บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์

1. กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มล. ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
2. ขวดแก้วฝาเกลียว (vial) ขนาด 22 ml (Screw cap with teflon finer) ของบริษัท Lab System, Thailand.
3. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunswick Scientific, USA.
4. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
5. เครื่องคัดกรองขนาดวัสดุ ขนาดความกว้างของรู 0.84 รุ่น ASTM E11 Test Sieve ของบริษัท Retsch GmbH & CO.KG, Germany.
6. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
7. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (Thermo-block) รุ่น MylabTH Thermo Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea.
8. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan.
9. เครื่องบด (blender) รุ่น Tarantura NC-4695 ของบริษัท Nesco, Spain.
10. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
11. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.และ รุ่น MJ Mini^{TM} Personal Thermal Cycler บริษัท Biorad,USA.
12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
13. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
14. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan.
    - หัวหมุนเหวี่ยง (rotor) ขนาดเล็ก รุ่น RA50J
    - หัวหมุนเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA22

15. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Bench-top centrifuge) รุ่น Pico ของบริษัท Kendro, Germany.
16. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE (polytetrafluoroethylene) ขนาดช่อง 0.2 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
17. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO laminar flow รุ่น BVT-124 ของบริษัท International Scientific Supply, USA. และ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
18. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ –20 °ซ ของบริษัท Sanyo Electric, Japan.
19. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ –70°ซ รุ่น ULT1786 ของบริษัท Forma Scientific, USA.
20. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ของบริษัท Memmert, Germany.
21. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany.
22. ตู้อบแห้ง (oven) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand.
23. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 10, 20, 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France.
24. ชุดอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
    - Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชั่น 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA.
27. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan.
28. ชุดเครื่องมือ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis รุ่น DCode™ 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

