

บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 ตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรีย และแบคทีเรีย

- 1) ไซยาโนแบคทีเรีย *Cylindrospermopsis* sp. C013, *Dolichospermum* sp. C014 และ *Microcystis* sp. C028 จากห้องปฏิบัติการวิจัยสาหร่ายประยูรศักดิ์ ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- 2) แบคทีเรีย *Bacillus* sp. AK3 (คนุพล, 2558)
- 3) *Microcystis* spp. จากอ่างแก้ว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และคูเมืองเชียงใหม่

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรีย

- 1) ขวดฝาเกลียว
- 2) จานเพาะเชื้อ
- 3) หัวถ่ายเชื้อ
- 4) แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (spreader)
- 5) ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 6) ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250, 1000 มิลลิลิตร
- 7) adjustable automatic pipettes และ pipette tip
- 8) ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow)
- 9) เครื่องซั่งทศนิยมสองตำแหน่ง
- 10) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- 11) เครื่องเขย่า (shaker) อุณหภูมิ 25, 37 องศาเซลเซียส
- 12) ตู้บ่มอุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย และไซยาโนแบคทีเรีย (ภาคผนวก ก)

- 1) Luria Bertani broth และ Luria Bertani agar (Ishii *et al.*, 2004)
- 2) BG-11 และ BG-11 ปราศจากไนเตรท (Stanier *et al.*, 1971)
- 3) mineral salt medium (Ibrahim *et al.*, 2013)

3.1.4 อุปกรณ์ที่ใช้ทดสอบการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียโดยแบคทีเรีย

- 1) ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250, 1000 มิลลิลิตร
- 2) จานเพาะเชื้อ
- 3) ห่วงถ่ายเชื้อ
- 4) haemocytometer และ cover glass
- 5) ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 6) adjustable automatic pipettes และ pipette tip
- 7) กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ
- 8) pH meter
- 9) เครื่อง microplate reader
- 10) ตู้บ่มอุณหภูมิ 25, 30, 35, 37 องศาเซลเซียส
- 11) น้ำยา lugol's solution

3.1.5 อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับสกัดสารพิษไมโครซิสติน

- 1) 99.99% methanol (RCI Labscan Limited)
- 2) deionized water
- 3) flask ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 4) foil
- 5) เครื่อง magnetic stirrers
- 6) กระดาษกรอง GF/C glass microfiber filters (Whatman)
- 7) เครื่อง evaporator
- 8) ขวดสีชา
- 9) เครื่อง centrifuge
- 10) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- 11) ชุดเครื่องแก้วกรอง

3.1.6 อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ และทำบริสุทธิ์ไมโครซิสติน

- 1) DEAE-650M resin (Toyopearl, Japan)
- 2) หลอดทดลองแบบฝาเกลียว
- 3) ion-exchange chromatography column
- 4) สารละลาย A (ภาคผนวก ข)
- 5) สารละลาย B (ภาคผนวก ข)
- 6) สารละลาย KOH (ภาคผนวก ข) (RCI Labscan Limited)

- 7) เครื่อง UV-visible spectrophotometer
- 8) เครื่อง high-performance liquid chromatography (HPLC)
- 9) C₁₈ HPLC column (Agilent)
- 10) acetonitrile (RCI Labscan Limited)
- 11) 0.05 M phosphate buffer (KH₂PO₄) (RCI Labscan Limited)
- 12) phosphoric acid (Merck KGaA)
- 13) สารมาตรฐาน microcystin-RR, -YR (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) และ -LR (Kanto Chemical CO., INC.)

3.1.7 อุปกรณ์ที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรีย

- 1) ชุดสกัดดีเอ็นเอ TIANamp Bacteria DNA Kit (TIAGEN, China)
- 2) ชุดทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ GF-1 AmbiClean Kit (Vivantis, Malaysia)
- 3) BioEdit และ MEGA 4.1 programs

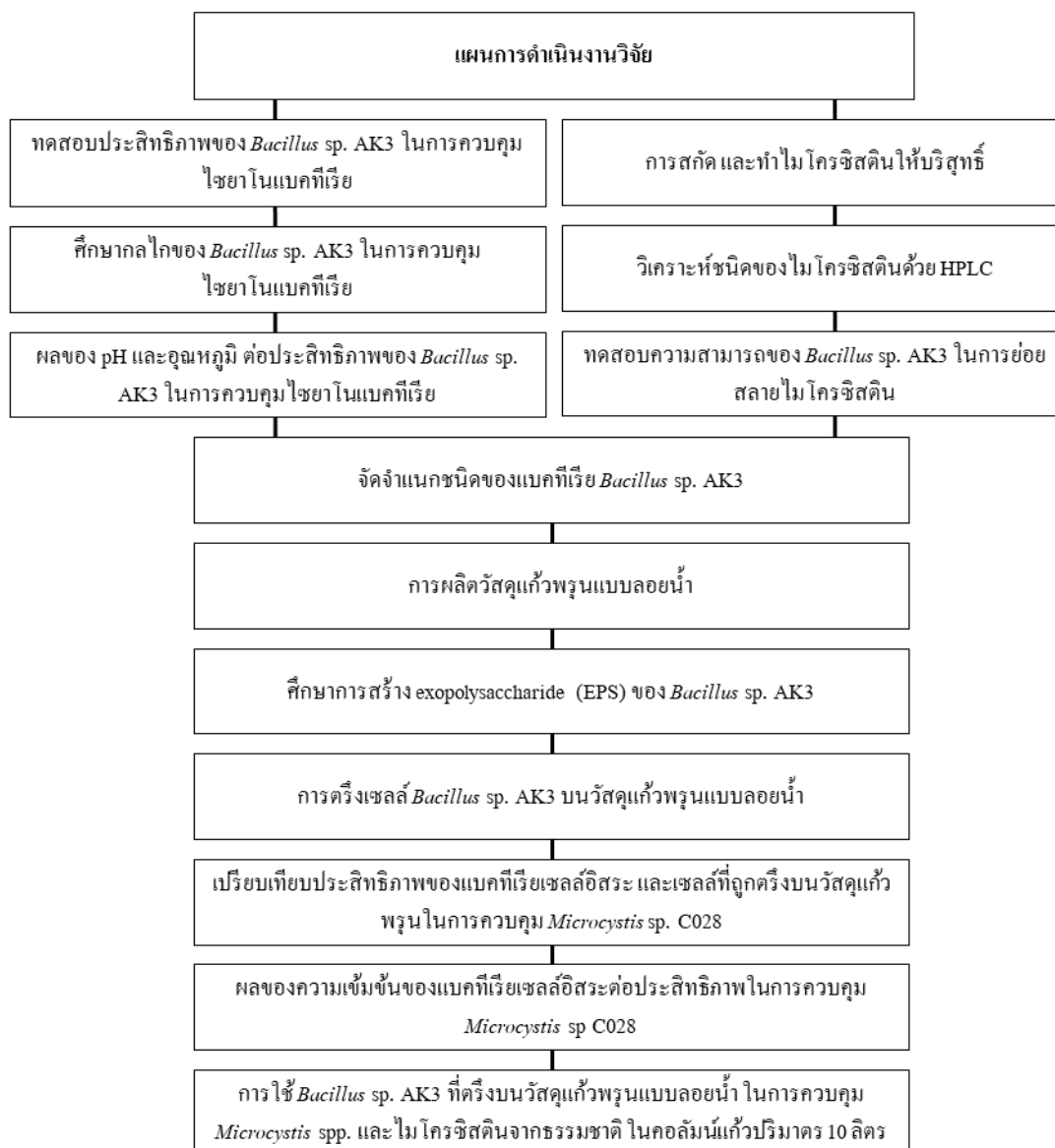
3.1.8 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการผลิตแควพูนแบบลอยน้ำ และตรึงเซลล์แบคทีเรีย

- 1) เต้าเผาแก๊ส อุณหภูมิ 700 องศาเซลเซียส
- 2) แบบพิมพ์โลหะทรงกระบอก
- 3) หม้อบด (pot mill)
- 4) เศษแควโซดา-ไลม์ ซิลิกา จากหุ่นส่วนจำกัด แก้วสิงห์ (2000) ; เกรดการค้า
- 5) โดโลไมท์ (dolomite) ; เกรดการค้า
- 6) ไดอะตอมไมท์ (diatomite) ; เกรดการค้า
- 7) 1% alcian blue solution (Himedia Laboratories Pvt, Ltd.)
- 8) probe sonicator

3.1.9 อุปกรณ์ติดตามการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยทางกายภาพ และเคมีบางประการของน้ำ

- 1) multiparameter waterproof meter (Hanna Instrument)
- 2) lux meter (Trans Instrument, Singapore)

3.2 วิธีการวิจัย



3.2.1 การควบคุมไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นพิษด้วย *Bacillus* sp. AK3

1) การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย นำไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สกุลที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *Cylindrospermopsis* sp. C013, *Dolichospermum* sp. C014 และ *Microcystis* sp. C028 มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร BG-11 ที่ pH 8.5 และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2) การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. AK3 ในการควบคุมการเจริญของ *Cylindrospermopsis* sp. C013, *Dolichospermum* sp. C014 และ *Microcystis* sp. C028 (ดัดแปลงจาก Kang *et al.*, 2012a)

2.1) เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. AK3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) broth เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 ($OD_{600} = 1$) และเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย และปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ($OD_{750} = 0.1$)

2.2) นำแบคทีเรีย และไซยาโนแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหาร BG-11 ที่มี pH เท่ากับ 7 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร โดยใส่แบคทีเรียในอัตราส่วน 5% ของปริมาตรทั้งหมด เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 120 รอบ/นาที่ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่มีเพียงไซยาโนแบคทีเรียเจริญอยู่ในอาหาร BG-11 เท่านั้น

2.3) วัดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 และ 750 นาโนเมตร (Hua *et al.*, 2009; Somdee *et al.*, 2013) และนับจำนวนของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก 12 ชั่วโมง จนกว่าจะไม่พบการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

3) ศึกษากลไกของ *Bacillus* sp. AK3 ในการควบคุม *Microcystis* sp. C028 (ดัดแปลงจาก Lin *et al.*, 2016)

3.1) การทดลองนี้ได้ใช้ไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis* sp. C028 ในการทดลอง เนื่องจากเป็นไซยาโนแบคทีเรียในสกุลที่พบได้บ่อยที่สุด และเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสิ่งแวดล้อมในแหล่งน้ำทั่วโลก โดยเพาะเลี้ยง *Microcystis* sp. C028 ในอาหาร BG-11 ที่ pH 8.5 และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ($OD_{750} = 0.1$)

3.2) เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. AK3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที่ ที่ 4 °C นาน 15 นาที และเก็บส่วนของเหลว (supernatant) นำไปกรองผ่านแผ่นกรองแบคทีเรียขนาด 0.22 ไมครอน ส่วนตะกอนเซลล์แบคทีเรีย (cell pellets) นำไปล้างเซลล์ด้วย 0.01 M phosphate buffer saline (PBS) 3 ครั้ง และเติม PBS ลงไป เพื่อนำมาทดลองต่อไป

3.3) แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุด ดังนี้ 1) ส่วนของเหลว (supernatant) 2) ตะกอนเซลล์ (cell pellets) และ 3) bacteria culture (ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง และกรอง) โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของตะกอนเซลล์แบคทีเรีย มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับความเข้มข้นของ bacteria culture ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (OD_{600} ประมาณ 2.0)

3.4) นำชุดการทดลองทั้ง 3 ชุด มาเพาะเลี้ยงร่วมกับไซยาโนแบคทีเรียในอาหาร BG-11 โดยใส่ส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากแบคทีเรียในอัตราส่วน 5% ของปริมาตรทั้งหมด 150 มิลลิลิตร โดยมีชุดควบคุมคือ ไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงใน LB broth และ BG-11 ติดตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 และ 750 นาโนเมตร และนับจำนวนเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จนกว่าจะไม่พบการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

4) ผลของ pH และอุณหภูมิ ต่อประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. AK3 ในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย

4.1) เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. AK3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) broth เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 ($OD_{600} = 1$) และเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สกุล ในอาหาร BG-11 ที่ pH 8.5 และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ($OD_{750} = 0.1$)

4.2) นำแบคทีเรีย และไซยาโนแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงร่วมกันในสภาวะที่แปรผัน pH และอุณหภูมิ ให้แตกต่างกันคือ pH ที่ 6, 7, 8 และ 9 และอุณหภูมิที่ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่มีเพียงไซยาโนแบคทีเรียในอาหาร BG-11 และชุดที่มีเพียงแบคทีเรียในอาหาร BG-11 ติดตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 และ 750 นาโนเมตร และนับจำนวนเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จนกว่าจะไม่พบการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย และติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (Somdee *et al.* 2013)

3.2.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไมโครซิสตินของ *Bacillus* sp. AK3

1) สกัดไมโครซิสติน (ดัดแปลงจากวิธีของ Saito *et al.*, 2003)

1.1) เก็บเซลล์ของ *Microcystis* spp. ที่เกิดการเจริญอย่างรวดเร็วบริเวณคูเมือง จังหวัดเชียงใหม่ และทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer จากนั้น นำเซลล์แห้งของไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 25 กรัม มาผสมกับ 75% methanol ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และกวนด้วยเครื่อง magnetic stirrer เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

1.2) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนของเหลว (supernatant) ไว้ และนำตะกอนเซลล์มาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นนำส่วนของเหลวที่ได้ มากรองด้วยกระดาษกรอง GF/C glass filter (Whatman, USA) และนำสารสกัดไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ภายใต้สุญญากาศ เก็บสารสกัดให้พ้นจากแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2) ทำปฏิกิริยาไมโครซิสติน (ดัดแปลงจากวิธีของ Saito *et al.*, 2003)

2.1) เตรียมคอลัมน์ ion-exchange chromatography โดยนำ DEAE-650M resin มาใช้ในสารละลาย A (ภาคผนวก ข) เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้อยู่ในสภาวะพร้อมใช้งาน จากนั้นบรรจุลงในคอลัมน์ให้มีความสูงประมาณ 30 เซนติเมตร ล้างคอลัมน์ก่อน และหลังการใช้งานด้วยสารละลาย A ปริมาตรเท่ากับ 1.5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ จากนั้นปรับคอลัมน์ให้มีอัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที

2.2) นำสารสกัดหยาบไมโครซิสตินมาละลายในสารละลาย A (ภาคผนวก ข) ในอัตราส่วน สารสกัด 1 มิลลิกรัม ต่อสารละลาย A 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดดังกล่าว ปริมาตร 10 มิลลิลิตรมาเทลงในคอลัมน์ และเริ่มชะด้วยสารละลาย A เมื่อเวลาผ่านไป ชะด้วยสารละลาย B (ภาคผนวก ข) โดยเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารละลาย B เป็นแบบเส้นตรง (linear gradient) และลดความเข้มข้นของสารละลาย A เป็นแบบเส้นตรงเช่นเดียวกัน เพื่อเป็นการเพิ่มประจุให้สารที่ถูกจับในคอลัมน์ค่อย ๆ ไหลออกมาจากคอลัมน์ตามลำดับ เก็บสารจำนวน 100 หลอด (fraction) หลอดละ 7 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารที่ถูกชะออกมาในแต่ละหลอดไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร และนำมาสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และจำนวน fraction

3) การวิเคราะห์ชนิดของไมโครซิสตินด้วย HPLC (Somdee *et al.*, 2016)

วิเคราะห์ชนิดของไมโครซิสตินที่ผ่านการทำปฏิกิริยา ด้วย HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ acetonitrile และ 0.05 M phosphate buffer pH 3 ในอัตราส่วน 30:70 v/v และเฟสคงที่ (stationary phase) คือ C18 HPLC column อัตราการไหล (flow rate) 1 มิลลิลิตร/นาที และวัดความยาวคลื่นแสงที่ 238 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐาน microcystin-RR, -YR และ -LR จากนั้น เก็บรักษาไมโครซิสตินให้พ้นจากแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทดลองต่อไป

4) การทดสอบความสามารถของ *Bacillus* sp. AK3 ในการย่อยสลายไมโครซิสติน (ดัดแปลงจาก Li *et al.*, 2016)

4.1) เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. AK3 ในอาหาร LB broth เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่ 4 °C นาน 15 นาที จากนั้นเทส่วนของเหลวทิ้ง และล้างตะกอนเซลล์ด้วย 0.01 M phosphate buffer saline (PBS)

4.2) นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์ OD₆₀₀ เท่ากับ 1.0 และนำมาใส่ในอาหาร MSM ที่มีไมโครซิสตินความเข้มข้นสุดท้าย 15 ไมโครกรัม/ลิตร โดยใส่เซลล์แบคทีเรียในอัตราส่วน 5% ของอาหาร MSM นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า (30°C, 120 รอบต่อนาที) เก็บผลการทดลองทุกวัน เป็นระยะเวลา 3 วัน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของไมโครซิสตินด้วยเครื่อง HPLC

3.2.3 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. AK3 (Wobus *et.al.*, 2003)

1) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส์ 16s rRNA โดยสกัด genomic DNA ของ *Bacillus* sp. AK3 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร LB broth เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในหลอด micro centrifuge และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น นำไปสกัด genomic DNA ด้วย TIAN Bacteria DNA Kit โดยดำเนินการตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ (ภาคผนวก ก)

2) นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ มาเพิ่มปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ยีน ด้วย Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ BIOTAQ™ DNA polymerase (Bioline) โดยเติมส่วนประกอบตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ (ภาคผนวก ก) และไพรเมอร์ 27F และ 1492R ลงในหลอด PCR จากนั้น นำไปเพิ่มปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง PCR โดยสภาวะที่ใช้ แสดงในภาคผนวก ก

3) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และนำผลิตภัณฑ์มาทำบริสุทธิ์ด้วย GF-1 AmbiClean Kit จากนั้น ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First BASE Laboratories Sdn. Bhd. และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบในฐานข้อมูลของ GenBank และสร้าง phylogenetic tree

3.2.4 การศึกษาการตรึงแบคทีเรีนวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ

1) การผลิตวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ (ดัดแปลงจาก Shongkittikul *et al.*, 2011)

ผสมวัตถุดิบหลักที่ประกอบด้วย ผงแก้ว (88%), Diatomite (5%) และ Dolomite (7%) ในหม้อบด ผสมวัตถุดิบเป็นเวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าว มาพรมด้วยน้ำให้พอมีความชื้น แล้วอัดลงในแบบพิมพ์ทรงกระบอก กดแบบพิมพ์ดังกล่าวลงบนแผ่นเซรามิกทนความร้อน และนำไปเผาที่อุณหภูมิ 700 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้วัสดุพองและเกิดรูพูน หลังจากครบเวลา ทิ้งให้วัสดุเย็นตัวลง แล้วนำมาเปิดรูพูนโดยการใส่ในหม้อบด และนำไปกวนด้วยเครื่องหมุน ทำให้เกิดรูพูนเปิดบริเวณผิวของวัสดุแก้วพูน (ภาพที่ 11)

2) ศึกษาการสร้าง exopolysaccharide (EPS) ของแบคทีเรีย (Hazaimah *et al.* 2014)

2.1) การศึกษาการสร้าง EPS ของแบคทีเรีย ซึ่งจะทำหน้าที่ช่วยในกระบวนการตรึงเซลล์แบบ absorption ทำให้แบคทีเรียยึดติดกับวัสดุตรึงได้ดี ทำได้โดย เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. AK3 (ความเข้มข้นเริ่มต้น $OD_{600} = 0.1$) ในอาหาร mineral salt medium และ luria bertani จากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บผลทุก 1 วัน เพื่อนำมาวัดปริมาณการสร้าง EPS ของแบคทีเรียด้วยวิธี Alcian blue adsorption assay

2.2) วิธี Alcian blue adsorption assay ทำได้โดย เติม 1% alcian blue solution ลงในตัวอย่างแบคทีเรียจากข้อ 2.1) ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที สี alcian blue จะย้อมติดกับ EPS และก่อให้เกิดการตกตะกอน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เพื่อแยกตะกอน และเซลล์แบคทีเรียออก จากนั้นจึงนำส่วนของเหลว (supernatant) มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 606 นาโนเมตร โดยปริมาณ EPS ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น จะคำนวณจากการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 606 นาโนเมตรในสารละลายตัวอย่าง



ภาพที่ 11 การผลิตวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ A) วัตถุดิบในการผลิตแก้วพูน B) ถังเซรามิกสำหรับผสมวัตถุดิบ C) การขึ้นรูปแก้วพูนด้วยแบบพิมพ์ D) การเผาแก้วพูนในเตาเผาแก๊ส

3) การตรึงเซลล์แบคทีเรียบนวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ (Jung *et al.* 2013)

3.1) เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. AK3 ในอาหาร LB broth ตามระยะเวลาที่ได้จากผลการศึกษาในข้อ 2) (48 ชั่วโมง) เพื่อให้แบคทีเรียผลิต EPS ได้ในปริมาณสูงก่อน จากนั้นจึงใส่วัสดุแก้วพูนลงไป เพื่อตรึงเซลล์แบคทีเรียแบบ adsorption และนำไปบ่มเขย่าที่ความเร็ว 30 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บผลการทดลองทุก 6 ชั่วโมง เพื่อนำมานับจำนวนแบคทีเรียบนวัสดุ จนกระทั่งแบคทีเรียที่เกาะติดบนวัสดุเริ่มมีจำนวนคงที่

3.2) การนับจำนวนแบคทีเรียที่เกาะติดบนวัสดุ ทำได้โดย เก็บตัวอย่างวัสดุ
ตรึงจำนวน 5 กรัม ล้างเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ได้เกาะติดบนวัสดุออกไป ด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้น นำเม็ด
วัสดุมาใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 30 นาที และนำไป
sonication ที่ amplitude เท่ากับ 20% เพื่อชะเซลล์แบคทีเรียที่เกาะติดอยู่กับวัสดุออกจากนั้น นำมาเจือ
จางแบบ ten-fold serial dilution และ spread plate ลงบน 3M Petrifilm™ aerobic count plates เพื่อนับ
จำนวนแบคทีเรีย

3.2.5 การควบคุมไซยาโนแบคทีเรียด้วยแบคทีเรียเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึงบนวัสดุแก้ว พูนแบบลอยน้ำ

1) การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึงบน วัสดุแก้วพูนในการควบคุม *Microcystis* sp. C028

1.1) แบ่งชุดทดลองออกเป็น 2 ชุด ได้แก่ 1) แบคทีเรียแบบเซลล์อิสระ (free
cells) 2) แบคทีเรียแบบเซลล์ตรึงด้วยวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ (immobilized-bacteria) โดยกำหนดให้
มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากันที่ 11×10^8 CFU / (g หรือ mL)

1.2) นำแต่ละชุดการทดลองมาเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Microcystis* sp. C028 ความ
เข้มข้นเซลล์ที่ $OD_{750} = 0.1$ ในอาหาร BG-11 โดยใส่ชุดการทดลองดังกล่าวในอัตราส่วน 5% ของ
ปริมาตรทั้งหมด 500 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง และ pH เท่ากับ 7 โดยมีชุดควบคุมคือ
ชุดที่มีเพียงไซยาโนแบคทีเรียเจริญอยู่ในอาหาร BG-11 และชุดที่มีเพียงไซยาโนแบคทีเรียกับวัสดุแก้ว
พูนแบบลอยน้ำ ติดตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทุกวัน จนกว่าจะไม่พบการเจริญของไซยา-
โนแบคทีเรีย

2) ผลของความเข้มข้นของแบคทีเรียเซลล์อิสระต่อประสิทธิภาพในการควบคุม *Microcystis* sp. C028

2.1) เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. AK3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth เป็นระยะเวลา
48 ชั่วโมง จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที่ ที่ 4 °C นาน 15 นาที และเก็บส่วน
ตะกอนเซลล์แบคทีเรียไว้ จากนั้น ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วย 0.01 M phosphate buffer saline (PBS) 3
ครั้ง และปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์ OD_{600} เท่ากับ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5

2.2) นำเซลล์แบคทีเรียที่มีความเข้มข้นดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงร่วมกับ
Microcystis sp. C028 ความเข้มข้นเซลล์ที่ $OD_{750} = 0.1$ ในอาหาร BG-11 โดยใส่เซลล์แบคทีเรียใน
อัตราส่วน 5% ของปริมาตรทั้งหมด 150 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ
pH เท่ากับ 7 โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่มีเพียงไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร BG-11 และติดตาม
การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทุกวัน จนกว่าจะไม่พบการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

3.2.6 การใช้แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ ในการควบคุม *Microcystis* spp. และย่อยสลาย ไมโครซิสติน ในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร

1) การเตรียมการทดลองในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร

1.1) เก็บตัวอย่าง *Microcystis* spp. จากอ่างแก้ว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ นำมาใส่ในคอลัมน์แก้วให้ได้ปริมาตร 10 ลิตร โดยจำนวนเซลล์เริ่มต้นของ *Microcystis* spp. เท่ากับ 65.88×10^5 cells/mL จากนั้น ใส่ *Bacillus* sp. AK3 ที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำในอัตราส่วน 5% ลงในตัวอย่างดังกล่าว (ภาพที่ 12)

1.2) ทดสอบความสามารถในการควบคุม *Microcystis* spp. และย่อยสลายไมโครซิสตินของ *Bacillus* sp. AK3 ที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ ในสภาวะ แสง:มืด 12:12 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง $116 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ และอุณหภูมิห้อง โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่มีเพียง *Microcystis* spp. จากธรรมชาติ เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยทางชีวภาพ เคมี และกายภาพ บางประการ



ภาพที่ 12 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. AK3 ที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ ในการควบคุม *Microcystis* spp. และย่อยสลายไมโครซิสตินจากธรรมชาติ ในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร

2) การติดตามการเจริญของ *Microcystis* spp.

2.1) นับจำนวนเซลล์โดย เก็บตัวอย่างน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป sonication ด้วย sonicator bath ประมาณ 30 นาที เพื่อแยกเซลล์ของ *Microcystis* spp. ที่อยู่เป็นโคลนี ให้หลุดเป็นเซลล์เดี่ยว และนับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer

2.2) วัดปริมาณ chlorophyll-*a* ด้วยวิธีของ Wintermans and de Mots (1965) และ Saijo (1975) โดยเก็บตัวอย่างน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร และกรองผ่านกระดาษกรอง GF/C จากนั้นเติม 90% methanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำไปปั่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm 10 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630, 645, 665 และ 750 นาโนเมตร จำนวนด้วยสมการ ดังนี้

$$\text{Chlorophyll-}a \text{ (}\mu\text{g/L)} = (11.6D_{665} - 1.31D_{645} - 0.14D_{630}) \times F$$

กำหนดให้ $F = (V/V_f) \times (1/L)$

$$D_{665} : (\text{OD}_{665} \text{ nm}) - (\text{OD}_{750} \text{ nm})$$

$$D_{645} : (\text{OD}_{645} \text{ nm}) - (\text{OD}_{750} \text{ nm})$$

$$D_{630} : (\text{OD}_{630} \text{ nm}) - (\text{OD}_{750} \text{ nm})$$

$$V : \text{ปริมาตรรวมทั้งหมดในการสกัด (mL)}$$

$$V_f : \text{ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการกรอง (L)}$$

$$L : \text{ความกว้างของ cuvette (cm)}$$

3) การติดตามปริมาณสารพิษไมโครซิสตินภายในคอลัมน์แก้ว

3.1) การวัดปริมาณไมโครซิสตินที่ละลายในน้ำ ทำได้โดย เก็บตัวอย่างน้ำ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้น กรองผ่านกระดาษกรอง GF/C และกรองด้วย sterile syringe filter nylon 0.45 μm จากนั้น นำไปวิเคราะห์ชนิด และปริมาณของไมโครซิสตินในน้ำด้วย HPLC เทียบกับสารมาตรฐานไมโครซิสติน เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.2.2

3.2) การวัดปริมาณ total microcystins ทำได้โดย เก็บตัวอย่างน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในวันที่ 8 ของการทดลอง จากนั้นนำไป freeze-thaw 3 ครั้ง และนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง GF/C และกรองด้วย sterile syringe filter nylon 0.45 μm และนำไปวิเคราะห์ชนิด และปริมาณของไมโครซิสตินด้วย HPLC เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.2.2

4) การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียภายในน้ำ และภายในวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ

4.1) นับจำนวนแบคทีเรียในน้ำ โดยเก็บตัวอย่างน้ำ และนำมาเจือจางแบบ ten-fold serial dilution และ spread plate ลงบน 3M Petrifilm™ Aerobic Count Plates เพื่อนับจำนวนแบคทีเรีย

4.2) นับจำนวนแบคทีเรียที่เกาะติดบนวัสดุ โดยเก็บตัวอย่างวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำจำนวน 5 กรัม ล้างเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ได้เกาะติดบนวัสดุออกไป ด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดวัสดุมาใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที และนำไป sonication ที่ amplitude เท่ากับ 20% เพื่อชะเซลล์แบคทีเรียที่เกาะติดอยู่กับวัสดุออกจากนั้น นำมาเจือจางแบบ ten-fold serial dilution และ spread plate ลงบน 3M Petrifilm™ aerobic count plates เพื่อนับจำนวนแบคทีเรีย

5) การติดตามการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยทางเคมี และกายภาพบางประการ

วัด pH, dissolved oxygen, conductivity, total dissolved solids และ อุณหภูมิของน้ำ โดยใช้ multiparameter waterproof meter และวัดค่าความเข้มแสงโดยใช้ lux meter ติดตามการเปลี่ยนแปลงทุกวันจนสิ้นสุดการทดลอง

3.2.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบผลการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ ได้แก่ Tukey HSD และ T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรม SPSS

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved