บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ในการทดลอง

1. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
2. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท Mettler-Toledo, Switzerland.
3. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS 3020 ของบริษัท SANYO, Japan.
4. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany.
5. ตู้อบแห้ง (oven) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand
6. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ของบริษัท Memmert, Germany.
7. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO laminar flow รุ่น BVT-124 ของบริษัท International Scientific Supply, USA. และ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
8. เครื่องเขย่า (Gyrotory shaker) รุ่น G10 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.
9. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ –20 ° ซ ของบริษัท Sanyo Electric, Japan
10. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ –70°ซ รุ่น ULT1786 ของบริษัท Forma Scientific, USA
11. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.
13. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Bench-top centrifuge) รุ่น Pico ของบริษัท Kendro, Germany.
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งพื้น (Centrifuge) ของบริษัท Kubota, Japan.
15. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
16. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 20, 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France.

17. กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มล. ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
18. ขวดแก้วฝาเกลียว(vial) ขนาด 22 ml (Screw cap with teflon finer) ของบริษัท Lab System , Thailand.
19. เครื่องคัดกรองขนาดดินและใบไม้ ขนาดความกว้างของรู 0.84 รุ่น ASTM E11 Test Sieve ของบริษัท Retsch GmbH & CO.KG, Germany.
20. เครื่องบด (blender) รุ่น MX-T31GH ของบริษัท Matsushita Electric, Taiwan.
21. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดช่อง 0.2 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
22. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
23. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (Thermo-block) รุ่น MylabTH Thermo- Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea.
24. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA. และ รุ่น MJ Mini^{TM} Personal Thermal Cycler บริษัท Biorad,USA
25. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) รุ่น WB 14 ของบริษัท Memmert, Germany.
26. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
    - Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชั่น 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA.
27. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis)
    - Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan.
    - Mini Sub-Cell GT agarose gel electrophoresis systems ของบริษัท Bio-Rad, USA.
28. ชุดเครื่องมือ DCode^{TM} system ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
29. ชุดเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี (Gas Chromatography, GC)
    - เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น 6890N ของบริษัท Agilent Technologies, USA
    - คอลัมน์ (column) ชนิด HP-5ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วย เฟนนิลเมธิลไซโลเซน ความเข้มข้น 5 % หนา 0.25 ไมโครเมตร

- เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิด Frame Ionization Detector (FID)
- เข็มฉีดยาขนาดเล็ก (microsyrings) ขนาด 10 ไมโครลิตร

3.2 เคมีภัณฑ์

1. ฟีแนนทรีน (phenanthrene) ของบริษัท Sigma, USA.
2. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
3. ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (CH_3SOCH_3) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
4. แบคโตอะการ์ (bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
5. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
6. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
7. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
8. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
9. เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) ของบริษัท May & Baker, England.
10. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
11. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
12. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
13. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany.
14. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany.
15. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท Merck, Germany.
16. โซเดียมอะซีเตต (CH_3COONa) ของบริษัท Merck, Germany.
17. สารปฏิชีวนะนิสเตติน (nystatin) ของบริษัท Bio Basic INC., Canada.
18. เมธานอล (CH_3OH) ของบริษัท Merck, Germany.
19. นอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) ของบริษัท J.T. Baker, USA.
20. Triton-x 100 ของบริษัท Research organic, USA.
21. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท Merck, Germany.
22. อะซิโตน (acetone) ของบริษัท Merck, Germany.
23. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท IUAI, Japan.
24. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenolblue) ของบริษัท Fluka, Germany.

25. โปรตีเนสเค (Proteinase K) ของบริษัท Sigma, USA.
26. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA.
27. *Taq* DNA polymerase ของบริษัท New England Biolabs, USA.
28. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท New England Biolabs, UK.
29. 100 base pair DNA ladder ของบริษัท New England Biolabs, USA.
30. โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ ของบริษัท Operon Biotechnologies GmbH, Germany.
31. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA.
32. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_22H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA.
33. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalal tesque, Japan.
34. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), [($C_{16}H_{32}N(CH_3)_3$)Br] ของบริษัท TCI-EP, Japan.
35. Geneclean II Kit ของบริษัท Q-BIOgene, USA.
36. Formamide (Deionized) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
37. 40% Acrylamide/Bis solution, 37.5:1 (2.6% C) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
38. Urea ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
39. Ammonium persulfate ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
40. TEMED (N,N,N′,N′-Tetra-methyl-ethylenediamine) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
41. 50xTAE ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
42. Dye solution ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
43. Ethidium bromide solution เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ คือ กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ซึ่งแยกได้จากใบจามจุรี ประกอบด้วยกลุ่มแบคทีเรียได้อย่างน้อย 7 ชนิด ซึ่งผลทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีสามารถจัดอยู่ใน 4 สกุล ได้แก่ *Comamonas, Rugamonas, Flavimonas, Pseudomonas* และส่วนที่เหลือไม่สามารถจำแนกได้จำนวน 1 ชนิด โดยเป็นแกรมลบทั้งหมด กลุ่มแบคทีเรียนี้มีความสามารถย่อยสลายไพรีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน ฟีแนนทรีนและฟลูออแรนทีนได้ (จิรทีปม์ แสนรัก, 2547)

3.3.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยมีดังนี้

1. EUB f933 GC มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ

5'–GCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGC

ACAAGCGGTGGAGCATGTGG-3' (Kawai และคณะ, 2002) และ

2. EUB r1387 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ

5'-GCCCGGGAACGTATTCACCG-3' (Kawai และคณะ, 2002)

3.3.3 เตรียมใบจามจุรี ดิน และกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

3.3.3.1 เตรียมใบจามจุรี

เก็บตัวอย่างใบจามจุรีจากบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเก็บใบแห้งสีน้ำตาลที่ร่วงหล่นบนพื้นดิน นำมาผึ่งลมให้แห้ง คัดแยกเอาเฉพาะใบ ปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องบด และคัดกรองโดยใช้เครื่องคัดกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.84 มิลลิเมตร (รูปที่ 3.1) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ จนกว่าจะทำการทดลอง

รูปที่ 3.1 ใบจามจุรีที่ใช้ในการทดลองที่บดและผ่านการคัดกรองแล้ว

3.3.3.2 เตรียมดิน

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณเนินเขาในป่าเขาใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา โดยขุดลึกจากผิวดินประมาณ 5 ซม. แยกเศษใบไม้และหินออก ตรวจสอบการปนเปื้อน PAHs โดยการสกัดตามวิธีของ Deangrueng (2005) โดยใช้ *n*-hexaneและวิเคราะห์ด้วย GC คัดกรองดินโดยใช้ตะแกรงร่อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.84 มิลลิเมตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการทดลอง

ศึกษาลักษณะองค์ประกอบทางเคมีของดินและใบจามจุรี โดยการส่งตัวอย่างดินและใบจามจุรี ชนิดละประมาณ 0.5 กิโลกรัมไปวิเคราะห์ที่ฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เพื่อวิเคราะห์ความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ (maximum water holding capacity) และค่าความเป็นกรด-ด่าง และที่ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาเกษตรศาสตร์ บางเขน วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณโปแทสเซียม สารอินทรีย์คาร์บอน และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

3.3.3.3 เตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

นำหัวเชื้อ กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM (carbon-free mineral medium) (Komukai-Nakamura และคณะ, 1996) และเติมไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. ในรูปสารละลายไพรีนและฟีแนนทรีนในไดเมธิลซัลฟอกไซด์

(DMSO) เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานของแบคทีเรีย บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 – 5 วัน สังเกตการเจริญของแบคทีเรีย

0 วัน 3 วัน

รูปที่ 3.2 ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีไพรีนและฟีแนนทรีนเข้มข้น 0.1 มก./มล. เมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบกับที่เวลา 0 วัน

3.3.4 ประเมินการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนใบจามจุรี

นำใบจามจุรีที่เตรียมไว้จากข้อ 3.3.1.1 จำนวน 1 กรัม มาบรรจุในขวดแก้วฝาเกลียว นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน แล้วปรับความชื้นให้มีค่าเท่ากับ 70% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 6.5 – 7.0

เก็บเซลล์ที่ได้จากการเตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตามข้อ 3.3.3.3 โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณภูมิห้อง นำส่วนตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาล้างด้วย สารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ โดยทำตามขั้นตอนนี้ 2 ซ้ำ นำส่วนเซลล์มาแขวนลอยในสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ ปรับให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรให้ได้ค่าเป็น 1 ซึ่งจะมีเชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^8 CFU/ml ผสมใบจามจุรีที่ฆ่าเชื้อรวมทั้งปรับความชื้นและค่าความเป็นกรด-ด่างแล้วจำนวน 1 กรัม กับหัวเชื้อที่เตรียมได้ จำนวน 1 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่วันที่ 0, 1, 3, 7, 10, และ 14 เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่มี

ความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนที่อยู่รอดได้ในใบจามจุรีด้วยวิธี Viable plate count ตามวิธีในข้อ 3.3.5 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB และ CFMM ที่มีผลึกไพรีนหรือฟีแนนทรีนวางบนฝาจานอาหารตามลำดับ

3.3.5 **วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี** viable plate count

โดยนำดินหรือใบจามจุรีมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก ก) หรือ CFMM (ภาคผนวก ก) ที่เติมนิสเตตินเข้มข้น 40 มก.ต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 3 - 5 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.3.6 **การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย** RRM-V3 **ที่เตรียมโดยวิธีต่างๆ**

เตรียมหัวเชื้อ 3 ชนิด ดังนี้

ก. **หัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย** RRM-V3 **ที่จับเกาะบนใบจามจุรี** เตรียมหัวเชื้อตามข้อ 3.3.4 โดยใช้เวลาในการบ่มเท่ากับวันที่มีจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนสูงที่สุด โดยดูจากผลของ Viable plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีผลึกไพรีนหรือฟีแนนทรีนวางบนฝาจานอาหาร

ข. **หัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย** RRM-V3 **ในน้ำดิน** เตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในน้ำดินโดยเตรียมน้ำดินจากการผสมดิน 1 ส่วนกับน้ำ 3 ส่วน แล้วเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นแยกตะกอนดินและน้ำโดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณภูมิห้อง เอาเฉพาะส่วนน้ำใสไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรเพื่อทำให้น้ำดินปลอดเชื้อ ใช้น้ำดินที่ได้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและเติมไพรีนหรือฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. ในรูปสารละลายไพรีนและฟีแนนทรีนในไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเก็บเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่

อุณภูมิห้อง ล้างและละลายตะกอนเซลล์ด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ และปรับจำนวนเซลล์ให้เท่ากับจำนวนในข้อ ก. โดยใช้ 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ในการเจือจาง

ค. **หัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ใน CFMM** เตรียมหัวเชื้อตามข้อ 3.3.1.3 จากนั้นเก็บเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณภูมิห้อง ล้างและละลายตะกอนเซลล์ด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ และปรับจำนวนเซลล์ให้เท่ากับจำนวนในข้อ ก. โดยใช้ 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ในการเจือจาง

ตรวจสอบการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดิน โดยใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3ที่เตรียมโดยวิธีต่างๆ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 7 ชุด ดังนี้

ชุดควบคุมที่ 1 ดินปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน เป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาการสลายของ PAHs เมื่อปราศจากปัจจัยทางชีวภาพจากดิน

ชุดควบคุมที่ 2 ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน เป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาการสลายของ PAHs เมื่อมีปัจจัยทางชีวภาพจากดิน

ชุดควบคุมที่ 3 ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน และใบจามจุรีปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาผลของใบจามจุรีต่อจุลชีพในดินที่สามารถสลาย PAHs ได้

ชุดควบคุมที่ 4 ดินปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน และผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่จับเกาะบนใบจามจุรีเป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาเฉพาะความสามารถของกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนใบจามจุรีต่อการย่อยสลายของ PAHs

ชุดการทดลองที่ 1 ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีนและหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่จับเกาะบนใบจามจุรีตามข้อ ก.

ชุดการทดลองที่ 2 ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน และหัวเชื้อที่เตรียมในน้ำดินตามข้อ ข.

ชุดการทดลองที่ 3 ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน และหัวเชื้อที่เตรียมใน CFMM ตามข้อ ค.

สำหรับดินปลอดเชื้อเตรียมได้จากนำดินที่เตรียมไว้จากข้อ 3.3.1.2 จำนวน 2 กรัม มาบรรจุในขวดแก้วฝาเกลียว นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที วันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน แล้วปรับความชื้นให้มีค่าเท่ากับ 70% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 6.5 – 7.0

ในทุกชุดควบคุมและชุดการทดลองใช้ดินจำนวน 2 กรัม ในกรณีที่เติมใบจามจุรี 0.5 กรัม ใช้ดินเพียง 1.5 กรัม ใช้สารละลายไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล.ในรูปสารละลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอะซีโตนผสมในดินทุกชุดควบคุมและชุดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืนเพื่อให้อะซิโตนระเหยจนหมด และใช้จำนวนเซลล์แบคทีเรียเท่ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 0, 3, 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนหรือฟีแนนทรีนด้วยวิธี Viable plate count ตามวิธีในข้อ 3.3.5 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB และ CFMM ที่มีผลึกไพรีนหรือฟีแนนทรีนวางบนฝาจานอาหาร ทุก 7 วันจะนำมาชั่งน้ำหนักเพื่อปรับความชื้นให้มีค่าเท่ากับ 70% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำตลอดระยะเวลาการทดลอง และวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนและไพรีนตามวิธีในข้อ 3.3.7

3.3.7 วิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีน

วิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในทุกชุดการทดลองตามวิธีของ Dangrueng (2005) โดยใช้ *n*-hexane ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และ 15% TritonX-100 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ในตัวอย่างดิน 2 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่เยือกแข็งนาน 24 ชั่วโมงเพื่อให้ส่วนของดินจับตัวกัน เติม anhydrous Na_2SO_4 ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสข้ามคืนและทิ้งไว้ให้เย็นเพื่อกำจัดน้ำออกจากส่วนของชั้น *n*-hexane แล้วนำส่วนของ *n*-hexane กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร

วิเคราะห์สารที่สกัดได้ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี โดยชุดเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น 6890N (บริษัท Agilent Technologies, USA) คอลัมน์ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร

ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนนิลเมธิลไซโลเซน ความเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร เครื่องตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID)

วิเคราะห์ภายใต้สภาวะดังนี้

อุณหภูมิเริ่มต้น	80°ซ				
อุณหภูมิขั้นที่ 1	25°ซ	ต่อนาที	จนอุณหภูมิ 160°ซ	คงไว้	3 นาที
อุณหภูมิขั้นที่ 2	3°ซ	ต่อนาที	จนอุณหภูมิ 220°ซ	คงไว้	2 นาที
อุณหภูมิขั้นที่ 3	40°ซ	ต่อนาที	จนอุณหภูมิ 300°ซ	คงไว้	7 นาที

โดยใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาไหลด้วยอัตราเร็ว 1.7 มิลลิลิตรต่อนาที

3.3.8 ติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในช่วงเวลาของการบำบัด

3.3.8.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) (ถ้าเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จะใช้เวลาประมาณ 3 วัน) ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์เป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 567 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นเติม 10% SDS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และโปรตีเนสเค (Proteinase K) (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของโปรตีเนสเคใน 0.5% SDS) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย (ประมาณ 0.7-0.8 มิลลิลิตร) ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็น

เวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้ติดส่วนตะกอนไปด้วย) จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโปรพานอลปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาจนกระทั่งตะกอนขาวของดีเอ็นเอปรากฏ หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของไอโซโปรพานอลทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธานอล 70% ที่เย็นจัดปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆ เทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอใน บัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และใส่ RNase A (ภาคผนวก ข) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ

3.3.8.2 **สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน**

สกัด DNA จากชุดการทดลอง ตามวิธีของ Sei และคณะ (2000) โดยชั่งดิน 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ เติม High extraction buffer 440 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) เติมโปรตีนเนสเค (proteinase K) 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติม 10% SDS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37°ซ นาน 2 ชั่วโมง โดยผสมให้เข้ากัน ทุก 20 นาที หลังจากนั้นสกัดด้วยสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) 2 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนน้ำใสและเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) เท่ากับปริมาตรของส่วนน้ำใส ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

เก็บส่วนน้ำใสซึ่งมีดีเอ็นเอลงในหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติม 3 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตต (ภาคผนวก ข)ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใส เติมเอธานอล 100% ที่เย็นจัดปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด นำไปแช่แข็งที่ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –70°ซ นาน 15

นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70% ที่เย็นจัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ระเหยเอธานอลออกจากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) 50 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ 4 °ซ จนกว่าจะใช้

3.3.8.3 กำจัด humic acid และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1% (ภาคผนวก ข) ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 1 เท่า เทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัวประมาณ 20 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ TAE ให้ท่วมเหนืออะกาโรสเจล 2-3 มม. ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตามหยอดลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ในบัฟเฟอร์ TAE นาน 1 นาที นำไปดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV)

ตัดส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอจากเจล และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย Geneclean II Kit (Q-BIOgene, USA) ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยนำเจลที่ตัดได้ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ และชั่งน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจลโดยหักออกจากน้ำหนักหลอดเปล่า เติม NaI ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ จนกระทั่ง อะกาโรสเจลละลายหมด เติม glass milk ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อ 1 ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที โดยเขย่าทุก 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอจับกับ glass milk ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสออก แล้วเติม washing buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยไมโครปิเปต นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนน้ำใสออกจนหมด โดยทำซ้ำ 2 รอบ นำไประเหยแห้งโดยบ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ นาน 5 นาที เติมน้ำปลอดประจุที่ฆ่าเชื้อแล้ว (ภาคผนวก ข) ปริมาตรเท่ากับปริมาตร glass milk ที่เติม ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนน้ำใสที่มีดีเอ็นเออยู่เก็บไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ 4°ซ จนกว่าจะนำมาใช้

3.3.8.4 วิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260} X 50 X dilution factor

ตามวิธีของ Sambrook และ Russell (2001)

3.3.8.5 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย

โดยใช้ไพรเมอร์ EUB f933 ซึ่งมี GC clamp เชื่อมต่อบริเวณ 5' และ EUB r1387 (Kawai และคณะ, 2002) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR มีความยาวประมาณ 500 bp โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยา เป็นดังนี้

-10X PCR buffer	5	ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1X buffer)		
- สารละลาย EUB f933 primer ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์	1	ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 ไมโครโมลาร์)		
- สารละลาย EUB r1387 ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์	1	ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 ไมโครโมลาร์)		
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ของนิวคลีโอไทด์	1	ไมโครลิตร
แต่ละชนิด (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์)		
- เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase	0.25	ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1.25 U)		
-ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.3.4.3 (ประมาณ 100 นาโนกรัม)		
-น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ จนกระทั่งมีปริมาตรสุทธิ	50	ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

1. Initial denaturation step	อุณหภูมิ 94°ซ	เวลา 5 นาที
2. Touchdown program จำนวน 20 รอบ		
2.1 Denaturation step	อุณหภูมิ 94°ซ	เวลา 1 นาที
2.2 Annealing step	อุณหภูมิ 65°ซ	เวลา 1 นาที
(อุณหภูมิลดลงทีละ 0.5°ซ ในแต่ละรอบ)		
2.3 Extension step	อุณหภูมิ 72°ซ	เวลา 2 นาที
3. Denaturation step	อุณหภูมิ 94°ซ	เวลา 1 นาที
4. Annealing step	อุณหภูมิ 60°ซ	เวลา 1 นาที
5. Extension step	อุณหภูมิ 72°ซ	เวลา 2 นาที
6. ทำขั้นตอนที่ 3-5 จำนวน 30 รอบ		
7. Final extension	อุณหภูมิ 72°ซ	เวลา 10 นาที

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) (Biorad,USA)

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ซึ่งทำโดยเตรียม อะกาโรสเข้มข้น 1% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ TAE 1 เท่า (ภาคผนวก ข) เทลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 20 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายเอ็นเอกับสีติดตาม หยอดดีเอ็นเอและหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิสโดยใช้ชุดทำอีเลคโทรโฟเรซิส Mupid ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 1 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 (Bio-Rad, USA.)

3.3.8.6 **วิเคราะห์** Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

ใช้อุปกรณ์ของ DCode™ system (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) ในการวิเคราะห์ DGGE โดยเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจล ที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 40 – 70% (ภาคผนวก ข) (100% denaturant ประกอบด้วย 7 M urea และ 40% formamide) ซึ่งทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant โดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต เมื่อทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant ลงในชุดแซนวิชเตรียมเจลแล้ว เสียบหวีลงไประหว่างกระจกแซนวิช โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้พอลิอะคริลาไมด์แข็งตัว นำชุดเจลแซนวิชใส่ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 6.8 ลิตร ที่ผ่านการให้ ความร้อนจนอุณหภูมิประมาณ 55°ซ ผสมผลิตภัณฑ์ PCR กับสีติดตามหยอดลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ที่ 60°ซ นาน 10 ชม. และย้อมพอลิอะคริลาไมด์เจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) นาน 15 นาที นำไปดูด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 (Bio-Rad, USA.)