# บทที่ 3

# อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

## อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
2. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA.
3. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan.
4. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ "ISSCO" laminar flow รุ่น BVT – 124 ของบริษัท International Sciencetific Supply, USA.
5. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunswick Scientific, USA.
6. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ –70 °ซ บริษัท Forma Scientific, USA.
7. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ –20 °ซ บริษัท Sanyo Electric, Japan
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys20 บริษัท Thermo spectonic, Japan.
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น Sorvall® Biofuge Stratos บริษัท Heraeus., Germany.
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น KM-15200 บริษัท Kubota, Japan.
11. ตู้อบแห้ง บริษัท Contherm Scientific, New Zealand.
12. กรวยแยก ขนาด 500 มล. ของบริษัท Sibata, Japan.
13. ไมโครปิเปต ขนาด 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Drummond Scientific, USA.
14. หัวกรอง ชนิด PTFE ขนาดความกว้างของรู 0.20 และ 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
15. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
16. ปิเปต (pipette) ขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร ของบริษัท Gilson, France.
17. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.

18. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS400 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
19. ตู้บ่มเชื้อ รุ่น Heraeus type B 5050 E ของบริษัท Heraeus, Germany.
20. ชุดเครื่องมือทำไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) สำหรับตรวจสอบปริมาณของ PAHs
    - ลิควิดโครมาโทกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - คอลัมน์ (column) : Inertsill ODS-3 ขนาด 4.6 x 150 มิลลิเมตร ของบริษัท GL Science, Japan.
    - เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-2A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - เครื่องบันทึก (recorder) Chromatography รุ่น C-RIA ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - กระบอกฉีดยา (microsyringe) ขนาด 100 ไมโครลิตร รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, USA.
21. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
22. เครื่องคัดกรองขนาดดิน ขนาดความกว้างของรู 0.84 และ 1.18 มิลลิเมตร รุ่น O.S.K. 119 Standard Sieve ของบริษัท Okawa Seiki, Japan.
23. เครื่องบด (blender) รุ่น MX-T31GH ของบริษัท Matsushita Electric, Taiwan.
24. แผ่นอลูมิเนียมทีแอลซี (TLC aluminium sheet) เคลือบด้วย silica gel 60 $F_{254}$ ขนาด 20×20 ซม. ของบริษัท Merck, Germany.
25. แผ่นอลูมิเนียมพีแอลซี (PLC aluminium sheet) เคลือบด้วย silica gel 60 $F_{254}$ หนา 1 มม. ขนาด 20×20 ซม. ของบริษัท Merck, Germany.
26. หลอดแสงอัลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร (ultra violet) รุ่น UVGL-15 ของบริษัท UVP, USA.
27. ชุดเครื่องมือแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry, MS) รุ่น Trio 2000 ของบริษัท Fisons Instruments จำกัด, England.

## เคมีภัณฑ์

1. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
2. กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (2,5-dihydroxybenzoic acid) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
3. กรดโปรโตคาทีคูอิก (protocatechuic acid) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
4. กรดซาลิไซลิก(salicylic acid) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
5. กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
6. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
7. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
8. ไดเมธิลซัลฟอกไซด์($CH_3SOCH_3$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
9. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany.
10. แอมโมเนียมไนเตรต ($NH_4NO_3$) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
11. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
12. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Auatralia.
13. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
14. เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) ของบริษัท May & Baker, England.
15. แคลเซียมคลอร์ไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Auatralia.
16. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany.
17. เมธานอล ($CH_3OH$) ของบริษัท Merck, Germany.
18. เอธิลอะซีเตท ($CH_3COOC_2H_5$) ของบริษัท Merck, Germany.
19. นอร์มัลเฮกเซน ($C_6H_{14}$) ของบริษัท J.T. Baker, USA.
20. ไดคลอโรมีเธน ($CH_2Cl_2$) ของบริษัท Merck, Germany.
21. ไดเอธิลอีเทอร์ ($(C_2H_5)O$) ของบริษัท Merck, Germany.
22. อะซีโตน ($CH_3COCH_3$) ของบริษัท Merck, Germany.
23. แบคโตอการ์ (Bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
24. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous $Na_2SO_4$) ของบริษัท Merck, Germany.
25. ไซโคลเฮกซามีด (cyclohexamide) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

26. โทลูอีน($C_6H_5CH_3$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.

27. 1,4-ไดออกเซน ($OCH_2CH_2OCH_2CH_2$) Carlo ERBA, France.

# วิธีดำเนินงานวิจัย

## 3.1 แบคทีเรียและการเก็บรักษาแบคทีเรีย

### 3.1.1 กลุ่มแบคทีเรีย STK

เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิกสูง โดย ทิมากร แสงดำ (2547) แยกจากใบมะขาม โดยใช้แผ่น PTFE ที่เคลือบด้วยไพรีน ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยสามารถย่อยสลายไพรีนอย่างมีประสิทธิภาพ ในระหว่างการย่อยสลายนี้จะมีการสะสมสารมัธยันตร์บางชนิดเกิดขึ้น กลุ่มแบคทีเรีย STK ประกอบด้วยแบคทีเรียบริสุทธิ์ 3 สายพันธุ์ คือ *Zoogloea* sp., *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. ตามลำดับ

### 3.1.2 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

ถ่ายกลุ่มเชื้อ STK จากอาหารเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM) ลงในอาหารแข็ง CFMM ที่มีผลึกของไพรีนบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 8 วัน จากนั้นเขี่ยโคโลนีถ่ายลงในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีนความเข้มข้น 100 มล.ต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 วัน จากนั้นนำมาผสมกับกลีเซอรอลในอัตราส่วนเชื้อในอาหารเหลวต่อกลีเซอรอลปลอดเชื้อเท่ากับ 70:30 และ 50:50 แล้วบรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง สำหรับการเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ -70 °ซ และ -20 °ซ ตามลำดับ

## 3.2 การเจริญและวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายไพรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK

3.2.1 เตรียมหัวเชื้อของกลุ่มแบคทีเรีย โดยถ่ายกลุ่มเชื้อ STK จากหลอดแช่แข็ง ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มล. ที่เติมไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 10 วัน หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 10 นาที นำส่วนเซลล์แบคทีเรียมาล้างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ทำการปั่นเหวี่ยงในสภาวะเดิม โดยทำตามขั้นตอนนี้ 2 ซ้ำ นำส่วนเซลล์มาแขวนลอยในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % นำเซลล์แขวนลอยมาวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเจือจางให้มีค่าการ

ดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.05 นำเซลล์แขวนลอยที่ปรับความเข้มข้นแล้วมาเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้แบคทีเรียใช้อาหารสะสมที่เหลืออยู่ในเซลล์ให้หมด (Grifoll และคณะ, 1995) หลังจากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 90 มล. ซึ่งมีไพรีนความเข้มข้น 100 มก. ต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 8 วัน เพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย และวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายไพรีน

3.2.2 วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count โดยนำอาหารเหลวมาเจือจางด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.2.3 นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทเพื่อวัดปริมาณไพรีนที่เหลือและวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนโดยวิธี HPLC ทำโดยนำอาหารเหลวที่ทราบปริมาตรแน่นอนมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 2.0-3.0 โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นเติมเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลวผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นแยกส่วนเอธิลอะซีเตทเก็บไว้ ทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อซ้ำอีกครั้งหนึ่ง รวมส่วนเอธิลอะซีเตททั้งหมดเข้าด้วยกัน กำจัดน้ำที่ปนออกมาโดยการเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส จากนั้นนำส่วนเอธิลอะซีเตทไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุนจนได้ตะกอนของสารมัธยันตร์ เติมเมธานอลปริมาตร 1 มล. ลงไปละลายสารมัธยันตร์ในขวดก้นกลม กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตรใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็ก เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ และวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนโดยวิธี HPLC ต่อไป

3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลือและวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนโดยวิธี HPLC

เตรียมชุดสารมาตรฐานของไพรีนโดยละลายไพรีนในอาหารเหลว CFMM ให้ได้ความเข้มข้น 0-200 มก.ต่อลิตร จากนั้นสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทตามขั้นตอนในข้อ 3.2.3 นำสารมาตรฐานและชุดทดลองมาวิเคราะห์หาปริมาณไพรีนโดยวิธี HPLC ซึ่งมีส่วนประกอบและสภาวะต่างๆ ในระบบ ดังนี้

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

นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างไปคำนวณหาปริมาณไพรีนโดยใช้กราฟมาตรฐานที่ได้จากชุดสารมาตรฐาน กราฟมาตรฐานแสดงในภาคผนวก ค.

3.2.5 การวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนโดยวิธี TLC

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ที่ผ่านการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทดังวิธีในข้อ 3.2.3 ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตรมาจุดลงบนแผ่น TLC ขนาดกว้าง 8× 8 ซม. โดยใช้ระบบตัวทำละลาย (solvent system) เป็นโทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซิติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90:25:4 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจหาสารมัธยันตร์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร

## 3.3 การผลิตสารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ให้บริสุทธิ์โดยวิธีทางเคมี

3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย STK ก่อนลงถังหมัก

เตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ตามวิธีในข้อ 3.2.1

3.3.2 เลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ทำสารแขวนลอยเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.05 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ถ่ายลงในถังหมักที่มีอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 900 มล. มีไพรีน ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร โดยปรับสภาวะในถังหมักให้มีค่า

aeration เท่ากับ 1 vvm (ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที)

agitation เท่ากับ 300 รอบต่อนาที

pH เท่ากับ 7

อุณหภูมิ 30 °ซ

ทำการเก็บตัวอย่างจากถังหมักทุก 12 ชั่วโมง แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.3 เปรียบเทียบการผลิตสารมัธยันตร์ในถังหมักกับการผลิตสารมัธยันตร์ในขวดเขย่า (ข้อ 3.2.1)

3.3.3 การผลิตสารมัธยันตร์ให้ได้ปริมาณมากในถังหมัก

ขั้นตอนนี้เป็นการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 1 ลิตร จากในถังหมัก โดยเลือกเก็บช่วงเวลาที่มีการสะสมสารมัธยันตร์มากที่สุด นำมาสกัดด้วย เอธิลอะซีเตทเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.3 เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ จนกว่าจะนำมาทดลองในขั้นต่อไป

3.3.4 การแยกสารมัธยันตร์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative TLC

โดยนำสารละลายตัวอย่างในเมธานอลที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์มาจุดให้เป็นแนวลงบนแผ่น PLC ที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล 60 หนา 1 มม. โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ โทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซิติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90:25:4 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจหาสารมัธยันตร์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร จากนั้นขูดแถบของซิลิกาเจลที่มีตัวอย่างที่ต้องการออกมาสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทที่อิ่มตัวด้วยน้ำปริมาตร 250 มล. แยกส่วนเอธิลอะซีเตทเก็บไว้ ทำการสกัดผงซิลิกาเจลด้วยเอธิลอะซีเตทปริมาตร 250 มล. อีกครั้งหนึ่ง รวมส่วนเอธิลอะซีเตททั้งหมดเข้าด้วยกัน กำจัดน้ำที่ปนออกมาโดยการผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส นำส่วนเอธิลอะซีเตทไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุนจนได้ตะกอนของสารมัธยันตร์ เติมเมธานอลปริมาตร 5 มล. ลงไปละลายสารมัธยันตร์ในขวดลดปริมาตร กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่

I22873033

ลงในหลอดแก้วขนาดเล็ก เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ นำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารมัธยันตร์ด้วยวิธี TLC ดังวิธีการในข้อ 3.2.5 และวิธี HPLC ดังวิธีการในข้อ 3.2.4

3.3.5 การแยกสารมัธยันตร์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี linear gradient HPLC

นำสารมัธยันตร์ที่ได้จากข้อ 3.3.4 มาวิเคราะห์ด้วยวิธี linear gradient HPLC ใช้สารละลายเมทานอล 40 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำที่มีค่า pH 2.0-3.0 เพื่อให้สารบริสุทธิ์ยิ่งขึ้น โดยทำการวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐาน

## 3.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันตร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยแมสสเปกโตรเมทรี (MS)

3.4.1 นำสารมัธยันตร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วมาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดย MS ด้วยเทคนิค Electron Impact (EI) ที่ 70 eV เปรียบเทียบมวลโมกุลและรูปแบบการแตกตัวของสารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายไพรีนเทียบกับสารมาตรฐานต่างๆ

## 3.5 การวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนในดินโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK

แบ่งการศึกษาประสิทธิภาพของกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย STK เป็น 2 วิธี

3.5.1 การย่อยสลายไพรีนในดินโดยใช้ระบบ solid state

3.5.1.1 การเตรียมดิน

เก็บตัวอย่างดินมากพอจากบริเวณสวนผลไม้เขตธนบุรี ที่ไม่มีการปนเปื้อนจากสารเคมีมาก่อน โดยขุดดินลึกจากผิวประมาณ 15 ซม. แยกเศษใบไม้และหินออก ตรวจสอบการปนเปื้อนสาร PAHs โดยการสกัดด้วยไดคลอโรมีเธนปริมาตร 1 เท่าของตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 2 นาที นำตัวอย่างดินที่อยู่ในขวดแก้วไปจุ่มในอ่างกำเนิดเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแยกส่วนไดคลอโรมีเธนเก็บไว้ และสกัดตัวอย่างดินด้วยไดคลอโรมีเธนซ้ำอีก 2 ครั้ง รวบรวมส่วนไดคลอโรมีเธนทั้งหมด ทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน ละลายไพรีนที่เหลืออยู่ในขวดลดปริมาตรด้วยเมธานอล 1 มิลลิลิตร (ซึ่งวิธี

สกัดดัดแปลงมาจากวิธีของ Juhasz และคณะ, 1997) และวิเคราะห์ด้วย HPLC แบ่งดินประมาณ 0.5 กิโลกรัม ไปวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมี ส่วนดินที่เหลือนำมาคัดกรอง โดยใช้เครื่องคัดกรองขนาดดินเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.18 มิลลิเมตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จนกว่าจะทำการทดลอง และเมื่อเริ่มต้นทดลองจะนำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนที่จะนำมาใช้ในการทดลอง

3.5.1.2 ศึกษาลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดิน

นำตัวอย่างดิน 0.5 กิโลกรัม ส่งวิเคราะห์ที่ฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เพื่อวิเคราะห์

ลักษณะเนื้อดิน

ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุหรือไอออน (cation exchange capacity)

ความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ (maximum water holding capacity)

และภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน เพื่อวิเคราะห์

ค่าความเป็นกรดด่าง

ปริมาณไนโตรเจน

ปริมาณฟอสฟอรัส

ปริมาณโพแทสเซียม

สารอินทรีย์

สารอินทรีย์คาร์บอน

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

โดยทำการวิเคราะห์เพื่อจำแนกลักษณะและส่วนประกอบของดินที่นำมาใช้ในการทดลอง

3.5.1.3 ศึกษาการเจริญและวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายไพรีนในดินโดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย STK

3.5.1.3.1 เตรียมหัวเชื้อ STK วิธีเตรียมเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.1 แล้วถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 90 มล. ที่มีไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1 นำเซลล์แขวนลอยที่ปรับความเข้มข้นแล้วมาเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้แบคทีเรียใช้อาหารสะสมที่เหลืออยู่ในเซลล์ให้หมด (Grifoll และคณะ, 1995)

3.5.1.3.2 นำดินที่เตรียมไว้มาบรรจุในขวดแก้ว (vial) ปลอดเชื้อขนาด 23 x 85 มิลลิเมตร มีฝาเกลียวปิด แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุด

ชุดการทดลองที่ 1 ใช้ดินปลอดเชื้อ เป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาการย่อยสลายไพรีนเมื่อปราศจากการเติมเชื้อแบคทีเรียและปราศจากปัจจัยชีวภาพจากดิน ใช้ดิน 2 กรัม บรรจุในขวดแก้วฝาเกลียว นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 45 นาที วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกัน ทดสอบความปลอดเชื้อของดินก่อนนำมาใช้ในการทดลองโดย เพาะเชื้อจากดินบนอาหารแข็ง LB (Luria Bertani, LB agar) เตรียมชุดการทดลองทั้งหมด 16 หลอด สำหรับเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน ครั้งละ 2 หลอด เป็นเวลา 1 เดือน นำตัวอย่างมาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อกำจัดน้ำออก จากนั้นสกัดด้วยไดคลอโรมีเธนตามวิธีข้อ 3.5.1.1

ชุดการทดลองที่ 2 ใช้ดินปลอดเชื้อผสมกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย STK เพื่อศึกษาการย่อยสลายไพรีนโดยเชื้อเพียงอย่างเดียว ใช้ดิน 2 กรัม บรรจุในขวดแก้วฝาเกลียว แล้วนำไปฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 เตรียมชุดการทดลองทั้งหมด 48 หลอด สำหรับเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน ครั้งละ 2 หลอด เป็นเวลา 1 เดือน นำตัวอย่างมาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อกำจัดน้ำออก จากนั้นสกัดด้วยไดคลอโรมีเธนตามวิธีข้อ 3.5.1.1 และอีก 1 หลอดนำไปตรวจนับแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนตามวิธีในข้อ 3.2.2

ชุดการทดลองที่ 3 ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย STKเพื่อศึกษาการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย STK เมื่อมีปัจจัยทางชีวภาพจากดิน โดยวิธีการเตรียมดินเหมือนชุดทดลองที่ 2 สำหรับเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน ครั้งละ 2 หลอด เป็นเวลา 1 เดือน นำตัวอย่างมาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อกำจัดน้ำออก จากนั้นสกัดด้วยไดคลอโรมีเธนตามวิธีข้อ 3.5.1.1 และอีก 1 หลอดนำไปตรวจนับแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนตามวิธีในข้อ 3.2.2

เมื่อเตรียมดินในชุดการทดลองปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อทั้ง 3 ชุดแล้ว เติมไพรีนในรูปสารละลายในอะซีโตน โดยให้มีความเข้มข้น 1.0 มก.ต่อดิน 1 กรัม (นารีรัตน์ เจริญช่าง, 2544) จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืนเพื่อให้อะซีโตนระเหยหมดไป จากนั้นเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย STK ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 ในชุดการทดลอง 2 แล 3 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสม หลังจากนั้นปรับความชื้นของดินให้มีค่าเท่ากับ 80% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ โดยเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปในชุดการทดลองต่างๆ ให้มีน้ำหนักตรงกับค่าที่คำนวณจากความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำที่ได้จาก

การวิเคราะห์ในชุดการทดลอง จากนั้นผสมดินในขวดด้วยการปั่นบนเครื่องปั่นผสมอีกครั้ง นำขวดไปบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °ซ ในที่มืด คลายเกลียวฝาหลอดทุกสัปดาห์เพื่อให้อากาศ (นารีรัตน์ เจริญช่าง, 2544) เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน โดยเก็บตัวอย่างละ 2 ขวดจากชุดการทดลองทั้ง 4 นำตัวอย่างมาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อกำจัดน้ำออก จากนั้นสกัดด้วยไดคลอโรมีเธน ตามวิธีข้อ 3.5.1.1 และวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่และสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี HPLC

3.5.1.4 วิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนในดินโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยวิธี HPLC และ TLC ใช้วิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4 และ 3.2.5

3.5.2 การย่อยสลายไพรีนในดินโดยใช้ระบบ slurry อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1 : 8 (กรัมต่อมล.) (รุจา สารคุณ, 2548)

3.5.2.1 การเตรียมดิน

ใช้ตัวอย่างดินอย่างเดียวกับข้อ 3.5.1.1 ที่ได้ทำการวิเคราะห์ค่าต่างๆ ไว้แล้วตามหัวข้อ 3.5.1.2

3.5.2.2 ศึกษาการเจริญและวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายไพรีนในดินในระบบ slurry โดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย STK

3.5.2.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ STK วิธีเตรียมเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.1 แล้วถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 90 มล. ที่มีไพรีนความเข้มข้น 100 มก. ต่อลิตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1 นำเซลล์แขวนลอยที่ปรับความเข้มข้นแล้วมาเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้แบคทีเรียใช้อาหารสะสมที่เหลืออยู่ในเซลล์ให้หมด (Grifoll และคณะ, 1995)

3.5.2.2.2 นำดินที่เตรียมไว้มาบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. ปลอดเชื้อ แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 2 ชุด

ชุดการทดลองที่ 1 ใช้ดินปลอดเชื้อ เป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาการย่อยสลายไพรีนเมื่อปราศจากการเติมเชื้อแบคทีเรีย ชั่งดิน 2 กรัม บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. นำไปฆ่าเชื้อ

ด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 45 นาที วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกัน ทดสอบความปลอดเชื้อของดินก่อนนำมาใช้ในการทดลองโดย เพาะเชื้อจากดินบนอาหารแข็ง LB (Luria Bertani, LB agar) เตรียมชุดการทดลองทั้งหมด 6 ขวด สำหรับเก็บตัวอย่างวันที่ 0 ,2 ,4 ,6 ,8 และ 10 นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เพื่อแยกส่วนดินกับน้ำ สกัดตัวอย่างแยกส่วนวัฏภาคดินกับวัฏภาคน้ำ โดยส่วนของวัฏภาคดินสกัดด้วยไดคลอโรมีเธนตามวิธีข้อ 3.5.1.1 และส่วนวัฏาคน้ำสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทตามวิธีข้อ 3.2.3

