บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้มีการเตรียมการทดลองโดยใช้อุปกรณ์และสารเคมีในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ Methanol ใน Methanotrophic Bacteria โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพจำเพาะ โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.1 อุปกรณ์

1) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor)
2) หลอดเก็บตัวอย่างดิน (soil tube) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร
3) ถุงปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุตัวอย่างดิน (sterile bag)
4) หลอดฝาเกลียว (screw cap test tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร
5) ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
6) ขวดรูปชมพู่ (conical flask) ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
7) บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 25, 100 และ 500 มิลลิลิตร
8) แท่งแก้วคน (stirring rod)
9) ปิเปตต์ (pipette) ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
10) ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
11) ปิเปตต์ทิป (pipette tip)
12) ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1) ก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ ร้อยละ 99
2) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 99
3) ก๊าซออกซิเจน ร้อยละ 99
4) ก๊าซไนโตรเจน ร้อยละ 99
5) Phosphhate Buffer Saline (Gibthai, Thailand)
6) Nitrate Mineral Salt (NMS, Difco, USA)
7) Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)
8) Takara Ex Taq DNA polymerase (Takara Shuzo Co., Ltd, Japan)
9) Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA)
10) Ethidium bromide (Sigma, Aldrich, USA)

11) Oligonucleotide primers

12) 1-kb DNA ladder (Fermentus, USA)

3.3 เครื่องมือ

3.3.1) pH meter ที่ใช้ในการวัดปริมาณความเป็นกรด-ด่าง ในถังปฏิกรณ์จำเพาะโดยคุณลักษณะดังนี้

1) mini pH meter pH-900

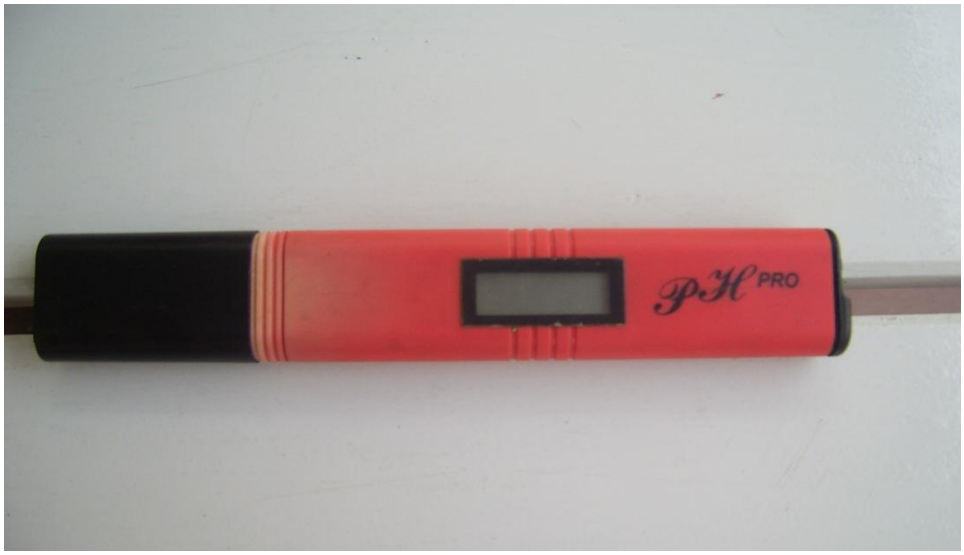
2) range : 0.00-14.0 pH.

3) resolution : 0.01 pH.

4) accuracy : +/-0.05 pH.

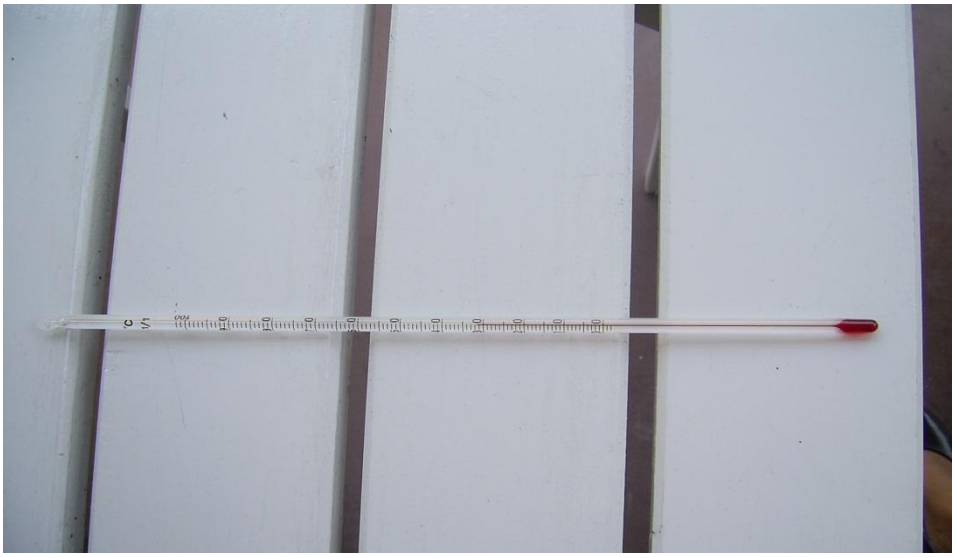
5) temp.°C : 0-60 °C.

6) calibration : two-point at 4.01 pH or 6.86 pH or 9.18 pH.



ภาพที่ 3.1 pH meter

3.3.2) เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer) ใช้ในการวัดอุณหภูมิในหน่วยองศาเซลเซียสและองศาฟาเรนไฮน์ (-20°-110° C, 1° increments; 0°-220° F, 2° increments). ใช้อ่านค่าได้ทันที



ภาพที่ 3.2 เทอร์โมมิเตอร์

3.3.3) มานอมิเตอร์ (manometer) ใช้วัดความดันเกจ โดยวัดที่ค่าความดันต่ำๆ อาศัยหลักการ balance pressure กับน้ำหนักของของเหลวภายใน column ดังนั้น การตอบสนองการวัดของ manometer ขึ้นอยู่กับการเคลื่อนไหวของของเหลวใน column ลักษณะเป็นหลอดแก้วรูปตัว U และต้องเติมของเหลวเข้าไปบางส่วน ซึ่งที่นิยมใช้ที่สุดคือ น้ำ, ปรอท เนื่องจากว่าทั้ง 2 ชนิดมีค่า specific weight คงที่แม้อุณหภูมิจะเปลี่ยนไปก็ตาม โดยปล่อยปลายด้านหนึ่งไว้กับบรรยากาศและปลายด้านหนึ่งต่อเข้ากับจุดวัดความดัน หรืออาจต่อปลายทั้งสองเข้ากับจุดวัดความดันก็ได้ สามารถอ่านและบันทึกค่าได้ค่อนข้างแม่นยำ

ภาพที่ 3.3 water manometer

3.3.4) เครื่องเก็บตัวอย่างอากาศแบบติดตามตัว (personal pump) ใช้ในการเก็บแก๊ส มีเทนที่มีการเติมเข้าไปในถังปฏิกรณ์จำเพาะ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1) Sampling: multi sorbent tube, filter, impringer, bags

2) มาตรฐาน NIOSH หรือ OSHA

3) ช่วงอัตราการไหล5–5000ml/min (low and high)

4) การทำงานชนิดอัตราการไหลคงที่ไม่เกิน +/-5%

5) อัตราการไหลของอากาศในช่วง 1-5 ลิตร/นาที

ภาพที่ 3.4 เครื่องเก็บตัวอย่างอากาศแบบติดตามตัว (personal pump)

3.3.5) ถุงเก็บตัวอย่างอากาศ (air bag) ขนาด 1 ลิตร

ภาพที่ 3.5 ถุงเก็บตัวอย่างอากาศ (air bag)

3.3.6) เครื่องวิเคราะห์ก๊าซมีเทนแบบทันที เป็นเครื่องแบบ single beam infrared spectrophotometer การวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของก๊าซไอระเหยของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ในอากาศ (portable ambient air analyzer) โดยวัดการดูดกลืนแสงอินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 7.7 ถึง 14.1 ไมโครเมตร

ภาพที่ 3.6 เครื่องวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของก๊าซมีเทนแบบทันที

3.3.7) เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas chromatography) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมทานอล โดยมีรายละเอียดดังนี้

1) เครื่องวิเคราะห์แก๊สโครมาโตกราฟ CHROMPACK รุ่น CP9001

2) Detector : Flame Ionization Detector (FID)

3) GC column (0.23 mm×30 m; stationary phase, SE-54)

4) Mobile Phase Hereum 99.95%

5) Pressure : 100 kPa

6) Flow rate : 37 ml/min

7) Column limit : 325 องศาเซลเซียส

8) Detector temperature : 270 องศาเซลเซียส

9) Inject temperature : 250 องศาเซลเซียส

10) Oven initial : 90 องศาเซลเซียส

11) Oven final : 270 องศาเซลเซียส

. 12) Time initial : 1 นาที

13) Time final : 5 นาที

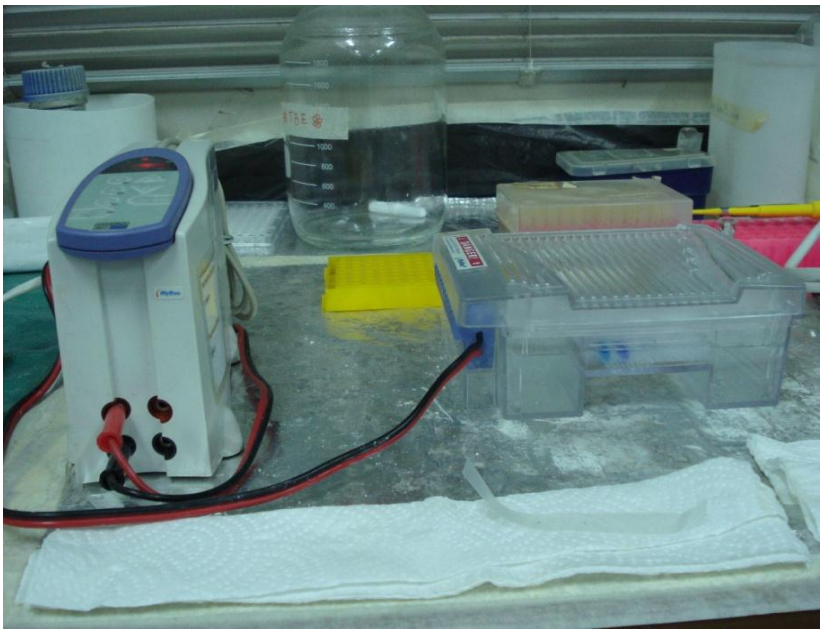
14) ปริมาตรที่ฉีด 5 มิลลิลิตร

ภาพที่ 3.7 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

3.3.8) เครื่อง Thermocycler ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน Conserved regions ของ 16S rRNA ของแบคทีเรีย Methanotroph

ภาพที่ 3.8 เครื่อง Tpersonal Thermocycler

3.3.9) เครื่อง Electrophoresis ใช้แยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าใน agarose gel



ภาพที่ 3.9 การแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Electrophoresis

3.3.10 เครื่องเขย่าอัตโนมัติ (Shaker) สำหรับการใช้งานด้านการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

ภาพที่ 3.10 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้เครื่องเขย่า

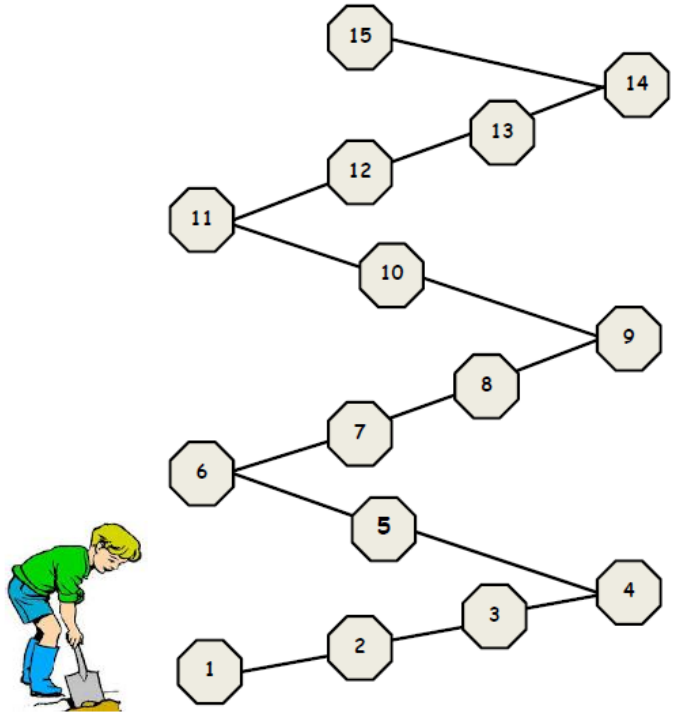
3.4 การลงพื้นที่สำรวจข้อมูลและเก็บตัวอย่าง

ลงพื้นที่สำรวจสภาพทั่วไปในพื้นที่เป้าหมายและสุ่มเก็บตัวอย่างดิน

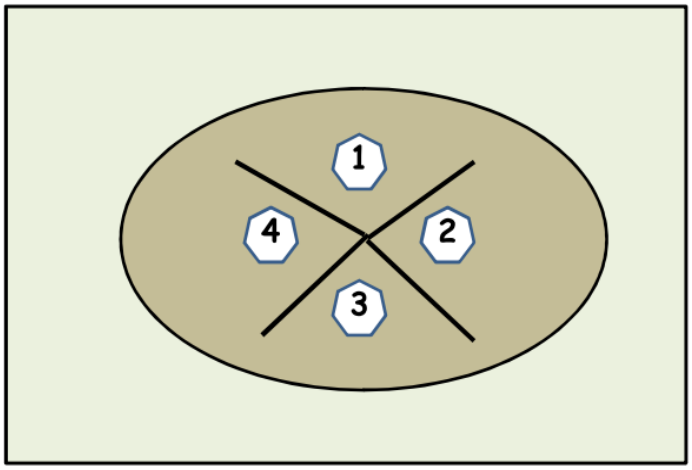
3.4.1 เก็บตัวอย่างดินหลุมฝังกลบ บริเวณพื้นที่กำจัดขยะมูลฝอย ตำบลคลองขวาง อำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี โดยเทคนิคการเก็บจะทำการสุ่มพื้นที่ออกเป็น 15 จุดย่อย (ภาพที่ 3.11) และเก็บตัวอย่างดินโดยใช้ Soil tube เป็นอุปกรณ์เก็บ ความลึกในการเก็บ 6 นิ้ว และ 12 นิ้ว

3.4.2 เก็บตัวอย่างดินทั้งหมดแล้วนำมารวมกัน คลุกเคล้าดินในถังให้เข้ากันและทำการ quartering ดินออกเป็น 4 ส่วน (ภาพที่ 3.12) แล้วนำมา 2 ส่วนเพื่อทำการทดลอง โดยดิน 2 ส่วนนั้นมีน้ำหนักประมาณ 1-2 กิโลกรัม

3.4.3 เก็บตัวอย่างดินประมาณ 1 กิโลกรัม เพื่อนำไปคัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยการสุ่มพื้นที่ออกเป็นจุดย่อย แปลงละ 15 จุด ตัวอย่างดินที่เก็บแสดงในภาพที่ 3.13



ภาพที่ 3.11 การสุ่มพื้นที่ออกเป็นจุดย่อย แปลงละ 15 จุด



ภาพที่ 3.12 การคลุกเคล้าดินตัวอย่างและการ Quartering ดินออกเป็น 4 ส่วน โดยกองดินเป็นรูปฝาชีแล้วใช้มือขีดเป็นกากบาท (+) บนยอดฝาชี เพื่อแบ่งกองดินเป็น 4 ส่วน

ภาพที่ 3.13 ตัวอย่างดินที่เก็บมาจากแหล่งฝังกลบขยะ ในเขตอำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี

3.5 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง

3.5.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

1) ลงพื้นที่สำรวจพื้นที่เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งฝังกลบขยะ ในเขตอำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี

2) การคัดแยกแบคทีเรีย Methanotroph จากดิน โดยนำตัวอย่างดินมาแยกเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrate Mineral Salt (NMS) ที่บรรจุก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ ร้อยละ 99.9 เขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์

3) ทำการจำแนกแบคทีเรียที่แยกได้ ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา โดยสกัดดีเอนเอของแบคทีเรียและใช้วิธีการ amplify ส่วน conserved regions ของ 16S rRNA ของแบคทีเรีย โดยใช้เครื่อง PCR และลำดับเบสของ Primer ได้แก่ Forward universal bacterial primer (27f) 5′ AGAGTTTGATCMIGGCTCAG3′ และ Reverse universal bacterial primer (1525r) 5′ AAGGAGGTGWTCCARCC 3′ โดยใช้ condition ของ PCR Cycle ดังนี้

5.1) Initial deraturation	95 องศาเซลเซียส 5 นาที	
5.2) Denaturation	95 องศาเซลเซียส 30 วินาที	35 Cycles
5.3) Annealing	57 องศาเซลเซียส 1 นาที	
5.4) Extension	72 องศาเซลเซียส 1 นาที	
5.5) Final extension	72 องศาเซลเซียส 5 นาที	

4) นำผลการ Amplify 16S rRNA ของแบคทีเรียที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี Sequencing เพื่อยืนยันการจัดจำแนกแบคทีเรีย Methanotroph

5) นำลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรีย Methanotroph สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ the National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อยืนยันผลการจัดจำแนก

6) นำลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรีย Methanotroph สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย ไปรายงาน (submission) ในฐานข้อมูลของ GenBank เพื่อเผยแพร่ในระดับนานาชาติ

7) ศึกษาเบื้องต้นในการผลิตเมทานอลของเชื้อที่แยกได้ ตามวิธีของ Lee และคณะ (2004) และ Xin และคณะ (2004) โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 0.6 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในอาหาร NMS และให้ก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ในปริมาณร้อยละ 20 ให้ปริมาณก๊าซ CO_2, O_2 และ N_2 ร้อยละ 40, 20 และ 20 ตามลำดับเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง rpm ตรวจวัดปริมาณ เมทานอลด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) (ภาพที่ 3.14)

ภาพที่ 3.14 การเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจำเพาะ

8) ศึกษาเพื่อคัดเลือกสภาวะที่มีความเหมาะสมในการผลิตเมทานอลของเชื้อที่แยกได้ ในปฏิกิริยาการผลิตเมทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยศึกษาผลของปัจจัยต่างๆที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ได้แก่ สัดส่วนเปอร์เซ็นต์ของ CH_4, CO_2, O_2 และ N_2 การเติมไอออนโลหะ ความเข้มข้นของเกลือ และอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์แบบแขวนลอย ความเข้มข้น 3 mg น้ำหนักแห้ง/ml ในระบบการผลิตแบบกะ (batch experiment) ปริมาตร 100 เปรียบเทียบปริมาณ เมทานอลที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อในแต่ละสภาวะ

9) วิเคราะห์คุณสมบัติของเมทานอลที่ได้ โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านกระบวนการหมักมากลั่นด้วยเครื่องกลั่นแบบลำดับส่วน และนำเมทานอลที่กลั่นได้ ณ เวลาที่มีความเข้มข้นของเมทานอลสูงสุดมาศึกษาคุณสมบัติของเมทานอลเทียบกับคุณสมบัติพื้นฐานของเมทานอล โดยหาค่าจุดเดือด ความหนาแน่น ความถ่วงจำเพาะและความหนืด

3.5.2 สถานที่ทำการทดลอง

1) ศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

2) สถานฝังกลบขยะในเขตอำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี

ภาพที่ 3.15 สถานที่ผังกลบขยะในเขตอำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี