บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อผลิตสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกชีวภาพจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม

ในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยทดลองศึกษาแบบการวิจัยประยุกต์ (Applied Research) แบ่งขั้นตอนการวิจัยดังนี้

1.1 การสำรวจข้อมูล

ทำการการศึกษาข้อมูลพื้นฐานเพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้มากำหนดลักษณะของงานวิจัย โดยการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ศึกษาเรื่องสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศึกษาเรื่องพลาสติกชีวภาพ ศึกษาเรื่องน้ำทิ้งโรงานอุตสาหกรรม ข้อมูลของนิคมอุตสาหกรรมในเขตจังหวัดพระนครศรีอยุธยาและปทุมธานี รวมถึงโรงงานอุตสาหกรรมในเขตนิคม เพื่อนำข้อมูลที่ได้มากำหนดการวางแผนการเก็บตัวอย่าง

1.2 การวางแผนการเก็บตัวอย่าง และการคัดเลือกจุลินทรีย์

1.2.1 วางแผนการเก็บตัวอย่างโดย ติดต่อนิคมอุตสาหกรรม และโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อขอเข้าเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งก่อนการบำบัดในแต่ละขั้นตอนของบ่อบำบัด

1.2.2 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพเบื้องต้นของน้ำทิ้งก่อนการบำบัด โดยการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ตามวิธีของ Hach Bottled Water Analysis Handbook 1st Edition และวิเคราะห์หาค่าบีโอดี (BOD) ตามวิธีของ Standard Method for Examination of Waterand Wastewater 17thed.

1.2.3 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม

นำตัวอย่างละ 25 มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 125 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ความเข้มข้นของตัวอย่างเจือจางเป็น 10^{-1} ทำการเจือจางตัวอย่างเป็น 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}และ 10^{-6} โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ MRS ที่เติม $CaCO_3$ บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับอาหาร NA สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อที่ขึ้นบนจานเลี้ยงเชื้อ นับจำนวนโคโลนี เลือกเก็บเชื้อจากจาน

เลี้ยงเชื้อที่นับจำนวนแล้ว โดยอาศัยความแตกต่างของสี รูปร่างและลักษณะของโคโลนีมาทำ Cross streak เพื่อทำให้เชื้อบริสุทธิ์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร NA เก็บไอโซเลตที่ได้สำหรับการทดลองต่อไป สำหรับเชื้อที่เจริญบนอาหาร MRS+ $CaCO_3$ คัดเลือกไอโซเลตที่เกิดวงใสล้อมรอบ ทำ Cross streak เพื่อทำให้เชื้อบริสุทธิ์เก็บไอโซเลตที่ได้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

1.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติบางประการทางชีวเคมี

1.3.1 การดูรูปร่างลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์ โดยการย้อมแกรม (Gram strain) และการสร้างเอนโดสปอร์ โดยการย้อมสีสปอร์

1.3.2 การทดสอบเอนไซม์คะตะเลส

เตรียมเชื้อเพื่อจะนำไปทำการทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง NA ที่อุณหภูมิ 30องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเกลี่ยลงบนแผ่นสไลด์ หยดสารละลาย 3%H_2O_2 ในบริเวณที่มีเชื้อบนแผ่นสไลด์ สังเกตฟองแก๊สที่เกิดขึ้นถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ แต่ถ้าไม่เกิดฟองแก๊สแสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้

1.3.3 การทดสอบคุณสมบัติการย่อยแป้งของเชื้อจุลินทรีย์

โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง Starch agar อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาทดสอบการย่อยแป้งโดยใช้สารละลายไอโอดีน 2% หากมีวงใสเกิดขึ้นบนอาหารแสดงว่าเชื้อจุลินทรีย์มีความสามารถในการย่อยแป้ง

1.4 การหาความสามารถในการผลิตมอนอเมอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

1.4.1 การหาปริมาณของกรดแลคติก

เตรียมตัวอย่างจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ โดยการนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRSปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายส่วนบนมากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนที่กรองได้มาวิเคราะห์โดยวิธี HPLC (Shimadzu Coperation Analytical & Measuring Intruments Division Kyoto, LC-20AD Series pumping system , SIL-10AD Series injector system and SPD-M20A Series Diode array detector)Inertsil ODS-3 column และ Inertsil ODS-3 gard column ใช้ UV detector ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และใช้ H_2SO_4 0.008 N เป็น mobile phase ด้วยอัตราการ

ไหล 0.6 มิลลิลิตร/นาที ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ปริมาณที่ฉีดวิเคราะห์เท่ากับ 20 ไมโครลิตร

1.4.2 การหาปริมาณ PHB ตามวิธีการของ ส่งศรี กุลปรีชา (2543) ดังนี้

1.) เตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ โดยปลูกเชื้อจุลินทรีย์จากเชื้อที่เก็บรักษาไว้บนอาหารแข็งเอียง โดยนำมาทำให้เซลล์แขวนลอยด์ ในสารละลายน้ำเกลือ เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) วัดการดูดกลืนแสงของเชื้อที่กระจาย (Cell suspensions) ในสารละลายที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.) นำกล้าเชื้อที่ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที นำตะกอนที่แยกได้ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม เติมสารละลายคลอรอกซ์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาขจัดคลอร็อกซ์โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนด้วยอะซิโตนแล เอทานอลบริสุทธิ์ 5 มิลลิลิตร เพื่อขจัดผิวเซลล์ (Cell membrane) ออก โดยปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ตามลำดับ หลังการปั่นทำการอบแห้งเพื่อขจัดเอทานอล จะได้ตะกอนบริสุทธิ์แล้วจึงนำมาเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อสกัด PHB ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นนำไปปั่นเก็บส่วนใสไว้ นำส่วนที่เป็นตะกอนไปสกัด PHB อีกครั้ง รวมส่วนใสที่ได้กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปรับปริมาตรของสารละลายที่ได้ด้วยคลอโรฟอร์มให้มีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ซึ่งจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ PHB ต่อไป โดยทำให้อยู่นความเข้มข้นที่เหมาะสม และจึงนำมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร อบแห้งในตู้อบ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อระเหยส่วนของคลอโรฟอร์มออกหมด จึงเติมกรด ซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปหาปริมาณ PHB โดยวิธี UV-Vis เทียบกับกราฟมาตรฐาน

1.5 การทดสอบสายพันธุ์จุลินทรีย์ของเชื้อที่ได้

คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำทิ้งโรงงานทั้ง 6 แหล่ง โดยดูจากความสามารถในการผลิตกรดแลคติกและการผลิตปริมาณ PHB สูง เพื่อทำการจัดจำแนกสายพันธุ์

จุลินทรีย์ตามวิธี partial 16S rDNA sequencing และ D1-D2 region sequencing วิธีการทดสอบดังแสดงในภาคผนวก 3