บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

การศึกษาผลของการเติมสารอาหารเสริมที่มีต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในถัง UASB โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นมาใช้ในการเดินระบบ UASB เพื่อศึกษาผลกระทบการเติมสารอาหารเสริมที่ประยุกต์ใช้แนวทางสูตรอาหารของ Richard E. Speece และไคโตซานต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในถัง UASB รวมถึงประสิทธิภาพของระบบ UASB ในด้านต่าง ๆ เช่น ประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์ในรูปของ ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand : COD) การผลิตก๊าซชีวภาพ และความเสถียรภาพของระบบ เป็นต้น โดยการศึกษาแบ่งออกเป็นส่วน ๆ ทั้งก่อนเติมและหลังเติมสารอาหารเสริม และไคโตซาน ได้แก่ การศึกษาคุณสมบัติน้ำเสียจากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้น การศึกษาคุณสมบัติเม็ดตะกอนเชื้อ UASB การออกแบบถังจำลอง UASB การศึกษาประสิทธิภาพของระบบในด้านต่าง ๆ รวมถึงการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ในระบบถัง UASB เป็นต้น โดยมีรายละเอียดการศึกษาดังต่อไปนี้

3.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

1) โพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$)

2) กรดซัลฟูริค (H_2SO_4)

3) ปรอทซัลเฟต ($HgSO_4$)

4) ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4)

5) เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ([Fe $(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$])

6) 1, 10-ฟีแนนโทรลีนโมโนไฮเดรต ($C_{12}H_8N_2.H_2O$)

7) เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)

8) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

9) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

10) ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

11) ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปต้าไฮเดรต ($Na_2HPO_4.7H_2O$)

12) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)

13) แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปต้าไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)

14) แอนไฮดรัสแคลเซียมคลอไรด์ (anhydrous $CaCl_2$)

15) เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซาไฮเรต ($FeCl_3.6H_2O$)

16) ไคโตซาน

17) สารอาหารเสริมประยุกต์จากสูตรของ Richard E. Speece

3.**1.2 วัสดุอุปกรณ์**

1) เตาย่อยสาร (COD Reactor)

2) ตู้อบ (Oven)

3) เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH Meter)

4) โถดูดความชื้น (Desiccator)

5) เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance)

6) เครื่องดูดอากาศ (Suction pump)

7) กรวยบุชเนอร์

8) เตาให้ความร้อน (Hotplate)

9) เครื่องจ่ายลม

10) ตู้บ่มเชื้อ (BOD Incubator)

11) สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

12) อุปกรณ์วัดแก๊สโดยใช้หลักการแทนที่น้ำ

13) เตาเผาอุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส (Muffle Furnace)

14) เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)

15) แก๊สโครมาโทรกราฟี่ (Gas Chromatography)

3.2 น้ำทิ้งกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง (Cassava stillage)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังอยู่ที่จังหวัดราชบุรี โดยเก็บตัวอย่างน้ำจากบริเวณทางน้ำออกจากบ่อพักน้ำ (AC1) ก่อนเข้าระบบ UASB และเก็บรักษาสภาพไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส เพื่อยับยั้งการทำงานของแบคทีเรีย ตัวอย่างน้ำดังกล่าวถูกทำการวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง (pH) บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand : BOD) ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand : COD) ของแข็งทั้งหมด (Total Solids : TS) ของแข็งทั้งหมดระเหย (Total Volatile Solids : TVS) ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total Dissolved Solids : TDS) ของแข็งแขวนลอย (Suspended Solids : SS) เจลดาลห์ ไนโตรเจนทั้งหมด (Total Kjeldahl Nitrogen : TKN) เป็นต้น โดยวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐาน (APHA, 2012) แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงวิธีวิเคราะห์ค่าดัชนีต่างๆ ของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง

ดัชนีชี้วัด	**วิธีวิเคราะห์**
ความเป็นกรดด่าง (pH)	pH meter
บีโอดี (BOD)	บ่ม 5 วัน อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
ซีโอดี (COD)	Closed reflux, Titrate method
ของแข็งทั้งหมด (TS)	อังไอน้ำ
ของแข็งทั้งหมดระเหย (TVS)	เผาที่ 550 องศาเซลเซียส
ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TDS)	อังไอน้ำ
ของแข็งแขวนลอย (SS)	กรองด้วยกระดาษ GF/C อบที่ 105 องศาเซลเซียส
เจลดาลห์ ไนโตรเจนทั้งหมด (TKN)	Kjeldahl Titration method

3.3 การเตรียมสารอาหารเสริมและไคโตซาน

การเตรียมสารอาหารเสริมเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับเม็ดตะกอนเชื้อระบบ UASB และส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบนั้นได้เตรียมโดยการประยุกต์สารอาหารที่จำเป็นต่อเชื้อจุลินทรีย์ในระบบไร้อากาศของ Richard E. Speece แสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สูตรสารอาหารเสริมโดยประยุกต์จากสูตรอาหารของ Richard E. Speece

สารอาหาร	**ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)**	**สารอาหาร**	**ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)**
สารอาหารเสริมหลัก		สารอาหารเสริมรอง	
NH_4Cl	400	$FeCl_2\ 4H_2O$	40
KCl	400	$CoCl_2\ 6H_2O$	10
$MgSO_4 7H_2O$	400	$NiCl_2\ 6H_2O$	0.5
$Na_2S\ 9H_2O$	300		
$(NH_4)_2\ HPO_4$	80		
$CaCl_2\ 2H_2O$	50		

สำหรับการเตรียมไคโตซานเพื่อใช้ในการทดสอบนั้น ทำการเตรียมจากไคโตซานชนิดพันธะสายยาวที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดย นำไคโตซานจากเปลือกกุ้งปริมาณ 100 กรัมเติมลงในน้ำสะอาด 1 ลิตร ที่มีการผสมกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 99.85 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการคนให้เข้ากันและเติมน้ำสะอาดเพิ่มอีก 3.75 ลิตร คนจนไคโตซานละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3.4 เม็ดตะกอนเชื้อจุลินทรีย์และการทดสอบ SMA (Specific Methanogenic Activity)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เม็ดตะกอนจุลินทรีย์จากโรงงานเดียวกันกับของตัวอย่างน้ำเสีย อยู่ที่จังหวัดราชบุรีโดยเก็บจากระบบ UASB1 และนำมาเก็บรักษาด้วยการหล่อน้ำเสียขาออก (Effluent) จากระบบ UASB1 เพื่อใช้ให้เป็นสารอาหารของตะกอนเชื้อก่อนนำมาทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.4.1 ศึกษาคุณสมบัติของเม็ดตะกอนจุลินทรีย์ในระบบ UASB

ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของเม็ดตะกอนจุลินทรีย์โดยมีดัชนีต่าง ๆ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าความชื้น (Moisture) ค่าของแข็งทั้งหมด (Total Solids) ค่าของแข็งระเหยง่าย (Volatile Solids) และค่าของแข็งแขวนลอย (Suspended Solids) โดยการวิเคราะห์และทดสอบใช้หลักและวิธีตามมาตรฐาน Standard Methods for Examination of Water and Wastewater,2012 ซึ่ง APHA : American Public Health Association, AWWA : American Water Works Association และ WPCF : Water Pollution Control Federation ร่วมกันกำหนดไว้

3.4.2 การหาขนาดของเม็ดตะกอนจุลินทรีย์

ทำการวิเคราะห์หาขนาดของเม็ดตะกอนเชื้อจุลินทรีย์ (Granular sludge) ซึ่งได้มีการดัดแปลงวิธีการหาขนาดของเม็ดตะกอนจุลินทรีย์จากมาตรฐานการทดสอบการหาขนาดของดินด้วยตะแกรงของสำนักวิจัยและพัฒนากรมชลประทาน (กรมชลประทาน, 2558) ใช้เม็ดตะกอนจุลินทรีย์ 100 กรัม และใช้ตะแกรงวัดขนาด (Sieve Size) 0.25, 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิเมตร โดยมีวิธีการดังนี้

1) เตรียมตัวอย่างเม็ดตะกอนจุลินทรีย์ โดยผสมตัวอย่างให้เข้ากันเพื่อเป็นตัวแทนของทั้งหมด แล้วนำตัวอย่างไปชั่งให้ได้ปริมาณ 100

2) นำตะแกรงวัดขนาด (Sieve Size) แต่ละขนาดไปชั่งน้ำหนักก่อนการทดลองและบันทึกค่า จากนั้นนำตะแกรงมาวางซ้อนกันโดยวางตะแกรงขนาดเล็กไปหาใหญ่ จากล่างขึ้นบน แสดงดังภาพที่ 3.2

3) นำตัวอย่างเม็ดตะกอนจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้เทใส่ตะแกรงด้านบนสุด ใช้น้ำกลั่นฉีด แสดงดังภาพที่ 3.5

4) นำตะแกรงแต่ละขนาดไปชั่งน้ำหนักหลังการทดลอง บันทึกค่า

3.4.3 การทดสอบ SMA (Specific Methanogenic Activity)

การศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซชีวภาพจากตะกอนจุลินทรีย์ (Granular Sludge) ของระบบบำบัดน้ำเสียแบบ UASB ในโรงงานราชบุรีเอทานอล ทำการศึกษาเพื่อหาความสามารถของตะกอนเชื้อจุลินทรีย์ก่อนนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไปของการศึกษา การทดสอบโดยกำหนดค่า F/M ratio อัตราส่วนอาหารต่อจุลินทรีย์เท่ากับ 0.5 การคำนวณปริมาณอาหาร (Food) ใช้ค่าปริมาณสารอินทรีย์ในรูปของซีโอดี (TCOD) และการคำนวณปริมาณเชื้อใช้ค่าของแข็งระเหยได้ของตะกอนเชื้อ (VSS) หลังจากนั้นเติมสารอาหารเสริมและไคโตซานเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเทียบกับที่ไม่ได้เติมสารอาหาร จากนั้นไล่ออกซิเจนออกด้วยการเติมก๊าซไนโตรเจน แล้วปิดฝาทันทีเพื่อให้เกิดสภาวะไร้อากาศอย่างสมบูรณ์ การทดสอบ SMA แบ่งทำการทดสอบทั้งหมดเป็น 7 ชุด (แสดงดังภาพที่ 3.1) ดังนี้

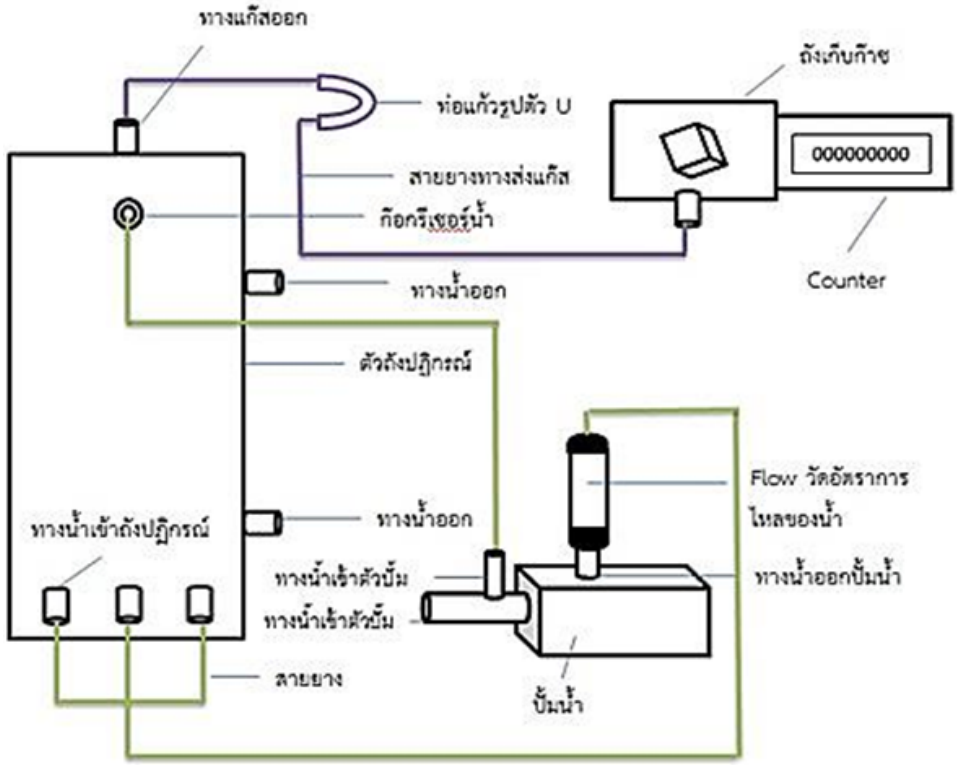
ชุดที่ 1 กลูโคส สารอาหารเสริมสูตร (Speece + Fe, Co, Ni) จำนวน 3 ซ้ำ
ชุดที่ 2 กลูโคส สารอาหารเสริมไคโตซานจำนวน 3 ซ้ำ
ชุดที่ 3 น้ำเสีย สารอาหารเสริมสูตร (Speece + Fe, Co, Ni) จำนวน 3 ซ้ำ
ชุดที่ 4 น้ำเสีย สารอาหารเสริมไคโตซาน จำนวน 3 ซ้ำ
ชุดที่ 5 กลูโคส จำนวน 3 ซ้ำ
ชุดที่ 6 น้ำเสีย จำนวน 3 ซ้ำ
ชุดที่ 7 ชุดควบคุม

ทำการทดลองในขวดไวแอล (Vial) ขนาด 100 มิลลิลิตร แต่ละตัวอย่างการทดลองทำการทดลองตัวอย่างการทดลองละ 3 ซ้ำ รวมทั้งสิ้นจำนวน 21 ตัวอย่างการทดลอง โดยดำเนินการทำการทดลองเป็นเวลาอย่างน้อย 20 วันหรือจนกว่าก๊าซชีวภาพจะอยู่ในระดับสมดุล ขณะดำเนินการทดลอง ทำการวัดปริมาณก๊าซชีวภาพสะสมทุกวัน ด้วยวิธีการแทนที่น้ำและวิเคราะห์ก๊าซชีวภาพสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ด้วยเครื่องวิเคราะห์ก๊าซชีวภาพ Gas Chromatograph

ภาพที่ 3.1 แสดงการทดสอบ SMA ในขวดไวแอลขนาด 100 มิลลิลิตร

3.5 ถังปฏิกรณ์ UASB

ถังปฏิกรณ์ยูเอเอสบี ทำจากพลาสติกอะคริลิกใส ในการการศึกษาครั้งนี้ใช้ถังทั้งหมด 3 ถังแต่ละถังมีปริมาตรความจุ 18 ลิตร (ปริมาตรกักเก็บน้ำ 15 ลิตร) ขนาดความกว้าง 15 เซนติเมตร ยาว 15 เซนติเมตร และความสูง 80 เซนติเมตร ด้านบนของถังมีชุดแยกก๊าซและตกตะกอน น้ำเข้าจากด้านล่างของถังปฏิกิริยาผ่านก๊อก 3 ก๊อก ด้วยแรงดันจากปั๊ม มีจุดเก็บตัวอย่าง 3 จุด คือ จุดเก็บน้ำออกที่ความสูง 65 เซนติเมตร จุดเก็บตะกอนที่ความสูง 20 เซนติเมตร และมีจุดเก็บตัวอย่างก๊าซอยู่ด้านบนสุดของถัง ดังภาพที่ 3.2 แสดงลักษณะของถังปฏิกิริยา UASB โดยการศึกษาถังที่ 1 ทำการเดินระบบโดยไม่มีการเติมสารอาหารเสริมใด ๆ (Normal UASB, N-UASB) ถังที่ 2 ทำการเดินระบบโดยการเติมสารอาหารเสริมหลักสูตร Speece (Speece UASB, S-UASB) ถังที่ 3 ทำการเดินระบบโดยการเติมไคโตซานให้กับระบบ (Chitosan UASB, C-UASB) โดยทั้งสามถังทำการเดินระบบแบบ Semi Continuous โดยทำการป้อนน้ำเข้าระบบวันละครั้ง แล้วปล่อยให้น้ำรีไซเคิลในระบบ 24 ชั่วโมง ซึ่งการเดินระบบจะควบคุมเวลาเดินระบบด้วย Timer โดยทำการเดินระบบ 45 นาที และหยุด 15 นาที



ภาพที่ 3.2 แผนผังการทำงานของชุดการทดลองระบบ UASB ระดับห้องปฏิบัติการ

3.6 การเดินระบบถังปฏิกรณ์ UASB (Operation system)

การเดินระบบทำโดยการป้อนน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์ในรูปของซีโอดี (COD) ที่มีการเจือจางให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10,000 มิลลิกรัมซีโอดีต่อลิตร โดยทำการป้อนน้ำเสียที่ 1.6 ลิตรต่อวัน โดยทำการป้อนแบบครั้งเดียว และมีอัตราการเวียนน้ำเท่ากับ 5 ลิตรต่อนาที ปั้มที่ป้อนน้ำเข้าระบบและเวียนน้ำภายในระบบใช้เครื่องปั้มน้ำรุ่น MIRANO WATER PUMP ID8-35 (220 V A.C. 50 Hz 0.37 kW)

