนโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี และวัดค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อ

ง. ผลของตัวค้ำจุน

ใส่ทราย (ที่ผ่านการทำความสะอาดโดยล้างด้วยน้ำกลั่น) ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าหรือเท่ากับ 0.2 มิลลิเมตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 121 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ประมาณ 0.01 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 10 มิลลิลิตร เพื่อเป็นตัวให้แบคทีเรียยึดเกาะเปรียบเทียบกับเมื่อไม่ใส่ทราย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย