

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์ในการวิจัย

ตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินในพื้นที่การเกษตรที่ใช้สารไกลโฟเสท (ภาคผนวก ก)

- สวนลำไย ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่
- สวนหอม ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่
- ไร่ข้าวโพด ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่
- สวนมะม่วง ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่
- สวนส้ม ตำบลแม่สาว อำเภอแม่เมาะ จังหวัดเชียงใหม่
- ไร่มันฝรั่ง ตำบลสันทราย อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

ตัวอย่างดินในพื้นที่เกษตรที่ไม่ใช้สารเคมี

- สวนผักอินทรีย์ ตำบลหนองแห้ง อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

สารเคมี

- | | |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| 1. TSB (tryptic soy both) | (Ajax Finechem, Australia) |
| 2. วุ้น (agar) | (Union Science, Thai) |
| 3. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) | (Ajax Finechem, Australia) |
| 4. ไกลโฟเสท (glyphosate) | (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germany) |

(ภาคผนวก 13)

- | | |
|--|----------------------------|
| 5. เมทานอล (methanol) | (Merck, Germany) |
| 6. กลีเซอรอล (glycerol) | (Ajax Finechem, Australia) |
| 7. เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) | (Union Science, Thai) |
| 8. โซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต (Sodium Hexametaphosphate) | |

(Ajax Finechem, Australia)

สารเคมีย้อมสีแบบแกรม

ชุดย้อมแกรม (Gram's stain set) (Bio-Medical Laboratory, Thai) ประกอบด้วย

1. คริสตัลไวโอเลต (crystal violet)
2. สารละลายไอโอดีน (iodine)
3. อะซิโตน แอลกอฮอล์ (acetone alcohol)
4. ซาฟรานิน (safranin-o)

สารเคมีที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรีย โดยวิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ ในส่วนของยีน 16S rRNA

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen, USA)
2. master mix (Qiagen, Germany)
3. 27F (forward primer) 5'AGAGTTTGATCMTGG CTCAG-3' (Operon, Germany)
4. 1522R (reverse primer) 5'- AAGGAGGTGATCCRCCGCA -3' (Operon, Germany)
5. ชุดทำ PCR Product ให้บริสุทธิ์ GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Hiyield, Japan)
6. loading dye (Fermentas LIFE SCIENCES, USA)
7. O' GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA)
8. absolute ethanol (Merck, Germany)
9. agarose gel (Amresco, USA)