ชุดการทดลองที่ 2 ใช้ดินปลอดเชื้อเช่นเดียวกับชุดควบคุมผสมกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย STK เพื่อศึกษาการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย STK ชั่งดิน 2 กรัม บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. แล้วนำไปฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 เตรียมชุดการทดลองทั้งหมด 12 ขวด สำหรับเก็บตัวอย่างวันที่ 0 ,2 ,4 ,6 ,8 และ 10 นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงและสกัดแยกส่วนวัฏภาคดินกับวัฏภาคน้ำ ตามวิธีในชุดทดลองที่ 1 และอีก 1 ขวดนำไปตรวจนับแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนตามวิธีในข้อ 3.2.2

เมื่อเตรียมดินในชุดการทดลองทั้ง 2 ชุดแล้ว เติมไพรีนในรูปสารละลายอะซีโตน โดยให้มีความเข้มข้น 1.0 มก.ต่อดิน 1 กรัม จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืนเพื่อให้อะซีโตนระเหยหมดไป ทำการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย STK เฉพาะในชุดการทดลอง 2 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสม หลังจากนั้นทำการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปให้มีอัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:8 นำขวดไปบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °ซ เก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0 ,2 ,4 ,6 ,8 และ 10 นำมาสกัดแยกส่วนวัฏภาคดินกับวัฏภาคน้ำ ตามวิธีในชุดทดลองที่ 1 และวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่และสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี HPLC

### 3.6 การทดสอบความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารมัธยันตร์ในแบคทีเรียโดยวิธีของ Ame (Maron และ Ames, 1983)

การทดสอบเอมส์เป็นการทดสอบการกลายพันธุ์แบบย้อนกลับ (Backward or reverse mutation) ในแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* เนื่องจากแบคทีเรียที่นำมาเป็นเครื่องมือของการทดลองถูกทำให้กลายพันธุ์ไปจนไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนฮีสทีดีนได้ แบคทีเรียจะไม่เจริญในอาหารที่ขาดกรดอะมิโนฮีสทีดีน เรียกว่า Histidine dependent ใช้สัญลักษณ์ *his*$^-$ สารที่

นำมาทดสอบสามารถทำให้แบคทีเรียกลายพันธุ์ไปสร้างกรดอะมิโนฮีสทีดีนได้อีกครั้งหนึ่ง การกลายพันธุ์ครั้งที่สองนี้จึงเป็นการย้อนกลับของการกลายพันธุ์ครั้งแรก

การวิเคราะห์สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อในงานวิจัยนี้แบ่งการทดสอบออกเป็น 2 ระบบ คือ ระบบแรก เป็นการทดสอบความเป็นสารก่อกลายพันธุ์โดยผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม คือ ระบบนี้เป็นการเกิดความเป็นพิษต่อร่างกายได้โดยต้องอาศัยการกระตุ้นของเอนไซม์และโคแฟคเตอร์ที่อยู่ในเซลล์ เนื่องจากการทดลองนี้ใช้แบคทีเรียในการทดสอบ ซึ่งแบคทีเรียไม่มีระบบกระตุ้นดังกล่าว เพราะฉะนั้นจึงได้มีการเติมเอนไซม์ลงไปในการทดลองด้วย เพื่อให้สารก่อกลายพันธุ์ถูกกระตุ้นให้เกิดปฏิกริยาได้โดยเอนไซม์ที่พบเหมือนในร่างกายมนุษย์ ดังนั้นการทดสอบระบบแรกนี้เป็นการจำลองสถานการณ์เมแทบอลิซึมสารพิษจนสามารถเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอให้ผิดปกติได้เหมือนกับที่อาจเกิดในร่างกายมนุษย์ และแบบที่ 2 เป็นการทดสอบความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม คือความเป็นพิษของสารสามารถเกิดขึ้นเองได้โดยไม่ต้องอาศัยการกระตุ้นจากระบบเอนไซม์และโคแฟคเตอร์จากเซลล์

3.6.1 การทดสอบความเป็นสารก่อกลายพันธุ์โดยผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม

3.6.1.1 การเตรียมแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* (ได้มีการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1-6) ในงานวิจัยนี้ใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 (ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันมะเร็ง แห่งชาติ) โดยทำการถ่ายเชื้อแต่ละสายพันธุ์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากหลอดแช่แข็ง -80 °ซ ลงในอาหารเหลว Oxoid No.2 (ภาคผนวก ก. หมายเลข 5) ปริมาตร 12 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในอ่างน้ำร้อน เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 ชม. เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ 1-2 × $10^8$ CFU ต่อ มล. ก่อนนำไปใช้ในการทดสอบ

3.6.1.2 การเตรียมอาหารแข็งสำหรับการทดสอบความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ ซึ่งอาหารหลักที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย

Minimal glucose agar (MGA) ที่ปลอดเชื้อ ที่มีส่วนประกอบของวุ้น 1.5 % และ Vogel Boner salt 50 เท่า เท MGA ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อ (รายละเอียดวิธีการเตรียมดูในภาคผนวก ก. หมายเลข 6)

Top agar ประกอบด้วยวุ้น 0.6 % และ NaCl 0.5 % นึ่งฆ่าเชื้อและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะนำมาใช้ (รายละเอียดวิธีการเตรียมดูในภาคผนวก ก. หมายเลข 8)

3.6.1.3 การเตรียมส่วนผสมของเอนไซม์ S9

ส่วนผสมของเอนไซม์ S9 ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้สามารถสกัดได้จากตับของหนูตัวผู้ เป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบความเป็นสารก่อกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็งในการทดสอบที่ต้องผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม การเตรียมส่วนผสมของเอนไซม์ S9 ประกอบด้วย เอนไซม์ S9 จากหลอดแช่แข็ง -80 °ซ มาละลายที่อุณหภูมิห้อง ,ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, สารละลาย NADP ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์, สารละลายกลูโคส-6-ฟอสเฟต (glucose-6-$PO_4$) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 0.16 โมลาร์ (ดูรายละเอียดส่วนผสมในภาคผนวก ก. หมายเลข 12) ส่วนผสมทั้งหมดควรจะเตรียมแล้วนำไปใช้ในการทดลองทันที

3.6.1.4 การทดสอบความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อใน *Salmonella typhimurium* TA 98 และ TA 100

นำสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.3 จากตู้แช่แข็ง -4 °ซ มาทำการเจือจางให้ได้ปริมาณ 2.5, 5.0, 10.0 และ 20.0 ไมโครกรัมต่อเพลท โดยนำตัวอย่างสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณต่างๆ ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 0.1 มล. ถ่ายลงในหลอดปราศจากเชื้อที่ประกอบด้วย ส่วนผสมของเอนไซม์ S9 ปริมาตร 0.5 มล. จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวมาแล้ว 14 ชม. ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ปริมาตร 0.1 มล. ลงในหลอดเดิม ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำร้อน 37 °ซ เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเติม Top agar ที่หลอมเหลวแล้วซึ่งมีส่วนประกอบของฮีสทีดีนและไบโอตินความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 9) ลงไปผสมให้เข้ากัน และเททับลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGA ตั้งทิ้งไว้จนวุ้นแข็ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ ในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ได้ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ วิธีการทดลองสามารถเขียนเป็นไดอะแกรมดังรูปที่ 3.1

3.6.2 การทดสอบความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองโดยไม่ผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม

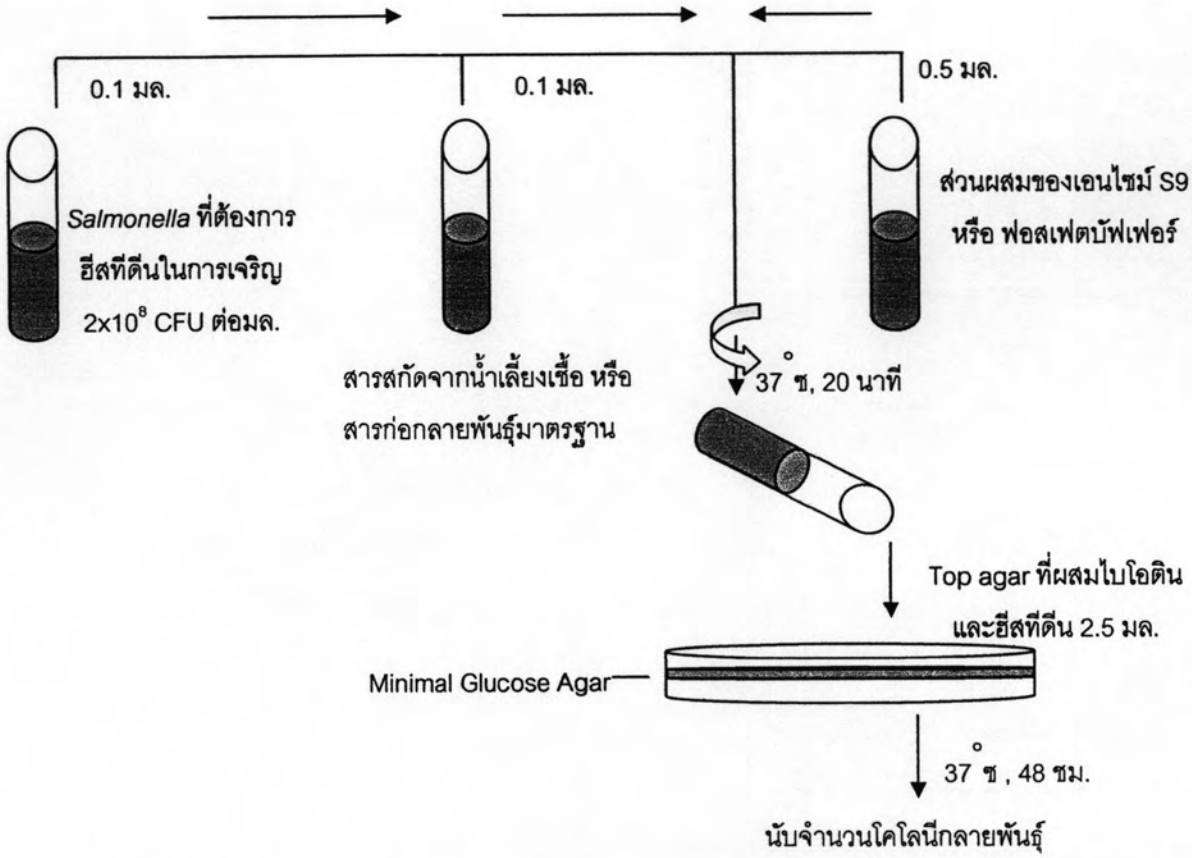
3.6.2.1 การเตรียมแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* (ได้มีการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1 ถึง 6 ) วิธีการเตรียมเชื้อทำเช่นเดียวกันกับข้อ 3.6.1.1

3.6.2.2 การเตรียมอาหารแข็งสำหรับการทดสอบความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ ซึ่งอาหารหลักที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย MGA และ Top agar เช่นเดียวกับข้อ 3.6.1.2

3.6.2.3 การทดสอบความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อใน *Salmonella typhimurium* TA 98 และ TA 100

นำสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.3 จากตู้แช่แข็ง -4 °ซ มาทำการเจือจางให้ได้ปริมาณ 2.5, 5.0, 10.0 และ 20.0 ไมโครกรัมต่อเพลท โดยนำตัวอย่างสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณต่างๆ ที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.1 มล. ถ่ายลงในหลอดปราศจากเชื้อที่ประกอบด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มล. จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวมาแล้ว 14 ชม. ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ปริมาตร 0.1 มล. ลงในหลอดเดิม ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำร้อน 37 °ซ เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเติม Top agar ที่หลอมเหลวแล้วซึ่งมีส่วนประกอบของฮีสทีดีนและไบโอตินความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 9) ลงไปผสมให้เข้ากัน และเททับลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGA ตั้งทิ้งไว้จนวุ้นแข็ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ ในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ได้ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ วิธีการทดลองสามารถเขียนเป็นไดอะแกรมดังรูปที่ 3.1

หมายเหตุ : ในการทดสอบความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ต้องทำเปรียบเทียบกับสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้ เบนโซ(เอ)ไพรีน เป็นตัวแทนของสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานที่ต้องผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม และ 2-(2-ฟูริล-3-(5-ไนโตร-2-ฟูริล) อะคริลาไมด์ เป็นตัวแทนของสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่ต้องผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม




**รูปที่ 3.1 ไดอะแกรมแสดงวิธีการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ**