

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- 3.1.1 ขวดพอลิเอทธิลีนขนาด 500 มิลลิลิตร
- 3.1.2 ขวดแก้วใสรูปร่างแบน (medical flat) ขนาด 120 มิลลิลิตร
- 3.1.3 ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร
- 3.1.4 จานเพาะเชื้อ
- 3.1.5 หลอดทดลองพร้อมฝาปิด
- 3.1.6 แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ
- 3.1.7 ห่วงถ่ายเชื้อ
- 3.1.8 แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์
- 3.1.9 อีมาไซโตมิเตอร์ (HBG)
- 3.1.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.1.11 บีเปตดูด-จ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Biohit และ Drawell)
- 3.1.12 ไมโครเพลทชนิด 96 หลุม
- 3.1.13 หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.1.14 เครื่องผสมสารละลาย (Gemmy VM-300)
- 3.1.15 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Olympus CX30)
- 3.1.16 เครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง (Mettler Toledo PG802-S)
- 3.1.17 หม้อนึ่งอัดไอน้ำ (Hirayama HVA-110 Hiclave)
- 3.1.18 ตู้ปลอดเชื้อ (Astec Microflow ABS1200)
- 3.1.19 ตู้อบลมร้อน (Binder ED/FD)
- 3.1.20 ตู้บ่มเชื้อ (Mettmert 600)
- 3.1.21 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Hettich Mikro 200R)

- 3.1.22 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Labtech LSI-3016A)
- 3.1.23 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Thermo spectronic GENESYS20)
- 3.1.24 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (HACH® DR 6000™)
- 3.1.25 เครื่องอัลตราโซนิก (Crest)
- 3.1.26 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (EZ Read 2000 Biochrom)
- 3.1.27 เครื่องทำปฏิกิริยาอุณหภูมิสูง (GeneAmp® PCR System 9700)
- 3.1.28 เครื่อง UltraSlim® LED Illuminator (MaestroGen)

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- 3.2.1 ชุดตรวจวัดปริมาณไมโครซิสติน (Microcystest® kit, ZEULAB)
- 3.2.2 ชุดทำปฏิกิริยาผลิตพันธะจากปฏิกิริยาอุณหภูมิสูง (GF-1 Ambiclean Kit, PCR & Gel, Vivantis)
- 3.2.3 น้ำยา Iugol's solution (ภาคผนวก ก)

3.3 อาหารเพาะเลี้ยง (ภาคผนวก ก)

- 3.3.1 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย
 - 3.3.1.1 อาหารสูตร Luria bertani (LB) broth และ LB agar (Ishii *et al.*, 2004)
- 3.3.2 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย
 - 3.3.2.1 อาหารสูตร MA (Watanabe *et al.*, 2000)
 - 3.3.2.2 อาหารสูตร BG-11 (Rippka *et al.*, 1979; Stanier *et al.*, 1971)

3.4 วิธีการวิจัย

- 3.4.1 การเก็บตัวอย่างแบคทีเรีย
 - 3.4.1.1 เลือกแหล่งน้ำที่มีประวัติการเจริญอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษ เช่น *Microcystis* spp. และ *Dolichospermum* spp. ได้แก่ อ่างเก็บน้ำเขื่อนแม่กวงอุดมธารา อำเภอดอยสะเก็ด และคูเมืองเชียงใหม่ อำเภอมือง จังหวัดเชียงใหม่
 - 3.4.1.2 ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินในแหล่งน้ำจากข้อ 3.4.1.1 โดยเก็บตัวอย่างน้ำด้วยขวด medical flat ที่ปราศจากเชื้อ เก็บที่ระดับน้ำลึกจากผิวน้ำประมาณ 20-30

เซนติเมตร ทำการเปิดและปิดขวดได้ผิวน้ำ และเก็บตัวอย่างตะกอนดินโดยใช้ฟลัสดักตะกอนดินได้ผิวน้ำและบรรจุใส่ภาชนะที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำตัวอย่างน้ำและตะกอนดินแช่ในกล่องบรรจุน้ำแข็งจนกระทั่งนำมาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียภายในห้องปฏิบัติการ

3.4.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

3.4.2.1 ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำหรือตะกอนดิน โดยนำน้ำตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตรหรือตัวอย่างตะกอนดิน 10 กรัม เติมลงในขวด medical flat ที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 1:10

3.4.2.2 ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำต่อโดยคลุกสารละลายในข้อ 2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง $1:10^2$ จากนั้นทำการเจือจางต่อจนถึง $1:10^4$

3.4.2.3 นำตัวอย่างน้ำที่มีความเจือจางตั้งแต่ $1:10^2$ จนถึง $1:10^4$ มาทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ dilution pour plate และ spread plate technique ในอาหาร LB agar และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-5 วัน

3.4.2.4 ตรวจสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และทำการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย streak plate technique บนอาหาร LB จนได้เชื้อบริสุทธิ์

3.4.3 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ไซยาโนแบคทีเรีย

3.4.3.1 เก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำที่พบการเจริญอย่างรวดเร็วของ *Dolichospermum* และ *Microcystis* ได้แก่ คูเมืองเชียงใหม่บริเวณด้านหน้าโรงพยาบาลสวนปรุง สระน้ำบริเวณพิพิธภัณฑสถานแห่งชาติเชียงใหม่ และคูเมืองลำพูน อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน (ภาพ 6 และ 7)

3.4.3.2 ทำการคัดแยกเส้นสายของ *Dolichospermum* sp. และ โคลนีเดี่ยวของ *Microcystis* sp. ในห้องปฏิบัติการแบบ unialgal culture โดยใช้ pick cell technique ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียคือ BG-11 และ MA

3.4.3.3 นำไปเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 40.50 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7-14 วัน

3.4.3.4 ตรวจสอบการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองชนิด สำหรับ *Microcystis* sp. ทำการคัดแยกเซลล์เดี่ยวอีกครั้งด้วยวิธีการในข้อ 3.4.3.2 เมื่อได้เซลล์เดี่ยวทำการถ่ายลงในขวดฟาคำที่มีอาหาร BG-11 และ MA และนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 3.4.3.3

3.4.3.5 เมื่อพบการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทำการขยายขนาดในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร BG-11 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร



ภาพ 6 จุดเก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียบริเวณคูเมืองลำพูนที่พบการเจริญอย่างรวดเร็วของ *Dolichospermum* (ถ่ายภาพเมื่อ มกราคม 2557)



ภาพ 7 จุดเก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียบริเวณคูเมืองเชียงใหม่ที่พบการเจริญอย่างรวดเร็วของ *Microcystis* (ถ่ายภาพเมื่อ สิงหาคม 2556)

3.4.4 การคัดกรองแบคทีเรียที่ควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย (ดัดแปลงจาก Kang *et al.*, 2012)

3.4.4.1 ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในหลอดทดลองที่มีฝาปิด จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปรับให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 1

3.4.4.2 เตรียมอาหาร BG-11 ปริมาตร 9.50 มิลลิลิตรในหลอดทดลองที่มีฝาปิด จากนั้นทำการเติม *Dolichospermum* sp. หรือ *Microcystis* sp. ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.4.3 โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) เริ่มต้นในอาหารเท่ากับ 0.1 และทำการเติมแบคทีเรียในข้อ 3.4.4.1 ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสงเท่ากับ 40.50 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลานาน 14 วัน (ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ, ชุดควบคุมคือชุดที่มีการเติมเฉพาะไซยาโนแบคทีเรีย)

3.4.4.3 ตรวจวัดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียด้วยการวัด OD_{680} และ OD_{750} (Hua *et al.*, 2009; Somdee *et al.*, 2013) และทำการนับจำนวนเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย

- สำหรับ *Dolichospermum* sp. ทำการติดตามการเจริญในวันที่ 0, 3 และ 7 ของการทดลอง และนับจำนวนเซลล์แบบ whole count

- สำหรับ *Microcystis* sp. ทำการติดตามการเจริญในวันที่ 0, 7 และ 14 ของการทดลอง และนับจำนวนเซลล์โดยการนำน้ำตัวอย่างมาด้วยสารละลาย lugol's solution และทำให้หลุดออกเป็นเซลล์เดี่ยวด้วยเครื่อง sonicator จากนั้นนับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemocytometer

3.4.4.4 คำนวณหาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญไซยาโนแบคทีเรีย (% inhibition) ตามวิธีการของ Li *et al.* (2015) ดังสมการ

$$I = \left(1 - \frac{D_{t-treatment}}{D_{t-control}}\right) \times 100$$

เมื่อ $D_{t-treatment}$ คือ จำนวนเซลล์ในชุดทดลอง (เซลล์ต่อมิลลิลิตร); $D_{t-control}$ คือจำนวนเซลล์ในชุดควบคุม (เซลล์ต่อมิลลิลิตร); t (วัน) คือจำนวนวันในการทดลอง

3.4.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการของแบคทีเรียในการควบคุมการเจริญของ
ไซยาโนแบคทีเรีย (ดัดแปลงจาก Choi *et al.*, 2005)

3.4.5.1 ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการควบคุมการเจริญ
ของ *Dolichospermum* sp. และ *Microcystis* sp. ในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่
ขนาด 125 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (ความเร็ว 150 รอบต่อนาที, 37 องศา
เซลเซียส) เป็นระยะเวลา 12-24 ชั่วโมง และทำการปรับให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1

3.4.5.2 จัดชุดการทดลองเพื่อหาสภาวะบางประการที่เหมาะสมต่อการควบคุมการ
เจริญของไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองชนิดในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร BG-11
ปริมาตร 47.5 มิลลิลิตร และทำการเติม *Dolichospermum* sp. หรือ *Microcystis* sp. โดยให้มีค่า OD₇₅₀
เริ่มต้นในอาหารเท่ากับ 0.1 จากนั้นทำการเติมแบคทีเรียในข้อ 3.4.5.1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร โดย
เปรียบเทียบความเป็นกรดต่างที่แตกต่างกันคือ 6, 7, 8 และ 9 และศึกษาอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 25,
30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที และม
ีความเข้มข้นเท่ากับ 40.50 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการทดลองซ้ำชุดละ 3 ซ้ำ ชุด
ควบคุมคือชุดที่มีการเติมเฉพาะไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรีย

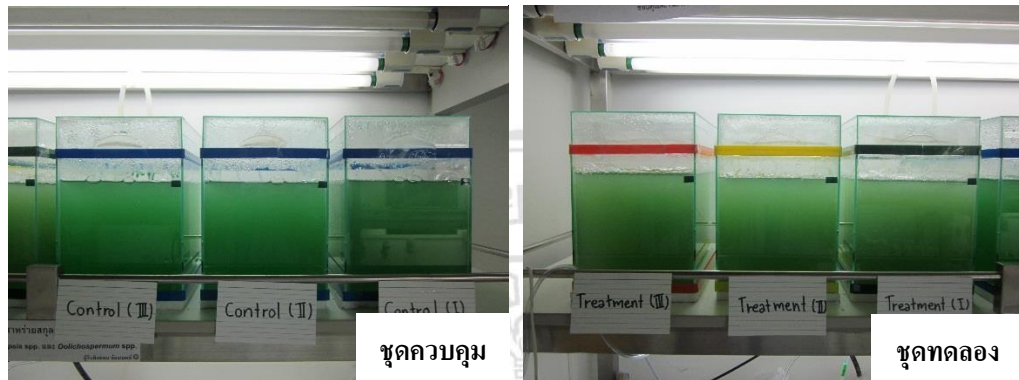
3.3.4.5. ตรวจวัดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียเช่นเดียวกันกับวิธีการในข้อ 3.4.4.3

3.4.6 การทดสอบการควบคุม *Microcystis* sp. ในปริมาตร 10 ลิตร

3.4.6.1 ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการควบคุมการเจริญ
ของ *Microcystis* sp. ในอาหาร LB ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (ความเร็ว 150 รอบต่อนาที, 37 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา
12-24 ชั่วโมง และทำการปรับให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1

3.4.6.2 จัดชุดการทดลองในตู้กระจกสี่เหลี่ยมขนาด 7x14x8.5 นิ้ว (ภาพ 8) จากนั้นทำ
การเติม *Microcystis* sp. ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 โดยให้มีค่า OD₇₅₀ เริ่มต้นในอาหารเท่ากับ 0.1
ปริมาตร 9.5 ลิตร และเติมแบคทีเรียในข้อ 3.4.6.1 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่
อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 40.50 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการ
กวนด้วยเครื่องปั่นอากาศ ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ ชุดควบคุมคือชุดที่มีการเติมเฉพาะไซยาโน
แบคทีเรีย

3.4.6.3 ติดตามการเจริญของ *Microcystis* sp. ในวันที่ 1-7 ของการทดลอง โดยนับจำนวนเซลล์ของ *Microcystis* sp. และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ตามวิธีการในข้อ 3.4.4.3



ภาพ 8 การทดสอบการควบคุม *Microcystis* sp. ขนาด 10 ลิตร ในตู้กระจกสี่เหลี่ยม
ขนาด 7x14x8.5 นิ้ว

3.4.7 การคัดกรองแบคทีเรียที่ย่อยสลายไมโครซิสตินโดยใช้ 96- well microplate (ดัดแปลงจาก Manage *et al.*, 2009)

3.4.7.1 ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอ่างเก็บน้ำเขื่อนแม่กวงอุดมธารา ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิตร ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12-24 ชั่วโมง

3.4.7.2 นำแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหาร LB ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.4.7.3 ทำการล้างเซลล์แบคทีเรียด้วย 0.01 M PBS (phosphate buffered saline) ที่ปลอดเชื้อ จากนั้นปรับให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5

3.4.7.4 ทำการเติมสารละลายแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-เวลไมโครเพลท จากนั้นเติมสารพิษมาตรฐาน microcystin-LR จากชุด ELISA ของบริษัท EnviroLogix

ให้แต่ละเวลามีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.4.7.5 ทำการตรวจวัดประสิทธิภาพการย่อยสลายสารพิษ microcystin-LR ของแบคทีเรียที่ระยะเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยการวัดปริมาณไมโครซิสตินโดยใช้ชุด commercial kit (Microcystest) ของบริษัท Zeulab S.L. ประเทศสเปน

3.4.8 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

3.4.8.1 เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB เป็นระยะเวลา 24-72 ชั่วโมง จากนั้นทำการขูดเชื้อแบคทีเรียใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์และทำการเติม glass beads อัตราส่วน 1:1

3.4.8.2 ทำการเติม 10% CTAB buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบดเซลล์ให้แตกด้วยตะเกียบพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย 95% เอทานอลและลนไฟเรียบร้อยแล้ว

3.4.8.3 เติมสารละลาย phenol : chloroform : isoamyl alcohol อัตราส่วน 25:24:1 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นทำการ vortex สลับกับน้ำแข็งเป็นเวลา 1:1 นาที (ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง)

3.4.8.4 ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที)

3.4.8.5 ถ่าย supernatant ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ใหม่ จากนั้นเติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ทำการผสมด้วยการกลับหลอดไปมา จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที)

3.4.8.6 ทำการถ่าย supernatant ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ใหม่ และบันทึกปริมาตรของสารละลายที่ได้ ทำการเติม isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของ supernatant จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-12 ชั่วโมง

3.4.8.7 ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที) จากนั้นทำการเท supernatant ทิ้งเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ

3.4.8.8 ทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที) จากนั้นเท supernatant ทิ้ง (ทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง)

3.4.8.9 นำตะกอนดีเอ็นเอมาทิ้งให้แห้งในตู้ดูดควันเป็นระยะเวลานาน 60 นาที จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และเก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.9 การเพิ่มปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ขึ้นด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

3.4.9.1 นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.8.8 มาเพิ่มขยายลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ BIOTAQ™ DNA polymerase (Bioline) โดยทำการเติมส่วนผสมประกอบตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ (ตาราง 2) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1525R (ตาราง 3) ลงในหลอดพีซีอาร์

ตาราง 2 ส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10x NH ₄ reaction buffer	2.5
50 mM MgCl ₂ solution	1.5
100 mM dNTP Mix	0.5
BIOTAQ	0.5
Primer 27F (10 ไมโครโมล)	1
Primer 1525R (10 ไมโครโมล)	1
DNA template	3
Distilled water	15
ปริมาตรรวม	25

ตาราง 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ 27F และ 1525R

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' – 3'
27F	5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC A 3'
1525R	5' AAG GAG GTG WTC CAR CC 3'

3.4.9.2 นำหลอดพีซีอาร์ใส่เครื่องพีซีอาร์ (GeneAmp® PCR System 9700) โดยสถานะที่ใช้ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (ตาราง 4)

ตาราง 4 สภาวะที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ของยีน 16s rDNA

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
Pre denaturation	94 องศาเซลเซียส	2 นาที
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที
Annealing	55 องศาเซลเซียส	30 วินาที
Extension	72 องศาเซลเซียส	30 วินาที
Cycles	35 รอบ	-
Final extension	72 องศาเซลเซียส	7 นาที
Hold	4 องศาเซลเซียส	∞

3.4.9.3 ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

3.4.9.4 นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GF-1 Ambiclean Kit (PCR & Gel) ของบริษัท Vivantis ตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์

3.4.9.5 ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Ward Medic Ltd.

3.4.9.6 ทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) และทำการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbor-joining algorithm method โดยใช้โปรแกรม MEGA 4.1 software ที่มีค่า bootstrap analyses ทำกับ 1,000 replicates

3.4.10 การตรวจสอบยีน *mlrA* ด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส

3.4.10.1 ดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้ในขั้นตอนที่ 3.4.8 มาทำการตรวจสอบหา *mlrA* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารพิษไมโครซิสติน ตามวิธีการของ Ho *et al.* (2006) โดยใช้ปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสด้วย BIOTAQ™ DNA polymerase (Bioline) โดยทำการเติมส่วนผสม (ตาราง 2) ตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ โดยใช้ไพรเมอร์ MF และ MR (ตาราง 5) ลงในหลอดพีซีอาร์

ตาราง 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ MF และ MR

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' – 3'
MF	5' GAC CCG ATG TTC AAG ATA CT 3'
MR	5' CTC CTC CCA CAA ATC AGG AC 3'

3.4.10.2 นำหลอดพีซีอาร์ใส่เครื่องพีซีอาร์ (GeneAmp® PCR System 9700) โดยสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาคุกโซโพลีเมอเรสตาม (ตาราง 6)

ตาราง 6 สภาวะที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ของยีน *mfrA*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
Pre denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	20 วินาที
Annealing	60 องศาเซลเซียส	10 วินาที
Extension	72 องศาเซลเซียส	30 วินาที
Cycles	30 รอบ	-
Final extension	72 องศาเซลเซียส	3 นาที

3.4.11 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA analyze) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistic Package for Social Science) เวอร์ชัน 17.0 for windows วิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเพื่อศึกษาความแตกต่างของแต่ละชุดการทดลอง โดยใช้การเปรียบเทียบของ Turkey test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ในการพิจารณาว่ามีความสำคัญทางสถิติหรือไม่