3.**6.1 การศึกษาผลของสารอาหารเสริมต่อระบบ UASB**

การศึกษาผลของสารอาหารเสริมต่อระบบ UASB โดยทำการป้อนน้ำเสียกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังที่มีการเติมอาหารเสริมที่ความเข้มข้นของ COD ประมาณ 10,000 มิลลิกรัม-ต่อลิตร เข้าถัง S-UASB ในขณะที่น้ำเสียที่ไม่มีการเติมอาหารเสริมป้อนเข้าถัง N-UASB โดยทำการป้อนน้ำเสียที่ 1.6 ลิตรต่อวันเป็นเวลา 60 วัน และทำการวิเคราะห์น้ำเสียขาออกทุกวันที่ออกจากระบบ

เพื่อทำการหาประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซชีวภาพจากระบบ ตลอดจนวัดสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ของถังระบบ UASB อาทิเช่น ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH), ปริมาณความเป็นด่าง (Alkalinity), ค่ากรดอินทรีย์ระเหยง่ายในน้ำเสีย (TVA), ค่าสารอินทรีย์ละลาย (SCOD), ค่าสารอินทรีย์ทั้งหมด (COD) สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซจะทำการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซชีวภาพต่อวัน (Biogas production) องค์ประกอบก๊าซชีวภาพ (Biogas composition) ได้แก่ ปริมาณก๊าซมีเทน (CH_4) ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และอื่น ๆ เป็นต้น

3.6.2 การศึกษาผลของไคโตซานต่อระบบ UASB

การศึกษาผลของไคโตซานต่อระบบ UASB โดยทำการป้อนน้ำเสียกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังที่มีการเติมอาหารเสริมที่ความเข้มข้นของ COD ประมาณ 10,000 มิลลิกรัม-ต่อลิตรเข้าถัง C-UASB ในขณะที่น้ำเสียที่ไม่มีการเติมอาหารเสริมป้อนเข้าถัง N-UASB โดยทำการป้อนน้ำเสียที่ 1.6 ลิตรต่อวันเป็นเวลา 60 วัน และทำการวิเคราะห์น้ำเสียขาออกทุกวันที่ออกจากระบบ เพื่อทำการหาประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซชีวภาพจากระบบ ตลอดจนวัดสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ของถังระบบ UASB อาทิเช่น ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH), ปริมาณความเป็นด่าง (Alkalinity), ค่ากรดอินทรีย์ระเหยง่ายในน้ำเสีย (TVA), ค่าสารอินทรีย์ละลาย (SCOD), ค่าสารอินทรีย์ทั้งหมด (COD) สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซจะทำการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซชีวภาพต่อวัน (Biogas production) องค์ประกอบก๊าซชีวภาพ (Biogas composition) ได้แก่ ปริมาณก๊าซมีเทน (CH_4) ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และอื่น ๆ เป็นต้น

3.7 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในถัง UASB

ตัวอย่างตะกอนเชื้อจากระบบ UASB ทั้งก่อนและหลังเติมสารอาหารเสริมและไคโตซานถูกนำมาศึกษาหาประชากรจุลินทรีย์ โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.7.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตะกอน

นำตัวอย่างตะกอนจาก 3 ขวด นำตัวอย่างมาขวดละ 3 มิลลิลิตร นำมาผสมกับและนำตัวอย่างที่ผสมกันแล้วไปสกัด DNA โดย นำมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บเอาส่วนตะกอน เพื่อนำไปสกัด DNA ด้วย PowerSoil® DNA isolation Kit ดังต่อไปนี้

1) เติมตะกอน 0.25 กรัม ใส่ในหลอด PowerBead และทำการผสมใน vortex

2) เติม 60 ไมโครลิตร ของสารละลาย C1 โดยก่อนที่เติมจะต้องตรวจสอบการตกตะกอนของสารละลาย C1 ถ้าตกตะกอนให้นำไปให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส จนตะกอนละลายก่อนใช้ และทำการผสมที่ความเร็วสูงสุดของเครื่อง vortex นาน 10 นาที

3) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง

4) นำส่วนใสไปใส่ในหลอด collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายC2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และผสม 5 วินาที แล้วนำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

5) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

6) ทำการดูดส่วนใสปริมาตร 600 ไมโครลิตร ไปใส่ในหลอด collection tube จากนั้นเติมสารละลาย C3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และผสม แล้วนำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

7) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

8) ทำการดูดส่วนใสปริมาตร 750 ไมโครลิตร ไปใส่ในหลอด collection tube จากนั้นเติมสารละลาย C4 ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร และทำการผสม 5 วินาที

9) ดูดส่วนใสปริมาตร 675 ไมโครลิตร ใส่ลงใน spin filter จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำ 2 รอบ

10) เติม 500 ไมโครลิตร ของสารละลาย C5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และทิ้งส่วนที่อยู่ข้างล่าง

11) ค่อย ๆ วาง spin filter ในหลอดใหม่ขนาด 2 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย C6 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง

12) นำ spin filter ทิ้ง เก็บ DNA ที่อยู่ในหลอดไว้ใช้งานต่อไป ที่อุณหภูมิ -20 ถึง -80 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบวัดปริมาณ DNA ที่สกัดได้ โดยวัดความบริสุทธิ์ของ DNA ด้วยเครื่อง NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific) ที่ 260/280 นาโนเมตร (nm)

3.7.2 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทำการเพิ่มปริมาณยีนส์ 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ 341F และ 805R โดยมีตำแหน่งเฉพาะ คือ V3-V4 โดยใช้ kit ของ sparQ HiFi PCR master mix (Quanta bio, USA) นำไปเข้าเครื่อง Perkin-Elmer GeneAmp PCR system 2400 Thermal Cycler (Perkin-Elmer, USA) โดยตั้งโปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

Temperature (°C)	Time	Cycle
94	3 min	Denaturation (Hot start)
98	20 sec	
55	30 sec	25
72	30 sec	
72	5 min	Final extension

จากนั้นเพิ่มปริมาณ nuclear ribosomal DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพเมอร์ ITS-1F และ ITS-2R นำไปเข้าเครื่อง Perkin-Elmer GeneAmp PCR system 2400 Thermal Cycler (Perkin-Elmer, USA) โดยตั้งโปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

Temperature (°C)	Time	Cycle
94	3 min	Denaturation (Hot start)
98	20 sec	
60	30 sec	25
72	30 sec	
72	5 min	Final extension

จากนั้น DNA ที่สร้างขึ้นมาใหม่จะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์โดย AMPure XP beads ทำการจำแนกชนิดของตัวอย่างโดยใช้ 5 ไมโครลิตร ของ Nextera XT index kit โดยในน้ำยาจะมี index primer ซึ่งประกอบด้วย

Forward Primer

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

Reverse Primer

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

สำหรับติดเข้ากับสาย DNA เพื่อจำแนกชนิดของตัวอย่าง ที่มี 50 ไมโครลิตร PCR reaction ตามด้วย 8-10 cycles ของสภาวะของ PCR สุดท้าย PCR products จะถูกทำให้สะอาดและรวบรวม หลังจากเสร็จสมบูรณ์แล้วตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซีส (Agarose Gel electrophoresis) โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอของ 16S rRNA ซึ่งมีขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายประมาณ 550 bp และเจือจางให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 6 pM ทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเครื่องวิเคราะห์จีโนมด้วยเครื่อง Illumina MiSeq

อ่านลำดับเบสโดยใช้ FASTQC software วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) โดยเปรียบเทียบลำดับวิวัฒนาการของยีนโดยใช้โปรแกรม PEAR (Zhang et al., 2014) FASTX-Tool kit is จะใช้อ่านข้อมูลที่ไม่มีคุณภาพน้อยกว่า 90 เปอร์เซนต์ และจะไม่อ่านลำดับเบสที่น้อยกว่า 300 bp เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยใช้วิธี UCHIME (Edgar et al., 2011) ใน vsearch 1.1.1 (Rognes et al., 2016) โดยใช้ uchime_ref การจัดจำแนกกลุ่มจะทำโดยใช้ OTU โดยใช้ *pick_open_reference_otus.py* command in QIIME 1.9.0, ความจำเพาะของลำดับเบสจะใช้ SortMeRNA เพื่ออ้างอิง และอนุกรมวิธานจะถูกสร้างต่อ Greengenes 97 เปอร์เซนต์ database ข้อมูลที่ผิดพลาดจะอ่านต่อโดยใช้ SUMACLUST ลำดับเบสที่ใช้จะใช้ 30,000 ในแต่ละตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ประชากรแบคทีเรีย ความหลากหลายระดับ alpha จะใช้คอมพิวเตอร์เพื่อหาความหลากหลายทางวิวัฒนาการ ความหลากหลายระดับ beta จะใช้ UniFrac distances ระหว่างตัวอย่างและ ใช้เทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal Coordinate Analyses, PCoA)

3.8 สถานที่ในการดำเนินการวิจัย และรวบรวมข้อมูล

ห้องปฏิบัติการศูนย์ความเป็นเลิศเฉพาะทางด้านการจัดการและใช้ประโยชน์จากของเสียอุตสาหกรรมการเกษตร คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน