บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีที่จำเป็นในการทดลอง

3.1.1 กลีเซอรอล (Glycerol) Fisher chemical, ประเทศอังกฤษ

3.1.2 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) Carlo Erba Reagent, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.3 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) Merck, ประเทศเยอรมัน

3.1.4 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) Fluka Chemika, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.1.5 สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) Scharlau, ประเทศสเปน

3.1.6 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) Merck, ประเทศเยอรมัน

3.1.7 กรดซิตริก (Citric acid) AnalaR®, ประเทศอังกฤษ

3.1.8 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) Merck, ประเทศเยอรมัน

3.1.9 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) Carlo Erba Reagent, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.10 โคบอลต์ (II) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) Fluka Chemika, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.1.11 แมงกานีส (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) Univar, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.12 กลูโคส (glucose) Fluka Chemika, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.1.13 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) Carlo Erba Reagent, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.14 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไตรไฮเดรต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) Carlo Erba Reagent, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.15 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) Carlo Erba Reagent, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.16 เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) Univar, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.17 เปปโตน (peptone) Srichem, ประเทศจีน

3.1.18 สารสกัดเนื้อ (meat extract) Biomark, ประเทศจีน

3.1.19 สารละลายแร่ธาตุ (trance element solution)

3.1.20 วุ้น (Agar)

3.1.21 ซีสเตอีน-ไฮโดรคลอริก (cysteine-HCl)

3.1.22 คาเซอิน เปปโตน (casein peptone)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 หลอดดูดจ่ายสารละลาย (Microcentrifuge Tube)

3.2.2 ทิปสำหรับเครื่องดูดจ่ายสาร (Micropipette Tip)

3.2.3 เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Micropipette) ยี่ห้อ ViPro บริษัท Vivantis Technologies, USA

3.2.4 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บริษัท BINDER, Germany

3.2.5 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Incubation Shaker)

3.2.6 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งรุ่น TE214S บริษัท Sartorius Weighing Technology, Germany

3.2.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับตกตะกอนตัวอย่าง (Microcentrifuge) รุ่น 16M บริษัท Labnet International, USA

3.2.8 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) บริษัท VELP Scientific, Italy

3.2.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 10S UV-Vis บริษัท Thermo Fisher Scientific, USA

3.2.10 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) บริษัท Memmert, Germany

3.2.11 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH Meter)

3.2.12 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) บริษัท Hirayama, Japan

3.2.13 ตู้ลามิน่าร์ (Laminar Air Flow Carbinet) บริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand

3.1.14 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงธรรมดา (Compound Light Microscope) ยี่ห้อ OLYMPUS บริษัท Olympus Corporation, Japan

3.2.15 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงธรรมดา (Compound Light Microscope) ยี่ห้อ HOLLYWOOD บริษัท Hollywood International, Japan

3.2.16 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) บริษัท Memmert, Germany

3.2.17 สไลด์สำหรับส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Sail บริษัท Yancheng Xingfu Glass Instrument Factory, China

3.2.18 กระจกปิดสไลด์ยี่ห้อ Menzel-Glaser บริษัท Gerhard Menzel, Germany

3.2.19 กระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร บริษัท Nipro, Thailland

3.2.20 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.2.21 ลูปสำหรับเขี่ยเชื้อ

3.2.22 ที่วางหลอดทดลอง (Lack)

3.2.23 จุกยาง

3.2.24 ขวดไวแอล ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.2.25 ตัวกรองที่มีขนาดช่องผ่าน 0.45 ไมครอน

3.2.26 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 อาหารสำหรับคัดแยกจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ

3.3.1.1 อาหารเหลวสำหรับคัดแยกจุลินทรีย์ (M9 broth) (Arasu และคณะ, 2011) มีส่วนประกอบ ดังนี้

กลีเซอรอล (Glycerol)	20.0	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.0	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟส ($MgSO_4.7H_2O$)	0.25	กรัมต่อลิตร
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	1.0	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียคลอไรด์ (NH_4Cl)	1.0	กรัมต่อลิตร

3.3.1.2 อาหารแข็งสำหรับคัดแยกจุลินทรีย์ (M9 agar) มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับอาหาร M9 broth แต่มีการเติม

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	10.0	กรัมต่อลิตร
วุ้น (Agar)	20.0	กรัมต่อลิตร

3.3.2 อาหารสำหรับคัดแยกจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

3.3.2.1 MRS broth ดัดแปลงจาก Chang และ คณะ (2001) มีส่วนประกอบดังนี้

กลีเซอรอล (Glycerol)	20.0	กรัมต่อลิตร

เปปโตน (peptone)	10	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากเนื้อ (meat extract)	8	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	4	กรัมต่อลิตร
dipotassium hydrogen phosphate	2	กรัมต่อลิตร
diammonium hydrogen citrate	2	กรัมต่อลิตร
sodium acetate	5	กรัมต่อลิตร
magnesium sulfate	0.2	กรัมต่อลิตร
manganese sulfate	0.05	กรัมต่อลิตร

3.3.2.2 MRS agar มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับอาหาร MRS broth แต่มีการเติม

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	10.0	กรัมต่อลิตร
วุ้น (Agar)	20.0	กรัมต่อลิตร

3.4 แหล่งเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างดินหรือน้ำเสียจากบริเวณที่คาดว่ามีการสะสมของไขมันเป็นเวลานาน โดยเก็บตัวอย่างที่ความลึก 0-10 เซนติเมตร จากทุกจุดให้กระจายทั่วบริเวณในปริมาณเท่าๆกัน แล้วคลุกเคล้าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างรวมเพื่อใช้เป็นตัวแทนของแหล่งดินหรือน้ำเสียจากทั้งบริเวณ

3.5 การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถใช้กลีเซอรอลและผลิตกรดได้

นำตัวอย่างดินและตะกอนจากถังบำบัดน้ำเสียปริมาณ 1 กรัม หรือตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 1 มิลลิลิตรเติมลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลวปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาทำการ spread plate บนอาหารแข็งที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) 10 กรัมต่อลิตร (Tabuchi และคณะ, 1981) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสังเกตเห็นจุลินทรีย์ที่สร้างโซนใสขึ้นโดยรอบโคโลนี นำโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวไปทำการ Cross streak ลงในอาหารแข็งอีก 1-2 ครั้ง เพื่อคัดแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (Pure cultures) สำหรับนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.6 การตรวจสอบการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้แต่ละไอโซเลทลงในอาหารเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร M9 broth และจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะ คือ สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วจึงทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (Arasu และคณะ, 2011) เพื่อแยกตะกอนเซลล์ จากนั้นกรองส่วนใสอีกครั้งด้วยเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน และนำส่วนใสที่ได้มาทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ด้วยเครื่อง High-Performance Liquid Chromatrography (HPLC) ต่อไป

3.7 การวิเคราะห์ปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ด้วยเครื่อง HPLC

ความเข้มข้นของกรด 3-hydroxypropionic ในน้ำเลี้ยงถูกตรวจสอบโดยเครื่อง HPLC รุ่น LG-20A ของบริษัท Shimadzu โดยใช้คอลัมน์ BP-0A จากบริษัท Benson polymeric ที่มีความขนาด 300 x 7.8 มิลลิเมตร เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้คือสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วน Colum oven ทำงานที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดค่าด้วย Detector คือ UV ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร (Huang และคณะ, 2013)

3.8 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ (จารุณี เกสรพิกุล และสุรวัฒน์ ชลอสันติสุข, 2554)

ทำ Gram staining เพื่อศึกษารูปร่างและการจัดเรียงตัวของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ และเพื่อจำแนกว่าจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้นั้นจัดเป็น Gram-positive หรือ Gram-negative โดยเริ่มจากการ Fix จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ลงบนแผ่นสไลด์ ด้วยการนำจุลินทรีย์มาหยดลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยดเล็กๆ จากนั้นเกลี่ยจุลินทรีย์ให้เป็นฝ้าบางๆ (Smear) ทิ้งสไลด์ไว้ให้แห้ง แล้วนำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้งเพื่อให้จุลินทรีย์ติดแน่นบนแผ่นสไลด์ จากนั้นทำการหยด Crystal violet ลงไปจนท่วมบริเวณที่ Smear ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด หยดสารละลายไอโอดีนจนท่วมสไลด์ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออก จากนั้นค่อยๆ หยด 95% Ethanol เอียงสไลด์ไปมาจนกระทั่งสีน้ำเงินเริ่มจาง แต่อย่าให้นานเกิน 20 วินาที แล้วจึงรีบล้างออกด้วยน้ำสะอาด แล้วจึงทำการย้อมทับอีกครั้งด้วย Safranin ให้ท่วมทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด เช็ดให้แห้งแล้วจึงนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ตรวจสอบลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนผิวอาหารแข็งโดยดูสี รูปร่าง ความหนืด ขอบ และลักษณะเนื้อสัมผัสของโคโลนี

สำหรับการจำแนกจุลินทรีย์ทำตามวิธีการของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath, 1986) และเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของจุลินทรีย์กับฐานข้อมูลของจุลินทรีย์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม BLAST ของ National Center of Biotechnology Information databases (NCBI databases)

3.9 การศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลวที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับปริมาณกล้าเชื้อให้เหมาะสม (โดยปรับค่า OD ให้มีค่าประมาณ 0.8 ซึ่งค่า OD = 0.8 มีเซลล์ประมาณ 1.4×10^6 CFU/ml) นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้ไปเติมลงในอาหารเหลว โดยใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมงเพื่อนำมาทำการตรวจสอบหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและตรวจสอบการผลิต 3-hydroxypropionic acid ซึ่งการตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทำได้โดยการนำตัวอย่างมาทำ 10 fold dilution แล้วนำไป spread บนอาหารแข็ง ที่มีกลีเซอรอลบริสุทธ์ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับโคโลนีเดี่ยวในช่วง 30-300 โคโลนี เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหาปริมาณเชื้อต่อไป และการตรวจสอบการผลิต 3-hydroxypropionic acid ทำได้โดยการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองผ่านตัวกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปตรวจสอบปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

3.10 การศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการผลิต 3-hydroxypropionic acid

ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือกในอาหารเหลว โดยมีการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับจุลินทรีย์เริ่มต้นเตรียมโดยปรับความขุ่นของจุลินทรีย์ให้มีค่าความขุ่น (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.8 จากนั้นเติมจุลินทรีย์ที่ได้ลงอาหารเหลวปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเลี้ยงเชื้อที่ 2 สภาวะ คือ สภาวะนิ่ง สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป