

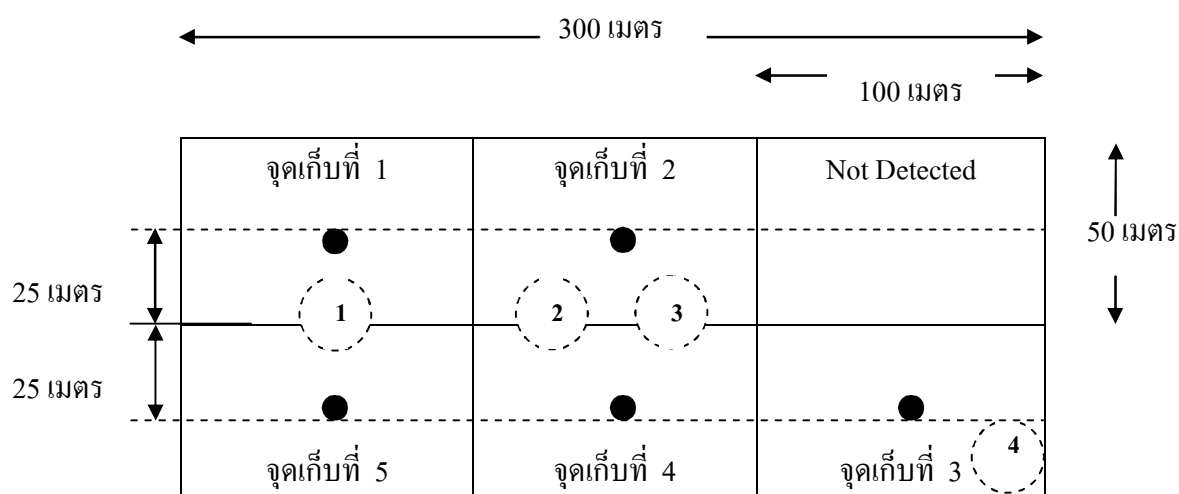
อุปกรณ์และวิธีการ

สำหรับการวิจัยครั้งนี้เป็นการจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟในดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่มีผลต่อการเกิดมีเทนออกซิเดชัน โดยในงานวิจัยครั้งนี้ประกอบไปด้วยอุปกรณ์และวิธีการดังต่อไปนี้

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างดินสำหรับการทดลอง

ในการดำเนินการทดลองครั้งนี้ได้ทำการศึกษาดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยของสถานกำจัดมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี ซึ่งเป็นพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยของจังหวัดปทุมธานีที่มีอายุการใช้งาน 8 ปีและมีขนาดพื้นที่ 30,000 ตารางเมตร (100 X 300 ตารางเมตร) ดังแสดงในภาคผนวกที่ ก1 และ ก2 โดยได้ทำการศึกษาที่ระดับความลึกต่างๆ คือ 0–15, 16–30, 31–45, และ 46–60 เซนติเมตร ในการเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยนี้ได้ดำเนินการเก็บในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2548 ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝน โดยอาศัยเครื่อง Core soccer ในการขุดเจาะเพื่อเก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึกดังกล่าวและทำการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มทั้งหมด 5 จุดด้วยกันโดยตำแหน่งและบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างดินและก๊าซจากปากท่อระบายก๊าซนั้นดังแสดงในภาพที่ 8 หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างดินดังกล่าวมาวิเคราะห์ลักษณะสมบัติต่างๆทางเคมีเบื้องต้นทันทีและเก็บรักษาตัวอย่างดินที่อุณหภูมิ -20 °ซ เพื่อใช้ในการศึกษาคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาและกิจกรรมของเชื้อเมทาโนโทรฟต่อไป (APHA,1997)



ภาพที่ 8 ตำแหน่งดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยและปากท่อระบายน้ำที่ทำการศึกษา

2. แก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) รุ่น GC 6890 Agilent Technologies Model : G 1530A

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์แก๊ส

ช่องนำตัวอย่างชนิด EPC Purged Packed Inlet ตั้งอุณหภูมิที่ 105 °ซ คอลัมน์ยี่ห้อ Alltech CTRT (Part No. 8700) อุณหภูมิของคอลัมน์ 35 °ซ อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียมเท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อนาที และช่วงเวลาในการวิเคราะห์นาน 11 นาที และใช้ดีเทคเตอร์ (Detector) ชนิดทีซีดี (TCD ; Thermal Conductivity Detector) อุณหภูมิของ Detector เท่ากับ 150 °ซ

3. แก๊สมีเทนความเข้มข้นร้อยละ 99.9 ซึ่งเป็น standard gas ใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับจุลินทรีย์
4. ขวดซีรัมขนาด 20 และ 118 มิลลิลิตร
5. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์ ยี่ห้อ OLYMPUS
6. โพรปชนิดต่างๆ สั่งเคราะห์จากบริษัท Bioservice Unit
7. สไลด์ชนิดหลุมขนาด 14 หลุม
8. เครื่อง Laminar Flow Biological Safety Cabinets (Class II)
9. เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด ยี่ห้อ Precisa รุ่น 240A

10. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ยี่ห้อ Metrohm
11. ตู้อบ 105 °ซ ยี่ห้อ Memmert
12. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ยี่ห้อ HACH รุ่น DR/4000U
13. เครื่องวิเคราะห์เจดดาห์ไนโตรเจน (Kjedahl Nitrogen)
14. เครื่อง Ultrasonic
15. ตู้ทำความเย็นอุณหภูมิ -20 °ซ
16. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ยี่ห้อ Yamato
17. อ่างต้มน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Memmert
18. โถสุญญากาศ (Desicator)

วิธีการ

ในการวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อจำแนกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มเมทาโนโทรฟที่มีบทบาทในการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกลบชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย โดยได้ทำการจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟด้วยวิธีการต่างๆเพื่อหาความสัมพันธ์กับการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ส่วนด้วยกัน นอกจากนี้ภายหลังจากการทำการทดลองเป็นระยะเวลา 1 ปีจึงเก็บก๊าซบริเวณปากท่อระบายก๊าซในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยดังกล่าวในช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2549 เพื่อตรวจสอบปริมาณก๊าซที่ปล่อยออกมาจากพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยดังกล่าว โดยได้ทำการเก็บก๊าซในบริเวณที่ลึกลงไปจากปล่องระบายก๊าซประมาณ 1 เมตรและนำก๊าซมาจำแนกองค์ประกอบของก๊าซในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatograph)

1. การศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพและทางเคมีในดินของพื้นที่ที่ทำการศึกษา

ในการศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางเคมีในดินกลบชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี ทำการศึกษอุณหภูมิ (Temperature) ความชื้น (Moisture Content) ความเป็นกรดด่าง (pH) ประเภทของดิน (Soil Texture) แอมโมเนียไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$) อินทรีย์ไนโตรเจน (Organic-N) ไนไตรต์ไนโตรเจน ($\text{NO}_2\text{-N}$) ไนเตรทไนโตรเจน ($\text{NO}_3\text{-N}$) ไนโตรเจนทั้งหมด (TN) ฟอสฟอรัสทั้งหมด (TP) ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (TOC) และปริมาณเถ้า

ราเซลล์ูลาโพลีแซคคาไรด์ (Extracellular Polysaccharides, EPS) โดยวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์
นั้นแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 รายละเอียดพารามิเตอร์และวิธีการในการวิเคราะห์ตัวอย่างดิน

พารามิเตอร์	วิธีการวิเคราะห์
Temperature	Thermometer
Moisture Content	Gravimetric Method
Soil Texture	Hydrometer Method
pH	pH Meter
Organic-N	Total N - [(NH ₃ -N) + (NO ₂ -N) + (NO ₃ -N)]
NH ₃ -N	Colorimetric Method
NO ₂ -N	Colorimetric Method
NO ₃ -N	Colorimetric Method
Total N	Colorimetric Method
Total PO ₄ ⁻³	Acid digestion-ascorbic Acid
Total Organic Carbon	Colorimetric Method
Extracellular Polysaccharides ,EPS	Colorimetric Method

ที่มา : APHA (1997) ; Lowe (1993)

2. การศึกษาความสามารถในการเกิดมีเทนออกซิเดชัน

ในการศึกษามีเทนออกซิเดชันได้ดำเนินการศึกษาตามวิธีการที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้ (Kightley *et al.*, 1995) กล่าวคือ นำตัวอย่างดินสดหนัก 10 กรัม ใส่ลงในขวดซีรัมขนาด 118 มิลลิลิตรแล้วจึงปิดปากขวดด้วยจุกยางและรัดด้วยฝาอลูมิเนียมให้แน่นก่อนฉีดก๊าซมีเทนที่ความเข้มข้นร้อยละ 99.9 ลงไป 12 มิลลิลิตรเพื่อให้ความเข้มข้นของบรรยากาศภายในขวดมีความเข้มข้นของก๊าซมีเทนประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตรของขวด หลังจากนั้นจึงใช้แผ่นพาราฟิล์มปิดปากขวดอีกครั้งหนึ่งเพื่อป้องกันก๊าซภายในขวดซีรัมออกมาด้านนอกขวดและจึงทำการตรวจวัดองค์ประกอบของก๊าซภายในขวดเริ่มต้นและทุกๆ 3 วันจนกว่าปริมาณก๊าซมีเทนภายในขวดที่

ทำการศึกษาทดลองจนเป็นศูนย์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของก๊าซภายในขวดด้วยวิธีเครื่องแกสโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) โดยในการทดลองหาค่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันดังกล่าวได้ทำการทดลองแบบ 2 ซ้ำต่อตัวอย่างและหาค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซมีเทนที่ลดลงจากตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้ง 5 จุด ก่อนนำค่าดังกล่าวมาคำนวณหาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันโดยการพลอตกราฟระหว่างปริมาณมีเทนกับเวลา โดยในการวัดอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันนี้ทำการวัดเฉพาะช่วงที่มีการเกิดปฏิกิริยาลำดับศูนย์ (Zero Reaction) ค่าที่ได้จากการเกิดอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันดังกล่าวเป็นค่าสูงสุดบนพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย

3. การตรวจหาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟด้วยวิธีโสมพรอบเอเบิลนัมเบอร์ (เอ็มพีเอ็น)

ในการศึกษาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟด้วยวิธีการโสมพรอบเอเบิลนัมเบอร์หรือเอ็มพีเอ็น (Most Probable Number, MPN) นั้นเป็นการศึกษาหาปริมาณเชื้อที่ทำการศึกษาทั้งหมดโดยการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวภายใต้สภาวะที่เหมาะสมตามวิธีของ ASA (1982) โดยการนำตัวอย่างดินสด 1 กรัมใส่ในน้ำเกลือสำหรับเชื้อจาง (NaCl 0.85%) 9.5 มิลลิลิตร ปิดฝาและนำไปเขย่าเป็นเวลา 10 นาทีที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้วจึงนำสารละลายที่สกัดได้มาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่ 10^0 - 10^{-6} (จำนวน 7 เท่า) โดยทำในระบบ 3 หลอดแล้วจึงดูดสารละลายดินเชื้อจาง 1 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดอาหารซีรัมขนาด 20 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวชนิดไนเตรทมิเนอร์รัลซอลท์หรือเอ็นเอ็มเอสอยู่ 5 มิลลิลิตร (Nitrate Mineral Salt Medium, NMS Medium) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อภายใต้อุณหภูมิและความดันสูงเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มอื่นเจริญภายในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว โดยอาหารเหลวเอ็นเอ็มเอสนี้จัดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะต่อการเจริญของเชื้อเมทาโนโทรฟที่สามารถเจริญได้ในภาวะที่เป็นกลางเนื่องจากมีค่าความเป็นกรดด่างที่ 8.3 หลังจากนั้นจึงปิดฝาขวดและฉีดก๊าซมีเทนที่ความเข้มข้นร้อยละ 99.9 ลงไป 2 มิลลิลิตรเพื่อให้ความเข้มข้นของบรรยากาศภายในขวดมีความเข้มข้นของก๊าซมีเทนประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตรของขวด แล้วจึงทำการตรวจวัดองค์ประกอบของก๊าซภายในขวดเริ่มต้นด้วยเครื่องวิเคราะห์ก๊าซ (Gas Chromatography) แล้วจึงเก็บขวดอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 °C) นาน 45 วัน และทำการตรวจวัดองค์ประกอบของก๊าซอีกครั้งเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของก๊าซที่เกิดขึ้นภายในขวด (ASA, 1982) ก่อนนำค่าผลจำนวนขวดทดลองที่มีการเจริญของเชื้อเมทาโนโทรฟที่ความเข้มข้นใดๆ ไปเปรียบเทียบกับตารางเอ็มพีเอ็นมาตรฐานหรือสามารถคำนวณได้ดังสมการที่ 8

$$\text{MPN / g Soil} = \frac{\text{จำนวนขวดที่ให้ผลบวก} \times \text{ปริมาตรน้ำเชื้อจากที่ใช้ (ml.)}}{\text{[ปริมาตรตัวอย่างที่ให้ผลลบ(ml) x ปริมาตรตัวอย่างทั้งหมด(ml)]}^{0.5} \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง(g)}} \quad (8)$$

$$\text{[ปริมาตรตัวอย่างที่ให้ผลลบ(ml) x ปริมาตรตัวอย่างทั้งหมด(ml)]}^{0.5} \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง(g)}$$

4. การตรวจหาปริมาณและจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 , 2 และแบคทีเรียชนิดไนโตรไฟอิง ด้วยวิธีฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน

ในการศึกษาเชื้อเมทาโนโทรฟในเชิงปริมาณด้วยวิธีการฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันหรือฟิช (Fluorescent In Situ Hybridization, FISH) นั้นได้อาศัยวิธีการของ Amann and Ludwig (2000) สามารถทำได้โดยการนำดินสด 3 กรัมใส่ในน้ำเกลือสำหรับเชื้อจาก (NaCl 0.85%) 9.5 มิลลิลิตร ปิดฝาและนำไปเขย่าเป็นเวลา 10 นาทีที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีและนำสารละลายที่สกัดได้ทำการปั่นเป็นเนื้อเดียว (Homogenizer) เพื่อบดย่อยอนุภาคดินให้ละเอียดมากยิ่งขึ้นและทำการปั่นตกที่ความเร็วรอบ 10000 xg

ดูดส่วนใสจากสารละลายดินที่สกัดออกมา 300 ไมโครลิตรลงใน 900 ไมโครลิตรของ 4% paraformaldehyde (เตรียมใน 3 PBS, pH 7.2) เพื่อตรึงเซลล์แล้วจึงนำตัวอย่างดังกล่าวเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการล้าง 3 PBS ด้วย 1 PBS โดยทำการปั่นตกและดูดส่วนใสออกประมาณ 3 ครั้ง แล้วจึงเติมเอทานอลและ 1 PBS ในอัตราส่วน 1 : 1 จึงจะสามารถคงสภาพเซลล์เพื่อเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 °ซ ไว้ได้นาน 3 เดือน (Eller *et al.*, 2001)

เมื่อต้องการวิเคราะห์นำสารละลายดังกล่าว 3 ไมโครลิตรหยดลงบนสไลด์แบบหลุมที่ผ่านการเคลือบเจลาคินให้กระจายทั่วหลุมปล่อยให้แห้งแล้วจึงทำให้เซลล์แห้งโดยการจุ่มสไลด์ลงในเอทานอลที่ความเข้มข้น 50, 80 และ 98% นานอย่างละ 3 นาที ตามลำดับ แล้วจึงทำการไฮบริไดเซชัน (สร้างพันธะอย่างจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างโพรบที่ทำการศึกษากับเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยในตัวอย่างดิน) ด้วยการเติม Hybridization Buffer 8 ไมโครลิตรและโพรบที่ทำการศึกษา 1 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุมของสไลด์โดยโพรบที่ทำการศึกษา ได้แก่ NSM-156, NIT-3, MY84+MY705, M0450, Mcell-1026 และ Mcap-1032 โดยรายละเอียดของโพรบที่ทำการศึกษาได้แสดงไว้ในตารางที่ 10 หลังจากนั้นจึงนำสไลด์ดังกล่าวใส่ใน 50 มิลลิลิตร plastic centrifuge tube ที่ภายในมีกระดาษที่ชุ่มไปด้วย Hybridization Buffer ที่มีความเหมาะสมต่อโพรบดังกล่าวแล้วจึงนำไปอบภายใต้อุณหภูมิ Hybridization เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ภายหลังจากทำการไฮน์บริดเซลล์ด้วยโพรปที่ทำการศึกษาแล้วจึงล้างโพรปด้วย 500 ไมโครลิตรของ Washing Buffer และนำสไลด์ดังกล่าวจุ่มลงใน Washing Buffer และนำไปใส่ในอ่างต้มน้ำที่อุณหภูมิ Washing เป็นเวลา 20 นาทีเพื่อกำจัดโพรปส่วนเกินที่ไม่เกิดพันธะกับลำดับ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ภายในเซลล์ที่ทำการศึกษา หลังจากนั้นจึงใช้ Milli Q Water (น้ำกลั่นที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตรและนั่งภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง) ในการล้างอีกครั้งแล้วปล่อยให้แห้งก่อนหยด DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 10 ไมโครลิตรเพื่อติดตามเชื้อทั้งหมดที่อาศัยอยู่ในตัวอย่างดินกลบทับชั้นสุดท้าย (Total Microorganisms) ย้อมทิ้งไว้ประมาณ 5 นาทีและล้างออกด้วย Milli Q Water อีกครั้งก่อนปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นจึงหยด SlowFade – Light เพื่อป้องกันการหนี (Fade) ของแสงลงในแต่ละหลุมของสไลด์ก่อนปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (Cover Slip) และนำไปตรวจวัดการเรืองแสงของเชื้อที่ทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์