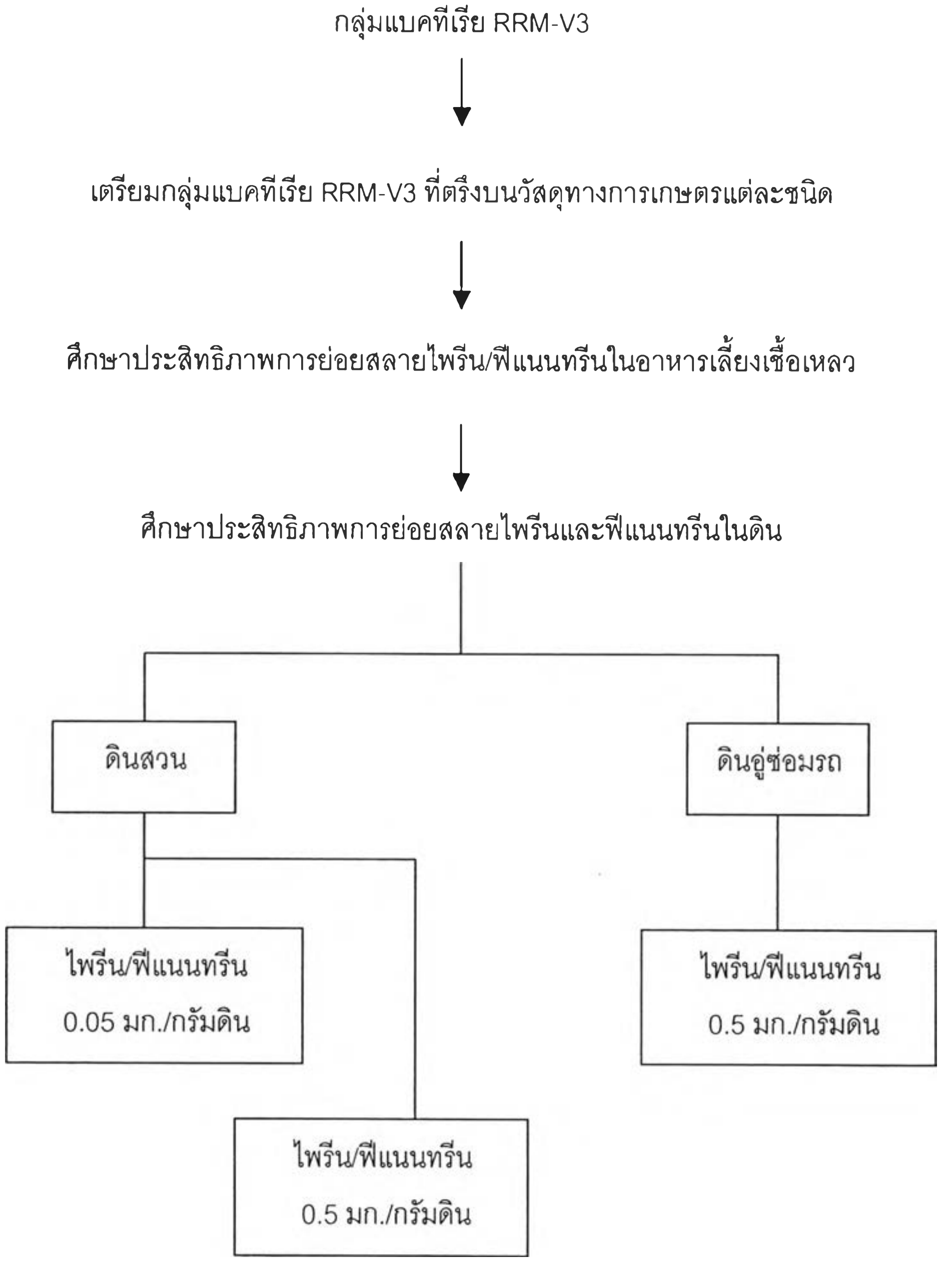
เคมีภัณฑ์

1. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany.
2. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany.
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany.
5. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท Merck, Germany.
6. โซเดียมอะซีเตต (CH_3COONa) ของบริษัท Merck, Germany.
7. ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (CH_3SOCH_3) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
8. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
9. นิสเตติน (Nystatin) ของบริษัท Bio Basic Inc., Canada
10. นอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) ของบริษัท J.T. Baker, USA.
11. แบคโตอะการ์ (bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
12. โปรตีเนสเค (Proteinase K) ของบริษัท Sigma, USA.
13. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
14. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
15. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
16. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
17. ฟีแนนทรีน (phenanthrene) ของบริษัท Sigma, USA.
18. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท Merck, Germany.
19. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) ของบริษัท May & Baker, England.
20. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
21. เมธานอล (CH_3OH) ของบริษัท Merck, Germany.
22. สารปฏิชีวนะนิสเตติน (nystatin) ของบริษัท Bio Basic INC., Canada.
23. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenolblue) ของบริษัท Fluka, Germany.
24. สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค DGGE ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
    - ฟอร์มาไมด์ (Formamide (Deionized))
    - สารละลาย 40% อะคริลาไมด์/บิส (40% Acrylamide/Bis solution, 37.5:1)
    - ยูเรีย (Urea)

- แอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate)
- 50xTAE
- สีติดตาม (Dye solution)
- เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide solution) เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

25. อะซีโตน (acetone) ของบริษัท Merck, Germany.
26. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท IUAI, Japan.
27. เอธิลอะซีเตต ($CH_3COOC_2H_5$) ของบริษัท Merck, Germany
28. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
29. โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ ของบริษัท Biodesign, Thailand
30. 1 kb DNA ladder ของบริษัท New England Biolabs, UK.
31. 100 bp DNA ladder ของบริษัท New England Biolabs, USA.
32. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), [($C_{16}H_{32}N(CH_3)_3$)Br] ของบริษัท TCI-EP, Japan.
33. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท New England Biolabs, UK.
34. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA.
35. Glass powder for DNA recovery รุ่น EASTTRAP Ver.2 ของบริษัท TAKARA, Japan.
36. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA.
37. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalal tesque, Japan.
38. *Taq* DNA polymerase ของบริษัท New England Biolabs, USA.
39. Triton-x 100 ของบริษัท Research organic, USA.
40. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA.

