บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilizer) รุ่น Modulyod-230 ของบริษัท Thermo Electron Corporation, USA และ ปั๊มสุญญากาศ Valupump รุ่น VLP200 ของบริษัท Thermo Savant Instruments inc., USA
2. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท METTLER-TOLEDO, Switzerland
3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท METTLER-TOLEDO, Switzerland.
4. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan
5. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany.
6. ตู้อบแห้ง (oven) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand
7. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ "ISSCO" laminar flow รุ่น BVT – 124 ของบริษัท International Sciencetific Supply, USA
8. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunswick Scientific, USA
9. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys20 บริษัท Thermospectonic, Japan
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.
11. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
12. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France.
13. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
14. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ของบริษัท Memmert, Germany.
15. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan

16. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดช่อง 0.2 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
17. ขวดแก้วฝาเกลียว (vial) ขนาด 22 มิลลิลิตร (Screw Cap with Teflon Liner) ของบริษัท Lab System, Thailand
18. หลอดแก้วสำหรับทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Drying Ampoules Neutral Glass) ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ของบริษัท แล็บซีสเต็มส์ จำกัด
19. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo Electric, Japan
20. เครื่องแก้วพื้นฐานที่มีในห้องปฏิบัติการ
21. ชุดเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี (Gas Chromatography, GC)
    - เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น 6890N ของบริษัท Agilent Technologies, USA
    - คอลัมน์ (column) ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ความยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนนิลเมธิลไซโลเซนความเข้มข้น 5 % หนา 0.25 ไมโครเมตร
    - เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิด Frame Ionization Detector (FID)
    - เข็มฉีดยาขนาดเล็ก (microsyrings) ขนาด 10 ไมโครลิตร

เคมีภัณฑ์

1. ฟีแนนทรีน (phenanthrene) ของบริษัท Sigma, USA.
2. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
3. น้ำมันดีเซล (diesel oil) ของบริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน)
4. ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (CH_3SOCH_3) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
6. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
7. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France
8. โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia

9. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France
10. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) ของบริษัท May & Baker, England
11. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia
12. แบคโตอะการ์ (bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
13. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
14. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
15. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany.
16. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท Merck, Germany.
17. สารปฏิชีวนะนิสเตติน (nystatin) ของบริษัท Bio Basic INC., Canada.
18. เมธานอล (CH_3OH) ของบริษัท Merck, Germany.
19. นอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) ของบริษัท J.T. Baker, USA.

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การเพาะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และ PDE4

3.1.1 จุลินทรีย์

กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากใบจามจุรี ประกอบด้วยแบคทีเรียอย่างน้อย 7 ชนิดโดยจัดอยู่ใน 4 สกุล ดังนี้ *Comamonas*, *Rugamonas*, *Flavimonas*. *Pseudomonas* และที่ไม่สามารถจำแนกได้ ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายสารไพรีนความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร หมดในเวลา 14 วัน (จีรทีปฆ์ แสนรัก, 2547)

กลุ่มแบคทีเรีย PDE4 เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน ซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1% (ปริมาตรต่อปริมาตร) เหลือเพียง 10.47% ในเวลา 14 วัน (ภัทราพร กวีสุทธิกุล, 2550)

3.1.2 การเพาะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และ PDE4

เลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon-free mineral medium (CFMM) (Komukai-Nakamura และคณะ, 1996) (ภาคผนวก ก) โดยเติมฟีแนนทรีนและไพรีน ความเข้มข้นชนิดละ 0.05 กรัมต่อลิตร เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

สำหรับการเพาะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย PDE4 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM จำนวน 50 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1% (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

3.2 การทำแห้งเยือกแข็ง (Lyophilization)

3.2.1 การเตรียมกลุ่มแบคทีเรีย

เลี้ยงกลุ่มแบคทีเรียแต่ละชนิด ตามวิธีในข้อ 3.1.2 เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์และแขวนลอยด้วยอาหารเหลว CFMM เจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรให้ได้ค่าเป็น 1 ซึ่งจะมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 8 log CFU/มล.

3.2.2 การเตรียมแอมพูล และสารป้องกันความเย็น

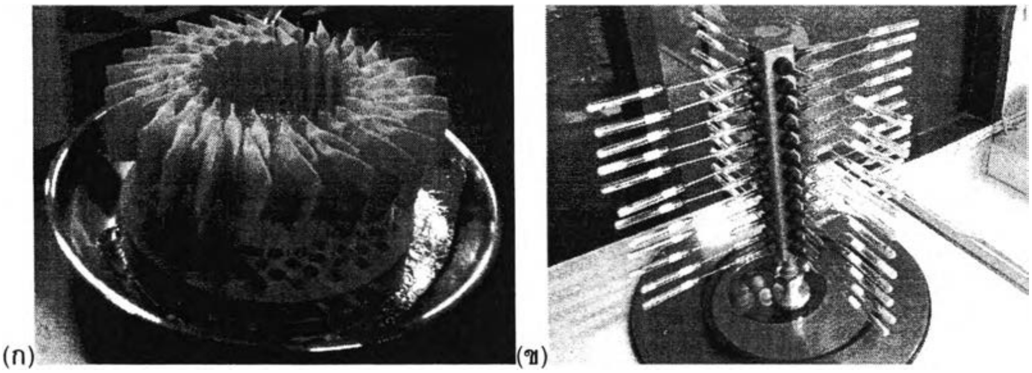
ล้างแอมพูลให้สะอาด โดยแช่ไว้ใน 2% HCl นาน 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำประปาสองครั้ง และน้ำกลั่นหนึ่งครั้ง นำไปอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส ปิดหลอดด้วยจุกสำลี แล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที จากนั้นอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส

สารป้องกันความเย็นที่เลือกใช้คือ 12% ซูโครส โดยชั่งซูโครส 12 กรัม ใส่ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3.2.3 กระบวนการไลโอฟิไลเซชัน

ใช้จำนวนแบคทีเรียประมาณ 8 log CFU ปั่นแยกตะกอนเซลล์ เทส่วนใสทิ้ง เติม 12% ซูโครส ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ทั้งหมดด้วยพลาสเจอร์ปิเปตปลอดเชื้อ ใส่ในแอมพูลปลอดเชื้อ ปิดด้วยถุงผ้าปลอดเชื้อแล้วนำเข้าเครื่องไลโอฟิไลเซชัน กระบวนการไลโอฟิไลเซชันมี 2 ขั้นตอนคือ การทำแห้งขั้นแรก (primary dry) และ การทำแห้งขั้นที่สอง (secondary dry)

การทำแห้งขั้นแรก ทำโดยนำสารแขวนลอยเซลล์ในแอมพูลจะถูกเหวี่ยงให้เอียงในเครื่องหมุนเหวี่ยง เป็นการเพิ่มพื้นที่หน้าตัดให้เชื้อ และป้องกันการเกิดฟองอากาศ ในขั้นนี้น้ำจะถูกระเหยออก และอุณหภูมิจะลดลงจนเซลล์แข็งตัว เครื่องทำสุญญากาศจะทำงานจนเกิดสภาพสุญญากาศ ทำให้น้ำที่แข็งตัวเกิดการระเหิดออกมาจนเหลือน้ำประมาณ 5-10% ใช้เวลาประมาณ 12 นาที จากนั้นทิ้งไว้อีก 2-3 ชั่วโมงเพื่อจะได้มีการแช่เยือกแข็งอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเปลี่ยนจากถุงผ้าไปเป็นจุกสำลีโดยเทคนิคปลอดเชื้อ ตัดปลายสำลีให้พอดีกับปากแอมพูลด้วยกรรไกรที่ปลอดเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วงอดันจุกสำลีลงไปจนถึงปลาย slant นำหลอดแอมพูลไปหลอมเพื่อคอดหลอด (constrict) และเป็นการลดพื้นที่หน้าตัดของปลายหลอดแอมพูลก่อนที่จะนำไปทำการทำแห้งขั้นที่สอง



รูปที่ 3.1 ลักษณะแอมพูลที่มีกลุ่มแบคทีเรียละลายใน 12% ซูโครสปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ในระหว่างขั้นตอนการทำแห้งขั้นแรก (ก) และการทำแห้งขั้นที่สอง (ข)

การทำแห้งขั้นที่สอง ทำโดยนำหลอดที่ทำการคอดทั้งหมดไปเสียบเขากับจุกของ manifold ที่ต่อกับไลโอฟิไลเซอร์ เพื่อทำให้แห้ง และภายในหลอดเป็นสุญญากาศทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จนตัวอย่างแห้ง ในขั้นนี้จะเกิดสภาพสุญญากาศขึ้น น้ำในเซลล์จะเหลือเพียง 1-2 % เนื่องจากการระเหิดกลายเป็นไอน้ำ ทำการปิดผนึกหลอดแอมพูล ขณะที่อยู่บนจุกของ manifold ที่ต่อกับไลโอฟิไลเซอร์ จากนั้นนำแอมพูลที่ปิดผนึกแล้วไปทดสอบความเป็นสุญญากาศ หลอดที่ผ่านการตรวจสอบนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3. ประเมินการรอดชีวิตและการย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน และน้ำมันดีเซลของกลุ่มแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลเซชัน

3.3.1 การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต

แขวนลอยกลุ่มแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลเซชันใน 0.85% NaCl ผสมให้เข้ากัน เจือจางให้มีความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสมด้วย 0.85% NaCl เกลี่ยบนอาหาร LB agar บ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ทำการนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น คำนวนปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเทียบกับปริมาณเซลล์เริ่มต้นก่อนการทำแห้งเยือกแข็ง

3.3.2 การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

ใช้เซลล์ที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลเซชัน ซึ่งมีจำนวนประมาณ 8 log CFU ละลายใน 0.85% NaCl จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีไพรีนและฟีแนนทรีน ความเข้มข้นแต่ละชนิด 0.05 กรัมต่อลิตร โดยชุดควบคุมคืออาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีน/ฟีแนนทรีน แต่ไม่เติมหัวเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วันและ เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 1, 3, 7 และ 14 หาปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลือในอาหาร ตามวิธีในข้อ 3.3.3 วัดการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียโดยวิธี Viable plate count บนอาหาร LB agar ตามวิธีในข้อ 3.3.1

3.3.3 การสกัดไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM

สกัดไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM (ดัดแปลงจาก Luepromchai และคณะ, 2007) โดยเติมเฮกเซนปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Vortex mixer เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำส่วนใสชั้นบน หรือชั้นเฮกเซนแบ่งใส่หลอดใหม่ เติมแอนไฮดรัส Na_2SO_4 (ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ข้ามคืนและทิ้งไว้ให้เย็น) เพื่อกำจัดน้ำที่เหลือออกจากชั้นเฮกเซน จากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์ anhydrous Na_2SO_4 แล้วกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ตามวิธีในข้อ 3.3.6

3.3.4 การย่อยสลายน้ำมันดีเซลของกลุ่มแบคทีเรีย PDE4

ใช้เซลล์ที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลเซชัน ซึ่งมีจำนวนประมาณ 8 log CFU ใส่ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี 1% น้ำมันดีเซล โดยชุดควบคุมคืออาหารเหลว CFMM ที่มีน้ำมันดีเซลแต่ไม่เติมหัวเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วันและ เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 1, 3, 7 และ 14 หาปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลือในอาหารตามวิธีในข้อ 3.3.3 วัดการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียโดยวิธี Viable plate count ในอาหาร LB agar ตามวิธีในข้อ 3.3.1

3.3.5 การสกัดน้ำมันดีเซลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM

เก็บตัวอย่างอาหารเหลว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเฮกเซนปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติม 15% Triton-X 100 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้นแยกส่วนเฮกเซน ใส่หลอดใหม่ เติมแอนไฮดรัส Na_2SO_4 ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ข้ามคืนและทิ้งไว้ให้เย็น เพื่อกำจัดน้ำที่เหลือออกจากชั้น n-hexane แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ anhydrous Na_2SO_4 จากนั้นกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ตามวิธีในข้อ 3.3.6

3.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณ PAHs และน้ำมันดีเซลโดยแก๊สโครมาโตกราฟี

คอลัมน์ที่ใช้คือ capillary column HP-5 ชนิด 5% Phenyl Methyl Siloxane (30 เมตร x 0.32 มิลลิเมตร x 0.25 เมตร nominal) อุณหภูมิสูงสุด 325 องศาเซลเซียส ตัวตรวจจับสัญญาณเป็นชนิด Flame ionizing Detector (FID)

สำหรับวิเคราะห์ PAHs อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มที่ 80 องศาเซลเซียส ช่วงต่อมาขึ้นครั้งละ 25 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ช่วงต่อมาขึ้นครั้งละ 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 220 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และต่อมาขึ้นครั้งละ 40 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และสุดท้ายคงอุณหภูมิที่ 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยอัตราการไหลของฮีเลียมเท่ากับ 1.7 มิลลิลิตรต่อนาที

สำหรับวิเคราะห์น้ำมันดีเซลอุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มที่ 80 องศาเซลเซียส ช่วงต่อมาขึ้นครั้งละ 25 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ช่วงต่อมาขึ้นครั้งละ 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 240 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และต่อมาขึ้นครั้งละ 40 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และสุดท้ายคงอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดยอัตราการไหลของฮีเลียมเท่ากับ 1.7 มิลลิลิตรต่อนาที

3.4 ประสิทธิภาพกลุ่มแบคทีเรียผสม RRM-V3 และ PDE4 ที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลเซชันในการบำบัดไพรีน/ฟีแนนทรีนและน้ำมันดีเซลในดิน

3.4.1 การเตรียมดิน

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณสวนผลไม้ในจังหวัดนครราชสีมาที่ไม่มีประวัติการปนเปื้อนจากสาร PAHs หรือ น้ำมันดีเซล โดยตากให้แห้งก่อนนำดินมาคัดกรองด้วยเครื่องคัดกรองขนาดดิน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.85 มิลลิเมตร ตรวจสอบการปนเปื้อน PAHs หรือน้ำมันดีเซลตามวิธีในข้อ 3.3.5 และ 3.3.6 ก่อนเก็บดินไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส แบ่งดินบางส่วนไปทำการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีที่กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.4.2 การย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน และน้ำมันดีเซลในดิน

ใช้หัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรียผสม RRM-V3 และ PDE4 ที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลเซชัน โดยละลายกลุ่มแบคทีเรียแต่ละชนิดจำนวน 1 แอมพูลด้วย 0.85% NaCl ใส่ลงในดินไม่ปลอดเชื้อ 2 กรัม ปรับความชื้นให้มีค่าเท่ากับ 70% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และปรับความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7 ด้วย 1 นอร์มัลโซเดียมไฮดรอกไซด์ และผสมกับไพรีน/ฟีแนนทรีน ความเข้มข้นชนิดละ 0.05 กรัม/กรัมดินและน้ำมันดีเซล 1% (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) โดยออกแบบชุดทดลองทั้งหมด 5 ชุดคือ

- ชุดควบคุมที่ 1 ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับไพรีน/ฟีแนนทรีและ น้ำมันดีเซลเพื่อศึกษาการลดลงจากวิธีทางกายภาพ
- ชุดควบคุมที่ 2 ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมสดเพื่อศึกษาการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียผสมในดิน
- ชุดควบคุมที่ 3 ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับกลุ่มแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลเซชัน เพื่อศึกษาการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียผสมในดิน
- ชุดทดลองที่ 1 ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับไพรีน/ฟีแนนทรีนและน้ำมันดีเซล และกลุ่มแบคทีเรียผสมที่เตรียมสด
- ชุดทดลองที่ 2 ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับไพรีน/ฟีแนนทรีนและน้ำมันดีเซล และกลุ่มแบคทีเรียผสมที่ผ่านการไลโอฟิไลเซชัน

ทุกชุดการทดลองใช้จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นที่เท่ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วันและ เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 1, 3, 7, 10 และ 14 หาปริมาณไพรีน/ฟีแนนทรีนและปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลือในดินตามวิธีในข้อ 3.3.5 วิเคราะห์ปริมาณ PAHs และน้ำมันดีเซลโดยแก๊สโครมาโตกราฟีตามวิธีในข้อ 3.3.6 และวัดการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธี Viable plate count บนอาหาร LB agar ที่มีนิสแตตินความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อยับยั้งเชื้อรา ตามวิธีในข้อ 3.3.1

3.4.3 การสกัดไพรีน/ฟีแนนทรีนและ น้ำมันดีเซลในดิน

สกัดไพรีน/ฟีแนนทรีนและ น้ำมันดีเซลในดินโดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Lueprомchai และคณะ (2007) นำตัวอย่างดินทดลอง 2 กรัม เติมเฮกเซนปริมาตร 4 มิลลิลิตร และเติม 15% Triton-X 100 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องผสมเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น แยกส่วนเฮกเซนใส่หลอดใหม่ เติมแอนไฮดรัส Na_2SO_4 ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ข้ามคืนและทิ้งไว้ให้เย็น เพื่อกำจัดน้ำที่เหลือออกจากชั้นเฮกเซน ตั้งทิ้งไว้จนตกตะกอนก่อนเก็บส่วนเฮกเซนไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ตามวิธีในข้อ 3.3.6

3.4.4 การคำนวณปริมาณน้ำมันดีเซล

ในการคำนวณปริมาณน้ำมันดีเซลในการทดลองจะใช้ค่าพื้นที่ใต้กราฟของทั้งหมด 18 พีค ที่เวลา 2.6, 3.1, 3.7, 4.4, 5.3, 6.6, 8.2, 10.2, 12.6, 15.3, 18.1, 21.0, 23.9, 26.7, 29.5, 32.2, 35.0 และ 36.4 นาที โดยการคำนวณเป็นค่าปริมาณน้ำมันดีเซลในตัวอย่างทั้งหมด จะได้จากผลรวมของพื้นที่ใต้กราฟทั้ง 18 พีค ซึ่งจะคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ที่เหลืออยู่} = \frac{\text{ผลรวมของพื้นที่ใต้กราฟทั้ง 18 พีคของตัวอย่าง}}{\text{ผลรวมของพื้นที่ใต้กราฟทั้ง 18 พีคของตัวอย่างที่วันที่ 0}} \times 100$$