บทที่ 3
วิธีการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

-ตัวอย่างน้ำ, ตะกอนดิน, สัตว์น้ำ
-ตัวอย่างสาหร่ายจากอ่าวปัตตานี
-*Escherichia coli*
-*Pseudomonas aeruginosa* TISTR 358
-ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ
-เครื่องแก้ว (ได้แก่ กระบอกตวง ขวดวัดปริมาตร ปิเปต)
-คอลัมน์แก้วขนาด 1.5x20 cm
-ตะแกรงร่อน (Sieve) ขนาด 300-600 mesh
-เครื่องเขย่า (Labortechnix, KS 125)
-เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่งและ 4 ตำแหน่ง
-ชุดกรองแบคทีเรีย (Millipore filter)
-อุปกรณ์ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์
-กล้องจุลทัศน์ (compound microscope)
-ตู้อบ (Hot air oven)
-เครื่องวัดตำแหน่ง GPS
-Vortex mixer
-กระดาษกรอง Whatman No.42 , GF/C
-membrane filter (Millipore, 0.45 μm)
-โถดูดความชื้น (desiccator)
-Incubator
-Hotplate
-Autoclave
-Centrifuge (Beckman, USA)
-pH meter (MP220, Mettler)
-UV-Vis Spectrophotometer, LKB 6405
-Atomic absorption spectrophotometer แบบ Flame (FAAS) และ Graphite furnace (GFAAS) ของ Shimadzu AA680 และ แบบ Hydride generation ของ Perkin Elmer Analyst 100

3.1.2 สารเคมี

-Ascorbic acid, BDH (AR Grade)
-$NaBH_4$, Cheika Swizerland
-37% HCl, JT Baker
-As_2O_3, Merck (AR Grade)
-95-97% H_2SO_4, Merck (AR Grade)
-Standard As^{3+}, Merck (AR Grade)
-70% HNO_3, BDH (AR Grade)
-Standard Pb^{2+}, Merck (AR Grade)
-KI, BDH (AR Grade)
-Standard Cu^{2+}, Merck (AR Grade)
-Perchloric acid, Merck (AR Grade)
-NaOH, Merck (AR Grade)
-KOH, BDH (AR Grade)
-$HgCl_2$, Fluka (AR Grade)
-I_2, Merck (AR Grade)
-Diphenylamine, Fluka (AR grade)
- Activated carbon, Merck
-Silica gel, BDH
-Nutrient broth (NB)
-OF basal medium
-Starch agar
-Nutrient agar (NA)
-Salmonella shigellar agar
-Nitrate broth
-0.1% Peptone
-Litmus milk

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การหาปริมาณโลหะหนักในตัวอย่างน้ำ ตะกอนดินและสิ่งมีชีวิตในน้ำ

การย่อยตัวอย่างและการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในตัวอย่างน้ำ ตะกอนดินและสิ่งมีชีวิต ทำตามวิธีมาตรฐานของ APHA (1992) ดังมีรายละเอียดในหัวข้อ 3.2.1.2-3.2.1.3

3.2.1.1 สถานที่เก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำ ตะกอนดินและสัตว์น้ำจาก 4 บริเวณ คือ

1. บริเวณเหมืองแร่เก่าใกล้วัดถ้ำทะลุ (ลำธาร) ตำบลวัดถ้ำทะลุ อำเภอบันนังสตา จังหวัดยะลา (N 06°15.595' E 101°09.88')

2. บริเวณส่วนล่างของวัดถ้ำทะลุ (ลำธาร) ตำบลวัดถ้ำทะลุ อำเภอบันนังสตา จังหวัดยะลา (N 06° 15.284' E 101°10.27')

3. แม่น้ำปัตตานี สะพานยีลาปัน ตำบลตลิ่งชัน อำเภอบันนังสตา จังหวัดยะลา (N 06°16.706' E 101°17.39')

4. แม่น้ำปัตตานี สะพานท่าสาบ เทศบาลเมือง อำเภอเมือง จังหวัดยะลา (N 06°33.16' E 101°16.0')

3.2.1.2 ชนิดตัวอย่าง

1) น้ำ เก็บไว้ในขวดขวดพลาสติก เติมด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 2 mL ต่อตัวอย่างน้ำ 1 L ซึ่งทำให้ตัวอย่างน้ำมี pH ต่ำกว่า 2 เพื่อป้องการตกตะกอนหรือการดูดซับกับผนังของภาชนะที่ใส่และเก็บตัวอย่างน้ำในห้องเย็นอุณหภูมิ 4°C ระหว่างรอการวิเคราะห์

2) ตะกอนดิน เก็บใส่ถุงพลาสติกที่สะอาด ไม่ให้ถูกความร้อนและแสงแดด แช่ในน้ำแข็ง นำมาอบที่ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการวิเคราะห์

3) สัตว์น้ำ เก็บใส่ถุงพลาสติกที่สะอาด ไม่ให้ถูกความร้อนและแสงแดด แช่ในน้ำแข็งและเก็บตัวอย่างในห้องเย็น 4°C ระหว่างรอการวิเคราะห์

3.2.1.3 การย่อยตัวอย่าง

การเตรียมอุปกรณ์และเครื่องแก้ว

ล้างอุปกรณ์และเครื่องแก้วให้สะอาด นำไปแช่กรดไนตริก 10% โดยปริมาตร เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้ง นำไปอบให้แห้ง

การย่อยตัวอย่างน้ำ

เขย่าน้ำตัวอย่างให้เข้ากันดี ปิเปตน้ำตัวอย่างปริมาตร 50 mL ใส่ขวดรูปกรวยเติมกรดไนตริกเข้มข้นจำนวน 5 mL ใส่ boiling ship แล้วให้ความร้อนโดยใช้ hotplate ปรับความร้อนให้สารละลายเดือดอ่อน ๆ จนเกิดควันขาว และได้สารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.42 ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL ด้วยน้ำกลั่น

Prince of Songkla University Pattani Campus

๒ *การย่อยตัวอย่างตะกอนดิน*

ผสมตะกอนดินให้เข้ากันดี นำตะกอนดินอบให้แห้งที่ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บดตัวอย่างตะกอนให้ละเอียดโดยโกร่ง นำไปชั่ง โดยเครื่องชั่งละเอียดให้ได้ประมาณ 0.5 กรัม ในขวดรูปกรวย เติมกรดไนตริกเข้มข้น 5 mL นำไปให้ความร้อนโดย hotplate ปรับความร้อนให้สารละลายเดือดอ่อนๆ จะเกิดควันสีน้ำตาลเมื่อควันสีน้ำตาลจางลงให้ยกลงแล้วเติม กรดไนตริกและกรดเปอร์คลอริกอย่างละ 10 mL ใส่ boiling chip แล้วให้ความร้อนต่อปรับความร้อนให้สารละลายเดือดอ่อน ๆ จนเกิดควันขาวและได้สารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 42 ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL ด้วยน้ำกลั่น

๓ *การย่อยตัวอย่างสัตว์น้ำ*

ล้างตัวอย่างสัตว์น้ำให้สะอาด ทิ้งไว้ให้สะเด็ดน้ำ หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ บดให้ละเอียดด้วยโกร่ง นำไปชั่ง โดยเครื่องชั่งละเอียดให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม ในขวดรูปกรวย เติมกรดไนตริกเข้มข้นจำนวน 5 mL และกรดซัลฟิวริก (1+1) 7 mL ใส่ boiling chip แล้วให้ความร้อนด้วย hot plate ปรับความร้อนให้สารละลายเดือดอ่อน ๆ จนเกิดควันขาว และได้สารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.42 ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL ด้วยน้ำกลั่น

3.2.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก

การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานตะกั่วความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 mg/L ใน 1%HNO_3 จาก stock solution เข้มข้น 1000 mg/L

2) เตรียมตัวอย่างและย่อยตามวิธีการข้างต้น นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง AAS ชนิด Flame และ Graphite Furnace (Perkin Elmer Analyst 100) ที่ศูนย์เครื่องมือกลางคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

การวิเคราะห์ปริมาณทองแดง

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานทองแดงความเข้มข้น 5, 10, 20, 30 mg/L ใน 1%HNO_3 จาก stock solution เข้มข้น 1000 mg/L

2) เตรียมตัวอย่างและย่อยตามวิธีการข้างต้น นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง AAS Flame Technique (Perkin Elmer Analyst 100) ที่ศูนย์เครื่องมือกลางคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

การวิเคราะห์ปริมาณสารหนู

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานสารหนูความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25 µg/L จาก stock solution เข้มข้น 1000 mg/L

-เตรียม 10% HCl, 0.2 $NaBH_4$ ใน 0.5M NaOH

-เตรียมตัวอย่างและย่อยตามวิธีการข้างต้น ปิเปตตัวอย่างมา 10 mL ทำการรีดิวซ์ให้สารหนูอยู่ในรูป As^{3+} ทั้งหมดโดยใช้สารผสม (5 % ascorbic acid + 5%KI) จำนวน 10 mL เติมกรด HCl เข้มข้น 10 mL ตั้ง

Prince of Songkla University Pattani Campus

ทิ้งไว้ 45 นาที ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ก่อนนำไปวิเคราะห์โดยเครื่อง AAS Hydride generation (Perkin Elmer Aanalyst 100) ที่ศูนย์เครื่องมือกลางคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

3.2.1.5 การหา % Recovery ของโลหะหนักในตัวอย่างน้ำ, ตะกอนดิน และสัตว์น้ำ

โลหะหนัก

เตรียมสารละลายมาตรฐานโลหะหนัก เข้มข้น 200 mg/L จาก stock solution 1000 mg/L

ตัวอย่างน้ำ

ปิเปตน้ำตัวอย่างใส่ขวดรูปกรวย 3 ใบ ๆ ละ 50 mL ในแต่ละชุดการทดลองเติมสารละลายมาตรฐานโลหะหนักที่เตรียมจากข้างต้นลงในตัวอย่างน้ำให้ได้ความเข้มข้นของทองแดง 20 mg/L ตะกั่ว 500 µg/L และสารหนู 40 µg/L จากนั้นจึงนำไปย่อยตามวิธีการข้างต้น ปรับปริมาตรเป็น 100 mL

ตัวอย่างดิน

อบดินตัวอย่างที่ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปบดให้ละเอียดชั่งใส่ขวดรูปกรวย 3 ใบ ๆ ละ 0.5 กรัมน้ำหนักแห้ง ในแต่ละชุดการทดลองเติมสารละลายมาตรฐานโลหะหนักที่เตรียมจากข้างบนลงในตัวอย่างดิน ความเข้มข้นของโลหะคือ ทองแดง 100 mg/L ตะกั่ว 20 mg/L และ สารหนู 1 mg/L หลังจากนั้นจึงนำไปย่อยตามวิธีการข้างต้นแล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 100 mL

ตัวอย่างสัตว์น้ำ

บดตัวอย่างสัตว์น้ำ (ปลา, หอย) ให้ละเอียด ชั่งใส่ขวดรูปกรวย 3 ใบ ๆ ละ 0.5 กรัมน้ำหนักเปียก ในแต่ละชุดการทดลองเติมสารละลายมาตรฐานโลหะหนักที่เตรียมจากข้างบนลงในตัวอย่างสัตว์น้ำ ความเข้มข้นของโลหะคือ ทองแดง 100 mg/L ตะกั่ว 20 mg/L และ สารหนู 1 mg/L หลังจากนั้นจึงนำไปย่อยตามวิธีการย่อยข้างต้นแล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 100 mL

การวิเคราะห์โลหะหนัก

กรณีทองแดง และตะกั่ว นำตัวอย่างที่เตรียมได้ ไปวิเคราะห์โดยเครื่อง AAS ชนิด Flame (FAAS) และ Graphite Furnace (GFAS) ตามลำดับ (Perkin Elmer Analyst 100) ที่ศูนย์เครื่องมือกลางคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แล้วนำค่าที่ได้ไปหา % Recovery

กรณีสารหนู ปิเปตตัวอย่างน้ำ ตะกอนดิน หรือสัตว์น้ำที่ย่อยและเติมสารละลายสารหนูลงไปแล้วจากข้างต้น (ตัวอย่างน้ำ สารหนูเข้มข้น 40 µg/L ส่วนตะกอนดินและสัตว์น้ำ สารหนูเข้มข้น 1 mg/L) จำนวน 10 mL มาทำการรีดิวซ์ให้สารหนูอยู่ในรูป As^{3+} ทั้งหมดโดยใช้สารผสม (5% ascorbic acid + 5% KI) จำนวน 10 ml เติมกรด HCl เข้มข้น 10 mL ทิ้งไว้ 45 นาที ปรับปริมาตรเป็น 100 mL นำไปวิเคราะห์โดยเครื่อง AAS, Hydride generation (Perkin Elmer, Aanalyst 100) ที่ศูนย์เครื่องมือกลางคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แล้วนำค่าที่ได้ไปหา % Recovery

3.2.2 การศึกษาความสามารถดูดซับโลหะหนักบางชนิด โดยใช้สาหร่ายทะเล

3.2.2.1 การเก็บตัวอย่างสาหร่าย

Payap University of Songkla University Pattani Campus

1) เก็บตัวอย่างสาหร่ายจากอ่าวปัตตานี ที่บ้านดาโต๊ะ และแหลมตาชี นำมาล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง

2) ทำการอบตัวอย่างสาหร่ายที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนบดให้มีขนาด 300-600 μm สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.2.2 การศึกษาความสามารถดูดซับโลหะหนักบางชนิดโดยตัวอย่างสาหร่าย

ก. ศึกษาผลของพีเอชต่อความสามารถในการดูดซับโลหะหนักของตัวอย่างสาหร่าย

1) นำตัวอย่างสาหร่ายที่อบแห้งจำนวน 0.1 g มาเติมสารละลายโลหะหนักทองแดง (20 mg/L) ตะกั่ว (70 μg/L) และสารหนู (50 μg/L) ที่มีค่าพีเอชต่าง ๆ กัน คือ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0 และ 6.0 นำมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 100 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) เมื่อครบเวลา กรองสาหร่ายออกโดยใช้ membrane filter (Millipore) ขนาด 0.45 μm นำสารละลายใสที่กรองได้มาตรวจหาปริมาณโลหะหนักที่เหลือด้วยเครื่อง AAS

3) นำค่าพีเอช ที่เหมาะสมไปใช้ในการทดลองต่อไป

ข. ศึกษาปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมในการดูดซับโลหะหนัก (ทองแดง และสารหนู)

1) ชั่งตัวอย่างสาหร่ายผักกาดที่อบแห้งปริมาณต่าง ๆ กันคือ 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 g แช่ในสารละลายโลหะหนักแต่ละชนิดปริมาตร 50 mL (สารละลายทองแดงความเข้มข้น 20 mg/L สารละลายสารหนู 50 μg/L, พีเอช 5.0) เขย่าความเร็ว 100 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) เมื่อครบเวลา กรองสาหร่ายออกโดยใช้ membrane filter (Millipore) ขนาด 0.45 μm นำสารละลายใสที่กรองได้มาตรวจหาปริมาณโลหะหนักที่เหลือด้วยเครื่อง AAS

ค. ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถดูดซับโลหะหนักของสาหร่ายชนิดต่าง ๆ

1) นำตัวอย่างสาหร่ายที่อบแห้งจำนวน 0.1 g มาเติมสารละลายโลหะหนักที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ทำการเขย่าความเร็ว 100 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้กระบวนการดูดซับเกิดขึ้นจนถึงสมดุล

2) เมื่อครบเวลา กรองสาหร่ายออกโดยใช้ membrane filter (Millipore) ขนาด 0.45 μm นำสารละลายใสที่กรองได้มาตรวจหาปริมาณโลหะหนักที่เหลือด้วยเครื่อง AAS

3.2.2.3 การศึกษาจลนศาสตร์ของการดูดซับโลหะหนัก

1) เขย่าตัวอย่างสาหร่ายที่อบแห้ง 0.1 g ในขวดที่บรรจุสารละลายโลหะหนักชนิดต่าง ๆ คือ ทองแดง (10, 20 mg/L) ตะกั่ว (25, 50 μg/L) และสารหนู (25, 50 μg/L)

2) วิเคราะห์หาความเข้มข้นของโลหะหนักในสารละลายแต่ละชุดที่เวลาต่าง ๆ กัน คือ 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 120, 180 และ 360 นาที โดยใช้เครื่อง AAS

3.2.3 การศึกษา sorption-desorption

เลือกตัวอย่างสาหร่ายผมนางมาทำการทดสอบกระบวนการ sorption และ desorption โดยใช้สารละลายตะกั่ว เข้มข้น 20 mg/L ในการทดสอบการดูดซับ และใช้สารละลาย 0.1M HNO_3 เป็นตัวชะใน

Prince of Songkla University Pattani Campus

การทดสอบ desorption ทำการทดลอง sorption-desorption 2 รอบ เพื่อดูความเป็นไปได้ของการนำวัสดุสาหร่ายที่ผ่านการดูดซับโลหะกลับมาใช้อีก

1) นำตัวอย่างสาหร่ายผมนางอบแห้ง จำนวน 0.5 g นำมาเติมสารละลายตะกั่วเข้มข้น 20 mg/L พีเอช 5.0 ปริมาตร 100 mL เขย่าด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรอง และนำส่วนสารละลายใสที่ได้ไปตรวจหาปริมาณตะกั่วที่เหลือด้วยเครื่อง AAS

2) นำตัวอย่างสาหร่ายที่ผ่านการกรองจากข้อ 1) มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C ชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปแช่ในสารละลาย 0.1M HNO_3 และ 0.1M $CaCl_2$ ปริมาตรอย่างละ 100 mL เป็นเวลาอย่างน้อย 5 ชั่วโมง กรอง และนำส่วนสารละลายใสไปตรวจหาปริมาณตะกั่วด้วยเครื่อง AAS

3) นำตัวอย่างสาหร่ายที่ผ่านการชะและกรอง มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C ชั่งน้ำหนักก่อนที่จะนำไปทดลองการดูดซับตะกั่วและ desorption โดย 0.1M HNO_3 ตามข้อ 1) และ 2)

4) ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง หาค่า %adsorption และ %desorption ของตะกั่วโดยตัวอย่างสาหร่าย

3.2.4 การศึกษาการดูดซับโลหะหนักสารหนูโดยจุลินทรีย์

3.2.4.1 การคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างดินและน้ำ

1) ทำการเก็บตัวอย่างดินและน้ำจากบริเวณเดียวกันกับข้อ 3.2.1.1 โดยเก็บตัวอย่างในขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ไม่ให้ถูกความร้อนและแสงแดด แช่ในน้ำแข็ง ก่อนนำมาคัดแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

2) ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำ 10 เท่า ด้วย 0.1% peptone (10:90) ก่อนดูดตัวอย่างให้เขย่าขวด 15-20 ครั้ง

3) ทำการเจือจางตัวอย่างดิน 10 เท่าโดยชั่งดินจำนวน 25 g เจือจางด้วย 0.1% peptone ปริมาตร 225 mL

4) นำตัวอย่างน้ำและดินที่เจือจางขั้นแรกแล้ว ทำการเจือจางต่อให้ได้ความเจือจางที่เหมาะสม โดย ใช้ 0.1% peptone ปริมาตร 9 mL ใช้ตัวอย่าง 1 mL เขย่าให้เข้ากัน

5) นำตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจางไปเทลงในอาหาร NA

6) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7) เลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ เก็บไว้ในหลอดทดลองวุ้นเอียง (NA slant) ที่อุณหภูมิ 4°C

3.2.4.2 ทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ธรรมชาติ

1) นำเชื้อที่เก็บไว้เป็นโคโลนีเดี่ยวจากข้อ 3.2.4.1 มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมา streak ลงในอาหาร NA slant หลอดใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2) ถ่ายเชื้อลงในอาหาร NB ที่มีสารหนูความเข้มข้น 12 mg/L ส่วนฟลาสก์ควบคุมนั้นไม่ใส่สารหนูลงไป นำฟลาสก์ไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3) นำตัวอย่างและฟลาสก์ควบคุมไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 570 nm

4) ทำการทดลองเช่นเดียวกันในทุก ๆ โคโลนีที่คัดแยกได้

Prince of Songkla University Pattani Campus

5) เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร NB ที่มีสารหนูเข้มข้น 12 mg/L โดยพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสง ทำการคัดเลือกเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูง จำนวน 8 ไอโซเลท

3.2.4.3 คัดเลือกเชื้อจากธรรมชาติที่มีความสามารถดูดซับสารหนูในปริมาณสูงที่สุด

1) นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.2.4.2 มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไป streak ลงในอาหาร NA slant หลอดใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2) ถ่ายเชื้อลงในอาหาร NB ที่มีสารหนูความเข้มข้น 12 mg/L ส่วนฟลาสก์ควบคุมนั้นไม่เติมเชื้อลงไป นำฟลาสก์ไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 7 วัน

3) นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ ที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสไปวัดปริมาณสารหนูที่เหลือด้วยเครื่อง AAS ชนิด Hydride generation

4) ปริมาณการดูดซับสารหนู สามารถคำนวณได้จากสูตร

ปริมาณการดูดซับ (%) = $(A - B)/A \times 100$

เมื่อ A = ปริมาณสารหนูในฟลาสก์ควบคุม

B = ปริมาณสารหนูที่เหลือจากการดูดซับในอาหารเลี้ยงเชื้อ

5) เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการดูดซับสารหนู กับชนิดของเชื้อที่แยกได้

3.2.4.4 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ได้จากการคัดแยก (ไอโซเลต W 2-4 3)

1) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4.2

2) เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่าง ๆ กันคือ 0, 8, 14, 24, 32, 38 และ 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่เก็บได้ไปหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

3) เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง กับระยะเวลา แล้วเลือกช่วงเวลาการเจริญของเซลล์ที่ระยะ early stationary phase ไปใช้ทดสอบความสามารถดูดซับ

3.2.4.5 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 358

1) นำเชื้อที่เก็บไว้มาวางที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมา streak ลงในอาหาร NA slant หลอดใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2) ทำ suspension ของเชื้อโดยใช้อาหาร NB ปริมาตร 5 mL ใส่ลงในหลอดอาหาร NA slant ที่มีเชื้อเจริญอยู่ ขูดผิวหน้าของวุ้นให้เป็นเซลล์แขวนลอย

3) เทเซลล์แขวนลอยลงในฟลาสก์ที่บรรจุ NB ปริมาตร 100 mL เพื่อเตรียมหัวเชื้อ

4) นำเซลล์หัวเชื้อไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5) ถ่ายหัวเชื้อ 5% ลงในฟลาสก์ที่บรรจุอาหาร NB ปริมาตร 100 mL นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C

6) เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือ 0, 8, 14, 24, 32, 38, และ 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงและจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

Prince of Songkla University Pattani Campus

7) การหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ทำได้โดยนำตัวอย่างไปเจือจางให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม ดูดตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 1 mL ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ทำ pour plate โดยใช้อาหาร NA ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนี

8) เขียนกราฟการเจริญของ *P. aeruginosa* TISTR 358 โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสง กับระยะเวลา และกราฟจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดกับระยะเวลา แล้วเลือกช่วงเวลาการเจริญของเซลล์ที่ระยะ early stationary phase ไปใช้ทดสอบความสามารถดูดซับเพื่อเปรียบเทียบกับของเซลล์ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ (ไอโซเลต W 2-4 3)

3.2.4.6 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้เปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ทราบชนิด

1) การย้อมสี แบบแกรม

ทำการย้อมสีแบบแกรมของเชื้อที่คัดแยกได้ (W 2-4 3) และแบคทีเรียที่ทราบชนิดคือ *P. aeruginosa* TISTR 358 โดยมีวิธีการดังนี้

1) ทำเสมียร์และตรึงเชื้อตัวอย่างบนแผ่นสไลด์

2) หยดสีย้อมคริสตัลไวโอเลตลงบนสเมียร์จนท่วม ปล่อยไว้ประมาณ 1 นาที

3) ล้างสีออกด้วยน้ำประปา แล้วหยดสารละลายแกรมไอโอดีนลงจนท่วมเสมียร์ ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ก่อนล้างออกด้วยน้ำ และซับน้ำที่เกาะสไลด์จนแห้ง

4) หยดเอทิลแอกอฮอล 95% ลงบนฟิล์มเสมียร์ทีละหยด จนไม่มีสีถูกชะล้างออกมาจากสไลด์แล้วล้างน้ำ

5) ย้อมซ้ำด้วยซะฟรานิน ปล่อยไว้ประมาณ 1 นาที แล้วล้างน้ำอีกครั้ง ปล่อยให้แห้ง แล้วจึงนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2) การย้อมสีสปอร์ของเชื้อ W 2-4 3

1) ทำเสมียร์เชื้อแต่ไม่ต้องตรึงเชื้อด้วยความร้อน

2) นำแผ่นสไลด์ที่เสมียร์แล้ว ไปวางบนลวดรองสไลด์ซึ่งวางบนถาดใส่น้ำเดือด

3) หยดสีย้อม มาลาไคต์ กรีนให้ท่วมรอยเสมียร์ ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ต้องระวังไม่ให้สีย้อมแห้ง จากนั้นนำแผ่นสไลด์ไปล้างน้ำ

4) หยดด้วยซะฟรานินให้ท่วมรอยเสมียร์ ปล่อยไว้ประมาณ 30 วินาที จึงล้างน้ำออก ทำให้แห้ง แล้วนำไปตรวจการติดสีของสปอร์ (ถ้ามี) ด้วยกล้องจุลทรรศน์

3) การทดสอบทางชีวเคมี

วิธีการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่แยกได้จากธรรมชาติ (W 2-4 3) เปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ทราบชนิดคือ *P. aeruginosa* TISTR 358 มีดังต่อไปนี้

1) Motility test โดยใช้วิธี Hanging drop method และ Semisolid method

2) Oxidase test โดยใช้วิธี Indirect paper procedure และ Direct plate procedure

Prince of Songkla University Pattani Campus

3) Nitrite production

4) Denitrification

5) Gelatinase test

6) Litmus milk peptonized

7) Growth on SS agar

8) Oxidative-fermentative test

วิธีการทดสอบแต่ละชนิด ได้แสดงไว้ในภาคผนวก ข

3.2.4.7 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสม สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารหนูจากเชื้อที่คัดแยกได้ (ไอโซเลต W 2-4 3)

1) นำเชื้อที่คัดแยกได้มา streak ลงในอาหาร NA slant หลอดใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2) เตรียมอาหาร NB ปรับพีเอชให้ได้ค่าอยู่ในช่วง 3 – 7 ด้วย 0.1M HCl หรือ0.1M NaOH และทำการเตรียมหัวเชื้อของเซลล์ที่คัดแยกได้

3) ถ่ายหัวเชื้อ 5% ลงในฟลาสก์ที่บรรจุอาหาร NB ปริมาตร 100 mL ที่มีความเข้มข้นสารหนู 12 mg/L ทำฟลาสก์ควบคุมแต่ละระดับค่าพีเอชโดยไม่เติมเชื้อ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 7 วัน

4) นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ ที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสไปวัดปริมาณสารหนูที่เหลือด้วยเครื่อง AAS ชนิด Hydride generation

5) เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการดูดซับกับค่าพีเอชต่าง ๆ

3.2.4.8 ศึกษาความสามารถดูดซับสารหนูโดยเชื้อที่คัดแยกได้ (ไอโซเลต W 2-4 3) ที่ระยะเวลาต่างๆ

1) นำเชื้อที่เก็บไว้มาวางที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมา streak ลงในอาหาร NA slant หลอดใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2) เตรียมหัวเชื้อของเซลล์ที่คัดแยกได้

3) ถ่ายหัวเชื้อ 5% ลงในฟลาสก์ที่บรรจุอาหาร NB ปริมาตร 100 mL ที่มีสารหนู เข้มข้น 12 mg/L ทำฟลาสก์ควบคุมโดยไม่เติมเชื้อ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C

4) เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือ ที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ ที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสไปวัดปริมาณสารหนูที่เหลือด้วยเครื่อง AAS ชนิด Hydride generation

5) เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการดูดซับกับ ระยะเวลาต่าง ๆ

3.2.4.9 ศึกษาความสามารถดูดซับสารหนูโดยเชื้อที่คัดแยกได้ในสภาพมีชีวิตและไม่มีชีวิต

ก. ศึกษาความสามารถดูดซับสารหนูในสภาพที่มีชีวิต (Active cells)

Prince of Songkla University Pattani Campus

1) นำเชื้อที่เก็บไว้มาวางที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมา streak ลงในอาหาร NA slant หลอดใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2) ถ่ายหัวเชื้อ 5% ลงในฟลาสก์ที่บรรจุอาหาร NB ปริมาตร 100 mL ที่มีสารหนูเข้มข้น 12 mg/L ทำฟลาสก์ควบคุมโดยไม่เติมเชื้อ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 7 วัน

3) นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสไปวัดปริมาณสารหนูที่เหลือด้วยเครื่อง AAS ชนิด Hydride generation

ข. ศึกษาความสามารถดูดซับสารหนู โดยเซลล์ที่ไม่มีชีวิต (Inactive cells)

1) นำเชื้อที่เก็บไว้มาวางที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมา streak ลงในอาหาร NA slant หลอดใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2) ถ่ายหัวเชื้อ 5% ลงในฟลาสก์ที่บรรจุอาหาร NB ปริมาตร 100 mL ที่มีสารหนูเข้มข้น 12 mg/L ทำฟลาสก์ควบคุมโดยไม่เติมเชื้อ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 7 วัน

3) นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2000 rpm อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บเซลล์ที่ได้ส่วนล่างไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ในโถดูดความชื้น จนกระทั่งเย็นแล้วนำไปชั่ง

4) นำเซลล์แห้งใส่ลงในฟลาสก์ที่บรรจุอาหาร NB ปริมาตร 100 mL ที่มีสารหนูเข้มข้น 12 mg/L ทำฟลาสก์ควบคุมโดยไม่เติมเชื้อ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5) นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสไปวัดปริมาณสารหนูที่เหลือด้วยเครื่อง AAS ชนิด Hydride generation

3.2.4.10 การทดสอบความสามารถดูดซับสารหนูโดยเซลล์ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 358

1) นำเชื้อที่เก็บไว้มาวางที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมา streak ลงในอาหาร NA slant หลอดใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2) เตรียมหัวเชื้อของเซลล์ *P. aeruginosa* TISTR 358

3) ถ่ายหัวเชื้อ 5% ลงในฟลาสก์ที่บรรจุอาหาร NB ปริมาตร 100 mL ที่มีสารหนูเข้มข้นในช่วง 10-80 µg/L ทำฟลาสก์ควบคุมแต่ละระดับความเข้มข้นโดยไม่เติมเชื้อ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 7 วัน

4) นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสไปวัดปริมาณสารหนูที่เหลือด้วยเครื่อง AAS ชนิด Hydride generation

Pokok Ja

Prince of Songkla University Pattani Campus