# บทที่ 3

# อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

## อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand.
2. ตู้บ่มเชื้อ รุ่น Heraeus type B 5050 E ของบริษัท Heraeus, Germany.
3. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ "ISSCO" laminar flow รุ่น BVT – 124 ของบริษัท International Scientific Supply, USA.
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA.
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
6. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น Mylab$^{TH}$ Thermo-Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea.
7. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
8. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น GenieII G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
9. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunswick Scientific, USA.
10. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) บริษัท Kakusan, Japan.
11. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Pico ของบริษัท Kendro, Germany.
12. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan.
    - หัวหมุนเหวี่ยง (rotor) ขนาดเล็ก รุ่น RA50J
    - หัวหมุนเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA22
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) รุ่น WB 14 ของบริษัท Memmert, Germany.
14. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France.
15. ปิเปต (pipette) ขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร ของบริษัท Gilson, France.
16. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Nalgene, USA.

17. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
18. หัวกรองชนิด PTFE ขนาดความกว้างรู 0.20 และ 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
19. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS400 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
20. ชุดเครื่องมือทำแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) สำหรับตรวจสอบปริมาณของ PAHs
    - เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography) รุ่น 6890N บริษัท Agilent Technologies, USA.
    - คอลัมน์ (column) ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วย เฟนนิลเมทิลไซโลเซน ความเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร
    - เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID)
    - เข็มฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) ขนาด 10 ไมโครลิตร
21. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer, USA.
22. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
    - Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชั่น 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA.
23. 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.
24. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –70 $^{o}$ซ รุ่น REVCO ULT 1786 ของบริษัท Forma Scientific, USA.
25. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –20 $^{o}$ซ รุ่น MDF-U536D ของบริษัท Sanyo Electric, Japan.
26. เครื่องคัดกรองขนาดวัสดุ ขนาดความกว้างของรู 0.84 มิลลิเมตร รุ่น ASTM E11 test sieve ของบริษัท Retsch GmbH & CO.KG, Germany.
27. เครื่องบด (blender) รุ่น MX-T31GH ของบริษัท Matsushita Electric, Taiwan.
28. ขวดแก้วฝาเกลียว(vial) ขนาด 22 ml (Screw Cap with Teflon Liner) ของบริษัท Lab System, Thailand.

29. ชุดเครื่องมือ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis รุ่น DCode™ system บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.

## เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. ฟีแนนทรีน (phenanthrene) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.
2. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
3. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
4. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
5. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท IUAI, Japan.
6. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia.
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany.
8. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany.
9. แอมโมเนียมไนเตรต ($NH_4NO_3$) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
10. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
11. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
12. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
13. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3.6H_2O$) ของบริษัท May & Baker, England.
14. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 . 2H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
15. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany.
16. เมทานอล ($CH_3OH$) ของบริษัท Merck, Germany.
17. เอธิลอะซีเตต ($CH_3COOC_2H_5$) ของบริษัท Merck, Germany.
18. ไดเมธิลซัลฟอกไซด์($CH_3SOCH_3$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
19. กลีเซอรอล (glycerol) บริษัท Research organics, Inc., USA.
20. นอร์มัลเฮกเซน ($C_6H_{14}$) บริษัท Merck, Germany
21. Triton X-100 บริษัท Sigma, USA.
22. แบคโตอการ์ (Bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
23. โซเดียมอะซีเตต (Sodium acetate) ของบริษัท Merck, Germany.
24. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous $Na_2SO_4$) ของบริษัท Merck, Germany.
25. นิสเตติน (Nystatin) ของบริษัท Bio Basic Inc., Canada.

26. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial $CH_3COOH$) ของบริษัท Merck, Germany.
27. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท Merck, Germany.
28. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenolblue) ของบริษัท Fluka, Germany.
29. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA.
30. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA.
31. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
32. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), [$(C_{16}H_{32}N(CH_3)_3)Br$] ของบริษัท TCI-EP, Japan.
33. 1 kb DNA ladder ของบริษัท New England Biolabs, UK.
34. 100 bp DNA ladder ของบริษัท New England Biolabs, UK.
35. *Taq* DNA polymerase ของบริษัท New England Biolabs, UK.
36. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท New England Biolabs, UK.
37. Proteinase K ของบริษัท Sigma, USA.
38. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล GENECLEAN II Kit ของบริษัท Q-BIO Gene, USA.
39. Oligonucleotide primer ของบริษัท Operon Biotechnologies GmbH, Germany.
40. สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค DGGE Formamide (Deionized) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
41. 40% Acrylamide/Bis solution, 37.5:1 (2.6% C) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
42. Urea ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
43. Ammonium persulfate ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
44. TEMED (N,N,N′,N′-Tetra-methyl-ethylenediamine) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
45. 50xTAE ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
46. Dye solution ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
47. Ethidium bromide solution เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.

<u>หมายเหตุ</u> สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade) หรือสูงกว่า

## วิธีดำเนินงานวิจัย

### 3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ซึ่งแยกมาจากใบจามจุรี ประกอบด้วยเชื้อบริสุทธิ์อย่างน้อย 7 ชนิด ซึ่งจัดอยู่ใน 4 สกุล ได้แก่ *Comamonas, Rugamonas, Flavimonas, Pseudomonas* และส่วนที่เหลือไม่สามารถจำแนกได้จำนวน 1 ชนิด โดยเป็นแบคทีเรียแกรมลบทั้งหมด สามารถย่อยสลายไพรีนได้ และยังสามารถลดปริมาณของอะซีแนพธีน ฟลูออรีน ฟีแนนทรีนและฟลูออแรนทีนได้อีกด้วย (จิรทีปม์ แสนรัก, 2547)

### 3.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีดังนี้

EUB f933 GC มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ

5'-GCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGC
ACAAGCGGTGGAGCATGTGG-3' (Kawai และคณะ, 2002) และ

EUB r1387 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ

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

### 3.3 เตรียมวัสดุทางการเกษตร

#### 3.3.1 วัสดุทางการเกษตร

วัสดุทางการเกษตรที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ ฟางข้าว ใยบวบ และนมผักกระเฉด

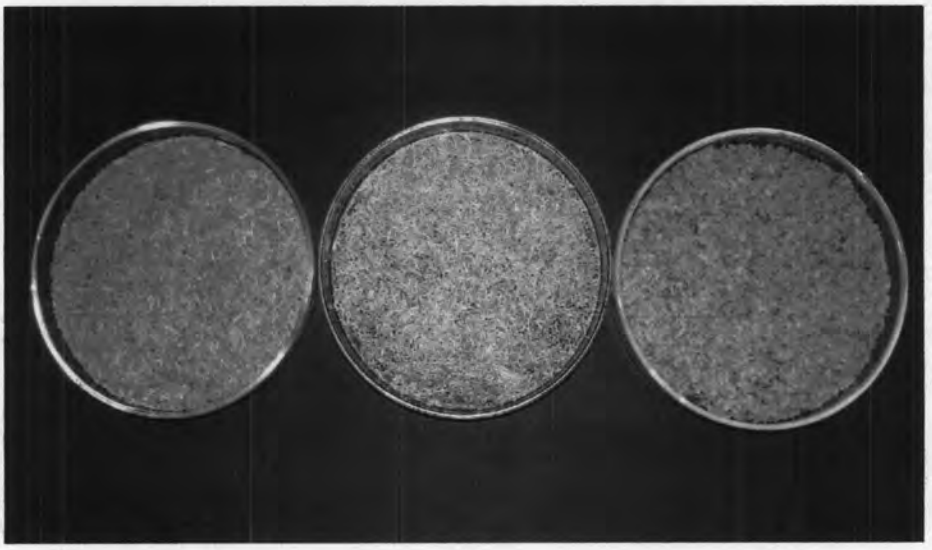
**ฟางข้าว** เก็บมาจากกองฟางบริเวณทุ่งนา อำเภอบ้านนา จังหวัดนครนายก ซึ่งฟางข้าวมีลักษณะแห้งและเก่า

