บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. วัตถุดิบ

ตัวอย่างดินจากพื้นที่เพาะปลูกทางการเกษตรในจังหวัดสงขลา 2 พื้นที่ คือ ต. บางเหลียง อ. ควนเนียง และ ต. ทุ่งหวัง อ. เมือง จำนวน 23 บริเวณ

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- อาหารสำหรับคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที ได้แก่ Mineral salt yeast-extract medium (MSYM)
- อาหารสำหรับทดสอบทางคุณสมบัติชีวเคมีตามวิธีการของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Noel, 1984) และ ดวงพร คันธโชติ (2537)

(รายละเอียดและวิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ข.)

3. สารเคมี

- สารมาตรฐานออร์กาโนคลอรีน ได้แก่ สารพารา,พารา′-ดีดีที (1,1,1-Trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane) 99% Aldrin (AR grade)
- สารสำหรับสกัดพารา,พารา′-ดีดีทีในตัวอย่างดิน ได้แก่ เมทานอล คลอโรฟอร์ม เฮกเซน
- สารทดสอบทางคุณสมบัติชีวเคมี ตามวิธีการของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Noel, 1984) และ ดวงพร คันธโชติ (2537)

(รายละเอียดและวิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ข.)

4. อุปกรณ์

- Centrifuge and Microcentrifuge
- Dessicator
- Gas chromatography-Micro Electron capture detector (GC-μECD)
- Gel electrophoresis apparatus
- Incubator and Shaking incubator
- Laminar air flow cabinet

- pH meter
- Rotary evaporator
- Thermocycler
- UV-visible spectrophotometer
- UV transilluminator
- Vortex mixer

5. วิธีการวิเคราะห์

5.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (ดัดแปลงจากวิธีของ Stoscheck, 1990)

นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จำนวน 2 ครั้ง ปิเปตส่วนใสทิ้ง เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปิเปตตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม reagent A (สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 3 ส่วน, โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล 1 ส่วนและสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 1 ส่วน) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม สารละลายโฟลิน (Folin reagent) 0.2 นอร์มอล ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน (ทำใน 96 well-plate) ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วย Microplate reader เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐานโปรตีนโดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน

5.2 การวิเคราะห์ปริมาณพารา,พารา′-ดีดีทีด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี (ดัดแปลงจากวิธีของบุญเสริม เซ่งล่าย, 2540; นิคม ละอองศิริวงศ์ และ อดินันท์ หมัดหมาน, 2542)

เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟีใช้เครื่องตรวจวัด (Detector) ชนิด ^{63}Ni Micro Electron capture detector (μECD) โดยใช้คอลัมน์แบบ capillary HP-35 (35% crosslinked methyl phenyl siloxane) ความยาว 30 เมตร ID 0.25 ไมโครเมตร สภาวะของเครื่องใช้อุณหภูมิของ Injector 250 องศาเซลเซียส Detector 320 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิคอลัมน์ 150 องศาเซลเซียส จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 250 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 20 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิที่ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สพา (carrier gas) อัตราเร็ว 2 มิลลิเมตรต่อนาที และไนโตรเจนเป็น make up แก๊สอัตราเร็ว 60 มิลลิลิตรต่อนาที

วิเคราะห์สารโดยฉีดสารละลายมาตรฐานของพารา,พารา′-ดีดีที 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี จะได้โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน เมื่อฉีดตัวอย่างที่เตรียมไว้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณเข้าสู่เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี จะได้โครมาโตแกรมเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ซึ่งค่ารีเทนชั่นไทม์ (Retention time) จะบอกให้ทราบถึงชนิดของสาร พื้นที่ใต้กราฟ และความสูงของพีคจะบอกถึงปริมาณสาร คำนวณความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์

6. วิธีการทดลอง

6.1 ศึกษาปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีที ในตัวอย่างดินที่ปนเปื้อน

6.1.1 การเก็บตัวอย่างดินที่ปนเปื้อน (วินันท์ดา หิมะหมาน, 2541)

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณผิวดินในพื้นที่แปลงเพาะปลูกซึ่งเป็นดินที่มีประวัติการใช้สารป้องกันและกำจัดศัตรูพืช โดยใช้พลั่วมือขุดหลุมลึกระดับ 0 - 15 เซนติเมตร ซึ่งเป็นความลึกระดับไถพรวน ตักดินขึ้นมาปาดด้านข้างออกทั้ง 2 ข้าง เก็บดินส่วนกลางใส่ถุงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บดิน 3 - 4 จุดในแต่ละแปลง เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีที และเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เจริญในดินที่มีการปนเปื้อนต่อไป

การเตรียมดินก่อนวิเคราะห์ นำดินแต่ละจุดในแปลงมารวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันผึ่งให้แห้งกลางแดด จากนั้นนำมากรองด้วยตะแกรงร่อนขนาด 10 mesh เพื่อกรองเอาสิ่งแปลกปลอมออก

6.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีทีจากตัวอย่างดิน (ดัดแปลงจากวิธีของบุญเสริม เซ่งล่าย, (2540))

นำตัวอย่างดิน 100 กรัม สกัดด้วยอะซิโตน 100 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองแล้วเก็บส่วนสารละลายไว้ สกัดอีกครั้งด้วยอะซิโตน:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าอีกครั้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง รวมส่วนสารละลายไว้ด้วยกันแล้วสกัดด้วยเฮกเซน 500 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ในกรวยแยกสารทิ้งส่วนน้ำ ส่วนสารละลายดูดความชื้นด้วยสารละลายโซเดียมซัลเฟตแบบปราศจากน้ำ จากนั้นระเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator เพื่อระเหยน้ำออกจนเหลือปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการ clean up สารที่สกัดได้ด้วย Florisil แล้วชะด้วยไดคลอโรมีเทน 40 มิลลิลิตร ระเหยอีกครั้งด้วย Rotary evaporator จากนั้นละลายกลับด้วยนอร์มอลเฮกเซนปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีที ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟฟี ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 5.2

6.2 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญบนสารพารา,พารา′-ดีดีที (ดัดแปลงจากวิธีการของ Bidlan และ Manonmani, 2002)

6.2.1 การคัดเลือกโดยวิธี Selective enrichment method

นำตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ลงในอาหาร MSYM ที่ผสมพารา,พารา′-ดีดีทีความเข้มข้น 25 พีพีเอ็ม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อที่บ่มไว้ปริมาณร้อยละ 10 ลงในอาหาร MSYM ที่ผสมพารา,พารา′-ดีดีทีความเข้มข้น 25 พีพีเอ็มปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เตรียมใหม่ และนำส่วนที่เหลือจากการถ่าย ทำการเจือจางเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ และ spread plate ลงบนอาหารแข็ง MSYM ผสมพารา,พารา′-ดีดีทีความเข้มข้น 25 พีพีเอ็ม คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ถ่ายใส่หลอดทดลองบรรจุอาหาร MSYM ผสมพารา,พารา′-ดีดีทีความเข้มข้น 25 พีพีเอ็มเพื่อเก็บรักษา ทำการถ่ายลงในอาหารใหม่ 3 - 4 ครั้ง นำเชื้อที่คัดเลือกได้ไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีในขั้นตอนต่อไป

6.2.2 การคัดเลือกเชื้อเบื้องต้นที่สามารถย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที

โดยการเตรียมอาหาร Nutrient agar (NA) ที่มีความเข้มข้นของสารพารา,พารา′-ดีดีทีต่าง ๆ คือ 25, 50 และ 100 พีพีเอ็ม จากนั้นนำเชื้อทั้งหมดที่คัดแยกได้ในข้อ 6.2.1 มาเขี่ยลงบนอาหารที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สังเกตวงใสรอบๆ โคโลนี ซึ่งแสดงถึงลักษณะการใช้สารพารา,พารา′-ดีดีที เลือกโคโลนีดังกล่าวมาทดสอบในขั้นตอนต่อไป

6.3 คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที

นำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 6.2.2 ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบจากหลอดที่เก็บรักษาเชื้อ ลงในหลอดอาหาร Nutrient broth (NB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนได้ culture suspension ที่วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรได้ประมาณ 0.5 เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น ถ่ายเชื้อปริมาณร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว MSYM ที่เสริมสารพารา,พารา′-ดีดีทีความเข้มข้น 25 พีพีเอ็ม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยการวัดปริมาณโปรตีน พีเอช และปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีทีโดย GC-ECD เลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการย่อยสลายสาร โดยพิจารณาจากอัตราการย่อยสลายและการเจริญของเชื้อ โดยหาอัตราการย่อยสลายจากสูตร

$$\text{อัตราการย่อยสลาย} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A = ความเข้มข้นสารพารา,พารา′-ดีดีทีเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ (พีพีเอ็ม)

B = ความเข้มข้นสารพารา,พารา′-ดีดีทีที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (พีพีเอ็ม)

6.3.1 การสกัดสารพารา,พารา′-ดีดีทีจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร สกัดด้วยสารละลายเอทิลอะซิเตตปริมาตร 4 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ระเหยออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ละลายกลับด้วยสารละลายเฮกเซนปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีทีด้วยเครื่อง GC-ECD ตามวิธีการในข้อ 5.2

6.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการย่อยสารพารา,พารา′-ดีดีที

นำเชื้อที่คัดเลือกไว้จากข้อ 6.3 โดยเขี่ยเชื้อจากหลอดที่เก็บรักษาเชื้อ 1 ลูป ถ่ายลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จนมีค่าประมาณ 0.5 เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

6.4.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที

นำเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ร้อยละ 10 ใส่ลงในอาหารเหลว MSYM ที่มีสารพารา,พารา′-ดีดีที ความเข้มข้น 25 พีพีเอ็ม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25, 30, 37, และ 45 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง ใช้อาหาร MSYM ที่เสริมสารพารา,พารา′-ดีดีที 25 พีพีเอ็มและไม่มีการเติมเชื้อเริ่มต้นลงไปเป็นชุดควบคุม วัดการเจริญเซลล์โดยการวิเคราะห์โปรตีน พีเอช วิเคราะห์ปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีทีที่ลดลงโดยใช้เครื่อง GC-ECD คัดเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที มาศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยพิจารณาจากการเจริญของเชื้อ และอัตราการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที

6.4.2 ศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที

นำเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ร้อยละ 10 ใส่ลงในอาหารเหลว MSYM ที่มีสารพารา,พารา′-ดีดีที ความเข้มข้น 25 พีพีเอ็ม ปรับพีเอชให้เป็น 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, และ 8.0 โดยใช้อาหารที่ไม่ปรับพีเอชเป็นชุดควบคุม เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่คัดเลือกได้ในข้อ 6.4.1 เป็นเวลา 10 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง วัดการเจริญเซลล์โดยการวิเคราะห์โปรตีน พีเอช วิเคราะห์ปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีทีที่ลดลง คัดเลือกพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที มาศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยพิจารณาจากการเจริญของเชื้อ และอัตราการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที

6.4.3 ศึกษาผลของสารอาหารที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที

ปิเปตเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้มาร้อยละ 10 ใส่ลงในอาหาร MSYM ที่เสริมสารพารา,พารา′-ดีดีที 25 พีพีเอ็ม โดยเติมสารอาหารดังต่อไปนี้

ชุดที่ 1 กลูโคส ร้อยละ 0.5

ชุดที่ 2 ซูโครส ร้อยละ 0.5

ชุดที่ 3 ซักซิเนต (เกลือโซเดียม) ร้อยละ 0.5

ชุดที่ 4 อะซิเตต (เกลือโซเดียม) ร้อยละ 0.5

ชุดที่ 5 กลีเซอรอล ร้อยละ 0.5

ชุดที่ 6 ยีสต์สกัด ร้อยละ 0.5

ใช้อาหาร MSYM ที่เสริมสารพารา.พารา′-ดีดีที 25 พีพีเอ็มและไม่มีการเติมเชื้อเริ่มต้นลงไปเป็นชุดควบคุม โดยใช้สภาวะการเลี้ยงที่คัดเลือกได้จากข้อ 6.4.1 และ 6.4.2 เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง วัดการเจริญเซลล์โดยการวิเคราะห์โปรตีน พีเอช วิเคราะห์ปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีทีที่ลดลง คัดเลือกสารอาหารที่เหมาะสมที่สุดไปศึกษาในขั้นต่อไป

6.4.4 ศึกษาผลของปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีทีต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

ปิเปตเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ มาร้อยละ 10 ใส่ลงในอาหารเหลว MSYM ที่เสริมสารพารา,พารา′-ดีดีทีเข้มข้น 10, 15, 20 และ 25 พีพีเอ็ม โดยใช้อาหาร MSYM ที่เสริมสารพารา,พารา′-ดีดีทีเข้มข้น 25 พีพีเอ็ม และไม่มีการเติมเชื้อเริ่มต้นลงไปเป็นชุดควบคุม เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่ววัดการเจริญเซลล์โดยการวิเคราะห์โปรตีน พีเอช วิเคราะห์ปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีทีที่ลดลง เพื่อศึกษาความเข้มข้นสูงสุดที่เชื้อสามารถย่อยสารพารา,พารา′-ดีดีที ได้สูงสุด

6.5 จำแนกชนิดของเชื้อที่สามารถย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที

เตรียมเชื้อเริ่มต้นเช่นเดียวกับข้อ 6.4 จากนั้นนำไปจำแนกชนิดของเชื้อ ดังนี้

6.5.1 ทดสอบทางสัณฐานวิทยา โดยการย้อมแกรม ดูรูปร่าง ขนาดและการเรียงตัวของเซลล์

6.5.2 ทดสอบทางชีวเคมี (ตามวิธีการของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Noel, 1984))

ทดสอบคาตาเลส (Catalase test) การผลิตอินโดล (Production of indole) การทดสอบ Methyl red test การทดสอบ VP (Voges-Proskauer test) ทดสอบการใช้ซิเตรท (Citrate utilization

test) การทดสอบการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide production test) การทดสอบออกซิเดส (Oxidase test) การทดสอบคาตาเลส (Catalase test) การศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test) การทำให้เจลาตินเหลว (Gelatin liquifaction) กระบวนการเปลี่ยนไนเตรท (Nitrate reduction) การทดสอบการออกซิไดส์และการหมัก (Oxidation-fermentation test)

6.5.3 การหาลำดับเบสของ 16S rDNA

6.5.3.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ (วิธี Boiling method ดัดแปลงจาก Yamada และคณะ (2002))

โดยเขี่ยเชื้อจากหลอดที่เก็บรักษาเชื้อลงในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง ปิเปตเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ใน Microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตส่วนใสออก ล้างเซลล์ด้วย TE buffer 2 ครั้ง ละลายกลับด้วย TE buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 10 นาที สลับกับการแช่น้ำแข็ง 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง ลองนำไปวิเคราะห์ด้วย Agarose gel electrophoresis จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

6.5.3.2 การทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rDNA (ดัดแปลงจากวิธีการของ Blackall (1999) และ Lee และคณะ (2003))

ใช้ primer เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rDNA ดังแสดงในตารางที่ 2 เติมสารสำหรับทำ PCR ดังนี้ 10xPCR buffer 5 ไมโครลิตร สารประกอบ dNTPs ความเข้มข้นชนิดละ 0.2 มิลลิโมลาร์ primer ทั้งสองชนิด ชนิดละ 2 ไมโครโมลาร์ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ 10 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* polymerase 2.5 Units และน้ำปราศจากอิออนที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำการ Denaturation ครั้งแรกที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำ PCR 25 รอบ (อุณหภูมิที่ใช้ต่อรอบ: 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 50 องศาเซลเซียส 45 วินาที, และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที) ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำชิ้นส่วนที่ได้ไปวิเคราะห์โดย Agarose gel electrophoresis เพื่อวิเคราะห์หาขนาดโดยเปรียบเทียบกับ Molecular marker

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนแล้วมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit (QIAGEN, Inc.) ก่อนส่งไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง DNA sequencer ตามด้วยการเทียบเคียงข้อมูลของลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูลใน GenBank (BLAST search ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

ตารางที่ 2 ชนิดของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและหาลำดับเบสของ 16S rDNA

Table 2. Primers used during PCR and DNA sequencing of the 16S rDNA.

Primer	sequence (5′-3′)	Tm (°C)
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	60.4
63F	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	54.4
339F	CTCCTACGGGAGGCAGCAG	66.6
785F	GGATTAGATACCCTGGTAGTC	60.6
1099F	GCAACGAGCGCAACCC	61.8
531R	TACCGCGGCTGCTGGCAC	66.7
802R	TACCAGGGTATCTAATCC	55.3
1115R	AGGGTTGCGCTCGTTG	59.3
1492R	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	60.6