แผนผังงานวิจัย



วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การเพาะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

3.1.1 จุลินทรีย์

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ คือ กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียคัดแยกได้จากใบจามจุรี ประกอบด้วยแบคทีเรียอย่างน้อย 7 ชนิด โดยจัดอยู่ใน 4 สกุล ได้แก่ *Comamonas*, *Rugamonas*, *Flavimonas*, *Pseudomonas* โดยเป็นแบคทีเรียแกรมลบทั้งหมด กลุ่มแบคทีเรียนี้มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ได้หมดภายในเวลา 14 วัน และยังสามารถย่อยสลาย อะซีแนพธีน ฟลูออรีน ฟีแนนทรีนและฟลูออแรนทีนได้อีกด้วย (จิรทีปฆ์ แสนรัก, 2547)

3.1.2 การเพาะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

เลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเหลว CFMM (carbon-free mineral medium) (Komukai-Nakamura และคณะ, 1996)(ภาคผนวก ก) ที่เติมไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. ในรูปสารละลายในไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน เพื่อเพิ่มจำนวนกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน

3.2 การเตรียมวัสดุทางการเกษตรและดิน

3.2.1 วัสดุทางการเกษตร

วัสดุทางการเกษตรที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ ใบจามจุรี ฟางข้าว ใยบวบ และนมผักกระเฉด

- ใบจามจุรี เก็บจากบริเวณทางเดินเท้าริมถนนในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเก็บใบที่ร่วงจากต้น มีลักษณะแห้งเป็นสีน้ำตาล
- ฟางข้าว เก็บจากบริเวณทุ่งนา อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี มีลักษณะแห้ง
- ใยบวบ เป็นผลบวบที่แก่แห้ง เนื้อหลุดหายไป ซื้อจากตลาดคลองเตย มีลักษณะเป็นเส้นใยแห้งแข็ง สีน้ำตาล

- นมผักกระเฉด ซื้อมาจากร้านขายผักในปากคลองตลาด โดยเลือกที่มีนมผักติดมากับลำต้นผักกระเฉดด้วย แยกส่วนที่เป็นนมผักซึ่งเป็นเยื่อสีขาวที่ติดกับลำต้นออก นำไปตากแดดให้แห้งจนมีลักษณะแห้งฟู

3.2.2 การเตรียมวัสดุทางการเกษตร

นำวัสดุทางการเกษตรทั้ง 4 ชนิดมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องบด คัดกรองขนาดด้วยตะแกรงคัดกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.84 มิลลิเมตร แบ่งวัสดุทางการเกษตรแต่ละชนิดเพื่อนำไปวิเคราะห์ลักษณะองค์ประกอบทางกายภาพและเคมี ส่วนที่เหลือเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการทดลอง

3.2.3 การเตรียมดิน

ดินที่ใช้ในการทดลองมี 2 ชนิด โดยชนิดแรกเป็นดินที่นำมาจากบริเวณสวนผลไม้ อ.พระประแดง จ.สมุทรปราการ โดยดินนี้อยู่ในบริเวณที่ไม่เคยมีการปนเปื้อนจากสาร PAHs มาก่อน และชนิดที่สองเป็นดินจากบริเวณอู่ซ่อมรถ อ.พระสมุทรเจดีย์ จ.สมุทรปราการ ซึ่งเป็นดินที่มีการปนเปื้อนจากน้ำมันมาเป็นระยะเวลานานและปัจจุบันยังมีการปนเปื้อนอยู่ โดยขุดลึกจากผิวดินประมาณ 3 เซนติเมตร แยกส่วนที่เป็นใบไม้และหินออก ตากให้แห้งและนำมาคัดกรองขนาด ด้วยตะแกรงคัดกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.84 มิลลิเมตร ตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร PAHs ตามวิธีในข้อ 3.7.2 แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง

3.3 องค์ประกอบทางกายภาพและเคมีของวัสดุทางการเกษตรและดิน

นำตัวอย่างวัสดุทางการเกษตร และดินส่งวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและทางเคมี เพื่อวิเคราะห์ ค่าความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ (maximum water holding capacity) และค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส ปริมาณโปแตสเซียม สารอินทรีย์คาร์บอนและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาเกษตรศาสตร์

3.4 การเตรียมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ตรึงบนวัสดุทางการเกษตร

นำวัสดุทางการเกษตรทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ใบจามจุรี ฟางข้าว ใยบวบ และนมผักกระเฉดที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.2 จำนวน 0.5 กรัม ใส่ในขวดแก้วฝาเกลียว นำไปฆ่าเชื้อโดยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที วันละครั้งเป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน

จากนั้นนำมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 6.5-7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล และค่าความชื้นให้มีค่าเป็น 70% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำโดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปให้มีน้ำหนักตรงกับค่าที่คำนวณจากความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำที่ได้จากการวิเคราะห์

นำกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงตามวิธีในข้อ 3.1.2 มาปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้ง ล้างส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 2 ครั้ง และแขวนลอยเซลล์ในอาหารเหลว CFMM จากนั้นนำสารแขวนลอยที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยปรับให้มีค่าเท่ากับ 1 ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียประมาณ 8 log CFU/มล. เติมหัวเชื้อที่เตรียมได้ 1 มิลลิลิตร ลงในวัสดุทางการเกษตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ การปรับความชื้นและค่าความเป็นกรด-ด่าง แล้วผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 7, 10 และ 14 เพื่อตรวจสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียในวัสดุทางการเกษตรด้วยวิธี viable plate count บนอาหารแข็ง LB ตามวิธีในข้อ 3.10

3.5 วิเคราะห์เซลล์กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผสมกับวัสดุทางการเกษตรด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ศึกษาการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนวัสดุทางการเกษตร โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ดำเนินการโดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีขั้นตอนดังนี้ ตรึงตัวอย่างวัสดุทางการเกษตรด้วย 2.5% กลูทารัลดีไฮด์ ที่ผสมกับ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์และน้ำกลั่น ครั้งละ 10 นาที และกำจัดน้ำออกด้วยเอทานอลเป็นเวลา 10 นาที ซ้ำ 3 ครั้ง นำตัวอย่างไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Balzers model CPD 020 นำตัวอย่างมาติดที่แท่นทองด้วยน้ำยาเคลือบเล็บแล้วนำตัวอย่างไปฉาบด้วยทองคำ สุดท้ายนำตัวอย่างที่ได้ไปส่องดูภายใต้เครื่อง Scanning Electron Microscope รุ่น JEOL, model JSM-5410LV เพื่อดูการจับเกาะและการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียในวัสดุทางการเกษตร

3.6 การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเหลว CFMM โดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผสมกับวัสดุทางการเกษตร

นำกลุ่มแบคทีเรียที่ผสมกับวัสดุทางการเกษตรในช่วงวันที่มีการเจริญสูงที่สุดในแต่ละวัสดุจากข้อ 3.4 มาใส่อาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. ชุดควบคุมคืออาหารเหลว CFMM ที่มีเฉพาะไพรีนและฟีแนนทรีน และอาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีนและฟีแนนทรีนแต่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จำนวน log 10 CFU/มล.

ลงไปด้วย นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน และเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 7, 10 และ14 เพื่อตรวจหาปริมาณกลุ่มแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี viable plate count บนอาหารแข็ง LB ตามวิธีในข้อ 3.10 และวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวตามวิธีในข้อ 3.7.1

3.7 การวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีน

3.7.1 การสกัดไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเหลว CFMM

สกัดไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในอาหารเหลว CFMM ตามวิธีของ Luepromchai และคณะ (2007) โดยเติมเฮกเซนปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ 15% Triton X-100 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีหรือไม่มีวัสดุทางการเกษตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) นาน 2 นาที แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้วัสดุทางการเกษตรตกตะกอน ดูดส่วนน้ำใสซึ่งเป็นชั้นของเฮกเซนใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม anhydrous Na_2SO_4 ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ข้ามคืนเพื่อกำจัดน้ำออกจากส่วนชั้นของเฮกเซน จากนั้นทำซ้ำอีกครั้งโดยการดูดส่วนของเฮกเซนผ่านคอลัมน์ anhydrous Na_2SO_4 แล้วกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร นำสารที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ตามวิธีในข้อ 3.7.3

3.7.2 การสกัดไพรีนและฟีแนนทรีนในดิน

สกัดไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในดิน โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Luepromchai และคณะ (2007) เติมเฮกเซน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ 15% Triton X-100 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างดินหรือวัสดุทางการเกษตร 2 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที นาน 24 ชั่วโมง นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกส่วนของเฮกเซน ดูดส่วนของเฮกเซนใส่ในหลอดใหม่ เติม anhydrous Na_2SO_4 ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ข้ามคืนเพื่อกำจัดน้ำออก ดูดส่วนเฮกเซนใส่ในหลอดทดลองหลอดใหม่ เติม anhydrous Na_2SO_4 เพื่อกำจัดน้ำออกจากเฮกเซนอีกครั้ง กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร นำสารที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ตามวิธีในข้อ 3.7.3

3.7.3 การวิเคราะห์สาร PAHs โดยแก๊สโครมาโตกราฟี

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)

วิเคราะห์ภายใต้ภาวะดังนี้

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

3.8 การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดิน

ดินที่ใช้ในการทดลองเป็นดินจากสวนผลไม้ที่ไม่ผ่านการปนเปื้อนจากสาร PAHs มาก่อน เตรียมดินตามวิธีในข้อ 3.2.2 และ เตรียมหัวเชื้อ 2 ชนิด ดังนี้

ก. หัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ตรึงบนวัสดุทางการเกษตร

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีในข้อ 3.4 โดยใช้ระยะเวลาในการบ่มเชื้อเท่ากับวันที่มีจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนสูงที่สุด

ข. หัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเหลว CFMM

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีในข้อ 3.1 เก็บเซลล์โดยการปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างและแขวนลอยเซลล์ในอาหาร CFMM ปรับจำนวนเซลล์ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้มีจำนวนเท่ากับในข้อ ก. โดยใช้ 0.85% โซเดียมคลอไรด์ในการเจือจาง

ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมด้วยวิธีต่างๆ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุด ดังนี้

ชุดควบคุมที่ 1 ดินปลอดเชื้อผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีนเพื่อศึกษาการสลายของ PAHs โดยปัจจัยทางกายภาพ

ชุดควบคุมที่ 2	ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน เพื่อศึกษาการลดลงของ PAHs เมื่อมีปัจจัยทางชีวภาพจากดิน
ชุดควบคุมที่ 3	ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน และวัสดุทางการเกษตรปลอดเชื้อแต่ละชนิด เพื่อศึกษาผลของวัสดุทางการเกษตรต่อจุลินทรีย์ในดินที่สามารถย่อยสลายสาร PAHs
ชุดการทดลองที่ 1	ดินไม่ปลอดเชื้อผสมไพรีนและฟีแนนทรีน และผสมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมในอาหารเหลว CFMM ตามข้อ ข.
ชุดการทดลองที่ 2	ดินไม่ปลอดเชื้อผสมไพรีนและฟีแนนทรีน และผสมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ตรึงบนวัสดุทางการเกษตรแต่ละชนิดตามข้อ ก.

ทุกชุดการทดลองใช้ดิน 2 กรัม ส่วนชุดที่เติมวัสดุทางการเกษตร 0.5 กรัม จะใช้ดิน 1.5 กรัม ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีนในรูปสารละลายอะซีโตน ความเข้มข้นชนิดละ 0.05 มก./กรัมดิน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืนเพื่อให้อะซีโตนระเหยออกหมดและใช้จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากัน สำหรับดินปลอดเชื้อเตรียมโดยใส่ดินจำนวน 2 กรัมลงในขวดแก้วฝาเกลียว นำไปฆ่าเชื้อโดยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที วันละครั้งเป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน จากนั้นปรับค่าความชื้นให้มีค่าเป็น 70% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำและค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.5-7.0 ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อและโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 วันและเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 7, 10, 14, 21และวันที่ 35 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในดินตามวิธีในข้อ 3.7.2 และวัดการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนโดยวิธี viable plate count บนอาหารแข็ง LB และ CFMM ที่มีผลึกไพรีนและฟีแนนทรีนวางบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 3.10

3.9 ประเมินประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆในดิน

นำหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ตรึงบนวัสดุทางการเกษตรชนิดที่ให้ผลการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้น 0.05 มก./กรัมดิน ได้ดีที่สุดจากข้อ 3.8 มาบำบัดไพรีนและฟีแนนทรีนที่มีความเข้มสูงขึ้น 10 เท่า คือความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.5 มก./กรัมดิน ที่ปนเปื้อนในดินสวนและดินอู่ซ่อมรถ โดยแบ่งเป็นชุดการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 3.8

3.10 การตรวจหาปริมาณกลุ่มแบคทีเรียด้วยวิธี Viable plate count

นำดินหรือวัสดุทางการเกษตรมาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ เกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก ก) หรือ CFMM (ภาคผนวก ก) ที่เติมนิสเตติน ความเข้มข้น 40 มก./มล. เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา วางผลึกไพรีนและฟีแนนทรีนบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ปิดผนึกด้วยเทป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ LB และ 5 วันสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.11 ติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในช่วงเวลาการบำบัดด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

3.11.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาข้ามคืนหรือประมาณ 16-18 ชั่วโมง (ถ้าเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จะใช้เวลาประมาณ 3 วัน) ปิเปตอาหารเหลวที่มีเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสออกให้หมด ทำขั้นตอนนี้ซ้ำ 3 ครั้งจนได้ปริมาณเซลล์ตามต้องการ นำตะกอนเซลล์ที่ได้เติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 567 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการดูดไมโครปิเปตขึ้นลง 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) ผสมสารให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

เติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย (ประมาณ 0.7-0.8 มิลลิลิตร) ผสมโดยการเขย่าจนกลายเป็นอิมัลชัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสด้านบนซึ่งเป็นส่วนที่มีดีเอ็นเออยู่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ ระวังอย่าให้ติดส่วนตะกอนไปด้วย จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสาร

ละลายสุดท้าย ผสมโดยการเขย่าจนกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสด้านบนเหนือชั้นตะกอนลงในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่แล้วเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาจนปรากฏตะกอนสีขาวของดีเอ็นเอ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสของไอโซโพรพานอลทิ้ง เติม70% เอธานอลที่เย็นจัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งแล้วนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปประเหยให้แห้งสนิท จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และใส่ RNase A (ภาคผนวก ข) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3.11.2 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินและวัสดุทางการเกษตร

สกัดดีเอ็นเอจากชุดการทดลองตามวิธีของ Sei และคณะ (2000) โดยชั่งวัสดุทางการเกษตรหรือดิน 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ เติม High DNA extraction buffer 440 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) เติมโปรตีนเนสเค (proteinase K) 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเติม 20% SDS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้สารเข้ากันโดยกลับหลอดไป นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง โดยกลับหลอดไปมาทุก 20 นาที จากนั้นสกัดด้วยสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) 2 ครั้ง ในแต่ละครั้งผสมโดยการเขย่าจนกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสลงในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรเท่ากับปริมาตรของส่วนน้ำใส ผสมโดยการเขย่าจนกลายเป็นอิมัลชัน ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสด้านบนที่มีดีเอ็นลงในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ เติม 3 โมลาร์โซเดียมอะซีเตต (ภาคผนวก ข) ในปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใสและเติม 100% เอธานอล ที่ยืนจัดปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด นำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติม 70% เอธานอลที่เย็นจัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ระเหยเอธานอลออกจากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งและละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

3.11.3 การกำจัด Humic acid และตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี Gel electrophoresis

เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1% (ภาคผนวก ข) ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า (ภาคผนวก ข) ทิ้งให้สารละลายเย็นลงจนอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทลงในถาดที่มีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัวประมาณ 60 นาที วางแผ่นอะกาโรสที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ให้ท่วมอะกาโรสเจล 2-3 มิลลิเมตร ผสมสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร รวมกับสีติดตาม (6x loading dye) 1 ไมโครลิตร หยอดลงในช่องวิ่งบนแผ่นอะกาโรส จากนั้นทำอิเลคโทรโฟเรซิส โดยเปิดสวิตส์ให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านแผ่นวุ้นและบัฟเฟอร์ TAE ที่ความต่างศักย์100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) นาน 15 นาที นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ด้วยเครื่องตรวจสอบเจล (Gel Documentation)

3.11.4 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

ตัดอะกาโรสเจลบริเวณส่วนที่มีดีเอ็นเอและทำดีเอนเอให้บริสุทธิ์ด้วย Glass powder for DNA recovery (TAKARA, Japan) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ นำอะกาโรสเจลที่ตัดได้ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ เติม NaI ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักอะกาโรสเจล แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส กลับหลอดไปมาจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมด จากนั้นเติม glass milk ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อ 1 ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที โดยกลับหลอดไปมาทุก 1 นาทีเพื่อให้ดีเอ็นเอจับกับ glass milk ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนน้ำใสทิ้งแล้วเติม washing buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยไมโครปิเปต แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดส่วนน้ำใสทิ้ง ทำขั้นตอนนี้ซ้ำ 2 รอบ จากนั้นระเหยน้ำออกจากตะกอน glass milk ให้แห้งโดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วเติมน้ำปลอดประจุที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เพื่อให้สายดีเอ็นเอหลุดออกจาก glass milk ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนน้ำที่มีดีเอ็นเอใส่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้ติดส่วนตะกอนไปด้วย) โดยทำซ้ำ 2 รอบ เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3.11.5 **วิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ**

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.11.4 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) ถ้าอัตราส่วนที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนสูง แต่ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนอยู่สูง และคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

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

ตามวิธีของ Sambrook และ Russell (2001)

3.11.6 **เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส** (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบนิเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ไพรเมอร์ EUB f933GC (5'GCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCACAAGCGGTGG AGCATGTGG-3' ซึ่งมี GC clamp เชื่อมต่อบริเวณ 5' และ ไพรเมอร์ EUB r1387 (5'-GCCCGGGAACGTATTCACCG-3')(Kawai และคณะ, 2002) เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีความยาวประมาณ 500 bp โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาเป็นดังนี้

- 10X PCR buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X buffer)	5	ไมโครลิตร
- สารละลาย EUB f933 primer ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- สารละลาย EUB r1387 ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (ความเข้มข้นสุดท้าย 1.25 U)	0.25	ไมโครลิตร

ใช้สารละลายดีเอ็นเอแม่แบบ จากข้อ 3.11.4 ประมาณ 100 ng ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ โดยรวมส่วนผสมทั้งหมดในหลอด PCR จะมีปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) (Biorad,USA) โดยโปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส มีดังนี้

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

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Gel electrophoresis โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% (ภาคผนวก ข) ในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ตามวิธีในข้อ 3.11.3 เปรียบเทียบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (100 bp DNA ladder)

3.11.7 วิเคราะห์ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

วิเคราะห์ DGGE โดยใช้อุปกรณ์ของ DCode™ system (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) โดยการเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 40 – 70% (ภาคผนวก ข) จากสารละลาย denaturant 0% และ 100% (ภาคผนวก ข) ซึ่งทำเกรเดียนท์ ของสารละลาย denaturant โดยใช้ระบบการจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ เมื่อทำเกรเดียนท์ ของสารละลาย denaturant ลงในชุดแซนวิชเตรียมเจลแล้ว เสียบหวีลงไประหว่างกระจกแซนวิช ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทิ้งให้พอลิอะคริลาไมด์เจลแข็งตัวประมาณ 5-6 ชั่วโมง จากนั้นนำชุดเจลแซนวิชใส่ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 7 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ

ประมาณ 55 องศาเซลเซียส ผสมผลิตภัณฑ์ PCR กับสีติดตามหยอดลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำ อีเลคโทรโฟเรซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ที่ 60 องศาเซลเซียสนาน 10 ชั่วโมง ย้อมพอลิอะคริลาไมด์เจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) นาน 15 นาที นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ด้วยเครื่องตรวจสอบเจล (Gel Documentation)