# บทที่ 3

# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 เชื้อแบคทีเรียย่อยสลายสารอาทราซีน

เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ไทยที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารอาทราซีนในการทดลองนี้ คือ เชื้อ *Burkholderia sp.* สายพันธุ์ ARB ซึ่งได้มาจากการคัดแยกและคัดเลือกเชื้อจากดินปนเปื้อนอาทราซีนจากดินในพื้นที่เกษตรกรรมในจังหวัดราชบุรี และมีการทดสอบแล้วว่ามีความสามารถในการย่อยสลายสารอาทราซีนได้จากการวิจัยของโสพิศ และคณะในช่วงปี 2555ข

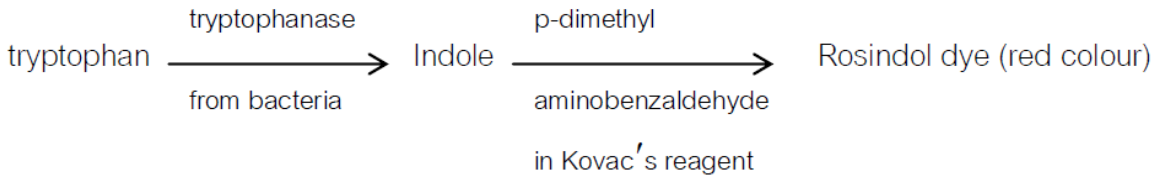
## 3.2 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย

ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่ศึกษาเพื่อยืนยันผลว่าเป็นชนิดเดียวกับที่คัดเลือกได้ โดยวิธีการต่างๆ ดังนี้

### 3.2.1 Indole test

ทดสอบแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ tryptophanase จะสามารถย่อย tryptophan ได้ indole ซึ่งจะทาปฏิกิริยากับ p-dimethylaminobenzaldehyde ในน้ำยา Kovac's ที่หยดลงไป

วิธีการทดสอบ




1. ปลูกเชื้อ *E.coli* ลงในอาหารเหลว Tryptone broth หลอดที่ 1 ปลูกเชื้อ *E.aerogenes* ลงในหลอดที่ 2 ส่วนหลอดที่ 3 ปลูกเชื้อที่ต้องการทดสอบ
2. บ่มเชื้อทั้ง 3 หลอดที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. หยด Kovac's ลงไป 1-2 หยด เขย่าเบาๆ

การอ่านปฏิกิริยา สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารในหลอด

ผลบวก เกิดสีแดงเข้มอยู่ชั้นบนของอาหารเหลว

ผลลบ อาหารเหลวยังคงเป็นสีเหลืองตามเดิม

### 3.2.2 Methyl Red test (MR Test)

วิธีการทดสอบ

1. ปลูกเชื้อ *E.coli* ลงในอาหารเหลว MRVP หลอดที่ 1 ปลูกเชื้อ *E.aerogenes* ลงในหลอดที่ 2 ส่วนหลอดที่ 3 ปลูกเชื้อที่ต้องการทดสอบ
2. บ่มเชื้อทั้ง 3 หลอดที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. หยดเมทิลเรด 6 หยด ลงในทั้ง 3 หลอด

   การอ่านปฏิกิริยา สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารในหลอด

   ผลบวก หลอดที่เกิดกรดจะเป็นสีแดงทันที

   ผลลบ ยังคงเป็นสีเหลืองตามเดิม แสดงว่าไม่เกิดกรด

### 3.2.3 Voges – Proskauer test (VP Test)

เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการสร้างสาร acetyl-methyl carbinol (acetoin) จาก glucose สารนี้มีฤทธิ์เป็นกลาง จะถูก oxidise โดย KOH และอากาศได้ Diacetyl แล้ว Diacetyl ที่ได้นี้ ถ้ามี แอลฟาแนฟทอล (catalyst) และกรดอมิโน arginine (เหลือจากอาหาร Peptone) หรือ Creatine อยู่ด้วยจะเกิดเป็น complex สีแดงส้มขึ้น

วิธีการทดสอบ

1. ปลูกเชื้อ *E.coli* ลงในอาหารเหลว MRVP หลอดที่ 1 ปลูกเชื้อ *E.aerogenes* ลงในหลอดที่ 2 ส่วนหลอดที่ 3 ปลูกเชื้อที่ต้องการทดสอบ
2. บ่มเชื้อทั้ง 3 หลอดที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. ใช้ปิเปตปลอดเชื้อถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำทั้ง 3 หลอด
4. เติมแอลฟาแนฟทอลหลอดละ 0.6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
5. เติมโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
6. บ่มเชื้อโดยวางหลอดเอียง เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวอาหารเหลว (เพราะปฏิกิริยาต้องการออกซอเจน)
7. ตรวจสอบผลที่ เวลา 15 นาที

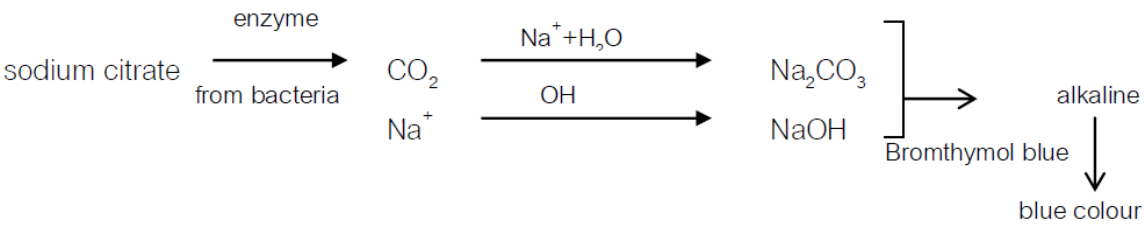
   การอ่านปฏิกิริยา สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารในหลอด

   ผลบวก เกิดสีแดงเข้มที่ผิวของอาหารภายใน 5 นาที

   ผลลบ อาหารเหลวยังคงเป็นสีเหลืองตามเดิม

### 3.2.4 Citrate Utilization test

เพื่อจะทดสอบความสามารถของเชื้อในการใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนในขบวนการ metabolismและให้ผลผลิตเป็นด่าง ซึ่งเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีน้ำเงิน




วิธีการทดสอบ

1. เตรียมสารละลายแบคทีเรียเจือจาง โดยเขี่ยเชื้อใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่นบริสุทธิ์ เขย่าให้เข้ากัน
2. ใช้เข็มเขี่ยตักเชื้อขีด (Streak) เป็นเส้นตรงยาวบนผิวหน้าอาหารแข็ง Simmons' Citrate agar หลอดละ 1 เชื้อ ส่วนหลอดที่ 2 และ 3 ให้เป็น *E.coli* และ *E.aerogenes* ตามลำดับ
3. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บ่มได้ถึง 7 วัน

4. ตรวจสอบสีของอาหาร แบคทีเรียที่ใช้ซิเตรทได้ จะมีสีน้ำเงิน (ปฏิกิริยาเป็นบวก) ส่วนแบคทีเรียที่ใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้ อาหารจะมีสีเขียวเช่นเดิม (ปฏิกิริยาลบ) และจะไม่เห็นการเจริญของเชื้อบนผิวอาหาร

การอ่านปฏิกิริยา สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารในหลอด

ผลบวก อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

ผลลบ อาหารเป็นสีเขียวเช่นเดิมและจะไม่เห็นการเจริญของเชื้อบนผิวหน้าอาหาร

**3.2.5 Catalase test**

catalase enzyme สามารถเปลี่ยน $H_2O_2$ ไปเป็น $O_2$ และ $H_2O$

วิธีการทดสอบ

1. ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดอาหาร Nutrient agar slant
2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง
3. หยด 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไป 1 มิลลิลิตร ให้ท่วมเชื้อบนสแลนท์

การอ่านปฏิกิริยา สังเกตการเกิดฟองแก๊สในหลอดอาหาร

ผลบวก เกิดฟองแก๊ส

ผลลบ ไม่เกิดฟองแก๊ส

**3.2.6 Motility test**

อาหารที่ทดสอบลักษณะกึ่งเหลว มีความเข้มข้นของวุ้นประมาณ 0.4% หรือน้อยกว่า ดังนั้นเมื่อแทงเชื้อลงไปตรงๆ ในอาหารเหลวแล้วนาไปอบ เชื้อที่เคลื่อนที่ได้จะเจริญออกมารอบๆ รอยแทงทำให้อาหารขุ่น ส่วนเชื้อที่เคลื่อนที่ไม่ได้เชื้อจะเจริญเฉพาะรอยที่แทงเท่านั้น

วิธีการทดสอบ

1. ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดอาหาร โดยการแทงตรงๆลงไปในเนื้ออาหาร
2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 - 28 ชั่วโมง

การอ่านปฏิกิริยา

ผลบวก แบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้จะเจริญออกรอบๆแนวที่ปลูกเชื้อทุกทิศทาง

ผลลบ แบคทีเรียที่มาสามารถเคลื่อนที่ได้จะเจริญเฉพาะบริเวณแนวที่แทงลงไปเท่านั้น

**3.2.7 Triple Sugar lron Agar test**

ในอาหาร TSI ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด คือ 0.1% glucose น้ำตาล Lactose และ Sucrose อย่างละ 1%

วิธีการทดสอบ

1. ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในหลอด Triple Sugar lron Agar Reaction (TSI) โดยวิธี stab คือ แทงเข็มเขี่ยเชื้อให้ลึกจนเกือบถึงก้นหลอด และโดยวิธี streak คือขีดเข็มเขี่ยบนผิวสแลนท์ อย่าอุดจุกสำลีให้แน่นเกินไปเพื่อให้อากาศเข้าสู่ผิวสแลนท์ได้มากเพียงพอ
2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

การอ่านปฏิกิริยา

- ถ้าบัตท์สีเหลือง สแลนท์สีแดง แสดงว่าน้ำตาลกลูโคสถูกเฟอร์เมนท์ แต่ซูโคส และแลคโตสไม่ถูกเฟอร์เมนท์

- ถ้าบัตท์สีเหลือง สแลนท์สีเหลือง แสดงว่าน้ำตาลแลคโตส และซูโคสถูกเฟอร์เมนท์ แต่กลูโคสไม่ถูกเฟอร์เมนท์
- ถ้าบัตท์สีแดง สแลนท์สีแดง แสดงว่าน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดไม่ถูกเฟอร์เมนท์
- การเกิดฟองอากาศในบัตท์ หรือเนื้ออาหารของบัตท์แตกเป็นรอยแยก แสดงว่าเชื้อผลิตก๊าซจากการเฟอร์เมนท์น้ำตาล
- การเกิดตะกอนสีดำ หรือเนื้ออาหารของบัตท์เป็นสีดำ แสดงว่าเชื้อผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

**3.3 การสังเคราะห์ยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียย่อยสลายอาทราซีน**

3.3.1 นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาณ 100 µl และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนที่ได้มาละลายใน TE Buffer 200 µl และต้มใน Water Bath 1 นาที และนำมาแช่แข็งเป็นเวลา 3 นาที และต้มในน้ำเดือด 100˚C เป็นเวลา 2 นาที และแช่แข็งอีก 2 นาที ทำขั้นตอนการต้มในน้ำเดือดและแช่แข็งอีก 2 ครั้ง เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียแตกตัวได้ดีขึ้น จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใส่ 100 µl ใส่ในหลอด eppendorf เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20˚C

3.3.2 การสังเคราะห์ 16S rRNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน 16S rRNA และใช้ไพร์เมอร์คู่ 27F (5’AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3’) และ 1492R (5’CGGYTACCTTGTTACGTT3’) ดังที่มีรายงานโดย LANE (1991) ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยสารละลายแบคทีเรีย 5 µl, 10X PCR buffer (0.5 M KCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 9.0 และ 1% Triton X-100) 2.5 µl, 10 mM dNTPs 0.5 µl, *Tag* polymerase (5U/ µl) 0.1 µl และ 10 µM primer ชนิดละ 1 µl และเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้มีปริมาตรครบ 25 µl นำส่วนผสมปฏิกิริยา PCR มาใส่ในเครื่อง T personal ของ Biometra โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาในการสังเคราะห์ดังนี้ ขั้นที่ 1 94˚C นาน 5 นาที ตามด้วย ขั้นที่ 2 94˚C 1 นาที, 55˚C 1 นาที และ 72˚C 2 นาที จำนวน 35 รอบ และขั้นสุดท้ายที่ 72˚C 15 นาที

3.3.3 วิเคราะห์ผลการสังเคราะห์ 16S rDNA ที่ได้จากการทำ PCR โดยการนำไปแยกขนาดบน Agarose gel โดยเทคนิค Gel electrophoresis โดยโหลด PCR Product 10 µl ที่ผสมกับ gel loading dye 2 µl ลงใน 1% Agarose gel ผสมกับสีย้อม Ultra pure DNA safe dye และใช้กระแสไฟฟ้า 110 V เป็นเวลา 35 นาที

**3.4 การวิเคราะห์และการเปรียบเทียบลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ**

3.4.1 นำชิ้นส่วน 16S rDNA ที่สังเคราะห์ได้ไปหาลำดับนิวคลิโอไทด์ ในการทดลองนี้ได้ใช้บริการหาลำดับนิวคลิโอไทด์ของบริษัท 1st BASE ประเทศมาเลเซีย และนำลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยการทำ BLAST ผ่านเว็บไซต์ the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) Internet site (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) วิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์โดยใช้โปรแกรม DNA STAR Software (Wisconsin, USA)

3.4.2 จัดทำ Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MegAlign เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียเหล่านั้น

**3.5 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียย่อยสลายอาทราซีน**

เลี้ยงเชื้อ *Burkholderia sp.* สายพันธุ์ ARB ในอาหารแข็ง nutrient agar (NA) media นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C นาน 3-4 วัน จากนั้นย้ายเชื้อลงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบ/นาที อุณหภูมิ 28°C

**3.6 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียสำหรับการ beading**

นำเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia sp.* สายพันธุ์ ARB ที่เพาะเลี้ยงไว้มาย้ายลงในสารละลาย 20 mmol/l potassium phosphate buffer pH 7 โดยนำเชื้อมา 1 ลูปใส่ลงในสารละลาย 20 mmol/l potassium phosphate buffer ปริมาตร 2 ml. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นย้ายสารละลายที่มีเซลล์แบคทีเรีย 400 ul ใส่ลงในขวดแก้วที่มีอาหารเหลว mineral salts (MS) media ปริมาตร 10 ml. ที่เติมอาทราซีนเข้มข้น 10 mg/l นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบ/นาที อุณหภูมิ 28°C ข้ามคืน ย้ายเชื้ออีกครั้งโดยนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติม 0.1% Tween-20 บ่มที่ 28°C ข้ามคืนโดยเขย่าที่ 160 รอบ/นาที

เก็บเซลล์แบคทีเรีย *Burkholderia sp.* สายพันธุ์ ARB ที่เพาะเลี้ยงโดยการปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบ/นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยอาหาร MS ที่แช่เย็นและละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียในอาหาร MS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1% (w/v)

**3.7 การเตรียมส่วนประกอบในการผลิตเม็ดบีด**

Stock solution ของ 3% (w/v) โซเดียมอัลจิเนตจะถูกนำมาละลายในน้ำและ autoclave ที่ 121°C นาน 15 นาที จากนั้นเติม Bentonite, ผง activated carbon (PAC), SM และ trehalose ลงไปในส่วนผสมอัลจิเนต การเตรียมสต๊อกของสารละลายประกอบด้วย 5% (w/v) bentonite และ 6% (w/v) PAC ที่ละลายในน้ำกลั่นและฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิและเวลาข้างต้น ส่วน 20% (w/v) SM จะถูกนำมาละลายในน้ำกลั่นและฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 5 นาที ในขณะที่ สารละลาย 20% (w/v) trehalose เตรียมโดยละลายในน้ำกลั่นและทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง ส่วน hardening solution ประกอบด้วย 0.5% (w/v) polyethyleneimine hydrochloride (PEI) ที่ละลายใน 0.1 mol/l $CaCl_2$ (T. Vancov และคณะ, 2005)

**3.8 การเตรียมเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต**

เซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia sp.* สายพันธุ์ ARB ถูกนำมาใส่ลงใน beading mixtures ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1% (w/v) และค่อยๆดันผ่าน 18-gauge needle ลงในสารละลาย 0.1 M $CaCl_2$ ที่มี 0.5% PEI ปล่อยทิ้งไว้นาน 1 ชม. จากนั้นล้างด้วย 2 volume ของ $CaCl_2$ ที่แช่เย็น นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องข้ามคืนในสารละลาย 0.1 M $CaCl_2$ เม็ดบีดจะถูกล้างในน้ำกลั่น 500 ml. และเก็บไว้ในภาชนะที่ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4°C และเมื่อต้องการให้เซลล์แบคทีเรีย *Burkholderia sp.* สายพันธุ์ ARB อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์อีกครั้งและมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ภายในเม็ดอัลจิเนต เม็ดบีดจะถูกย้ายไปไว้ในอาหาร Nutrient broth (NB) และเขย่าเบาๆที่ความเร็ว 80 รอบ/นาที จากนั้นนำไปบ่มข้ามคืนที่

อุณหภูมิ 28°C ล้างเม็ดบีดในน้ำกลั่น 500 ml. เก็บไว้ในภาชนะที่ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4°C (T. Vancov และคณะ, 2006)