เครื่องมือ

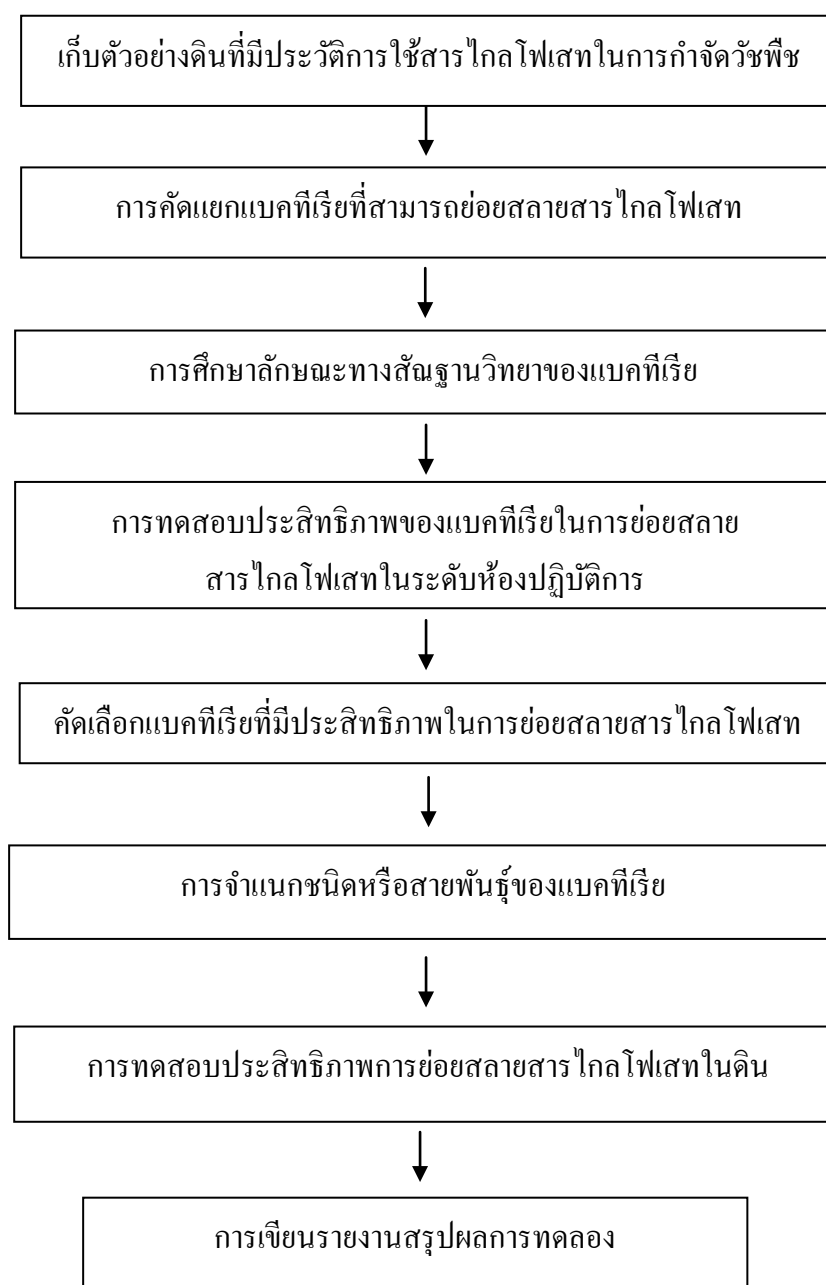
1. incubator	บริษัท Memmert รุ่น UM/SM 200
2. laminar air flow	บริษัท Eis Flufrance
3. spectrophotometer	บริษัท Genesys
4. autoclave	บริษัท Sturdy รุ่น SA-300VL
5. hot air oven	บริษัท Binder
6. กล้องจุลทรรศน์	บริษัท Olympus
7. เครื่องชั่งสารทศนิยม 2 ตำแหน่ง	บริษัท Mettler-Toledo รุ่น AG285
8. เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง	บริษัท Swiss Quality รุ่น Precisa 62 A
9. incubator shaker	บริษัท Scietific Promotion รุ่น E24/E24R
10. centrifuge	บริษัท Hettich รุ่น EBA 12R
11. microcentrifuge	บริษัท Harmony รุ่น MCF-1350
12. deep freezer	บริษัท Sanyo
13. PCR sprint thermal cyclers	บริษัท Thermal Hybrid รุ่น Sprint
14. transluminator	บริษัท Bio-red
15. fume hood	บริษัท Pro Lab รุ่น 2000
16. microwave	บริษัท LG
17. global positioning system (GPS)	บริษัท GARMIN รุ่น eTrex Legend HCx
18. soil dispersion cups	บริษัท Hamilton Beach
18. high performance liquid chromatography (HPLC)	
บริษัท Agilent Technologies รุ่น Agilent 1100	

อุปกรณ์อื่นๆ

1. หลอดทดลอง (test tube)
2. ขวดรูปชมพู่ (flask)
3. บีกเกอร์ (beaker)
4. จานเพาะเชื้อ (plate)
5. แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (spreader)
6. กระบอกตวง (cylinder)
7. ขวดปริมาตร (volumetric flask)
8. ปิเปต (pipette)
9. ไมโครปิเปต (micropipette)
10. ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)
11. ขวดแก้วดูแรน (duran)
12. ขวดไวแอล (vial tube)
13. หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube)
14. แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)
15. กระดาษกรอง (filter papers)
16. ไนลอน ไซลิงค์ฟิวเตอร์ (nylon syringe filter)
17. เข็มฉีดยา (syringe)
18. แผ่นสไลด์ (slide)
19. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)
20. ไม้บรรทัด (ruler)
21. พลั่วขุดดิน (spades)

แนวทางการดำเนินงานวิจัย

ในการทดลองเป็นการย่อยสลายสารไกลโฟเสททางชีวภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในพื้นที่เพาะปลูก โดยมีขั้นตอนการศึกษาวิจัยแสดงดังภาพ 5



ภาพ 5 ขั้นตอนในการศึกษาวิจัย

จากแผนภาพขั้นตอนในการศึกษาวิจัยสามารถอธิบายขั้นตอนในการวิจัยโดยละเอียดได้ดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณพื้นที่แปลงเพาะปลูกซึ่งมีประวัติการใช้สารไกลโฟเสท โดยใช้พลั่วขุดหลุมลึกระดับ 0-15 เซนติเมตร ซึ่งเป็นความลึกระดับไถพรวน เก็บดินใส่ถุงเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสท ตรวจวัดพิกัดเพื่อเก็บข้อมูลชุดดินด้วยเครื่องหาพิกัดด้วยสัญญาณดาวเทียม (GPS)

2. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

นำตัวอย่างดิน 1 กรัม เติมลงไปนในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้วมาทำการเจือจางเป็นลำดับส่วน (serial dilution) ครึ่งละ 10 เท่า จากนั้นเลือกระดับการเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับ คือ 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} แล้วนำมาแยกเชื้อโดยการเกลี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง tryptic soy agar (TSA) ที่มีสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นองค์ประกอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญได้และทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิค cross streak บนอาหารแข็ง TSA เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารแข็งวุ้นเอียง (slant agar) และอีกส่วนนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว tryptic soy broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูโคโลนีที่หลุดเก็บเชื้อที่มีสารละลายกลีเซอรอล ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ นำไปเก็บในตู้แช่ อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดเลือก

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในเบื้องต้นมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยนำแบคทีเรียที่เก็บไว้ในสารละลายกลีเซอรอลมาเลี้ยงในอาหารเหลว tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียที่เจริญในอาหารไปขีด (streak) บนอาหารแข็ง tryptic soy agar (TSA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงสุด ทำการศึกษารูปร่าง การจัดเรียงตัว และการติดสีแกรมของแบคทีเรีย

4. การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโอฟอสฟอรัสในระดับห้องปฏิบัติการ

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีสารไกลโอฟอสฟอรัสความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นองค์ประกอบแล้วนำไปเขย่าบน shaker เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่ 5 และ 10 วัน นำตัวอย่างที่เก็บมากรองผ่าน filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรู 0.45 ไมโครเมตร ใส่ขวด vial ปิดฝาให้สนิท จากนั้นทำการทดสอบความเข้มข้นของสารไกลโอฟอสฟอรัสที่เหลือนับด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) รุ่น agilent 1100 (ภาพผนวก ข) โดยเตรียมสารละลายไกลโอฟอสฟอรัสมาตรฐานความเข้มข้น 0.05 0.5 5 10 20 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางผนวก 5) เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายไกลโอฟอสฟอรัส (ภาพผนวก 12) ซึ่งกำหนดสภาวะที่เหมาะสมดังตาราง 5

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test ด้วยโปรแกรม SPSS Ver. 11.5 จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโอฟอสฟอรัสได้ดีที่สุด 3 ไอโซเลต เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนการศึกษาอัตราการเจริญของแบคทีเรีย และการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโอฟอสฟอรัสในดิน

ตาราง 5 การวิเคราะห์สารไกลโอฟอสฟอรัสโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ตัวแปร	สภาวะที่เหมาะสม
1. คอลัมน์	C18 (4.6mm x 150mm, 5 μ m)
2. ประเภทของเครื่องตรวจวัด	diode array detector (DAD)
3. ความยาวคลื่นที่ตรวจวัด	195 นาโนเมตร
4. ปริมาตรของสารที่ฉีดเข้าเครื่อง	20 ไมโครลิตร
5. ส่วนผสมเคลื่อนที่	น้ำปราศจากไอออน (deionized water)
6. อัตราการไหล	1 มิลลิลิตร/นาที
7. ระยะเวลาการวิเคราะห์ตั้งแต่ต้น	6 นาที

ที่มา: Lynn and David (1996)

5. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบส 16S rRNA

5.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อบริสุทธิ์เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร tryptic soy broth (TSB) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหาร TSB โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เซลล์แบคทีเรียจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด eppendorf ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen, USA) ตามขั้นตอนดังนี้

เติม lysozyme digestion buffer ปริมาตร 180 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex เติม PureLink™ genomic lysis/binding buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม ethanol ความเข้มข้น 96-100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 5 วินาที จากนั้นย้ายมาใส่ในหลอด spin column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ล้างดีเอ็นเอด้วยการเติม wash buffer 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติม wash buffer 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที สะดดีเอ็นเอด้วยการเติม PureLink™ genomic elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction)

5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction)

นำดีเอ็นเอทั้งหมดของเชื้อแบคทีเรียมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ด้วยเครื่อง PCR Mastercycler Personal โดยใช้ primer คือ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGG CTCAG-3') และ 1522R (5'- AAGGAGGTGATCCRCGCA -3') ทำการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับการทำ PCR โดยปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย

น้ำปราศจากไอออน (deionized water)	ปริมาตร 12 ไมโครลิตร
27F primer (ความเข้มข้น 10 พิโกโมล/ไมโครลิตร)	ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
1522R primer (ความเข้มข้น 10 พิโกโมล/ไมโครลิตร)	ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (genomic DNA)	ปริมาตร 5 ไมโครลิตร
PCR master mix	ปริมาตร 25 ไมโครลิตร

ผสมส่วนประกอบต่างๆ ในแต่ละปฏิกิริยาให้เข้ากัน จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณโดยใช้เครื่อง PCR sprint thermal cycler โดยปฏิกิริยาที่ใช้มีรายละเอียดของอุณหภูมิต่างๆ ในแต่ละรอบ ดังนี้ ระยะที่ 1 pre-denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ระยะที่ 2 denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ระยะที่ 3 annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ระยะที่ 4 extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำจากระยะที่ 2 ถึง 4 จำนวน 25 รอบ สุดท้ายเป็นระยะ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของ DNA ภายใต้อินฟราเรดโดยผ่านตัวกลางชนิดวุ้น (agarose gel electrophoresis) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ เตรียม agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เติม gel star 1 ไมโครลิตรต่อ agarose gel 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำเจลมาเทใน apparatus รอให้เจลแข็งตัวดีแล้วนำเจลที่ได้ไปวางในเครื่อง run gel เท 1x TAE buffer ลงไปให้ท่วมเจลเตรียมตัวอย่าง DNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วนำไปหยดลงหลุมบนเจลโดยมี DNA marker อยู่ในหลุมที่หนึ่งซึ่งใช้ DNA marker ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำปลอดเชื้อปริมาตร 4 ไมโครลิตร และ loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นปิดฝาเครื่องแล้วตั้งค่ากระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง transilluminator ทำให้สังเกตเห็นแถบของดีเอ็นเอปรากฏขึ้น จากนั้นนำ PCR product ของชิ้นส่วน 16S rRNA ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์

5.3 การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

นำ PCR product ของชิ้นส่วน 16S rDNA ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Hiyield, Japan) ตามขั้นตอนดังนี้ นำ PCR product ใส่ลงไปในหลอด microcentrifuge เติม DF buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที แล้วทำการกลั่นหลอดไปมาทุกๆ 2-3 นาที เอา DF column ใส่ลงใน collection tube นำตัวอย่างใส่ลงใน DF column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวทิ้งแล้วเติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวทิ้งแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม elution buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 2 นาที เก็บดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วใน eppendorf และนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

5.4 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบสในส่วนของยีน 16S

rRNA

นำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วมาวิเคราะห์หาลำดับเบสในส่วนของยีน 16S rRNA โดยในการวิจัยครั้งนี้ได้จัดส่งไปหาลำดับเบสที่บริษัท First BASE Laboratories ณ ประเทศมาเลเซีย แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย

6. ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโอฟอสฟอเนตในดินด้วยแบคทีเรีย

6.1 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโอฟอสฟอเนตในดิน

นำดินที่ใช้ในการทดสอบไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นนำดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 500 กรัม ใส่ลงในถังพลาสติกแล้วเติมสารไกลโอฟอสฟอเนตปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในดิน คลุกเคล้าผสมให้เข้ากันโดยให้ดินมีการปนเปื้อนของสารไกลโอฟอสฟอเนตที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้วเติมเชื้อที่คัดเลือกซึ่งที่มีอัตราการเจริญ 10^8 CFU/ml ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในดินผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างดินตั้งแต่ 0-10 วัน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ completely randomized design (CRD) แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ

ชุดการทดลองที่ 1 ดินเติมสารไกลโอฟอสฟอเนต (control)

ชุดการทดลองที่ 2 ดินเติมสารไกลโอฟอสฟอเนตและเชื้อไอโซเลท 1

ชุดการทดลองที่ 3 ดินเติมสารไกลโอฟอสฟอเนตและเชื้อไอโซเลท 2

ชุดการทดลองที่ 4 ดินเติมสารไกลโอฟอสฟอเนตและเชื้อไอโซเลท 3

ชุดการทดลองที่ 5 ดินเติมสารไกลโอฟอสฟอเนตและเชื้อผสม (MIX)

7.2 วิธีการสกัดสารไกลโอฟอสฟอเนตในดินเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เก็บตัวอย่างดินมา 3 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำกลั่น ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง shaker ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดระยะเวลา 24 ชั่วโมง ให้ย้ายลงในหลอด centrifuge แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสมา 1.5 มิลลิลิตร กรองผ่าน filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรู 0.45 ไมโครเมตร ใส่ขวด vial ปิดฝา

ให้สนิท (Carl and Moye 1988; Sailaja and Satyaprasad, 2006) จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารไกลโคไซด์ที่เหลือด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) รุ่น agilent 1100 (ภาพผนวก 14) โดยกำหนดสภาวะที่เหมาะสม (ตาราง 5)

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SPSS Ver. 11.5