บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. วัสดุ

1.1 สารเคมีที่ใช้เป็นตัวอย่างของสารหนู

- โซเดียมอาร์เซไนต์ (Sodium arsenite)

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์สารหนู

- กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)
- กรดไนตริก (Nitric acid)
- กรดซัลฟูริค (Sulfuric acid)
- กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid)
- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)
- โพแทสเซียมไอโอเดต (Potassium iodate)
- โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (Sodium metabisulfite)
- โซเดียมไทโอซัลเฟต (Sodium thiosulfate)
- แอมโมเนียม โมลิบเดต (Ammonium molybdate)
- แอนติโมนิล โพแทสเซียม ทาร์เทรต (Antimonyl potassium tartrate)

1.3 สารเคมีที่ใช้ในการจำแนกเชื้อ

- เอทิลลีนไดเอมีนไตรคลอโรอะซิเตต (Ethylene diamine trichloroacetate, EDTA)
- Tris(hydroxymethyl)methylamine
- สารละลายบัฟเฟอร์เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (PCR buffer)
- dNTP
- ไพรเมอร์ (Primer)
- เอนไซม์พอลิเมอร์เรส (Taq DNA polymerase enzyme)
- DNA marker
- สีสำหรับย้อมเจล
- ชุดการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ (QIAquick DNA Purification Kit)
- อะกาโรสเจล (Agarose gel)

1.4 สารเคมีที่ใช้เป็นตัวอย่างของสารหนู

- โซเดียมอาร์เซไนต์ (Sodium arsenite)

1.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์สารหนู

- กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)
- กรดไนตริก (Nitric acid)

1.6 สารเคมีที่ใช้ในการจำแนกเชื้อ

- เอทิลลีนไดเอมีนไตรคลอโรอะซิเตต (Ethylene diamine trichloroacetate; EDTA)

1.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ

BSMY I (Basal Salt Yeast extract Medium I) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียประกอบด้วย (1 ลิตร) : 0.1% Tris-HCl buffer pH 8.0, yeast extract 1.0 กรัม, $(NH_4)_2SO_4$ 0.3 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.14 กรัม, $CaCl_2.2H_2O$ 0.2 กรัม, NaCl 0.1 กรัม, KH_2PO_4 0.05 กรัม, K_2HPO_4 0.05 กรัม, H_3BO_3 0.6 มิลลิกรัม, $CoCl_2.6H_2O$ 0.17 มิลลิกรัม, $CuCl_2.2H_2O$ 0.09 มิลลิกรัม, $MnCl_2.4H_2O$ 0.1 มิลลิกรัม, $ZnCl_2$ 0.22 มิลลิกรัม, glucose 10 กรัม(Yamamura *et al.*, 2003)

BSMY II (Basal Salt Yeast extract Medium II) อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการศึกษาระยะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารหนูประกอบด้วย (1 ลิตร) : glucose 10 กรัม, yeast extract 1.0 กรัม, NH_4Cl 0.25 กรัม, $MgCl_2.6H_2O$ 0.62 กรัม, $CaCl_2.2H_2O$ 0.15 กรัม, NaCl 1.0 กรัม, KH_2PO_4 0.14 กรัม, KCl 0.5 กรัม, H_3BO_3 0.06 มิลลิกรัม, $CoCl_2.6H_2O$ 0.12 มิลลิกรัม, $CuCl_2.2H_2O$ 0.015 มิลลิกรัม $MnCl_2.4H_2O$ 0.1 มิลลิกรัม, $ZnCl_2$ 0.07 มิลลิกรัม (ดัดแปลงจาก Kuai *et al.*, 2001)

2. อุปกรณ์

1. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter): METTLER รุ่น Delta 320
2. เครื่อง Spectrophotometer
3. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge): DENVILLE รุ่น 260 D, HETTICH ZENTRIFUGEN รุ่น Universal 32 R
4. เครื่องเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (Thermocycler): PERKIN ELMER, GeneAmp PCR system รุ่น 2400
5. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าในการทำเจลอิเล็กโตรโฟลิซิส (Power supply): BIO-RAD รุ่น Power PAC 300
6. เครื่อง UV transilluminator: AMERSHAM Bioscience, Hoefer Macrovue รุ่น UV-20
7. เครื่องเขย่า (Shaker): GFL รุ่น 3017

8. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaker incubator): VISION SCIENTIFIC
9. เครื่อง Vortex: Scientific Industries, Disruptor Genie รุ่น SI-D246
10. เครื่องทำความร้อน (Heating block): WEALTEC Corp., Wealtec รุ่น HB-1
11. เครื่อง Microplate reader
12. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow): Biohazard laminar flow รุ่น V6 Class II
13. ตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
14. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
15. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง: SARTORIUS รุ่น A210P
16. ตู้อบอากาศร้อน (Hot air oven): MEMMERT รุ่น UM 600

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณของสารหนู

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณของสารหนูทั้งหมดในตัวอย่างดินโดยเครื่อง ICP-AES

นำตัวอย่างดินมาชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 1 กรัมใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วทำการย่อยด้วยกรดไนตริกเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและทำการรีฟลักซ์โดยปิดปากบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกาเป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ทำให้เย็นแล้วนำมาเติมกรดไนตริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมกรดไนตริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์เป็นเวลา 30 นาทีอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้สารระเหยจนมีสารละลายเหลืออยู่ปริมาตร 5 มิลลิลิตรแล้วตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายเย็นลง จากนั้นเจือจางสารละลายที่ได้ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน (deionized water) 2 มิลลิลิตรและสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 30 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำสารละลายมาให้ความร้อนอย่างช้าๆ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 35 ปริมาตร 7 มิลลิลิตรนำไปให้ความร้อนจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติม สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 35 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรอีกครั้ง แล้วจึงเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตรและน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตรแล้วทำการรีฟลักซ์เป็นเวลา 15 นาที โดยไม่ให้สารละลายเดือดแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ทำการกรองและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณของสารหนูทั้งหมดโดยใช้เครื่อง Inductively coupled plasma-atomic emission spectrophotometer (ICP-AES)

<u>หมายเหตุ</u> การแสดงผลเป็นน้ำหนักแห้งให้นำตัวอย่างดินอีกส่วนหนึ่งมาชั่งให้ได้น้ำหนักที่ใกล้เคียงกับตัวอย่างดินที่นำไปย่อยโดยน้ำหนักที่ชั่งได้ไม่ควรเกิน 0.01 กรัม เพื่อหาอัตราส่วนของน้ำหนักแห้งต่อน้ำหนักเปียก (ดินส่วนนี้ต้องไม่นำไปทำการย่อยและวิเคราะห์ เพราะส่วนของสารที่ถูกวิเคราะห์จะมีการสูญหายไปในระหว่างการทำตัวอย่างดินให้แห้ง) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ100 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างที่อบแห้งแล้วไปทำการชั่งเพื่อหาน้ำหนักของตัวอย่างดิน

การคำนวณหาปริมาณสารหนู

$$C_s = (I_c - B) \times D \times R$$

เมื่อ B = ความเข้มข้นของ blank (มิลลิกรัม/ลิตร)

C_s = ความเข้มข้นของธาตุในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

D = Dilution factor (= 50 เมื่อใช้ตัวอย่าง 2 กรัมในปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

R = อัตราส่วนน้ำหนักเปียกต่อน้ำหนักแห้ง

I_c = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่อ่านได้จากเครื่อง (มิลลิกรัมต่อลิตร)

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณของสารหนูโดยวิธีวัดการดูดกลืนแสง (ดัดแปลงจาก Dhar และคณะ, 2004)

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มาทำให้เป็นกรดด้วยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 1 (ตัวอย่างจะต้องไม่นำมาปรับให้เป็นกรดด้วยสารละลายกรดไนตริกเนื่องจากกรดไนตริกจะมีผลทำให้สีที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาไม่มีความคงตัว ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันของสารละลาย) จากนั้นตัวอย่างสารละลายที่ได้มาทำวิเคราะห์โดยการดูดตัวอย่าง 2 ไมโครลิตรจำนวน 3 ครั้ง แล้วทำการเติมน้ำที่ปราศจากไอออนลงไปเพื่อทำการเจือจางสารละลายเป็น 1000 เท่า ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ตัวอย่างสารละลายที่ดูดมาในครั้งแรกจะถูกนำมาทำปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยสารละลายที่เป็นตัวออกซิไดซ์ (สารละลายโพแทสเซียมไอโอเดตความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร สารละลายที่ดูดมาในครั้งที่ 2 ถูกนำมาทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันกับสารละลายที่เป็นตัวรีดิวซ์ (ประกอบด้วย สารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 10 สารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้นร้อยละ 14 และสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 1.4 ตามลำดับ) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตัวอย่างในครั้งที่ 3 ให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตัวอย่างทั้ง 3 เมื่อทำปฏิกิริยากับสารแล้วให้วางทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงเติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี (ประกอบด้วย สารละลายกรดแอสคอร์บิกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10.8 สารละลายแอมโมเนียมโม

ลิบเดตความเข้มข้นร้อยละ 3 สารละลายแอนติโมนิล โพแทสเซียม ทาร์เทรตความเข้มข้นร้อยละ 0.56 และสารละลายกรดซัลฟูริคความเข้มข้นร้อยละ 13.98 ตามลำดับ) ลงไปในสารละลายทั้ง 3 ชนิด โดยเติมลงไปในปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวางทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 880 นาโนเมตร

2. การวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินมาชั่งให้ได้น้ำหนัก 10 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 25 นาที จึงนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

3. การวิเคราะห์การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จำนวน 2 ครั้ง แล้วจึงนำมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำตัวอย่างมา 100 ไมโครลิตรมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย Lowry reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายที่ได้มาเติมสารละลาย Folin reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาปริมาณของสารหนูในตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อน

ทำการเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารหนูในเขตอำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราชซึ่งได้แก่ ตัวอย่างดินจากบริเวณโครงการปฏิบัติการแก้ไขและลดการแพร่กระจายของสารหนูโดยใช้พืช ตัวอย่างดินบริเวณบ่อฝังกลบกากแร่สารหนู และบริเวณร่องน้ำเก่าบนเขาร่อนนาที่มีแนวทางไหลจากบ่อฝังกลบกากแร่ (ภาพที่ 6) โดยจะทำการเก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึกจากผิวดิน 0 - 15 เซนติเมตร จากนั้นนำตัวอย่างดินที่เก็บได้ใส่ในถุงพลาสติกแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำวัดค่าพีเอชของตัวอย่างดินการวิเคราะห์หาปริมาณสารหนูทั้งหมดในดินโดยเครื่อง ICP-AES (ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 1.1) และทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถดูดซับสารหนูได้ในขั้นต่อไป

(A)

(B)

ภาพที่ 6 (A) พื้นที่ในการเก็บตัวอย่างดินบริเวณโครงการปฏิบัติการแก้ไขและลดการแพร่กระจายของสารหนูโดยใช้พืช

(B) พื้นที่ในการเก็บตัวอย่างดินบริเวณบ่อฝังกลบกากแร่สารหนู

Figure 6. (A) Sample area within the Phytoremediation Project site

(B) Sample area surrounding landfill containing arsenic contaminated soil.

2. การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารหนู

นำตัวอย่างดิน 2 กรัม ใส่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการเขย่าเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อสกัดเชื้อจุลินทรีย์ออกมาจากดิน จากนั้นทำการดูดสารละลายมา 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSMY I ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มีการเติมโซเดียมอาร์เซไนต์ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการดูดสารละลายมา 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร BSMY I ที่มีการเติมโซเดียมอาร์เซไนต์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกันอีก 2 ครั้งแต่ใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอาร์เซไนต์ที่เติมลงไปในอาหาร BSMY แต่ละครั้งเท่ากับ 20 และ 40 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ หลังจากนั้นดูดสารละลาย 0.1 มิลลิลิตรมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง BSMY I ที่มีการเติมสารโซเดียมอาร์เซไนต์ลงไป 40 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ไปทำการจำแนกเชื้อเบื้องต้นโดยวิธีทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี และศึกษาอายุของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการดูดซับในการทดลองขั้นต่อไป

3. การศึกษาระยะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารหนู

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSMY II ที่มีการเติมโซเดียมอาร์เซไนต์ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ทำการวัดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และปริมาณของอาร์เซไนต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาเริ่มต้นและทุกๆ 6 - 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจนสิ้นสุดการทดลอง นำผลวิเคราะห์มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักเซลล์แห้ง และกราฟเพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และปริมาณของอาร์เซไนต์ที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อกับระยะเวลาในการบ่มเพื่อศึกษาอายุของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่เหมาะสมในการดูดซับสารหนู เมื่อทราบอายุของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่เหมาะสมต่อการดูดซับแล้วจึงนำเชื้อจุลินทรีย์ไปทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการดูดซับสารหนูในขั้นตอนการทดลองถัดไป

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการดูดซับสารหนูโดยเชื้อจุลินทรีย์

4.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการดูดซับสารหนู

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากข้อ 2 ประมาณ 1 ลูป ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSMY ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายมา 10 มิลลิลิตรใส่ในอาหาร BSMY ปริมาตร 100 มิลลิลิตรจำนวน 5 ฟลาสก์ แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในระยะเวลาที่เหมาะสมซึ่งได้จากข้อ 3 เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีอายุอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการดูดซับสารหนู แล้วจึงนำเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการดูดซับสารหนูในขั้นต่อไป

4.2 ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการดูดซับสารหนู

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมจากข้อ 4.1 ปริมาณ 10 มิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ใส่ในสารละลายโซเดียมอาร์เซไนต์ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการปรับค่าพีเอชของสารละลายให้มีค่าเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายใสที่ได้และตะกอนเซลล์จุลินทรีย์ไปวิเคราะห์หาปริมาณของสารหนู (ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 1.2)

4.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการดูดซับสารหนู

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมจากข้อ 4.1 ปริมาณ 10 มิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ใส่ในสารละลายโซเดียมอาร์เซไนต์ความเข้มข้น40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการปรับค่าพีเอชของสารละลายให้มีค่าที่เหมาะสมซึ่งได้จากข้อ 4.2 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสและตะกอนเซลล์จุลินทรีย์ไปวิเคราะห์หาปริมาณของสารหนู (ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 1.2)

4.4 ศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของไอออนของสารหนูต่อการดูดซับ

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมจากข้อ 4.1 ปริมาณ 10 มิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ใส่ในสารละลายโซเดียมอาร์เซไนต์ความเข้มข้น 40, 60 และ 80 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการปรับค่าพีเอช และนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 4.2 และ 4.3 เขย่าที่ความเร็ว150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสและตะกอนเซลล์จุลินทรีย์ไปวิเคราะห์หาปริมาณของสารหนู (ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 1.2)

4.5 ศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการดูดซับสารหนู

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมจากข้อ 4.1 ปริมาณ 10 มิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ใส่ในสารละลายโซเดียมอาร์เซไนต์ที่ทำการปรับค่า พีเอช อุณหภูมิในการบ่ม ความเข้มข้นเริ่มต้นของโซเดียมอาร์เซไนต์ที่เหมาะสมจากข้อ 4.2 - 4.4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0, 2, 4, 8, 12, 16 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายใสและตะกอนเซลล์จุลินทรีย์ไปวิเคราะห์หาปริมาณของสารหนู (ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 1.2)

4.6 ศึกษาปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการดูดซับสารหนู

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมจากข้อ 4.1 ปริมาณ 10, 20, 30 และ 40 มิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ใส่ในสารละลายโซเดียมอาร์เซไนต์ ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ที่ทำการปรับค่าพีเอช อุณหภูมิในการบ่ม ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารหนูและระยะเวลาที่เหมาะสมซึ่งได้จากข้อ 4.2 - 4.5 เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายใสและตะกอนเซลล์จุลินทรีย์ไปวิเคราะห์หาปริมาณของสารหนู (ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 1.2)

5. ศึกษาการปล่อยสารหนูของจุลินทรีย์ (ดัดแปลงจาก Gong และคณะ, 2005)

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมจากข้อ 4.1 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารประกอบของสารหนูลง โดยมีการปรับพีเอช อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม อายุและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ ระยะเวลาที่ใช้ในการดูดซับ และความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายของสารหนู ซึ่งได้จากข้อ 4.2 - 4.6 โดยนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณของสารหนูที่เหลืออยู่ (ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 1.2)

นำเซลล์จุลินทรีย์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง มาทำการเตรียมด้วยสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากนั้นนำไปเขย่าเป็นเวลา 20 นาที ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีแล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยง นำสารละลายที่เป็นส่วนใสมาทำการวิเคราะห์การปริมาณของสารหนู คำนวณหาประสิทธิภาพในการปล่อยสารหนูจากสมการ

ประสิทธิภาพในการปล่อยสารหนู (%)

$$= \frac{\text{ปริมาณของสารหนูที่ปล่อยออกมาในสารละลาย}}{\text{ปริมาณของสารหนูที่ถูกดูดซับ}} \times 100$$

ประสิทธิภาพในการนำตัวดูดซับกลับมาใช้ใหม่ (%)

$$= \frac{\text{ปริมาณของสารหนูที่ดูดซับ}}{\text{ปริมาณของสารหนูที่ถูกดูดซับครั้งแรก}} \times 100$$

6. การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

6.1 ทดสอบทางสัณฐานวิทยา โดยการย้อมแกรม ดูรูปร่าง ขนาดและการเรียงตัวของเซลล์

6.2 ทดสอบทางชีวเคมี (ตามวิธีการของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Noel, 1984))

ทดสอบคาตาเลส (Catalase test) การผลิตอินโดล (Production of indole) การทดสอบ Methyl red test การทดสอบ VP (Voges-Proskauer test) ทดสอบการใช้ซิเตรท (Citrate utilization test) การทดสอบการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide production test) การทดสอบออกซิเดส (Oxidase test) การทดสอบคาตาเลส (Catalase test) การศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test) การทำให้เจลาตินเหลว (Gelatin liquefaction) กระบวนการเปลี่ยนไนเตรท (Nitrate reduction) การทดสอบการออกซิไดส์และการหมัก (Oxidation-fermentation test)

6.3 การหาลำดับเบสของ 16S rDNA

<u>6.3.1</u> การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี Boiling/Freezing treatment (ดัดแปลงจาก Yamada และคณะ, 2002)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการล้างเซลล์โดยใช้ Tris-EDTA บัฟเฟอร์ นำเซลล์มาละลายใน Tris-EDTA บัฟเฟอร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำสารละลายเซลล์มาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาทีแล้วนำมาวางในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นเติมสารละลาย Tris-EDTA บัฟเฟอร์ปริมาณ 300 ไมโครลิตรจากนั้นจึงเก็บสารละลายมาดำเนินการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ และนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่สนใจต่อไป

<u>6.3.2</u> การเพิ่มจำนวนของ 16S rDNA

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ในข้อ 6.3.1 มาเพิ่มจำนวน 16S rDNA โดยทำตามขั้นตอนดังนี้ ปริมาตรรวมของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10x ปริมาตร 5 ไมโครลิตร สารละลาย dNTPs ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสความเข้มข้น 2.5 ยูนิต และน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Thermocycler ที่ตั้งระบบการทำงานดังนี้คือ ทำการ denaturation เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที หลังจากนั้นจึงทำตามขั้นตอนคือ 94

องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที, 50 องศาเซลเซียส เวลา 45 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที โดยทำเป็นจำนวน 25 รอบ หลังจากนั้นจึงทำ extension ครั้งสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นตรวจลักษณะของ PCR product ที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis จากนั้น PCR product ที่ได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR Purification Kit (QIAGEN, Inc.) แล้วทำการหาลำดับเบสโดยใช้ ABI Prism 3100 Genetic Analyzer แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบกับ GenBank