**ใยบวบ** เป็นผลบวบที่ปล่อยจนแก่แห้งแล้วเนื้อหลุดหายไปเหลือแต่เส้นใย ซื้อมาจากหาบเร่ในตลาดนนทบุรี มีลักษณะแห้ง

**นมผักกระเฉด** ซื้อมาจากร้านขายผักในตลาดนนทบุรีโดยเลือกร้านที่มีนมหรือเนื้อเยื่อสีขาวติดมากับลำต้นผักกระเฉดด้วย มีลักษณะเปียกชื้น

### 3.3.2 การเตรียมวัสดุทางการเกษตรเพื่อวิเคราะห์และใช้ในงานวิจัย

นำฟางมาตัดให้สั้นลง ปั่นและคัดกรองขนาดด้วยเครื่องคัดกรอง ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.84 มม. นำใยบวบมาตัดให้เป็นชิ้นเล็กและปั่น ส่วนนมผักกระเฉด รูดนมสีขาวออกจากต้นผักกระเฉด ตากแห้งกลางแดดเป็นเวลา 10 วัน และนำมาปั่น (รูปที่ 3.1) แบ่งวัสดุทางการเกษตรแต่ละชนิดสำหรับนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพและเคมี ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ จนกว่าจะใช้



ก. ข. ค.

**รูปที่ 3.1 วัสดุทางการเกษตรที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ ฟางข้าว (ก.) ใยบวบ (ข.) และนมผักกระเฉดที่อบแห้ง (ค.) ที่บดและผ่านการคัดกรองขนาดแล้ว**

### 3.3.3 การวิเคราะห์วัสดุทางการเกษตร

นำตัวอย่างวัสดุทางการเกษตร 3 ชนิด ชนิดละ 0.5 กิโลกรัม ส่งวิเคราะห์ที่ฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เพื่อวิเคราะห์ความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ ( maximum water holding capacity ) และค่าความเป็นกรด-ด่าง และวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส ปริมาณโปแทสเซียม สารอินทรีย์คาร์บอนและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาเกษตรศาสตร์ บางเขน

### 3.4 เตรียมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ใน Carbon Free Mineral Medium (CFMM)

เพาะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเหลว carbon free mineral medium (CFMM) (Komukai-Nakamura และคณะ, 1996) ที่มีไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 3 วัน (รูปที่ 3.2)

วันที่ 0 วันที่ 3

**รูปที่ 3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. เมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบกับที่เวลา 0 วัน**

### 3.5 ตรวจสอบการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผสมกับวัสดุทางการเกษตร

#### 3.5.1 การเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรียในวัสดุทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิด

นำวัสดุทางการเกษตรได้แก่ ฟางข้าว ใยบวบและนมผักกระเฉด ที่เตรียมไว้จากข้อ 3.3.2 จำนวน 0.1 กรัมใส่ขวดแก้วฝาเกลียว ไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน จากนั้นนำกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงใน CFMM จากข้อ 3.4 มาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 10 นาที ล้างเซลล์แบคทีเรียในสารละลายโซเดียมคลอไรด์

0.85% ทำการปั่นเหวี่ยงในสภาวะเดิม โดยทำตามขั้นตอนนี้ 2 ซ้ำ แขวนลอยเซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% โซเดียมคลอไรด์ และเจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 เพื่อปรับความเข้มข้นให้ได้ $10^8$ CFU/มล. แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดคือ

**ชุดการทดลองที่ 1** นำฟางข้าว 0.1 กรัม ปลอดเชื้อในขวดแก้วฝาเกลียว มาทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 6.5 - 7.0 และปรับความชื้น (moisture content) เป็น 70% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ โดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ผสมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัลลงไปให้มีน้ำหนักตรงกับค่าที่คำนวณจากความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำที่ได้จากการวิเคราะห์ จากนั้นเติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จำนวน $10^8$ CFU ลงในฟาง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เตรียมชุดการทดลองทั้งหมด 12 ขวด บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน ครั้งละ 2 ขวด (รูปที่ 3.3) เพื่อดูการอยู่รอดของแบคทีเรีย โดยติดตามจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จากลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร

**ชุดการทดลองที่ 2** ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 แต่เปลี่ยนวัสดุทางการเกษตรเป็นใยบวบ

**ชุดการทดลองที่ 3** ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 แต่เปลี่ยนวัสดุทางการเกษตรเป็นนมผักกระเฉด

**ชุดการทดลองที่ 4-6** ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1-3 แต่ใช้วัสดุทางการเกษตรไม่ปลอดเชื้อผสมกับกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

**ชุดควบคุมที่ 1** ชั่งวัสดุทางการเกษตร ซึ่งประกอบด้วย ฟางข้าว ใยบวบและนมผักกระเฉดปลอดเชื้อ 0.1 กรัม ลงในขวดแก้วฝาเกลียว ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1-3 แต่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ลงในวัสดุทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิด เพื่อตรวจสอบความปลอดเชื้อในวัสดุทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิด

**ชุดควบคุมที่ 2** ทำเช่นเดียวกับชุดควบคุมที่ 1 แต่ใช้วัสดุทางการเกษตรไม่ปลอดเชื้อ

ทุกชุดการทดลองและชุดควบคุมทำสองซ้ำ

### 3.5.2 วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count

เติมสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 9.9 มล. ลงในวัสดุทางการเกษตร 0.1 กรัม เขย่าด้วยเครื่องปั่นผสม 1 นาที ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ นำมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) (ภาคผนวก ก

หมายเลข 4) หรือ CFMM (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ที่มี nystatin ความเข้มข้น 40 มก./มล. วางผลึกไพรีนและฟีแนนทรีนไว้บนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ปิดผนึกด้วยเทป บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 2 วันสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ LB และ 7 วันสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM นับจำนวนโคโลนีและเปรียบเทียบการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้วัสดุทางการเกษตร 3 ชนิดที่ต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง

## 3.6 ความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมในวัสดุทางการเกษตร

### 3.6.1 การเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมในวัสดุทางการเกษตรในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีนและฟีแนนทรีน

ทดสอบความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมในวัสดุทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิด ตามวิธีการและภาวะการเลี้ยงเชื้อเดียวกับข้อ 3.5 ในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนโดยแบ่งการทดลองดังนี้

**ชุดการทดลองที่ 1** นำกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มาเลี้ยงในวัสดุทางการเกษตรปลอดเชื้อ 0.1 กรัม ในหลอดทดลองขนาด 22 x 175 มม. บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ตามระยะเวลาที่กลุ่มแบคทีเรียมีการเจริญสูงสุดในวัสดุนั้นๆ เมื่อถึงวันที่กลุ่มแบคทีเรียมีการเจริญสูงสุดแล้ว จึงใส่อาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. ลงในหลอด เขย่าที่อุณหภูมิ 30°ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยเก็บตัวอย่างวันที่ 0, 3, 7, 14, 21, 28 และ 35 วันละ 5 หลอด นำ 2 หลอดแรกมาตรวจหากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตามวิธีข้อ 3.5.2 เพื่อดูการอยู่รอดของแบคทีเรีย และนำอีก 3 หลอดที่เหลือ มาวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในวัสดุทางการเกษตร ตามวิธีข้อ 3.6.2 เพื่อดูความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

**ชุดการทดลองที่ 2** ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 แต่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในวัสดุทางการเกษตรไม่ปลอดเชื้อ 0.1 กรัม

**ชุดควบคุมที่ 1** ใส่เฉพาะอาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล.ในหลอดทดลองขนาดใหญ่

**ชุดควบคุมที่ 2** ทำเช่นเดียวกับชุดควบคุมที่ 1 แต่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จำนวน $10^{10}$ CFU/มล. ปริมาตร 1 มล. ลงไปด้วย

**ชุดควบคุมที่ 3** ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 แต่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ลงในวัสดุทางการเกษตรปลอดเชื้อ

**ชุดควบคุมที่ 4** ทำเช่นเดียวกับชุดควบคุมที่ 3 แต่ใช้วัสดุทางการเกษตรไม่ปลอดเชื้อ

ในทุกชุดควบคุมและชุดการทดลอง วัสดุทางการเกษตรจะใช้ฟางข้าวหรือใยบวบหรือนมผักกระเฉดอย่างละ 0.1 กรัม เท่ากัน ทั้ง 3 ชนิด จำนวนเซลล์ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เท่ากันเท่ากับ $10^8$ CFU ยกเว้นชุดควบคุมที่ 2 และใช้สารละลายไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. ในอาหารเหลว CFMM

ทุกชุดการทดลองและชุดควบคุมทำสองซ้ำสำหรับการตรวจหากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และทำสามซ้ำสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในวัสดุทางการเกษตร

### 3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีน

วิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนตามวิธีของ Daengrueng (2005) โดยใช้ *n*-hexane ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ 15% Triton X-100 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ในตัวอย่างวัสดุทางการเกษตร 0.1 กรัมที่อยู่ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4°ซ นานประมาณ 1-2 ชั่วโมงเพื่อให้ส่วนของวัสดุทางการเกษตรจับตัวกันตกตะกอน เติม anhydrous $Na_2SO_4$ ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 55°ซ ข้ามคืนและทิ้งไว้ให้เย็นเพื่อกำจัดน้ำออกจากส่วนของชั้น *n*-hexane จากนั้นนำส่วนของ *n*-hexane กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร

วิเคราะห์สารที่สกัดได้ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี โดยชุดเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น 6890N (บริษัท Agilent Technologies, USA) คอลัมน์ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนนิลเมทิลไซโลเซน 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

นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การลดลงของไพรีนและฟีแนนทรีนโดยเทียบกับวันที่ 0 ของแต่ละชุดการทดลอง

สำหรับชุดควบคุมที่ 1 และ 2 ซึ่งไม่มีวัสดุทางการเกษตร ทำการสกัดโดยใช้ *n*-hexane ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพียงอย่างเดียว ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ทิ้งไว้จนแยกชั้น จากนั้นจึงดูดส่วนบนซึ่งเป็นชั้นของ *n*-hexane กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร

## 3.7 ติดตามพลวัตรประชากรแบคทีเรียโดย Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

### 3.7.1 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุทางการเกษตร

สกัดชุดการทดลองตัวอย่างวัสดุทางการเกษตรตามวิธีของ Sei และคณะ (2000) ที่ใช้ไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.5 มก./มล. ในอาหารเหลว CFMM ชั่งตัวอย่างวัสดุทางการเกษตร 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 ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่ 37°ซ นาน 2 ชั่วโมง โดยกลับหลอดไปมาทุก 20 นาที

จากนั้นนำมาสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) 2 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสชั้นบนถ่ายลงหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่และเติมคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) (ภาคผนวก ข) เท่ากับปริมาตรของส่วนน้ำใส ผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

ดูดส่วนน้ำใสชั้นบน ถ่ายลงหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมโซเดียมอะซีเตต (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใส และเติมเอธานอลสัมบูรณ์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด นำไปเยือกแข็งที่ -80°ซ นาน 15 นาที และนำมาไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอธานอล (ภาคผนวก ข) โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ระเหยเอธานอลออกจากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ 4°ซ จนกว่าจะใช้

### 3.7.2 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยถ่ายเชื้อที่เลี้ยงอยู่ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) ถ่ายเชื้อปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เพื่อแยกเซลล์เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 567 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นดูดลง จากนั้นเติม 10% SDS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และโปรตีเนสเค (Proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) 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 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้ติดส่วนตะกอนไปด้วย) จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโปรพานอลปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาจนกระทั่งตะกอนขาวของดีเอ็นเอปรากฏ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของไอโซโปรพานอลทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 70% เอธานอล (ภาคผนวก ข) ที่เย็นจัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆเทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอใน บัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ

### 3.7.3 การทำดีเอ็นเอที่สกัดได้ให้บริสุทธิ์

เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1% (ภาคผนวก ข) ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 1 เท่า เทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัวประมาณ 20 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่าให้ท่วมเหนืออะกาโรสเจล 2-3 มม. นำสารละลายดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตรมาผสมกับสีติดตามความเข้มข้น 10 เท่าปริมาตร 5 ไมโครลิตรหยอดลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) นาน 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำปลอดประจุ นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV)

ตัดส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอจากเจล และทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย Geneclean II kit (Q-BIO Gene, USA.) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยนำเจลที่ตัดได้ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ และชั่งน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจลโดยหักออกจากน้ำหนักหลอดเปล่า เติม NaI ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ เขย่าทุก 1 นาที เป็นเวลา 5 นาทีจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมด เติม glass milk โดยถ้าปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอทั้งหมดน้อยกว่า 500 ไมโครลิตร จะใช้ glass milk ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ถ้าปริมาตรอยู่ในช่วง 500 -1000 ไมโครลิตร จะใช้ glass milk ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นผสมเบาๆให้เป็นเนื้อเดียวกันทุก 1 นาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอจับกับ glass milk ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที เทส่วนน้ำใสออก แล้วเติมสารละลาย new wash ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นดูดลงเบาๆ เพื่อล้าง glass milk นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที ดูดส่วนน้ำใสออก ล้างด้วยสารละลาย new wash และปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งหนึ่ง ดูดส่วนน้ำใสออกจนหมด ระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 55°ซ เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้น้ำและเอธานอลซึ่งเป็นส่วนผสมของสารละลาย new wash ระเหยหมด ละลายตะกอนด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ดูดส่วนน้ำใสที่มีดีเอ็นเออยู่เก็บไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ 4°ซ จนกว่าจะใช้

### 3.7.4 ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ($A_{260}$ และ $A_{280}$) เพื่อปรับความเข้มข้นของแม่แบบสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ให้เท่ากันทุกหลอดของแต่ละชุดการทดลอง โดยคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

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

### 3.7.5 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ไพรเมอร์ EUB f933 ซึ่งมี GC clamp เชื่อมต่อบริเวณ 5' (Kawai และคณะ, 2002) และ EUB r1387 (Kawai และคณะ , 2002) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR มีความยาวประมาณ 500 bp โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาเป็นดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| - 10X *Taq* DNA polymerase buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X *Taq* DNA polymerase buffer) | 5 | ไมโครลิตร |
| - สารละลาย F933 GC primer ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 ไมโครโมลาร์) | 1 | ไมโครลิตร |
| - สารละลาย R1387 primer ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 ไมโครโมลาร์) | 1 | ไมโครลิตร |
| - สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์) | 1 | ไมโครลิตร |
| - เอนไซม์ *Taq* polymerase (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 x *Taq* polymerase) | 0.25 | ไมโครลิตร |

ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมไว้ประมาณ 100 ng ปรับปริมาตรน้ำด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดมีปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศและเก็บส่วนผสมทั้งหมดในน้ำแข็ง หลังจากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) (Biorad,USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

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

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 1.2% (ภาคผนวก ข) ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.7.3 ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder โดยหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานลงในช่องวิ่งแรกปริมาตร 2 ไมโครลิตร

### 3.7.6 วิเคราะห์ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

ใช้อุปกรณ์ของ DCode™ system (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) ในการวิเคราะห์ DGGE โดยการเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 40 – 70% (ภาคผนวก ข) (100% denaturant ประกอบด้วย 7 M urea และ 40% formamide) เกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant จะใช้ระบบการจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ เมื่อทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant ลงในชุดแซนวิชเตรียมเจลแล้ว เสียบหวีลงไประหว่างกระจกแซนวิช โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้พอลิอะคริลาไมด์เจลแข็งตัว จากนั้นนำชุดเจลแซนวิชใส่ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ 1xTAE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 7 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนจนอุณหภูมิประมาณ 55°ซ ผสมผลิตภัณฑ์ PCR กับสีติดตามหยอดลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 30 โวลต์ ที่ 55°ซ นาน 15 นาที จากนั้นใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ที่ 60°ซ นาน 8 ชั่วโมง ย้อมพอลิอะคริลาไมด์เจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) นาน 15 นาที และล้างสีย้อมด้วยน้ำกลั่นปลอด

ประจุ 2 ครั้งครั้งละ 5 นาที แล้วนำไปดูด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One Version 4.4.1 (Bio-Rad, USA.) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV)