บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท Mettler-Toledo, Switzerland.
2. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท Mettler-Toledo, Switzerland.
3. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น MLS 3020 ของบริษัท SANYO, Japan.
4. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany.
5. ตู้อบแห้ง (Oven) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand
6. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ของบริษัท Memmert, Germany.
7. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO Laminar flow รุ่น BVT-124 ของบริษัท International Scientific Supply, USA. และ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
8. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 4330 บริษัท New Brunswick Scientific, USA
9. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ –20 $^{\circ}$ ซ ของบริษัท Sanyo Electric, Japan
10. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ –70°ซ รุ่น ULT1786 ของบริษัท Forma Scientific, USA
11. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys20 บริษัท Thermospectonic, Japan
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.
13. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
14. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France.
15. ปิเปต (pipette) ขนาด 10 และ 15 มิลลิลิตร ของบริษัท Gilson, France
16. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan

17. ขวดแก้วฝาเกลียว (vial) ขนาด 22 ml (Screw cap with teflon finer) ของบริษัท Lab System , Thailand.
18. กระดาษกรอง Whatman filter paper
19. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดพอลิเตตระฟลูออโรเอธิลีน (PTFE) ขนาดช่อง 0.22 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
20. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
21. เครื่องคนแม่เหล็กชนิดให้ความร้อน
22. เครื่องคนแม่เหล็ก
23. เครื่องทำน้ำขจัดไอออน (Millipore ZMQS5V00Y)
24. ชุดเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC)
    - เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น 6890N ของบริษัท Agilent Technologies, USA
    - คอลัมน์ (column) ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วย เฟนนิลเมธิลไซโลเซน ความเข้มข้น 5 % หนา 0.25 ไมโครเมตร
    - เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิด Frame Ionization Detector (FID)
    - เข็มฉีดยาขนาดเล็ก (microsyrings) ขนาด 10 ไมโครลิตร

3.2 เคมีภัณฑ์

1. โซเดียมอัลจิเนต (alginic acid sodium salt) ของบริษัท Fluka, Norway.
2. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
3. โซเดียมซิเตรดไดไฮเดรต ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany.
4. ฟีแนนทรีน (phenanthrene) ของบริษัท Sigma, USA.
5. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
6. ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (CH_3SOCH_3) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
7. แบคโตอะการ์ (bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
8. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
9. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
10. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.

11. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮฟตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
12. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) ของบริษัท May & Baker, England.
13. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
14. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
15. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
16. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany.
17. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany.
18. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท Merck, Germany.
19. โซเดียมอะซีเตต (CH_3COONa) ของบริษัท Merck, Germany.
20. สารปฏิชีวนะนิสเตติน (nystatin) ของบริษัท Bio Basic INC., Canada.
21. เมธานอล (CH_3OH) ของบริษัท Merck, Germany.
22. นอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) ของบริษัท J.T. Baker, USA.

3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 การเพาะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ คือ กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ซึ่งแยกได้จากใบจามจุรี ประกอบด้วยกลุ่มแบคทีเรียได้อย่างน้อย 7 ชนิด ซึ่งผลทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีสามารถจัดอยู่ใน 4 สกุล ได้แก่ *Comamonas*, *Rugamonas*, *Flavimonas*, *Pseudomonas* โดยเป็นแกรมลบทั้งหมด กลุ่มแบคทีเรียนี้มีความสามารถย่อยสลายไพรีนได้หมดภายใน 14 วัน นอกจากนี้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ยังสามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นได้อีกหลายชนิด โดยสามารถลดปริมาณของอะซีแนพธีน ฟลูออรีน ฟีแนนทรีนและฟลูออแรนทีนได้เป็นจำนวน 100, 98, 99 และ 34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภายในเวลา 14 วัน ที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (จิรทีปฆ์ แสนรัก, 2547)

เพาะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเหลว CFMM (carbon-free mineral medium) (Supaka และคณะ, 2001) ที่เติมไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในรูปสารละลายในไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์และล้างด้วยน้ำปลอดประจุสองครั้ง จากนั้นชะส่วนตะกอนเซลล์ในน้ำปลอดประจุนำสารแขวนลอยที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ปรับให้ได้ค่าการดูดกลืนเท่ากับ 1 ซึ่งมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียประมาณ 8 log CFU/มิลลิลิตร เพื่อนำหัวเชื้อที่ได้ไปใช้ในการตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตต่อไป

3.2 ตรึงกลุ่มแบคทีเรียด้วยอัลจิเนต

3.2.1 การเตรียมอัลจิเนต

เตรียมอัลจิเนตให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรือ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำปลอดประจุ จากนั้นนำของผสมไปทำให้ปลอดเชื้อโดยนึ่งที่

ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ควรเตรียมอัลจิเนตไว้ก่อนการทดลองประมาณ 2 วัน เพื่อให้เจลละลายจนเป็นเนื้อเดียวกันอย่างสมบูรณ์

3.2.2 การตรึงเซลล์ในอัลจิเนต

นำกลุ่มแบคทีเรียจำนวน 8 log CFU/มล. ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.3 ดูดมาให้มีปริมาตรเป็นหนึ่งเท่าของปริมาตรสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นที่ต้องการ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นกวน (vortex) จากนั้นหยดของผสมด้วยพลาสเจอร์ปิเปตลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสซึ่งจะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้ หนึ่งหยดมีปริมาตร 35 ไมโครลิตร ระวังไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้นในเม็ดอัลจิเนตทั้งก่อนหยด ขณะที่หยดกวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กอย่างช้าและกวนต่อเนื่องอีกเป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดการจำลองเม็ดอัลจิเนตอย่างสมบูรณ์ เม็ดอัลจิเนตสมบูรณ์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร และมีเซลล์แบคทีเรียถูกตรึงอยู่ภายในเม็ดอัลจิเนต

3.3 ภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์

หาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์โดยแปรผันปัจจัยดังต่อไปนี้

3.3.1 ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตเท่ากับ 2% น้ำหนักต่อปริมาตร, 4% น้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีข้อ 3.2.1.1

3.3.2 ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ เท่ากับ 0.05, 0.1และ 0.2 โมลาร์

3.3.3 ปริมาณเซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 8 และ 10 log CFU/มิลลิลิตร

จากนั้นนำเม็ดอัลจิเนตไปทดสอบการคงอยู่ของกลุ่มแบคทีเรียในเม็ดอัลจิเนตตามวิธีในข้อ 3.4.1 และหาจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตตามวิธีข้อ 3.9.1

3.4 การคงอยู่ของกลุ่มแบคทีเรียในเม็ดอัลจิเนตและเสถียรภาพ (Stability) ของกลุ่มแบคทีเรียตรึง

3.4.1 การคงอยู่ของกลุ่มแบคทีเรียในเม็ดอัลจิเนต

เม็ดอัลจิเนตอัลจิเนตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จำนวน 1 กรัม บันทึกจำนวนเม็ดอัลจิเนต นำเม็ดอัลจิเนตใส่ลงในขวดรูปชมพู่ซึ่งบรรจุอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดด้วย

จุกสำลีพันพาราฟินให้แน่นป้องกันการระเหยของอาหารในระหว่างการทดลอง จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในวันที่ 0, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน สังเกตลักษณะและขนาดของเม็ดอัลจิเนตด้วยตาเปล่า นับจำนวนเม็ดอัลจิเนตที่ยังคงสภาพเดิมอยู่ และตรวจวัดจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต ด้วยวิธี viable plate count ตามวิธีในข้อ 3.9.1

3.4.2 เสถียรภาพของกลุ่มแบคทีเรียตรึง

นำเม็ดอัลจิเนตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสใน 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ เป็นระยะเวลา 0, 1 และ 3 เดือน ตรวจสอบลักษณะและขนาดของเม็ดอัลจิเนตหาจำนวนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งในและนอกเม็ดอัลจิเนตด้วยวิธี viable plate count ตามวิธีในข้อ 3.9.1 และวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีนตามวิธีในข้อ 3.9.2

3.5 การย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีนด้วยกลุ่มแบคทีเรียตรึง

การย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ตรึงในอัลจิเนตโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุด ดังต่อไปนี้

ชุดควบคุม ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อเติมไพรีนและฟีแนนทรีน เพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพต่อการลดลงของไพรีน/ฟีแนนทรีน

ชุดทดลองที่ 1 ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด จำนวน 8 log CFU/มล. และไพรีน/ฟีแนนทรีน ความเข้มข้นชนิดละ 50 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อศึกษาการลดลงของไพรีน/ฟีแนนทรีนโดยกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมสด

ชุดทดลองที่ 2 ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ อัลจิเนตที่มีแบคทีเรียตรึง 1 กรัมมีแบคทีเรียประมาณ 8 log CFU/กรัมเม็ดอัลจิเนต และไพรีน/ฟีแนนทรีน ความเข้มข้นชนิดละ 50 มิลลิกรัม/ลิตร

ทุกชุดการทดลองทำในอาหารเหลว CFMM จำนวน 5 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในวันที่ 0 , 1, 3, 5, 7 วัน วิเคราะห์จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ตรึงอยู่ในอัลจิเนตตามวิธีในข้อ 3.9.1 ทุกชุดการทดลองทำสามซ้ำวิเคราะห์ปริมาณไพรีน/ฟีแนนทรีน ที่เหลืออยู่โดยเติม *n*-เฮกเซน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม

สารประมาณ 2 นาที และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นน้ำและเฮกเซน จากนั้นนำส่วนน้ำออกจากชั้นของเฮกเซนด้วยการเติม anhydrous Na_2SO_4 ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ทำซ้ำอีกครั้งในคอลัมน์ที่มี anhydrous Na_2SO_4 นำส่วนของ *n*-เฮกเซน กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป PTFE ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ตามวิธีของ Luepromchai และคณะ (2007)

3.6 การใช้ซ้ำกลุ่มแบคทีเรียตรึง

แยกเม็ดอัลจิเนตที่ใช้แล้วจากข้อ 3.5 ในภาวะปลอดเชื้อ ล้างด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ นำเม็ดอัลจิเนตใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว CFMM 5 มิลลิลิตร พร้อมกับเติมไพรีน/ฟีแนนทรีนความเข้มข้นชนิดละ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ความเข้มข้นเท่ากับเมื่อเริ่มต้นการทดลอง) เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันที่ 1 และ 3 หาจำนวนของแบคทีเรียในอัลจิเนตและปริมาณไพรีน/ฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ ทำซ้ำขั้นตอนนี้หลายครั้ง และเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพเซลล์ตรึงด้วยอัลจิเนตที่ใช้ซ้ำในการย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน

3.7 การศึกษาเซลล์แบคทีเรียตรึงในเม็ดอัลจิเนต

ศึกษาเม็ดอัลจิเนตที่มีและไม่มีแบคทีเรียตรึง โดยการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอน ขั้นตอนนี้ดำเนินการโดย ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีขั้นตอนโดยย่อคือ ผ่าแยกเม็ดอัลจิเนตเป็นสองส่วนด้วยใบมีดปลอดเชื้อเพื่อศึกษาพื้นผิวภายในและภายนอก รวมทั้งดูลักษณะการยึดเกาะของกลุ่มแบคทีเรีย ต่อไปจึงทำการตรึงตัวอย่างด้วย 1% ออสเมียมเตตรอกไซด์ ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบ 2 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที และทำการขจัดน้ำออกด้วยเอทานอลเป็นเวลา 10 นาที 3 ครั้ง ทำให้แห้งด้วยเครื่อง Balzers model CPD 020 จากนั้นนำตัวอย่างมาติดที่แท่นทองด้วยน้ำยาทาเล็บแล้วนำตัวอย่างไปเคลือบด้วยทองคำ สุดท้ายจึงนำตัวอย่างที่ได้ไปถ่ายภาพโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope รุ่น JEOL, model JSM-5410LV เพื่อดูการเกาะของแบคทีเรียในอัลจิเนต

3.8 การบำบัดในน้ำเสียจากห้องปฏิบัติการ

ใช้น้ำเสียจากห้องปฏิบัติการโดยแยกส่วนน้ำและตะกอนออกจากกัน นำส่วนน้ำมาใช้ในการทดลองโดยใช้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมสารปฏิชีวนะนิสเตติน (nystatin) ความเข้มข้นสุดท้าย 40 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อยับยั้งรา จากนั้นจึงนำกลุ่มแบคทีเรียตรึงด้วยอัลจิเนตซึ่งเตรียมในภาวะที่ดีที่สุดมาใช้บำบัดน้ำเสียจากห้องปฏิบัติการโดยแบ่งการทดลองออกเป็นชุดดังนี้

ชุดควบคุม ประกอบด้วย น้ำเสียจากห้องปฏิบัติการ 5 มิลลิลิตรที่มีสารปฏิชีวนะนิสเตติน (nystatin) ความเข้มข้นสุดท้าย 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพต่อการลดลงของสารที่อยู่ในน้ำเสียจากห้องปฏิบัติการ

ชุดทดลองที่ 1 ประกอบด้วย น้ำเสียจากห้องปฏิบัติการ 5 มิลลิลิตรที่มีสารปฏิชีวนะนิสเตติน (nystatin) ความเข้มข้นสุดท้าย 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลุ่มแบคทีเรียตรึงในอัลจิเนต จำนวน 1 กรัม ซึ่งมีเซลล์ประมาณ 10^8 CFU/กรัมเม็ดอัลจิเนต

ชุดทดลองที่ 2 ประกอบด้วย น้ำเสียจากห้องปฏิบัติการ 5 มิลลิลิตรที่มีสารปฏิชีวนะนิสเตติน (nystatin) ความเข้มข้นสุดท้าย 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลุ่มแบคทีเรียเตรียมสดมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^8 CFU/ มิลลิลิตร

ทุกการทดลองทำสามซ้ำ นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในวันที่ 0 , 1, 3, 5, 7, 14, 21 วัน วิเคราะห์จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ตรึงอยู่ในอัลจิเนตตามวิธีในข้อ 3.9.1 และวิเคราะห์ปริมาณไพรีน/ฟีแนนทรีนที่หลงเหลืออยู่ตามวิธีในข้อ 3.9.2 รวมทั้งศึกษาเซลล์แบคทีเรียตรึงในเม็ดอัลจิเนตก่อนและหลังบำบัดโดยใช้เทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM) ตามวิธีในข้อ 3.7

3.9 การวิเคราะห์

3.9.1 วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count

วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count โดยวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียในอาหารเหลว ดูดเซลล์ที่แขวนลอย 0.1 มิลลิลิตร เจือจางด้วย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ นำค่าความเจือจางที่เหมาะสมมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria Bertani (LB) (ภาคผนวก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในช่วง 30-300 โคโลนี คำนวณค่า CFU ต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่ตรึงอยู่ในอัลจิเนตตามวิธีของ Tsen และ

คณะ (2003) โดยนำเม็ดอัลจิเนตที่ได้จากข้อ 2.2 ล้างด้วย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ 2 ครั้ง ชั่งเม็ดอัลจิเนตโดยซับส่วนของน้ำซึ่งติดมากับเม็ดอัลจิเนตบนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จนไม่มีน้ำหลงเหลืออยู่บนกระดาษกรอง จากนั้นชั่งน้ำหนักของเม็ดอัลจิเนตประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในขวดฝาเกลียว ละลายเม็ดอัลจิเนตด้วยสารละลาย 1% โซเดียมซิเตรต (น้ำหนักต่อปริมาตร) ค่า pH 7.0 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง จนเม็ดอัลจิเนตละลายอย่างสมบูรณ์ใช้เวลาประมาณ 30 นาที เจือจางแบคทีเรียโดยวิธี 10-fold dilution วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count ตามที่ได้กล่าวมาข้างต้น คำนวณเป็นค่า CFU ต่อกรัมอัลจิเนต

3.9.2 วิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีน

วิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ตามวิธีที่ได้ดัดแปลงจากวิธีของ Luepromchai (2007) โดยเติมนอร์มอลเฮกเซน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นนำไปแช่เยือกแข็งนาน 24 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดการแยกระหว่างวัฏภาคน้ำและเฮกเซน นำชั้นเฮกเซนมาเติม anhydrous Na_2SO_4 ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสข้ามคืนและทิ้งไว้ให้เย็นเพื่อกำจัดน้ำ นำส่วนของนอร์มอลเฮกเซน กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร

วิเคราะห์สารที่สกัดได้ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี โดยชุดเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น 6890N (บริษัท Agilent Technologies, USA) คอลัมน์ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนนิลเมธิลไซโลเซน ความเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร เครื่องตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID)

วิเคราะห์ภายใต้สภาวะดังนี้

อุณหภูมิเริ่มต้น 120 °ซ

อุณหภูมิขั้นที่ 1	25°ซ	ต่อนาที	จนอุณหภูมิ 160°ซ	คงไว้	3 นาที
อุณหภูมิขั้นที่ 2	6°ซ	ต่อนาที	จนอุณหภูมิ 220°ซ	คงไว้	2 นาที
อุณหภูมิขั้นที่ 3	40°ซ	ต่อนาที	จนอุณหภูมิ 300°ซ	คงไว้	2 นาที

โดยใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาไหลด้วยอัตราเร็ว 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที