

การขจัดพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนในบรรยากาศโดยแบคทีเรีย
บนใบโมก *Wrightia religiosa*



นาย ชนม์วิศศักดิ์ ยุตธรรมโม

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

REMOVAL OF ATMOSPHERIC POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS
BY PHYLLOSHERE BACTERIA ON *Wrightia religiosa*



Mr. Chontisak Yutthammo

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การขจัดพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนในบรรยากาศโดย
แบคทีเรียบนใบโมก *Wrightia religiosa*

โดย

นาย ชนม์วิศุทธิ์ ยุทธธรรมโม


สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

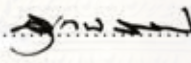
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุธงษ์ นารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุธงษ์ นารหนองบัว)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปั่นพานิชการ)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจภรณ์ ประภักดิ์)

ชนมัญญ์ศักดิ์ ยุทธธรรมโม : การขจัดพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนในบรรยากาศโดยแบคทีเรียบนใบไมก *Wrightia religiosa* (REMOVAL OF ATMOSPHERIC POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS BY BACTERIA ON *Wrightia religiosa*) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย; 104 หน้า.

มลพิษทางอากาศเป็นปัญหาสำคัญในประเทศไทย โดยเฉพาะจากการปนเปื้อนของพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนในอากาศ (PAHs) ซึ่งมาจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงปิโตรเลียม โดย PAHs สามารถตกสะสมบนผิวใบไม้ แล้วระเหยกลับไปในบรรยากาศได้อีก การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าแบคทีเรียบนใบไม้สามารถกำจัดพีแนทรีนที่ตกค้างบนใบได้ ทั้งนี้แบคทีเรียที่ย่อยสลายพีแนทรีนบนใบไมก มีจำนวนมากกว่าบนใบไม้ประดับชนิดอื่น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนใบไมก ในการกำจัด PAHs ชนิดอื่นๆ ในอากาศ จากการศึกษาใบไมกตามธรรมชาติที่มีแบคทีเรียอาศัยอยู่ในขวดทดลองขนาด 60 มิลลิลิตร พบว่าหลังจากการบ่ม 4 วัน ปริมาณอะซีแนพธิน อะซีแนพธิน ฟลูออรีน และพีแนทรีน ในอากาศ เหลือเพียง 117.8, 145.3, 101.1 และ 81.6 ppmV ตามลำดับ จากปริมาณ PAHs ทั้งหมด 800 ppmV และค่าที่ได้น้อยกว่าขวดทดลองที่บรรจุใบไมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์และใบไมกแห้งอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าแบคทีเรียที่พบใบไมกช่วยเสริมประสิทธิภาพของใบไม้ในการกำจัด PAHs ในอากาศ เพื่อขยายขนาดของระบบทดสอบ ได้ใส่กิ่งไมกในแชมเบอร์ที่สามารถกันอากาศเข้า ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าขวดที่ใช้ก่อนหน้านี้ 230 เท่า ผลการทดลองพบว่าในวันที่ 7 แชมเบอร์ที่บรรจุกิ่งไมกตามธรรมชาติ มีปริมาณอะซีแนพธิน อะซีแนพธิน ฟลูออรีน และพีแนทรีน ที่เหลือ น้อยกว่าแชมเบอร์ที่บรรจุกิ่งไมกที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามกิ่งไมกตามธรรมชาติและกิ่งไมกที่พ่นปุ๋ยพืชทางใบ มีประสิทธิภาพในการกำจัด PAHs ใกล้เคียงกัน แสดงว่าปุ๋ยพืชที่ให้ไม่มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัด PAHs ในอากาศ ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ของกิ่งไมกที่ได้รับปุ๋ยพืช ซึ่งมีจำนวนคงที่ตลอดการทดลอง 7 วัน เมื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs บนใบไมก พบว่าอยู่ในสกุล *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Naxibacter*, *Parvibaculum* และ *Pseudomonas* จำนวนแบคทีเรียบนใบไม้ที่สามารถย่อยสลาย PAHs มีค่าตั้งแต่ 6.37×10^3 ถึง 4.37×10^4 เซลล์/กรัมใบไม้ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียบนใบไมกสามารถกำจัด PAHs ในอากาศได้ และอาจจะนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัด PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่อไป

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....*ชนมัญญ์ศักดิ์ ยุทธธรรมโม*
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์.....*lana*
ปีการศึกษา.....2551.....

4972262923 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: air pollutants, PAHs, phyllosphere bacteria, bacteria communities

CHONTISAK YUTTHAMMO: NOVEL REMOVAL OF ATMOSPHERIC POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS BY PHYLLOSHERE BACTERIA ON *Wrightia religiosa*.

ADVISOR: ASST. PROF. EKAWAN LUEPROMCHAI, Ph.D., 104 pp

Atmospheric pollution is a serious problem in Thailand, especially from the contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) that was emitted from the incomplete combustion of petroleum fuels. PAHs can be accumulated on leaves surface before volatilizing back into the air. Previous studies found that phyllosphere bacteria could degrade phenanthrene deposited on the leaves. Moreover, *Wrightia religiosa* had the highest number of phenanthrene-degrading bacteria. Thus, the objective of this study was to investigate the activity of bacteria on *Wrightia religiosa* leaves on removal of other PAHs in the air. The study of natural *Wrightia religiosa* leaves containing bacteria in 60 mL bottles showed that the amounts of airborne fluorene, acenaphthene, acenaphthylene, and phenanthrene were decreased from 800 ppmv to 117.7, 145.3, 101.1 and 81.6 ppmv after 4 days, respectively. The values were significantly lower than when dried or sterilized leaves were used. The result indicated that phyllosphere bacteria enhanced the activity of leaves on atmospheric PAH removal. To scale-up the system, *Wrightia religiosa* branches were put in a gas-tight chamber, which was 230 times larger than the bottle used earlier. The results also showed that the amounts of remaining fluorene, acenaphthene, acenaphthylene, and phenanthrene in chamber containing unsterilized branches were significantly lower than sterilized branches. Meanwhile, the removal of atmospheric PAHs by unsterilized branches with or without the added fertilizer was not different. The result was corresponded to the constant number of PAHs degrading-bacteria on *Wrightia religiosa* branches with added fertilizer throughout the 7-day experiments. The dominant PAHs degrading-bacterial populations were identified in genus such as *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Naxibacter*, *Parvibaculum* and *Pseudomonas*. The numbers of PAH-degrading bacteria were ranged from 6.37×10^3 to 4.37×10^4 cells/g. These results provide the evidence that bacteria on *Wrightia religiosa* leaves could remove the atmospheric PAHs and they may be further applied for PAH remediation.

Department:.....Microbiology.....Student's signature.....*chontisak*.....

Field of Study:.....Industrial Microbiology....Advisor's signature.....*Ekawan*.....

Academic Year:....2008.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น รวมถึงกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ฐนิยวัน ที่กรุณารับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชกร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจภรณ์ ประภักดิ์ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์รวมทั้งให้ คำปรึกษา-คำแนะนำ และกำลังใจ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ ที่ให้การสนับสนุนด้านค่าใช้จ่ายในงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้อง 448 และ 453 ที่คอยให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนบนภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้ที่คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่น้อง ญาติๆ ทุกคนและเพื่อนๆ รุ่นพี่ที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

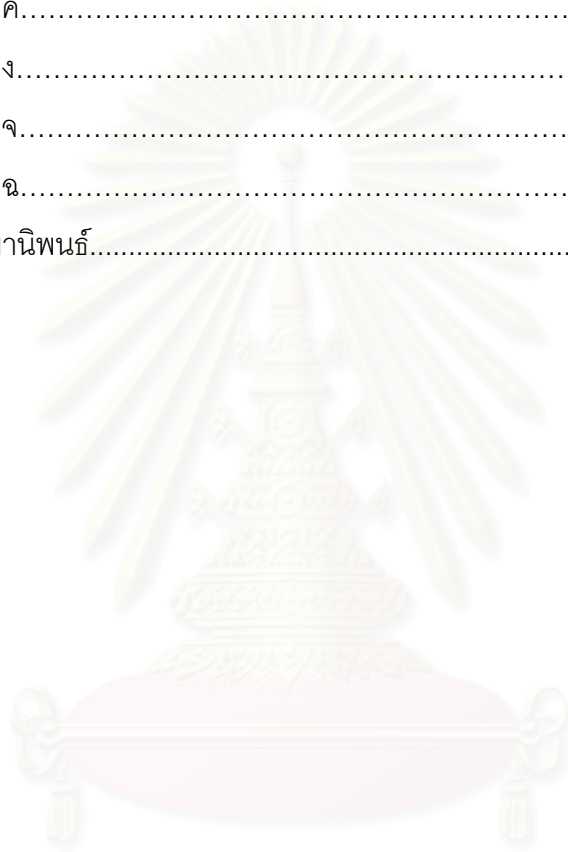
สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฑ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. ทัศนวิสัย.....	4
2.1 สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน.....	4
2.2 การปนเปื้อนของ PAHs ในสิ่งแวดล้อม.....	8
2.3 ความเป็นพิษของ PAHs ต่อมมนุษย์ เมื่อได้รับจากแหล่งในอากาศ.....	11
2.4 การศึกษา PAHs ในอากาศ.....	12
2.5 การบำบัด PAHs ในสิ่งแวดล้อม.....	13
2.6 แบคทีเรียบนใบไม้ (phyllospere bacteria).....	20
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	24
อุปกรณ์.....	24
เคมีภัณฑ์.....	26
แผนผังของงานวิจัย.....	29
วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	30
3.1 วิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียที่ย่อยสลาย อะซีแนพริลิน อะซีแนพริลิน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธิน พีแนนทริน แอนทราซีน ไพรีน และเบนโซ[เอ] ไพรีน บนใบไมก.....	30
3.1.1 เก็บตัวอย่างใบไมก.....	30
3.1.2 สกัดแบคทีเรียจากใบไมก.....	30

3.1.3	เพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่ย่อยสลาย อะซีแนพริลีน อะซีแนพรีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธิน พีแนนทรีน แอนทราซีน ไพรีน และเบนโซ [เอ]ไพรีน.....	30
3.1.4	สกัดดีเอ็นเอ.....	31
3.1.5	ตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยวิธี Gel Electrophoresis.....	31
3.1.6	ทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์.....	32
3.1.7	เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	32
3.1.8	วิเคราะห์ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)..	34
3.1.9	วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นดีเอ็นเอเด่นจากโปรไฟล์ของ DGGE	34
3.2	นับจำนวนแบคทีเรียบนใบไมกโดยวิธี Most Probable Number (MPN)..	37
3.2.1	นับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด.....	37
3.2.2	นับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs.....	38
3.4.	ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนใบไมกที่สามารถกำจัด อะซีแนพริลีน อะซีแนพรีน ฟลูออรีน และ พีแนนทรีนในอากาศในขวดทดลอง.....	39
3.3.1	วิธีคำนวณความเข้มข้นของ PAHs ในหน่วย ppmV.....	39
3.3.2	ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนใบไมกในการกำจัด อะซีแนพริลีน อะซีแนพรีน ฟลูออรีน และ พีแนนทรีนในอากาศในขวดทดลอง.....	39
3.4	ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนกิ่งไมกในการกำจัด อะซีแนพริลีน อะซีแนพรีน ฟลูออรีน และ พีแนนทรีนในแชมเบอร์ และอิทธิพลของปุ๋ยพืชที่พ่นให้ทางใบ.....	41
3.5	วิเคราะห์ อะซีแนพริลีน อะซีแนพรีน ฟลูออรีน และ พีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในอากาศ.....	43
4.	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	45
4.1	การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียบนใบไมกที่ย่อยสลายอะซีแนพรีน อะซีแนพริลีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธิน พีแนนทรีน แอนทราซีน ไพรีน และเบนโซ [เอ]ไพรีน.....	45

4.1.1 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายอะซีแนพธิน อะซีแนพธิลีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธิน พีแนนทริน แอนทราซีน ไพรีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน.....	45
4.1.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียบนโมกที่ย่อยสลายอะซีแนพธิน อะซีแนพธิลีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธิน พีแนนทริน แอนทราซีน ไพรีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน โดยวิธี DGGE.....	46
4.1.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA.....	47
4.2 การนับจำนวนแบคทีเรียบนใบโมกโดยวิธี Most Probable Number (MPN).....	51
4.3 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนใบโมกที่สามารถกำจัดอะซีแนพธิลีน อะซีแนพธิน ฟลูออรีน และพีแนนทรินในอากาศ ในขวดทดลองขนาด 60 มิลลิลิตร.....	52
4.3.1 ชุดควบคุมที่ไม่มีใบโมกบรรจุในขวดทดลอง.....	52
4.3.2 ชุดทดลองที่มีใบโมกในขวดทดลอง.....	54
4.4 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนกิ่งโมกที่สามารถกำจัดอะซีแนพธิลีน อะซีแนพธิน ฟลูออรีน และพีแนนทรินในอากาศ ในแชมเบอร์.....	59
4.4.1 การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนกิ่งโมกที่สามารถกำจัดอะซีแนพธิลีน อะซีแนพธิน ฟลูออรีน และพีแนนทริน ในอากาศในแชมเบอร์ เมื่อทิ้งไว้ 7 วัน.....	59
4.4.2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนกิ่งโมกที่กำจัดอะซีแนพธิลีน อะซีแนพธิน ฟลูออรีน และพีแนนทริน ในอากาศในแชมเบอร์ เมื่อมีการเพิ่ม PAHs ทุก 24 โมง ใน 7 วัน และอิทธิพลของปุ๋ยที่พ่นให้ทางใบ.....	62
4.4.3 จำนวนแบคทีเรียตามธรรมชาติและแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs บนใบโมกหลังจากได้รับปุ๋ยพืชที่พ่นให้ทางใบ.....	67
4.4.4 อัตราการกำจัดอะซีแนพธิลีน อะซีแนพธิน ฟลูออรีนและพีแนนทริน ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ของแบคทีเรียบนกิ่งโมก ในแชมเบอร์.....	69

	หน้า
5. สรุปผลการทดลอง.....	71
รายการอ้างอิง.....	74
ภาคผนวก.....	
ภาคผนวก ก.....	78
ภาคผนวก ข.....	81
ภาคผนวก ค.....	90
ภาคผนวก ง.....	91
ภาคผนวก จ.....	96
ภาคผนวก ฉ.....	100
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	104



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของ PAHs ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษานี้ (ATSDR, 1995).....	6
2.2 แบบที่เรียกชนิดต่างๆที่รายงานว่าสามารถย่อยสลาย PAHs (Juhasz และคณะ, 2000).....	18
4.1 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ขึ้นดีเอ็นเอเด่นจากแบคทีเรียบนใบไมกที่ย่อยสลาย PAHs ทั้ง 8 ชนิด.....	49
4.2 เปรียบเทียบปริมาณ อะซีแนฟลิซีน อะซีแนฟธิน ฟลูออรีน และพีแนนทรีนที่คงเหลือในอากาศในเขตทดลอง (%) ในวันที่ 4 ที่บรรจุด้วยใบไมกแห้ง ใบไมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และใบไมกตามธรรมชาติ.....	57
4.3 เปรียบเทียบปริมาณ อะซีแนฟลิซีน อะซีแนฟธิน ฟลูออรีน และพีแนนทรีนที่คงเหลือในอากาศในแฮมเบอร์ (%) ในวันที่ 7 ที่บรรจุด้วยกิ่งไมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์และกิ่งไมกตามธรรมชาติ.....	61
4.4 เปรียบเทียบปริมาณ อะซีแนฟลิซีน อะซีแนฟธิน ฟลูออรีนและพีแนนทรีน ที่คงเหลือในอากาศในแฮมเบอร์ (%) ในวันที่ 6 ที่บรรจุด้วยกิ่งไมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ กิ่งไมกตามธรรมชาติ และกิ่งไมกตามธรรมชาติที่ได้รับปุ๋ยพืชที่พ่นให้ทางใบ.....	65
4.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัด อะซีแนฟลิซีน อะซีแนฟธิน ฟลูออรีน และพีแนนทรีน ของใบไมกตามธรรมชาติในเขตทดลอง ในวันที่ 4 และกิ่งไมกตามธรรมชาติและกิ่งไมกตามธรรมชาติที่ได้รับปุ๋ยในแฮมเบอร์ ในวันที่ 6.....	66
4.6 เปรียบเทียบอัตราการลดลงของอะซีแนฟลิซีน อะซีแนฟธิน ฟลูออรีนและพีแนนทรีน ในอากาศในแฮมเบอร์ ภายใน 24 ชั่วโมง ที่บรรจุด้วยกิ่งไมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และกิ่งไมกตามธรรมชาติ.....	69

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	โครงสร้างของสารประกอบ PAHs ชนิดต่างๆ (Wilson และ Jones, 1993)..... 4
2.2	พีแนนทรีน (สีฟ้า) ที่ถูกดูดซึมโดยใบข้าวโพด (ก) ชั้นแวกซ์ที่ผิวใบ (ข) ท่อลำเลียงอาหาร (Wild และคณะ, 2006)..... 15
2.3	วิธีการย่อยสลาย PAHs ของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Cerniglia, 1992)..... 16
2.4	วิธีการย่อยสลาย PAHs ทั่วไปโดยจุลินทรีย์แบบใช้ออกซิเจน (Juhasz และคณะ, 2000)..... 20
2.5	แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในไม้แบบต่างๆ (Lindow และคณะ, 2003)..... 22
3.1	ขวดทดลองขนาด 60 มิลลิลิตร ปิดด้วยเซปตัมที่เคลือบด้านล้างด้วยเทลลอน/ซิลิคอน (Teflon/Silicon) และผนึกด้วยฝาอะลูมิเนียม ภายในมีกระดาศกรองขนาด 1x2 เซนติเมตร (ก) ชุดควบคุมที่ไม่ได้บรรจุใบไมก (ข) ชุดทดลองที่บรรจุใบไมกน้ำหนัก 0.5 กรัม..... 40
3.2	แชมเบอร์แก้วขนาด 20 x 20 x 35 เซนติเมตร..... 42
4.1	ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่เติม PAHs และบ่มเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ก) ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียจากใบไมก (ข) ชุดทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียจากใบไมก..... 46
4.2	DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 10 – 70% denaturant แสดงความหลากหลายของแบคทีเรียจากใบไมกที่สามารถย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ ช่องวิ่ง A: อะซีแนพทีน ช่องวิ่ง B: อะซีแนพทีน ช่องวิ่ง C: ฟลูออรีน ช่องวิ่ง D: เบนโซ[เอ]ไพรีน ช่องวิ่ง E: แอนทราซีน ช่องวิ่ง F: ฟลูออแรนทีน ช่องวิ่ง G: ไพรีน ช่องวิ่ง H: พีแนนทรีน... 47
4.3	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบนใบไมกและแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ, PAHs ผสม ประกอบด้วย อะซีแนพทีน, อะซีแนพทีน, ฟลูออรีนและพีแนนทรีน ความเข้มข้นเริ่มต้นทุกชนิด PAHs 500 ppm..... 52
4.4	ขวดทดลองขนาด 60 มิลลิลิตร ปิดด้วยเซปตัมที่เคลือบเทลลอน/ซิลิคอนและผนึกด้วยฝาอะลูมิเนียม ภายในมีกระดาศกรองขนาด 1x2 เซนติเมตร (ก) ชุดควบคุมที่ไม่ได้บรรจุใบไมก (ข) ชุดทดลองที่บรรจุใบไมกน้ำหนัก 0.5 กรัม..... 53

รูปที่	หน้า
4.5 ปริมาณอะซีแนฟธิลีน อะซีแนฟธิน ฟลูออรีน และพีแนนทรีน ที่ในอากาศ ณ เวลาต่างๆ ในขวดทดลองขนาด 60 มิลลิลิตรที่ไม่มีใบโมก.....	53
4.6 ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ในอากาศ ณ เวลาต่างๆ โดยเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 400 ppmV.....	55
4.7 แซมเบอร์แก้วขนาด 20 x 20 x 35 เซนติเมตร ที่บรรจุกิ่งโมกน้ำหนัก 10 กรัม.....	59
4.8 แสดงปริมาณอะซีแนฟธิลีน อะซีแนฟธิน ฟลูออรีน และพีแนนทรีน ในอากาศในแซมเบอร์เมื่อทิ้งไว้ 7 วัน.....	60
4.9 ปริมาณ PAHs ในแซมเบอร์ ณ เวลาต่างๆ ใน 7 วัน โดยเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 100 ppmV.....	63
4.10 จำนวนแบคทีเรียตามธรรมชาติบนใบโมกหลังจากได้รับปุ๋ยพืช ในวันต่างๆ.....	67
4.11 จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs บนใบโมกหลังจากได้รับปุ๋ยพืช ในวันต่างๆ.....	68
ค.1 โครมาโทแกรม GC จากการวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนฟธิลีน อะซีแนฟธิน ฟลูออรีน และพีแนนทรีน ความเข้มข้น 100 ppmV.....	90
ง.1 กราฟมาตรฐานอะซีแนฟธิลีนในขวดทดลอง 60 มิลลิลิตร.....	91
ง.2 กราฟมาตรฐานอะซีแนฟธินในขวดทดลอง 60 มิลลิลิตร.....	92
ง.3 กราฟมาตรฐานฟลูออรีนในขวดทดลอง 60 มิลลิลิตร.....	92
ง.4 กราฟมาตรฐานพีแนนทรีนในขวดทดลอง 60 มิลลิลิตร.....	93
ง.5 กราฟมาตรฐานอะซีแนฟธิลีนในแซมเบอร์ 14 ลิตร.....	93
ง.6 กราฟมาตรฐานอะซีแนฟธินในแซมเบอร์ 14 ลิตร.....	94
ง.7 กราฟมาตรฐานฟลูออรีนในแซมเบอร์ 14 ลิตร.....	94
ง.8 กราฟมาตรฐานพีแนนทรีนในแซมเบอร์ 14 ลิตร.....	95
จ.1 กราฟอัตราการกำจัดอะซีแนฟธิลีนในอากาศในแซมเบอร์ภายใน 24 ชั่วโมง.....	96
จ.2 กราฟอัตราการกำจัดอะซีแนฟธินในอากาศในแซมเบอร์ภายใน 24 ชั่วโมง.....	97
จ.3 กราฟอัตราการกำจัดฟลูออรีนในอากาศในแซมเบอร์ภายใน 24 ชั่วโมง.....	98
จ.4 กราฟอัตราการกำจัดพีแนนทรีนในอากาศในแซมเบอร์ภายใน 24 ชั่วโมง.....	99

คำย่อและสัญลักษณ์

A_{260}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความความคลื่น 260 นาโนเมตร
A_{280}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความความคลื่น 280 นาโนเมตร
ppm	=	มิลลิกรัม/ลิตร
ppmV	=	มิลลิกรัม/ลิตร/ปริมาตร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

มลพิษทางอากาศเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย สาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งคือ พอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PAHs) ที่ปนเปื้อนในอากาศ ซึ่งเกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงในรถยนต์ ซึ่ง PAHs หลายชนิดมีรายงานว่าเป็นสารก่อมะเร็งและสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ด้งานวิจัยของ Ruchirawat และคณะ (2006) ที่พบว่าเด็กที่อาศัยอยู่ในเขตกรุงเทพมหานครมีความเสี่ยงที่จะเป็นมะเร็งปอดเนื่องจาก PAHs ที่ปนเปื้อนในอากาศสูงกว่าในเขตชานเมือง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tuntawiroon และคณะ (2007) ที่พบว่าและเด็กนักเรียนในเขตเมืองมีปริมาณ PAHs ที่จับกับเม็ดเลือดขาวสูงเด็กในเขตชานเมือง จากการศึกษามลพิษในประเทศไทยพบว่าบริเวณถนนในกรุงเทพมหานครที่มีการจราจรหนาแน่น เป็นแหล่งผลิตและสะสม PAHs โดย Chang และคณะ (2006) พบว่า PAHs มีการปนเปื้อนทั้งในอากาศและเกาะติดกับอนุภาคต่างๆ โดยบริเวณถนนพลโยธินมีการปนเปื้อนของเบนโซ[*a*]พีริลีน และโคโรนีน และมีรายงานการปนเปื้อนของ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น แนนทาลีน, อะซีแนฟทีลีน และอะซีแนฟทีน จะพบระเหยอยู่ในอากาศ Boonyatumanond และคณะ (2007) พบ PAHs ปริมาณมากที่สุดในเขม่าดำจากยานพาหนะที่ใช้ น้ำมันเบนซิน (2600 ± 2900 ไมโครกรัม/กรัม) รองลงมาคือในเขม่าดำจากยานพาหนะที่ใช้ น้ำมันดีเซล (115 ± 245 ไมโครกรัม/กรัม) และในฝุ่นละอองในอากาศบริเวณท้องถนน (101 ± 35 ไมโครกรัม/กรัม) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบ PAHs สะสมในเครื่องยนต์ ยางล้อรถ ยางถนน โดยพืชที่ปลูกบริเวณริมถนนก็มีโอกาสจะพบการสะสมของ PAHs ที่ไปได้ โดยการศึกษาของ Nicola และคณะ (2007) พบว่าต้น *Quercus ilex* L. ที่ปลูกในเมืองใหญ่ที่มีการจราจรหนาแน่น มีการสะสม PAHs หลายชนิดที่ไปในปริมาณมากกว่าต้นไม้ที่ปลูกในบริเวณชานเมือง และการศึกษาของ Wang และคณะ (2008) พบว่ามี PAHs ตกค้างในใบไม้ 6 ชนิดที่ปลูกบริเวณริมถนน และพบว่าต้นพืชจะสามารถดูดซึม PAHs ในอากาศได้ 2 แบบ คือ ดูดซึมโดยแวกซ์ที่ผิวใบและดูดซึมโดยเซลล์พืช

ในขณะเดียวกัน มีการศึกษาพบว่าใบไม้เป็นแหล่งที่อยู่อาศัย (phyllospere) ของจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ สาหร่าย โปรโตซัว และนีมาโทด โดยพบว่าแบคทีเรียมีปริมาณมากที่สุดทั้งชนิดและจำนวน ถึง 10^6 - 10^7 เซลล์/ตารางเซนติเมตร และอาจพบถึง 10^8 เซลล์/กรัม (Steven และคณะ, 2003) จากรายงานของ Yang และคณะ (2001) ที่ศึกษาในกลุ่มแบคทีเรียบนใบไม้ด้วยวิธี DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) พบว่ากลุ่มแบคทีเรียจะ

คล้ายคลึงกันในพืชชนิดเดียวกัน แต่จะแตกต่างกันในพืชต่างชนิดกัน และกลุ่มแบคทีเรียบนใบไม้มีความซับซ้อนสูง โดย Yadav และคณะ (2005) พบว่ากลุ่มแบคทีเรียบนใบไม้ในแถบเมดิเตอร์เรเนียน จะมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณไนโตรเจนที่ผิวใบ ปริมาณน้ำและฟอสฟอรัส ในขณะที่เดียวกันก็มีความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณสารฟีนอลิกที่ขับออกมาที่ผิวใบและความหนาของใบ และพบว่าบนใบไม้มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่จำกัด แต่แบคทีเรียบนใบไม้ก็สามารถได้แหล่งอาหารจากที่อื่นมาทดแทน ได้แก่ ละอองเรณู น้ำหวาน หรือบรรยากาศ เช่น สารอินทรีย์ที่มาสะสมที่ใบ

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าแบคทีเรียหลายชนิดสามารถย่อยสลาย PAHs ได้ เช่น *Mycobacterium*, *Sphingomonas*, *Terrabacter*, *Rhodococcus*, *Methylobacterium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, *Cycloclasticus*, *Rhodococcus*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Neptunomonas*, *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* เป็นต้น (Juhasz และคณะ, 2000) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในดินหรือน้ำที่มีการปนเปื้อน PAHs ในขณะเดียวกันก็มีการรายงานว่า พืชและแบคทีเรียหลายชนิดมีกิจกรรมร่วมกันแล้วทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัด PAH ได้ดีขึ้น เช่น Kuiper และคณะ (2004) พบว่าการบำบัด PAHs ในดินด้วยพืชหลายชนิด จะมีประสิทธิภาพดีขึ้นเมื่อมีการเติมแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ลงไป และจาก Gao และคณะ (2006) พบว่าต้นข้าวที่ปลูกในนาข้าวที่มีการปนเปื้อนของ PAH เมื่อเติมเชื้อ *Acinetobacter* sp. จะสามารถกำจัดพีแนทรีนได้ถึง 86-87% ใน 40 วัน โดยชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมเชื้อสามารถกำจัด พีแนทรีนได้เพียง 70-78% ใน 80 วัน

การศึกษาเกี่ยวกับการนำแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับต้นพืช เพื่อการบำบัดสารมลพิษในอากาศเริ่มเป็นที่สนใจมากขึ้น โดย Orwell และคณะ (2004) พบว่าแบคทีเรียในดินในกระถางที่ปลูกต้นไม้ มีบทบาทในการกำจัดเบนซีนในอากาศได้ถึง 12-27 ppm ต่อวัน ส่วนการศึกษาของ De Kempeneer และคณะ (2003) ที่ทำการทดลองพ่นเชื้อ *Pseudomonas putida* TVA8 บนต้น *Azalea indica* เพื่อบำบัดโทลูอีนในอากาศ ในระบบปิด พบว่าสามารถกำจัดโทลูอีนได้ 95% ในระยะเวลาเพียง 27 ชั่วโมง และจากการศึกษาของ Sandhu และคณะ (2007) ที่ทำการทดลองพ่นแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอล *Pseudomonas* sp. CF600 ให้กับใบต้นถั่วและข้าวโพด พบว่าฟีนอลในอากาศสลายไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้มากถึงแปดเท่าเมื่อเทียบต้นพืชที่ไม่ได้รับการพ่นเชื้อ และพบว่าต้นถั่วและข้าวโพดที่ปลูกในบริเวณที่มีปริมาณสารอินทรีย์ในอากาศสูง ใบถั่วและข้าวโพดจะสามารถกำจัดฟีนอลในอากาศได้มากกว่าใบถั่วและข้าวโพดที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ แสดงว่าจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติบนใบสามารถย่อยสลายฟีนอลได้

การศึกษาเกี่ยวกับการบำบัด PAHs ในอากาศโดยแบคทีเรียบนใบไม้ในปัจจุบัน มีเพียงงานวิจัยเกี่ยวกับการย่อยสลายฟีนแอนทรีนที่ตกสะสมบนใบไม้ เช่น Waight (2005) พบว่าแบคทีเรียตามธรรมชาติบนใบไม้ในประเทศไทยสามารถย่อยสลายฟีนแอนทรีนที่ตกค้างบนใบไม้ และจำแนกได้ว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Rhizobium* และ *Deinococcus* การศึกษาต่อมาโดย นุชนาฏ ทองธรรมชาติ (2550) พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟีนแอนทรีนบนใบไม้ มีค่าแตกต่างกันตามชนิดของไม้ประดับ ในขณะที่เดียวกันพบว่าใบไมกมีจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟีนแอนทรีนมากที่สุด นอกจากนี้พบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนแอนทรีนสูงขึ้น ตามจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟีนแอนทรีนที่พบบนใบ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนใบไมกเพิ่มเติม โดยเฉพาะจงที่การย่อยสลาย PAHs ในอากาศชนิดต่างๆ ได้แก่ อะซีแนพทิลีน อะซีแนพทีน ฟลูออรีน และฟีนแอนทรีน ซึ่งเป็น PAHs ที่มีรายงานว่าปนเปื้อนในอากาศ ซึ่งพบได้ทั้งอากาศภายในอาคาร (indoor air) และอากาศภายนอกอาคาร (outdoor air) ซึ่งรายงานโดย Liu และคณะ (2001)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาหาประสิทธิภาพและจำแนกชนิดของแบคทีเรียบนใบไมก (*Wrightia religiosa*) ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัด PAHs ในอากาศ ได้แก่ อะซีแนพทิลีน อะซีแนพทีน ฟลูออรีน และฟีนแอนทรีน และหาความสัมพันธ์ระหว่างการลดลงของ PAHs โดยการย่อยสลายของแบคทีเรียบนต้นไมกกับปริมาณพืชที่พ่นให้ทางใบ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

ทราบชนิดและประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนใบไมกที่สามารถกำจัด PAHs ชนิดต่างๆที่ปนเปื้อนในอากาศได้ และทราบประสิทธิภาพการกำจัด PAHs ในอากาศโดยแบคทีเรียบนใบไมกเมื่อได้รับปุ๋ยของพืชโดยการพ่นผ่านทางใบ

บทที่ 2

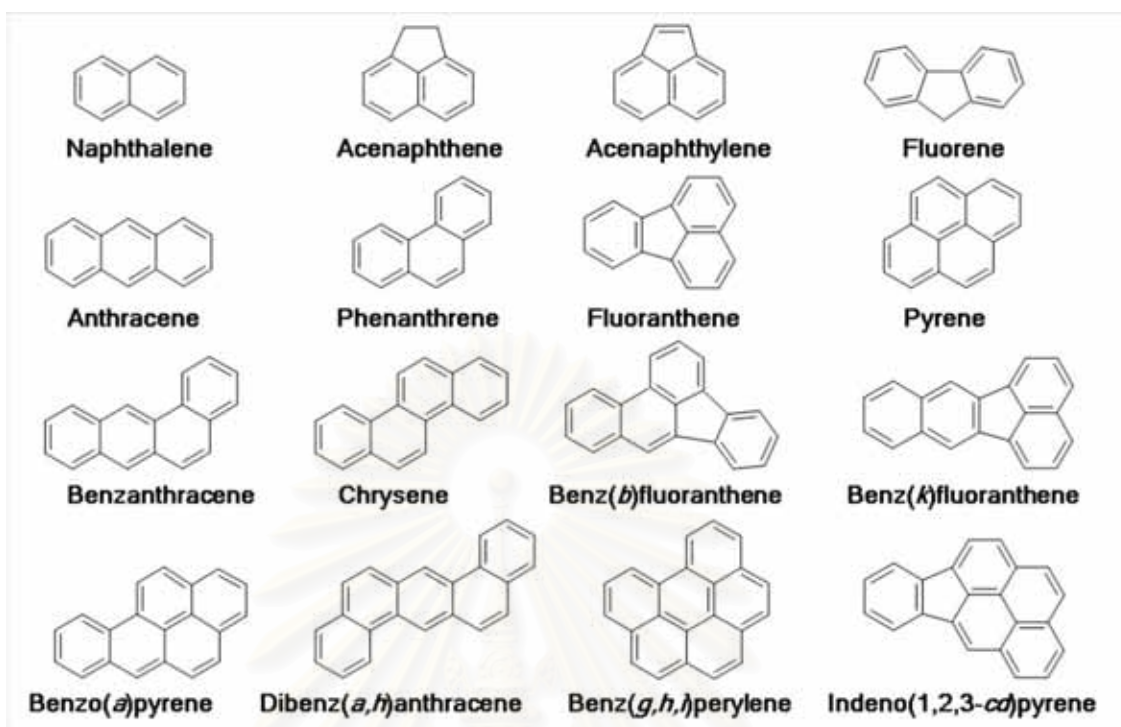
ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) เป็นกลุ่มสารเคมีที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบไปด้วยวงเบนซีน ตั้งแต่ 2 วงเชื่อมต่อกัน สารประกอบ PAHs ประกอบด้วยสารที่มีโครงสร้างหลักแตกต่างกัน 35 ชนิด จากรายงานของสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, EPA) ได้กำหนดให้สารประกอบ PAHs 16 ชนิด เป็นสารพิษอันตรายที่ควรให้ความสำคัญ

PAHs สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ สารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (Low molecular weight PAHs, LMW PAHs) ซึ่งประกอบไปด้วยวงอะโรมาติก 2 และ 3 วง ได้แก่ แนพทาลีน อะซีแนพทีน อะซีแนพทีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนทีน แอนทราซีน พีแนนทีน เป็นต้น และสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง (High molecular weight PAHs, HMW PAHs) ซึ่งประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 4 วง ขึ้นไป ได้แก่ ไพรีน ไครซีน เบนโซ[เอ]ไพรีน เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน เบนโซ[เอช]ฟลูออแรนทีน ดังรูปที่ 2.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสารประกอบ PAHs ชนิดต่างๆ (Wilson และ Jones, 1993)

คุณสมบัติของ PAHs คือ ละลายดีในไขมัน (lipophilic) แต่ละลายน้ำได้น้อย PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำสามารถระเหยในอากาศได้ง่ายกว่า PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง เพราะมีแรงดันไอสูงกว่า (ATSDR, 1995) และพบว่า PAHs ย่อยสลายเองได้ยาก จึงตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้เป็นระยะเวลายาวนาน ซึ่งปัจจุบันมีรายงานว่า PAHs เป็นสารก่อมะเร็งและสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ PAHs ที่เลือกมาทดสอบในการศึกษานี้ มีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ซึ่ง PAHs เหล่านี้มีงานวิจัยพบว่า ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในอากาศ ซึ่งพบว่าปนเปื้อนทั้งในเขตอุตสาหกรรมหรือในเขตที่มีการจราจรหนาแน่น และจากรายงานของ Zhang และ Tao (2009) พบว่าทั่วโลกมีการปล่อย PAHs สู่อากาศในปริมาณมาก โดยเฉพาะในปี 2004 พบว่ามี PAHs ถึง 520×10^9 กรัม/ปี โดย PAHs เหล่านี้ส่วนใหญ่มาจากการใช้เชื้อเพลิง (56.7%) จากไฟฟ้า (17.0%) และจากกิจกรรมของมนุษย์ (6.9%) ซึ่ง PAHs ส่วนใหญ่จะผลิตมาจากประเทศจีน (114×10^9 กรัม/ปี), อินเดีย (90×10^9 กรัม/ปี) และสหรัฐอเมริกา (32×10^9 กรัม/ปี)

ตาราง 2.1 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของ PAHs ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา (ATSDR, 1995)

คุณสมบัติ PAHs	อะซีแนพทีลิน	อะซีแนพทีน	ฟลูออรีน	พีแนนทีน
จำนวนวงเบนซีน	2	2	2	3
สูตรโมเลกุล	C ₁₂ H ₈	C ₁₂ H ₁₀	C ₁₃ H ₁₀	C ₁₄ H ₁₀
น้ำหนักโมเลกุล	152.20	154.21	166.22	178.23
ลักษณะปรากฏ	ผลึกสีเหลือง	ผลึกสีขาว	ผลึกสีขาว	ผลึกขาวเหลือง
อุณหภูมิหลอมเหลว	92-93	95	116-117	101 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิการกลายเป็นไอ	265-275	279	295	340 องศาเซลเซียส
ความถ่วงจำเพาะ ที่ 23 องศาเซลเซียส	1.08	1.024	1.203	1.06
การละลายในน้ำ	3.93 มิลลิกรัมต่อลิตร	4.00 มิลลิกรัมต่อลิตร	1.69 มิลลิกรัมต่อลิตร	1.29 มิลลิกรัมต่อลิตร
การละลายตัวทำละลาย	แอลกอฮอล์, อีเทอร์, เบนซีน	แอลกอฮอล์, เมทานอล, คลอโรฟอร์ม, เบนซีน, กรดอะซิ ติก, โพรพานอล, โทลูอีน	แอลกอฮอล์, อีเทอร์, คลอโรฟอร์ม	โทลูอีน, คาร์บอนเตตระคลอไรด์, อีเทอร์, คลอโรฟอร์ม, เบนซีน, กรดอะซิติก
สัมประสิทธิ์แบ่งการละลาย (Log K _{ow})	3.7	3.98	4.2	4.46
ความดันไอที่ 20 องศาเซลเซียส	6.8 × 10 ⁻³ มิลลิเมตรปรอท	5.32 × 10 ⁻³ มิลลิเมตรปรอท	7.1 × 10 ⁻⁴ มิลลิเมตรปรอท	6.8 × 10 ⁻⁴ มิลลิเมตรปรอท

ตาราง 2.1 (ต่อ)

คุณสมบัติ PAHs	แอนทราซีน	ฟลูออแรนทีน	ไพรีน	เบนโซ[เอ]ไพรีน
จำนวนวงเบนซีน	3	3	4	5
สูตรโมเลกุล	C ₁₄ H ₁₀	C ₁₆ H ₁₀	C ₁₆ H ₁₀	C ₂₀ H ₁₂
น้ำหนักโมเลกุล	178.23	202.26	202.3	252.3
ลักษณะปรากฏ	ผลึกสีขาวเหลืองโปร่งแสง	ผลึกผงสีขาว	ผลึกสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน	ผลึกสีเหลือง
อุณหภูมิหลอมเหลว	217 องศาเซลเซียส	105 องศาเซลเซียส	156 องศาเซลเซียส	179 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิการกลายเป็นไอ	340 องศาเซลเซียส	380-384 องศาเซลเซียส	393-404 องศาเซลเซียส	496 องศาเซลเซียส
ความถ่วงจำเพาะ ที่ 23 องศาเซลเซียส	1.24	1.252	1.271	-
การละลายในน้ำ	0.07 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.26 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.14 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.0038 มิลลิกรัมต่อลิตร
การละลายตัวทำละลาย	แอลกอฮอล์, เบนซีน, คาร์บอนไดซัลไฟด์, คลอโรฟอร์ม, ไฮโดรเนพธาลิน, ตัวทำละลายสารอินทรีย์	แอลกอฮอล์, เบนซีน, อีเทอร์ ตัวทำละลายสารอินทรีย์	เบนซีนไดเอทิลอีเทอร์, อีเทอร์, ปีโตรเลียม-อีเทอร์, โทลูอิน, เอทานอล, คาร์บอนไดซัลไฟด์	เมทานอล, เอทานอล, เบนซีน, โทลูอิน, ไซลีน, อีเทอร์
สัมประสิทธิ์แบ่งการละลาย (Log K _{ow})	4.45	5.33	5.32	6.04
ความดันไอที่ 25 องศาเซลเซียส	2.0 × 10 ⁻⁴ มิลลิเมตรปรอท	6.0 × 10 ⁻⁶ มิลลิเมตรปรอท	6.8 × 10 ⁻⁷ มิลลิเมตรปรอท	5.0 × 10 ⁻⁹ มิลลิเมตรปรอท

2.2 การปนเปื้อนของ PAHs ในสิ่งแวดล้อม

2.2.1 แหล่งที่มาของ PAHs

PAHs เกิดจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงแบบไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดการกระจายตัวในบรรยากาศ ซึ่งแหล่งกำเนิดของ PAHs มาจาก 2 สาเหตุใหญ่ คือ

1. กระบวนการสังเคราะห์ตามธรรมชาติ เช่น ไฟไหม้ป่า ภูเขาไฟระเบิด และการรั่วซึมของน้ำมันตามธรรมชาติ
2. กิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ เช่น การเผาไหม้เชื้อเพลิงในชีวิตประจำวัน การเผาไหม้เชื้อเพลิงของเครื่องยนต์ การประกอบอาหารในครัวเรือน และจากควันบุหรี่ รวมไปถึงการปล่อยของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมปิโตรเคมี อุตสาหกรรมการผลิตที่ใช้เครื่องจักรยนต์ และการใช้สารรักษาเนื้อไม้ เป็นต้น

2.2.2 การปนเปื้อนของ PAHs ในอากาศ

Diane และคณะ (1997) รายงานว่าในสหรัฐอเมริกา ไบพีซ (ข้าวโพด ต้นสนและเมเปิ้ล) ที่ปลูกในเขตชุมชนเมืองจะมี PAHs สูงกว่าเขตชนบทถึง 10 เท่า และเขตชนบทจะไม่พบการปนเปื้อนของแอนทราซีน เบนโซ[เอ]แอนทราซีน หรือ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงบางชนิด โดย PAHs ในอากาศเหล่านี้มาจากยานพาหนะ ซึ่งเผาไหม้เชื้อเพลิงไม่สมบูรณ์

Oanh และคณะ (1999) รายงานว่าการใช้เชื้อเพลิงพวกถ่านไม้ในการทำอาหารหรือกิจกรรมต่างๆ จะปล่อย PAHs ออกมาสู่อากาศถึง 18 ชนิด โดย 11 ชนิดเป็น PAHs ที่มีรายงานว่าเป็นสารอันตราย โดยพบว่าปริมาณ PAHs ทั้งหมด 110 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งเป็น PAHs ที่เป็นอันตรายถึง 13.4 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

Liu และคณะ (2001) พบว่าในช่วงฤดูร้อนในประเทศจีน อากาศภายในอาคาร (indoor air) มีการปนเปื้อนของ PAHs ถึง 1.418-20.466 ไมโครกรัม/ลูกบาศก์เมตร และในฤดูใบไม้ร่วงมีการปนเปื้อนในอากาศสูงถึง 3.897-29.852 ไมโครกรัม/ลูกบาศก์เมตร ในขณะที่พบ PAHs ปนเปื้อนในอากาศภายนอกอาคาร (outdoor air) ในฤดูร้อน 1.380-20.468 ไมโครกรัม/ลูกบาศก์เมตร และในฤดูใบไม้ร่วง 2.721-30.678 ไมโครกรัม/ลูกบาศก์เมตร คณะผู้วิจัยยังรายงานว่ามีปริมาณ PAHs ในอากาศในตัวอาคาร มีความสัมพันธ์กับปริมาณ PAHs ในอากาศภายนอกอาคาร โดยพบว่าห้องนอนจะมีปนเปื้อนมากที่สุด รองลงมาคือห้องครัว ห้องนั่งเล่น และระเบียง ตามลำดับ

Smith และคณะ (2001) รายงานว่า PAHs ในอากาศในประเทศอังกฤษ จะพบในปริมาณ 5.7-44.6 นาโนกรัม/ลูกบาศก์เมตร และพบว่า PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำจะไม่รวมตัวกับอนุภาคใด เช่น ฟลูออรีนจะพบในอากาศถึง 370-4670 พิโคกรัม/ลูกบาศก์เมตร ซึ่งไม่พบฟลูออรีนที่รวมตัวกับอนุภาคอื่นๆ ในขณะที่ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง เช่น ไดเบนโซ[เอ,เอช]แอนทราซีน จะพบระเหยในอากาศน้อย แต่พบว่ารวมตัวกับอนุภาคอื่นๆถึง 89-100 พิโคกรัม/ลูกบาศก์เมตร

Liu และคณะ (2007) รายงานว่า PAHs ส่วนใหญ่ในประเทศจีน จะมีการปนเปื้อนในบริเวณโรงงานอุตสาหกรรม บริเวณที่มีการจราจรหนาแน่นและบริเวณชุมชน โดยในช่วงฤดูหนาว การเผาไหม้เชื้อเพลิงของยานพาหนะตามท้องถนน จะปลดปล่อย PAHs ออกมา ในปริมาณ 9.176-32.573 ไมโครกรัม/กรัมตัวอย่างฝุ่น และในฤดูร้อน 6.875-27.766 ไมโครกรัม/กรัมตัวอย่างฝุ่น โดย PAHs ที่อยู่ในอากาศส่วนใหญ่ประกอบด้วยวงเบนซีน 2-4 วง ในขณะที่ PAHs ที่มีวงเบนซีนมากกว่า 4 วงจะเกาะอยู่กับอนุภาคชนิดต่างๆ เช่น ฝุ่น ยานพาหนะ ท้องถนน หรือต้นพืช

Rosaria และคณะ (2008) พบว่าในประเทศอิตาลีมี PAHs ปนเปื้อนในอากาศในตัวอาคาร (indoor air) ถึง 36-34,453 ไมโครกรัม/กิโลกรัมฝุ่น

2.2.3 การสะสม PAHs บนใบพืช

Smith และคณะ (2001) ยังพบอีกว่า ต้นพืช 5 ชนิด ได้แก่ *Festuca ovina*, *Holcus lanatus*, *Koeleria macrantha*, *Lolium perenne* และ *Trifolium repens* ในไร่ มีการสะสม PAHs ที่ใบ โดยพบว่าในฤดูหนาวปริมาณ PAHs จะสูงกว่าฤดูร้อน โดยค่าคงที่ของปริมาณ PAHs ในฤดูร้อนเท่ากับ 4-52 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักใบไม้ แต่ในฤดูหนาวเท่ากับ 8-88 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักใบไม้ และพบว่าปริมาณ PAHs ที่สะสมบนใบพืชทั้ง 5 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกัน

Nicola และคณะ (2007) พบว่าต้น *Quercus ilex* L. ที่ปลูกในเมืองใหญ่ที่มีการจราจรหนาแน่น มีการสะสม PAH หลายชนิดที่ใบในปริมาณมากกว่าต้นไม้ที่ปลูกในบริเวณชานเมือง ปริมาณ PAHs ที่วัดได้อยู่ระหว่าง 92-1454 ไมโครกรัม/กิโลกรัมใบไม้แห้ง สอดคล้องกับรายงานของ Alfani และคณะ (2007) พบว่าในเขตชุมชนเมือง บนใบ *Quercus ilex* L. มีการปนเปื้อนของ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลกลางๆ ถึง 72% แต่ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำและมวลโมเลกุลสูง พบตกค้างเพียง 10% และ 18% ตามลำดับ

Wang และคณะ (2008) ศึกษาพบว่าบริเวณท้องถนนและมหาวิทยาลัยในปักกิ่ง มี PAHs ตกค้างบนใบพืช 6 ชนิด ได้แก่ *Ginkgo biloba*, *Prunus persica*, *Sophora japonica*, *Prunus cerasifera*, *Syringa pekinensis* และ *Euonymus japonicus* โดยต้นพืชจะสามารถดูดซึม PAHs ในอากาศได้ 2 แบบ คือ ดูดซึมโดยแวกซ์ที่ผิวใบและดูดซึมโดยเซลล์พืช และพบว่าพืชที่ปลูกตามท้องถนนพบ PAHs ที่ผิวใบและ

เนื้อเยื่อชั้นของพืช (inner leaf tissues) ถึง 69.3 ± 64.6 และ 1.07 ± 0.2 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักใบไม้แห้ง และพืชในเขตมหาวิทยาลัยพบ PAHs ที่ผิวใบและเนื้อเยื่อชั้นของพืชถึง 57.5 ± 52.6 และ 0.716 ± 0.2 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักใบไม้แห้ง

2.2.4 การปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs ในอากาศในประเทศไทย

Oanh และคณะ (2000) รายงานว่าในบริเวณถนนพลโยธินในกรุงเทพมหานคร มีการปนเปื้อนของ PAHs ในอากาศ โดย PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง ซึ่งได้แก่ เบนโซ[เอ]ไพรีน เบนโซ[อี]ไพรีน และเบนโซ[เอ]แอนทราซีน ดูดซับกับฝุ่นละอองได้ดี แต่ไม่พบว่า PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำซึ่งระเหยได้ง่าย เช่น แนพทาลีน อะซีแนพทิลีน และอะซีแนพทีน มีการดูดซับกับฝุ่นละออง

Garivait และคณะ (2000) ศึกษาการกระจายตัวของ PAHs ในอากาศในกรุงเทพมหานคร ในรูปของก๊าซและฝุ่นละออง พบว่า PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น ไพรีน, เบนโซ[อี]ไพรีน และเบนโซ[เอ]แอนทราซีน พบถึง 80%, 40% และ 24% ตามลำดับ ในขณะที่ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง จะอยู่ในรูปฝุ่นละอองเกือบทั้งหมด โดยพบว่า 30%-60% ของ PAHs จะจับอยู่กับฝุ่นละอองที่มีขนาดเล็กกว่า 0.43 ไมครอน และ 70% จะจับอยู่กับฝุ่นละอองที่มีขนาดเล็กกว่า 2.1 ไมครอน

Laowagul และคณะ (2000) รายงานการปนเปื้อน PAHs ในกรุงเทพมหานครและนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด พบว่ามี PAHs ปนเปื้อน 12.64 และ 4.69 นาโนกรัม/ลูกบาศก์เมตร ซึ่งบอกว่าในเขตเมืองมี PAHs สูงกว่าเขตอุตสาหกรรมถึง 3 เท่า และจากการศึกษาการกระจายตัวของ PAHs พบว่า 99% ของ PAHs ที่มีวงเบนซีน 2-3 วง จะอยู่ในรูปก๊าซ และมากกว่า 90% ของ PAHs ที่มีวงเบนซีน 5-7 วง จะอยู่ในรูปฝุ่นละออง ส่วน PAH ที่มีวงเบนซีน 4-5 วง จะอยู่ทั้งสองสถานะ

Norramit และคณะ (2005) ศึกษาปริมาณ PAHs ในอากาศในเขตชุมชนเมืองในกรุงเทพมหานคร พบว่า PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง (วงเบนซีน 4-6 วง) ปนเปื้อนในอากาศ (91.7%) มากกว่า PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำและพบว่า 71.4% ของ PAHs ที่พบเป็น PAHs ที่มีรายงานว่าน่าเป็นสารก่อมะเร็ง เช่น เบนโซ[เอ]ไพรีน จะพบปนเปื้อนอยู่ทั่วไป โดยพบว่าความน่าจะเป็นของมะเร็งปอดของประชากรในกรุงเทพฯ สูงเกือบเท่าเมืองนางาซากิ (Nagasaki) และโรม (Rome)

Chang และคณะ (2006) พบว่า PAHs มีการปนเปื้อน ทั้งในอากาศและเกาะติดกับอนุภาคต่างๆ โดยบริเวณถนนพลโยธินมีการปนเปื้อนของเบนโซ[จี,เอช,ไอ]พีริลีน และโคโรนีน และมีรายงานการ

ปนเปื้อนของ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น แนพทาลีน, อะซีแนพทิลีน และอะซีแนพทีน ะเหยงอยู่ในอากาศ

Boonyatumanond และคณะ (2007) รายงานการปนเปื้อนของ PAHs บริเวณถนนในกรุงเทพมหานครที่มีการจราจรหนาแน่น ซึ่งเป็นแหล่งผลิตและสะสม PAHs โดย PAHs พบปริมาณมากที่สุดเ็นเขม่าดำจากยานพาหนะที่ใช้น้ำมันเบนซิน (2600 ± 2900 ไมโครกรัม/กรัม) รองลงมาคือเ็นเขม่าดำจากยานพาหนะที่ใช้น้ำมันดีเซล (115 ± 245 ไมโครกรัม/กรัม) ในฝุ่นละอองในอากาศบริเวณท้องถนน (101 ± 35 ไมโครกรัม/กรัม) ในเครื่องยนต์ (97 ± 65 ไมโครกรัม/กรัม) ยางล้อรถ (82 ± 41 ไมโครกรัม/กรัม) และยางถนน (2.3 ± 1.6 ไมโครกรัม/กรัม) ตามลำดับ

2.3 ความเป็นพิษของ PAHs ต่อมนุษย์ เมื่อได้รับจากแหล่งในอากาศ

สำนักงานวิจัยมะเร็งแห่งชาติ (The International Agency for Research Cancer; IARC, 1999) ได้แบ่งกลุ่มสารประกอบ PAHs ออกเป็น 3 กลุ่ม ตามการออกฤทธิ์ในการก่อมะเร็ง ดังนี้

กลุ่ม 2A สารที่น่าจะก่อมะเร็งในมนุษย์ได้สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ มี 3 ชนิด ได้แก่ เบนโซ[เอ]แอนทราซีน เบนโซ[เอ]ไพรีน และไดเบนซ[เอ,เอช]แอนทราซีน

กลุ่ม 2B สารที่อาจจะก่อมะเร็งในมนุษย์มี 11 ชนิด ได้แก่ แนพทาลีน เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน เบนโซ[เค]ฟลูออแรนทีน เบนโซ[เจ]ฟลูออแรนทีน ไดเบนโซ[เอ,เอช]ไพรีน ไดเบนโซ[เอ,แอล]ไพรีน ไดเบนโซ[เอ,อี]ไพรีน ไดเบนโซ[เอ,ไอ]ไพรีน ไดเบนโซ[เอ,เอช]อะคริดีน ไดเบนโซ [เอ,เจ]อะคริดีน และอินดีโน[1,2,3-ซีดี]ไพรีน

กลุ่ม 3 สารที่ไม่ก่อมะเร็งในมนุษย์มี 23 ชนิด ได้แก่ ไตรฟีนิลีน ฟิแนนทรีน แอนทราซีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนทีน ไพรีน ไครซีน ไควนิน เพอริลีน เบนโซ[เอ]อะคริดีน เบนโซ[ซี]อะคริดีน เบนโซ[จี,เอช,ไอ]ฟลูออแรนทีน เบนโซ[เอ]ฟลูออรีน เบนโซ[บี]ฟลูออรีน เบนโซ[ซี]ฟลูออรีน เบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอริลีน เบนโซ[ซี]ฟิแนนทรีน เบนโซ[อี]ไพรีน ไชโคลเพนทะ[ซี,ดี]ไพรีน ไดเบนซ[เอ,ซี]แอนทราซีน ไดเบนโซ[เอ,เจ]แอนทราซีน ไดเบนโซ[เอ,อี]ฟลูออแรนทีน และไดเบนโซ[เอช,อาร์,เอส,ที]เพนทะฟีน

Ruchirawat และคณะ (2002) พบว่าตำรวจจราจรที่ทำงานบริเวณถนนจะมีปริมาณอนุภาค PAHs ติดตัวสูงกว่าตำรวจจราจรที่ทำงานในสำนักงาน ถึง 20 เท่า (74.25 นาโนกรัม/ลูกบาศก์เมตร) PAHs ที่พบส่วนใหญ่เป็น เบนโซ[จี,เอช,แอล]ไพรีน และพบว่าเมื่ออนุภาคที่เป็นสารก่อมะเร็งในตำรวจจราจรที่ทำงานบริเวณท้องถนนในปริมาณ 1.6 ± 0.9 ร่างกาย/ 10^8 นิวคลีโอไทด์ ในขณะที่ตำรวจจราจรที่ทำงานในสำนักงานพบเพียง 1.2 ± 1.0 ร่างกาย/ 10^8 นิวคลีโอไทด์

Gaspari และคณะ (2003) รายงานว่า PAHs สามารถจับกับดีเอ็นเอของสเปิร์มและทำให้ดีเอ็นเอผิดปกติ จนให้ทำให้เกิดการเป็นหมันได้

Straif และคณะ (2006) พบว่าอากาศภายในบ้านเรือนในประเทศกำลังพัฒนา มีการปนเปื้อน PAHs ซึ่งมาจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงภายในบ้าน ทำให้เสี่ยงที่จะเป็นมะเร็งปอดมากขึ้น

Ruchirawat และคณะ (2006) พบว่าเด็กนักเรียนที่อาศัยอยู่ในเขตกรุงเทพมหานครมีความเสี่ยงที่จะเป็นมะเร็ง เนื่องจาก PAHs ในอากาศที่มาจาก การเผาไหม้ไม่สมบูรณ์จากยานพาหนะ โดยพบว่า PAHs สูงกว่าเขตชานเมือง 3.5 เท่า และพบว่าอนุพันธ์ของ PAHs (Urinary 1-hydroxypyrene) จับเม็ดเลือดขาวในเด็กนักเรียนในเขตเมืองถึง 5 เท่าเมื่อเทียบกับเด็กในเขตชานเมือง โดย PAHs จะทำให้ดีเอ็นเอมีความผิดปกติ หรือเสียหาย และส่งผลต่อประสิทธิภาพของขบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอลดลง

Tuntawiroon และคณะ (2007) พบว่า PAHs ในอากาศ ในบริเวณที่มีการจราจรหนาแน่นในกรุงเทพมหานคร (30.39 ± 5.80 นาโนกรัม/ลูกบาศก์เมตร) มีปริมาณสูงกว่าในบริเวณชานเมือง (1.50 ± 0.28 นาโนกรัม/ลูกบาศก์เมตร) ถึง 30 เท่า โดยพบ ไพรีน[จี,เอช,ไอ]ไพรีน ปนเปื้อนอยู่ทั่วไป และพบว่าเด็กนักเรียน (6-13 ปี) ในเขตเมืองที่มีการจราจรหนาแน่นได้รับ PAHs (4.13 ± 0.21 นาโนกรัม/ลูกบาศก์เมตร) สูงกว่าเขตชานเมือง (1.18 ± 0.09 นาโนกรัม/ลูกบาศก์เมตร) ถึง 3.5 เท่า และเด็กนักเรียนในเขตเมืองมีปริมาณ PAHs ที่จับกับเม็ดเลือดขาวสูงเด็กในเขตชานเมือง แสดงให้เห็นว่าเด็กในเขตเมืองที่มีการจราจรหนาแน่นมีโอกาสเสี่ยงสูงที่จะเกิดมะเร็ง เพราะได้รับ PAHs ในปริมาณที่มากกว่า

2.4 การศึกษา PAHs ในอากาศ

ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคใหม่ๆ ในการวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ในอากาศ เพื่อให้มีความแม่นยำมากขึ้น เช่น การใช้ เชม Solid Phase Microextraction (SPME) โดยที่เชมจะมีไฟเบอร์ที่เคลือบด้วย 100 ไมครอน Polydimethylsiloxane (PDMS) ซึ่งสามารถดูดซับสารระเหยไฮโดรคาร์บอนในอากาศได้ แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC) ดังการศึกษาของ

Vaz (2003) ที่พบว่าเข็ม SPME ที่มีไฟเบอร์เคลือบด้วย PDMS สามารถวัดปริมาณ PAHs หลายชนิดในอากาศได้ โดยพบว่าปริมาณ PAHs ที่วัดได้น้อยสุดอยู่ที่ $5-20 \times 10^{-10}$ กรัม และเมื่อนำเข็ม SPME ไปวัดปริมาณ PAHs ในอากาศในเมืองเซาเปาโล (Saopaulo) ในประเทศบราซิล พบว่ามีปริมาณ อะซีแนฟธิลีน อะซีแนฟธิน ฟลูออรีน พีแนนทรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนทรีน ไพรีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน เป็น 0.28 ± 0.03 , 0.20 ± 0.05 , 0.27 ± 0.04 , 1.2 ± 0.04 , 0.20 ± 0.03 , 1.5 ± 0.1 , 1.8 ± 0.06 และ 1.0 นาโนกรัม/ลูกบาศก์เมตร ตามลำดับ

Kircher และคณะ (2003) ทดลองนำเข็ม SPME มาเก็บตัวอย่างมลพิษในอากาศในบริเวณถนนทางหลวงและบริเวณโรงงานอุตสาหกรรม แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี พบว่าถนนทางหลวงมีการปนเปื้อนของ แอนทราซีน ฟลูออแรนทรีน และไพรีน ในขณะที่บริเวณโรงงานอุตสาหกรรมมีการปนเปื้อนของ พีแนนทรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนทรีน และไพรีน ในอากาศ

Li-bin และคณะ (2006) รวบรวมเทคนิคการใช้เข็ม SPME ในการเก็บตัวอย่าง PAHs ที่ปนเปื้อนในอากาศจากงานวิจัยก่อนหน้า ด้วยเทคนิคต่างๆ และวิเคราะห์ปริมาณด้วยด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี หรือเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) พบว่า เข็ม SPME สามารถวัดปริมาณ PAHs ในอากาศได้หลายชนิดพร้อมกัน และวัดปริมาณ PAHs ได้ต่ำกว่า 5 ไมโครกรัม/ลูกบาศก์เมตร

2.5 การบำบัด PAHs ในสิ่งแวดล้อม

เมื่อ PAHs ปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม พบว่ามักจะสะสมอยู่ในดิน ตะกอนดิน น้ำ ฝุ่นละออง พืช และอากาศ การบำบัด PAHs สามารถทำได้หลายวิธี ทั้งวิธีทางกายภาพและชีวภาพ (bioremediation)

2.5.1 การบำบัดทางกายภาพ

การบำบัดทางกายภาพ เช่น การย่อยสลายด้วยแสง (photolysis) โดย Miller และ Olejnik (2000) พบว่า เบนโซ[เอ]ไพรีน ไครซีน และฟลูออรีน ในน้ำสามารถโดนย่อยสลายด้วยแสง โดยพบว่าค่าคงที่การย่อยสลายเท่ากับ 0.014 , 0.0013 , และ 0.0038 ตามลำดับ และการย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ซึ่ง Ledakowicz และคณะ (1999) พบว่า เบนโซ[เอ]ไพรีน ไครซีน และฟลูออรีน ในน้ำ จะถูกย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) โดยค่าคงที่ของอัตราการทำปฏิกิริยาด้วยไฮดรอกซิล (hydroxyl) เท่ากับ 2.53×10^{10} , 9.82×10^9 และ 2.77×10^9 ตามลำดับ

2.5.2 การบำบัดทางชีวภาพด้วยพืช

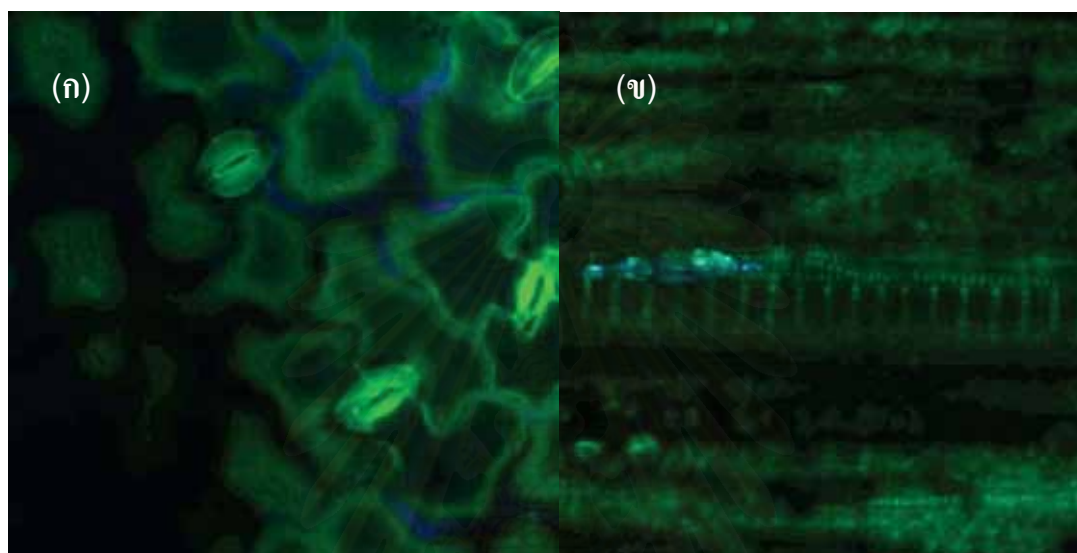
พืชจะมีกลไกในการบำบัด PAHs ในอากาศ โดยทั่วไปจะเป็นการดูดซึม (absorption) ถึง 90% และปัจจุบันยังไม่มียานวิจัยยืนยันว่าพืชสามารถย่อยสลาย PAHs ได้ การดูดซึม PAHs สู่ตัวพืชมีได้ 2 ทาง คือ ทางราก และทางใบ

การดูดซึมทางราก จะเกิดขึ้นเมื่อ PAHs ที่ละลายน้ำ โดย Gao และ Zhu (2004) พบว่าพืช 12 ชนิด ได้แก่ *Amaranthus tricolor* Linn., *Brassica Parachinensis* Bailey, *Raphnus sativus* L., *Lpomoea aquatica* Forsk, *glycine max* Merr., *Phaseolus vulgaris* L., *Brassica chinensis* L., *Brassica oleracea* L., *Spinacea oleracea* L., *Capsicum annuum* L., *Solanium melongena* L. และ *Lolium multiflorum* Lam สามารถดูดซึมพีแนทรีนและไพรีนจากดินที่ปนเปื้อนได้ พีแนทรีนและไพรีนจะสะสมในรากเป็นส่วนใหญ่และบางส่วนจะส่งไปสะสมที่ยอด และ Jiao และคณะ (2007) พบว่ารากของต้นข้าวสามารถดูดซึม PAHs ที่สะสมอยู่ในดินได้ และรากต้นข้าวสะสม PAHs ได้มากกว่า 60% ของ PAHs ที่ปนเปื้อนในดิน โดย PAHs จะสะสมในรากฝอย (lateral root) มากกว่าในปมราก (nodal root)

การดูดซึม PAHs ทางใบ จะเกิดขึ้นเมื่อ PAHs อยู่ในรูปก๊าซ ซึ่งสามารถผ่านเข้าทางปากใบโดยตรง หรือซึมผ่านชั้นแวกซ์ สู่น้ำเยื่อใบพืชด้านใน เช่น Tao และคณะ (2005) พบว่าผักกาดขาวปลี (Chinese cabbage) ที่ปลูกบริเวณที่มีการปนเปื้อน PAHs ในอากาศ สามารถดูดซึมและสะสม PAHs ในใบพืชได้ โดยปริมาณ PAHs ที่วัดได้มีถึง 596 ± 231 นาโนกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง

Wild และคณะ (2006) พบว่า ใบข้าวโพดและใบผักขม (spinach) ที่ปลูกบริเวณที่มีการปนเปื้อนพีแนทรีนในอากาศ ใบข้าวโพดและผักขมสามารถดูดซึมพีแนทรีนจากอากาศได้ โดยจะพบพีแนทรีนสะสมที่ผิวใบทั้งด้านหลังใบ (abaxial) และท้องใบ (adaxial) และเมื่อผ่านไป พีแนทรีนจะพบสะสมที่ปากใบแต่ไม่พบสะสมในช่องว่างภายใน (inter cellular space) หลังจาก 24-48 ชั่วโมง จะพบพีแนทรีนสะสมในเซลล์อีพิเดอร์มิส (epidermis) โดยในผักขมพีแนทรีนจะสะสมในแวคิวโอล (vacuole) แต่ไม่พบในข้าวโพด หลังจากนั้นพีแนทรีนจะสะสมในเนื้อเยื่อชั้นล่าง (mesophyll) และเมื่อผ่านไป 12 วัน พีแนทรีนจะพบสะสมในท่อลำเลียงอาหาร (zylem) ของพืชทั้งสองชนิด ดังรูปที่ 2.2 ที่แสดงการดูดซึมโดยใบพืชจะแบ่งเป็น 2 แบบคือ ดูดซึมโดยแวกซ์ที่ผิวใบ และการดูดซึมโดยเซลล์พืช ดังรายงานของ Wang และคณะ (2008) ที่พบว่า พืชที่ปลูกตามท้องถนนพบ PAHs ที่แวกซ์ที่ผิวใบและเนื้อเยื่อชั้นของพืช (inner leaf tissues) ถึง 69.3 ± 64.6 และ 1.07 ± 0.2 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักใบไม้แห้ง และพืชในเขตมหาวิทยาลัยพบ PAHs ที่แวกซ์ที่ผิวใบและเนื้อเยื่อชั้นของพืชถึง 57.5 ± 52.6 และ 0.716 ± 0.2 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักใบไม้แห้ง

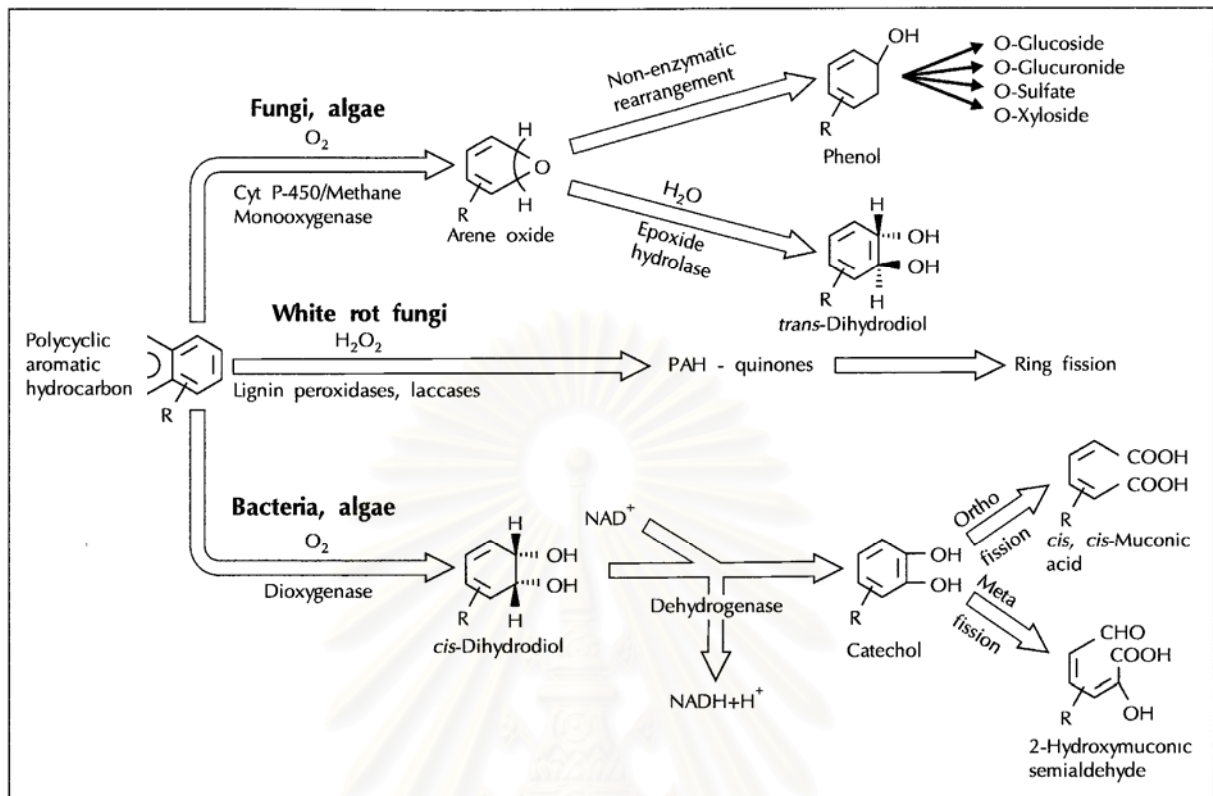
Lin และคณะ (2007) พบว่า ไบโฆ้วาโศดสามารถดูดซึบและสะสม อะซีแนพธึน ฟลูออรีน และพีแนนทรึนจากอากาศได้ ปริมาณของอะซีแนพธึนในอากาศจะสัมพันธ์กับปริมาณอะซีแนพธึนในสะสมในข้าวโศด งานวิจัยนี้ยังพบว่าอะซีแนพธึนสะสมที่ชั้นแวกซ์ที่ผิวไบ เนื้อเยื่อไบชั้นใน และลำต้น โดยอะซีแนพธึนที่พบสะสมที่ไบและลำต้นถึง 0.05 และ 0.17 ไมโครกรัม/กรัมไบไม้ ตามลำดับ



รูปที่ 2.2 พีแนนทรึน (สีฟ้า) ที่ถูกดูดซึบโดยไบข้าวโศด (ก) ชั้นแวกซ์ที่ผิวไบ (ข) ท่อลำเลียงอาหาร (Wild และคณะ, 2006)

2.5.3 การบำบัดทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์

การบำบัดทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา สาหร่าย เป็นการใช้ประโยชน์จากความรู้เรื่องวิธีการย่อยสลาย PAHs ของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ดังรูปที่ 2.3 โดยแบคทีเรียจะย่อยสลาย PAHs โดยการเติมออกซิเจนและใช้เอนไซม์ไดออกซิจีเนส (dioxygenase) ในขณะที่เชื้อราบางชนิดและสาหร่ายจะย่อยสลาย PAHs ด้วยการเติมออกซิเจนและใช้เอนไซม์ไซโตโครม พี-450 โมโนออกซิจีเนส (cytochrome P-450 monooxygenase) หรือเชื้อราบางชนิดจะย่อยสลาย PAHs ด้วยเอนไซม์แลคเคส (laccases) หรือเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (lignin peroxidases)



รูปที่ 2.3 วิธีการย่อยสลาย PAHs ของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Cerniglia, 1992)

Trejo และ Quintero (2000) ได้รายงานวิธีการบำบัดทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์ ได้แก่

Natural attenuation เป็นการนำจุลินทรีย์ในธรรมชาติมาบำบัดสารพิษที่ปนเปื้อน

Bioaugmentation เป็นการเติมจุลินทรีย์ที่ทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษ เพื่อให้เกิดการย่อยสลายสารพิษในบริเวณที่มีการปนเปื้อน แบบที่เรียนว่ามีบทบาทสำคัญในกระบวนการนี้ นอกจากการนำจุลินทรีย์แล้ว การปลูกพืชเพื่อบำบัดสารพิษก็เป็น Bioaugmentation ด้วย

Biostimulation มีการใช้สารอาหารหรือสารใดๆ ที่จะช่วยกระตุ้นการทำงานของจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีขึ้นหรือทำให้จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนได้มากขึ้น ส่วนใหญ่จะใช้ปุ๋ยหรือสารที่ช่วยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ บางครั้งสารพิษที่ปนเปื้อนในปริมาณน้อยๆ ก็สามารถช่วยในการกระตุ้นการทำงานของจุลินทรีย์หรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายได้

Bioventing คล้ายกับ Biostimulation แต่มีการให้ออกซิเจนเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ให้ดีขึ้นด้วย มักใช้ในการกำจัดสารพิษปนเปื้อนประเภทปิโตรเคมีออกจากดิน

Biofilters เป็นการกำจัดของเสียในอากาศจำพวกก๊าซอินทรีย์ โดยผ่านวัสดุที่มีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายก๊าซอินทรีย์ได้ติดอยู่ด้วย ใช้ในการกำจัดสารอินทรีย์ที่สามารถระเหยเข้าสู่อากาศ

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานว่าแบคทีเรียหลายชนิดสามารถย่อยสลาย PAHs ดังในตาราง 2.2 ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในดินหรือน้ำที่มีการปนเปื้อน PAHs ในขณะที่เดียวกันก็มีการรายงานว่า พืชและแบคทีเรียหลายชนิดมีกิจกรรมร่วมกันแล้วทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัด PAHs ได้ดีขึ้น เช่น Liste และคณะ (2000) พบว่าดินที่มีการปนเปื้อนของไพรีนเมื่อมีการปลูกพืช จะสามารถกำจัดไพรีนได้ถึง 74% แต่ดินที่ไม่มีการปลูกพืชสามารถกำจัดไพรีนได้เพียง 40% เท่านั้น และจาก Gao และคณะ (2006) พบว่าต้นข้าวที่ปลูกในนาข้าวที่มีการปนเปื้อนของ PAHs เมื่อเติมเชื้อ *Acinetobacter* sp. จะสามารถกำจัดพีแนทรีนได้ถึง 86-87% ใน 40 วัน โดยชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมเชื้อสามารถกำจัดพีแนทรีนได้เพียง 70-78% ใน 80 วัน

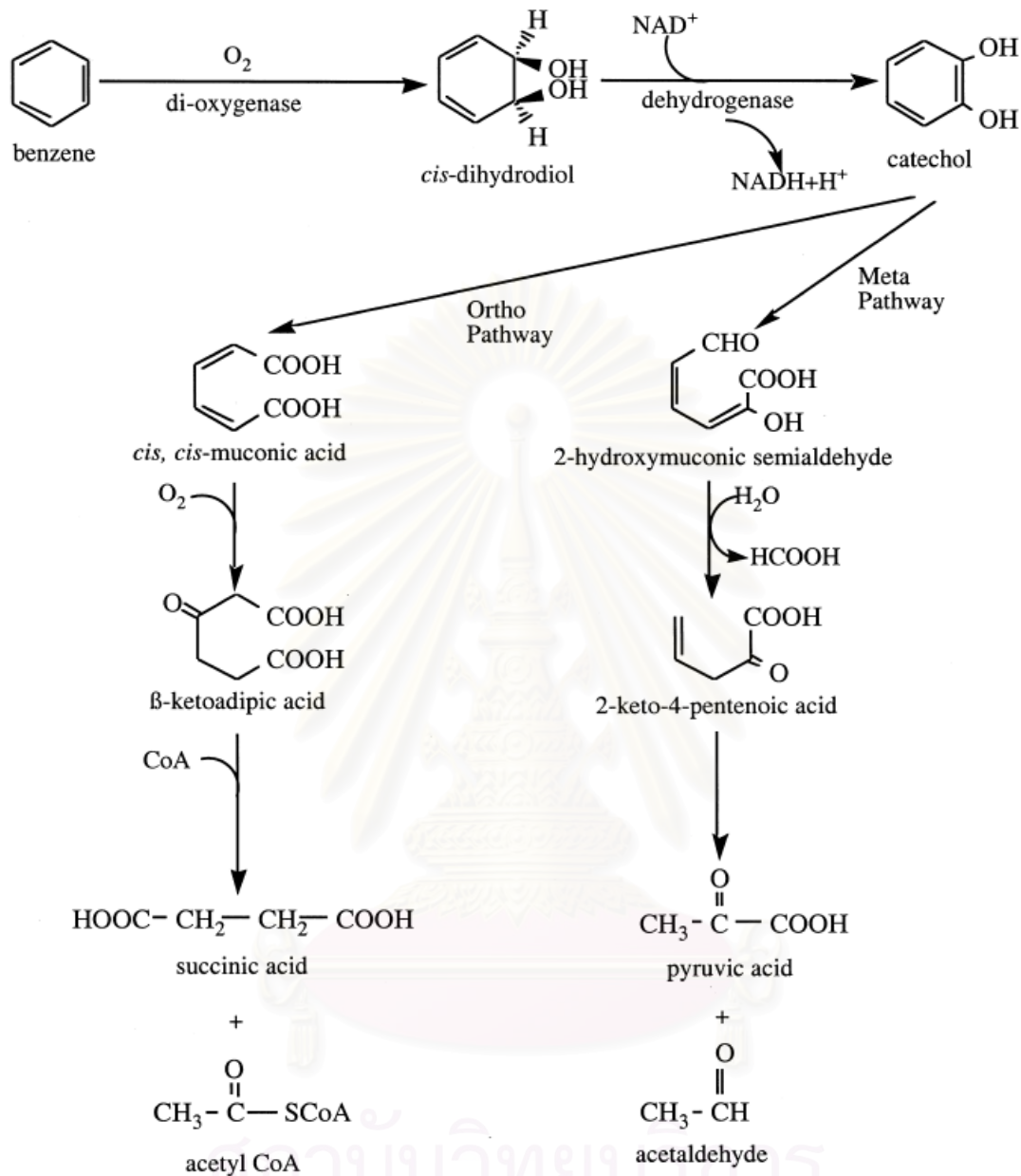
2.5.3.1 กระบวนการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรีย

กระบวนการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียส่วนใหญ่ จะเกิดในสภาวะมีออกซิเจน เริ่มต้นจากการเติมออกซิเจนให้กับโมเลกุลคาร์บอนที่เป็นพันธะคู่โดยเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาด้วยระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (multicomponent dioxygenase) ได้เป็นซิส-ไดไฮโดรไดออล (*cis*-dihydrodiol) จากนั้นเร่งปฏิกิริยาต่อโดยด้วยเอนไซม์ ซิส-ไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส (*cis*-dihydrodiol dehydrogenase) ได้เป็นสารอนุพันธ์ประเภทไดไฮดรอกซิล จากนั้นสารตั้งต้นที่คล้ายแคทีคอล (catechol) จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์เอ็กซ์ตราไดออลไดออกซิจีเนส (extradiol dioxygenase) ผ่านทางวิถีการแตกวงเบนซีนแบบ เมตา หรือจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ อินตราไดออลไดออกซิจีเนส (intradiol dioxygenase) ผ่านทางวิถีการแตกวงเบนซีนแบบ ออโร และเข้าสู่วัฏจักรกรดไทรคาร์บอกซิลิกต่อไป ดังรูปที่ 2.4 และได้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับแบคทีเรียในการเจริญเติบโต (Cerniglia และคณะ, 1995)

ตารางที่ 2.2 แบคทีเรียชนิดต่างๆที่รายงานว่าสามารถย่อยสลาย PAHs (Juhasz และคณะ, 2000)

PAHs	แบคทีเรียที่ย่อยสลายได้
แนฟธาลีน	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Alcaligenes denitricans</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>Sp. paucimobilis</i> , <i>Brevundimonas vesicularis</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Corynebacterium renale</i> , <i>Moraxella sp.</i> , <i>Streptomyces sp.</i> , <i>B. cereus</i> , <i>P. marginalis</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>P. saccharophila</i> , <i>Neptunomonas naphthovorans</i> , <i>Cycloclasticus sp.</i>
อะซีแนฟทีน	<i>Beijernickia sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>Bu. cepacia</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Cycloclasticus sp.</i> , <i>Neptunomonas naphthovorans</i> , <i>Alcaligenes eutrophus</i> , <i>Alcaligenes paradoxus</i>
แอนทราซีน	<i>Beijernickia sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>Sp. paucimobilis</i> , <i>Bu. cepacia</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Flavobacterium sp.</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>P. marginalis</i> , <i>Cycloclasticus sp.</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>Sp. yanoikuyae</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Gordona sp.</i> , <i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Cycloclasticus pugetii</i>
ไพรีน	<i>A. denitricans</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Sp. aucimobilis</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Gordona sp.</i> , <i>Sphingomonas sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>Bu cepacia</i> , <i>P. saccharophila</i>

PAHs	แบคทีเรียที่ย่อยสลายได้
พีแนนทรีน	<p><i>Aeromonas sp.</i>, <i>A. faecalis</i>, <i>A. denitricans</i>, <i>Arthrobacter polychromogenes</i>, <i>Beijernickia sp.</i>, <i>Micrococcus sp.</i>, <i>Mycobacterium sp.</i>, <i>P. putida</i>, <i>Sp. paucimobilis</i>, <i>Rhodococcus sp.</i>, <i>Vibrio sp.</i>, <i>Nocardia sp.</i>, <i>Flavobacterium sp.</i>, <i>Streptomyces sp.</i>, <i>S. griseus</i>, <i>Acinetobacter sp.</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>P. stutzeri</i>, <i>P. saccharophila</i>, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>, <i>Cycloclasticus sp.</i>, <i>P. fluorescens</i>, <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>, <i>Acidovorax delaeldii</i>, <i>Gordona sp.</i>, <i>Sphingomonas sp.</i>, <i>Comamonas testosteroni</i>, <i>Cycloclasticus pugetii</i>, <i>Sp. yanoikuyae</i>, <i>Agrobacterium sp.</i>, <i>Bacillus sp.</i>, <i>Burkholderia sp.</i>, <i>Sphingomonas sp.</i>, <i>Pseudomonas sp.</i>, <i>Rhodotorula glutinis</i>, <i>Nocardioides sp.</i>, <i>Flavobacterium gondwanense</i>, <i>Halomonas meridiana</i></p>
ไครซีน	<p><i>Rhodococcus sp.</i>, <i>P. marginalis</i>, <i>Sp. paucimobilis</i>, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>, <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>, <i>Agrobacterium sp.</i>, <i>Bacillus sp.</i>, <i>Burkholderia sp.</i>, <i>Sphingomonas sp.</i>, <i>Pseudomonas sp.</i>, <i>P. saccharophila</i></p>
เบนโซ[เอ] แอนทราซีน	<p><i>A. denitricans</i>, <i>Beijernickia sp.</i>, <i>P. putida</i>, <i>Sp. paucimobilis</i>, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>, <i>Agrobacterium sp.</i>, <i>Bacillus sp.</i>, <i>Burkholderia sp.</i>, <i>Sphingomonas sp.</i>, <i>Pseudomonas sp.</i>, <i>P. saccharophila</i></p>



รูปที่ 2.4 วิธีการย่อยสลาย PAHs ทั่วไปโดยจุลินทรีย์แบบใช้ออกซิเจน (Juhasz และคณะ, 2000)

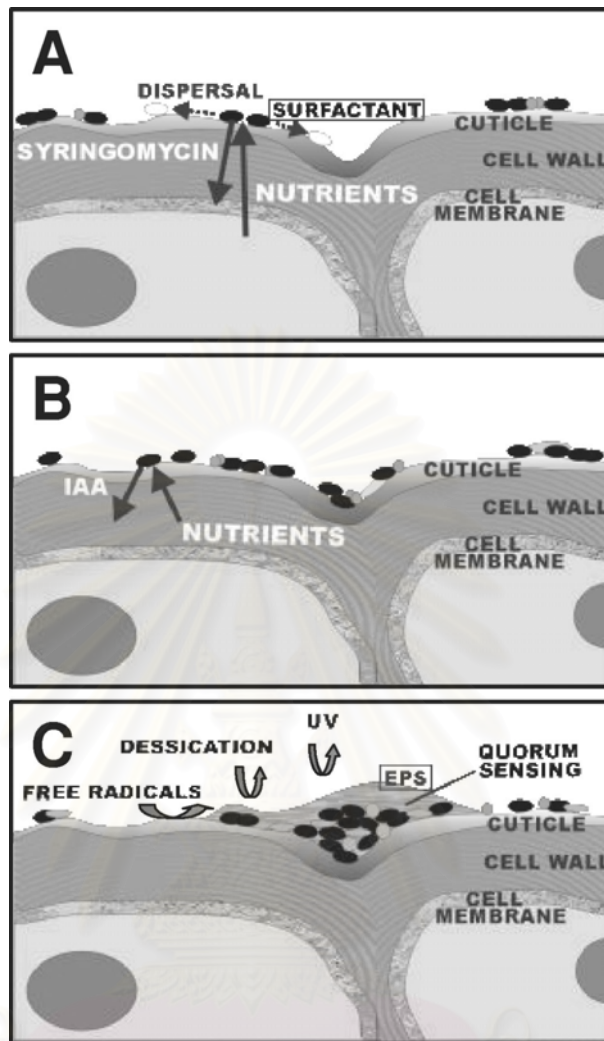
2.6 แบคทีเรียบนใบไม้ (phyllospere bacteria)

ใบไม้เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ สาหร่าย โปรโตซัว และนีมาโทด การศึกษากลุ่มแบคทีเรียบนใบไม้ด้วยวิธี DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ของ Yang และคณะ (2001) พบว่ากลุ่มแบคทีเรียจะคล้ายคลึงกันในพืชชนิดเดียวกัน แต่จะแตกต่างกันในพืชต่างชนิดกัน และกลุ่มแบคทีเรียบนใบไม้มีความซับซ้อนสูง และรายงานของ Steven และคณะ (2003)

พบว่าแบคทีเรียมีปริมาณมากที่สุดทั้งชนิดและจำนวน ถึง 10^6 - 10^7 เซลล์/ตารางเซนติเมตรใบไม้ และอาจพบถึง 10^8 เซลล์/กรัมใบไม้ โดยแบคทีเรียที่พบมีทั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคต่อต้นพืชและแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรค โดยปริมาณและชนิดของแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคจะมากกว่าแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคพืช และรายงาน Yadav และคณะ (2004) รายงานว่าจำนวนแบคทีเรียตามธรรมชาติบนใบพืช *Arbutus unedo* L. และ *Lavandula stoechas* L. คือ 1.3×10^4 CFU/กรัมใบไม้ และต้น *Melissa officinalis* L. และ *Calamintha nepeta* (L.) Savi คือ 1.3×10^5 CFU/กรัมใบไม้ ซึ่งจำนวนแบคทีเรียบนใบไม้จะเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา

2.6.1 ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียและใบไม้

จากรายงานของ Lindow และคณะ (2003) แบคทีเรียสามารถอาศัยอยู่บนใบไม้ได้หลายแบบ เช่น แบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* ที่อาศัยอยู่บนใบไม้จะสร้างสารไซริงโกไมซิน (syringomycin) ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นสารลดแรงตึงผิวเพื่อช่วยยึดแบคทีเรียกับใบไม้ แต่เป็นพิษต่อพืช ทำให้เซลล์พืชขับสารอาหารออกมาให้แบคทีเรียใช้ในการเจริญเติบโต ดังรูปที่ 2.4 A หรือ *Methylobacterium* spp. จะสามารถสร้างฮอร์โมนพืชพวกออกซิน ซึ่งจะช่วยให้พืชขับสารอาหารบางอย่างที่เป็นประโยชน์สำหรับแบคทีเรียออกมา ดังรูปที่ 2.4 B หรือแบคทีเรียบางชนิดสามารถขับสารพอลิแซ็กคาไรด์ เพื่อสร้างไบโอฟิล์ม เพื่อป้องกันแบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ดังรูปที่ 2.4 C ซึ่ง Yadav และคณะ (2005) รายงานว่าบนใบไม้มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่จำกัด แต่แบคทีเรียบนใบไม้ก็สามารถได้แหล่งอาหารจากที่อื่นมาทดแทน เช่น ละอองเรณู น้ำหวาน หรือบรรยากาศ เช่น PAHs ที่มาสะสมที่ใบ โดยจากรายงานเกี่ยวกับการปนเปื้อน PAHs ในอากาศ พบว่ามี PAHs ตกค้างในอากาศในปริมาณที่สูง ซึ่ง PAHs เหล่านี้สามารถเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับแบคทีเรียได้ ดังงานวิจัยของนุชนาฏ ทองธรรมชาติ (2550) ที่พบว่าแบคทีเรียบนใบโสม เติม และชบา สามารถย่อยสลายพีแนทรีนที่ตกค้างบนใบไม้ได้ และ Yadav ยังพบว่ากลุ่มแบคทีเรียบนใบไม้ในแถบเมดิเตอร์เรเนียน จะมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณชนที่ผิวใบ ปริมาณน้ำและฟอสฟอรัส ในขณะที่เดียวกันก็มีความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณสารฟีนอลิกที่ขับออกมาที่ผิวใบและความหนาของใบ ซึ่งใบไม้ก็เป็นแหล่งของแบคทีเรียที่น่าสนใจ ที่น่าจะมีแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ



รูปที่ 2.5 แบคทีเรียที่อาศัยอยู่บนใบไม้แบบต่างๆ (Lindow และคณะ, 2003)

2.6.2 การนำแบคทีเรียบนใบไม้มาบำบัดสารพิษในอากาศ

การนำแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับต้นพืช มาใช้ในการบำบัดสารมลพิษในอากาศเริ่มเป็นที่สนใจมากขึ้น เพราะแบคทีเรียช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสารพิษในอากาศ และ 90% ของการกำจัดสารพิษโดยต้นพืชจะเป็นเพียงการดูดซึม (Absorption) โดยต้นพืช ซึ่งสารพิษเหล่านี้จะไม่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างและความเป็นพิษ และอาจเกิดการหลุด (Desorption) ของสารพิษเหล่านี้ได้ แต่แบคทีเรียหลายชนิดสามารถกำจัดสารพิษด้วยการย่อยสลาย

De Kempeneer และคณะ (2003) ทำการทดลองพ่นเชื้อ *Pseudomonas putida* TVA8 บนต้น *Azalea indica* เพื่อบำบัดโทลูอีนในอากาศ (339 มิลลิกรัม/ลูกบาศก์เมตร) ในระบบปิด พบว่าสามารถ

กำจัดโพลูอินได้ 95% ในระยะเวลาเพียง 27 ชั่วโมง แต่ชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียต้องใช้เวลาจนถึง 75 ชั่วโมง

Orwell และคณะ (2004) ได้ศึกษาพบว่าแบคทีเรียในดินในกระถางที่ปลูกต้นไม้ มีบทบาทหลักในการกำจัดเบนซีนในอากาศได้ถึง 12-27 ppm ต่อวัน

Sandhu และคณะ (2007) ที่ทำการทดลองพ่นแบคทีเรียย่อยสลายฟินอล *Pseudomonas* sp. CF600 ให้กับใบต้นถั่วและข้าวโพด พบว่าฟินอลในอากาศสลายไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้มากถึงแปดเท่าเมื่อเทียบต้นพืชที่ไม่ได้รับการพ่นเชื้อ และพบว่าต้นถั่วและข้าวโพดที่ปลูกในบริเวณที่มีปริมาณสารอินทรีย์ในอากาศสูง ใบถั่วและข้าวโพดจะสามารถกำจัดฟินอลในอากาศได้มากกว่าใบถั่วและข้าวโพดที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ แสดงว่าจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติบนใบสามารถย่อยสลายฟินอลได้

อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับการบำบัด PAHs ในอากาศโดยแบคทีเรียบนใบไม้ยังไม่มีผู้ศึกษาน้อย จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ความรู้สำหรับการปรับปรุงคุณภาพอากาศต่อไป ในปัจจุบันการศึกษาที่เกี่ยวข้องมีเพียงการย่อยสลายพีแนทรีนหลังจากที่ตกสะสมบนใบไม้ เช่น Waight (2005) พบว่าแบคทีเรียตามธรรมชาติบนใบเข็มในประเทศไทย สามารถย่อยสลายพีแนทรีนที่ตกค้างบนใบได้ และจำแนกได้ว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Rhizobium* และ *Deinococcus* การศึกษาต่อมาโดย นุชนาฏ ทองธรรมชาติ (2550) พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายพีแนทรีนบนใบไม้มีค่าแตกต่างกันตามชนิดของไม้ประดับ ในขณะที่เดียวกันพบว่าใบไม้มีจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายพีแนทรีนมากที่สุดและมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดพีแนทรีนที่ความเข้มข้น 20 และ 50 mg/kg ของใบไม้ นอกจากนี้พบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายพีแนทรีนสูงขึ้นตามจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายพีแนทรีนที่พบบนใบ

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนใบไม้เพิ่มเติม โดยเฉพาะจงที่การย่อยสลาย PAHs ในอากาศชนิดต่างๆ ได้แก่ อะซีแนพทิลีน อะซีแนพทีน ฟลูออรีน และพีแนทรีน ซึ่ง PAHs ชนิดที่เลือกมาใช้ศึกษานี้ พบสะสมปริมาณมากในอากาศบนท้องถนนของกรุงเทพมหานคร (Oanh และคณะ, 2000; Garivait และคณะ, 2000; Norramit และคณะ, 2005; Chang และคณะ, 2006; Boonyatumanond และคณะ 2007) นอกจากนี้ได้จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง และศึกษาวิธีเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยสลาย PAH ของแบคทีเรียบนใบไม้โดยการให้ปุ๋ยทางใบพืช

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์

1. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร บริษัท Nigro, Thailand
2. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 บริษัท Decan Ultrasonics, England
3. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 บริษัท New Brunswick Scientific, USA
4. เครื่องชั่ง รุ่น P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
5. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น MIKRO20 บริษัท Hettich, Germany
8. เครื่องตรวจสอบเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000™ บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
9. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer, USA และ รุ่น MJ Mini™ Personal Thermal Cycler บริษัท Biorad, USA
10. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) บริษัท Kakusan, Japan
11. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu, Japan
12. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 บริษัท Corning, USA
13. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดความกว้างรู 0.2 ไมโครเมตร บริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan
14. ชุดเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC)
เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น 6890N บริษัท Agilent Technologies, USA
คอลัมน์ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วย เฟนนิล เมทิล ซิโลเซน ความเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร
เครื่องตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID)

15. ชุดเข็มเก็บตัวอย่างสารระเหยในอากาศ Solid Phase MicroExtraction (SPME) บริษัท SUPELCO Inc., USA
16. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO รุ่น BV-124 บริษัท International Scientific supply Co., Ltd., Thailand
17. ตู้เขี่ยเชื้อ Bosstech รุ่น HVB 120S บริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand
18. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80°C รุ่น ULT1786 บริษัท Forma Scientific, USA
19. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20°C รุ่น MDF-U332 บริษัท Sanyo Electric, Japan
20. ตู้ป่นเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE800, Germany
21. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany
22. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
23. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20, 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf AG, Germany
24. ไมโครปิเปตขนาด 10 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
25. ไมโครปิเปตชนิด 8 หัวจ่าย ขนาด 200 ไมโครลิตร รุ่น BPE-200 บริษัท Labnet International Inc., USA
26. ไมโครไตเตอร์เพลต (96 well polystyrene microtiter plate) ชนิดกันแบน บริษัท Corning Incorporated, USA
27. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงของ 96 well-plate (96 well-plate reader) รุ่น EL_x800 บริษัท BIO-TEK Instruments, Inc., USA
28. เครื่องผสมสาร (compact Rocker) รุ่น CR300 บริษัท Finemould precision. Ind. Co., Korea
29. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น digital water bath SB-1000 บริษัท Eyla, Japan
30. ชุดเครื่องเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส mini Gel migration trough รุ่น i-mupid บริษัท COSMO BIO, Japa
31. หัวกรองสำเสร็จรูป ขนาดความกว้างรู 0.20 ไมโครเมตร บริษัท Corning Incorporated, Germany

เคมีภัณฑ์

1. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
2. กลูโคส (glucose) บริษัท Merck, Germany
3. ทริปโตเน (tryptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
5. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Carlo ERBA, France
6. ไดแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท Merck, Germany
7. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
8. แคลเซียมไนเตรต ($Ca(NO_3)_2$) บริษัท Merck, Germany
9. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) บริษัท Merck, Germany
10. เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) บริษัท Merck, Germany
11. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) บริษัท Merck, Germany
12. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) บริษัท Merck, Germany
13. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
14. เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) บริษัท Merck, Germany
15. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia
16. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
17. แบคโตอะการ์ (bacto agar) บริษัท Difco, USA.
18. กลีเซอรอล (glycerol) บริษัท Research organics, Inc., USA
19. ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) บริษัท Sigma, USA
20. อะซีแนพทิลีน (acenaphthylene) บริษัท Sigma, USA
21. อะซีแนพทีน (acenaphthene) บริษัท Sigma, USA
22. ฟลูออแรนทีน (fluoranthene) บริษัท Kanto Chemical Co., INC, Japan
23. ฟลูออรีน (fluorene) บริษัท Kanto Chemical Co., INC, Japan
24. ไพรีน (pyrene) บริษัท Sigma, USA
25. แอนทราซีน (anthracene) บริษัท Sigma, USA
26. เบนโซ[เอ]ไพรีน (benzo(a)pyrene) บริษัท Sigma, USA
27. เมทานอล (CH_3OH) บริษัท Merck, Germany
28. นอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) บริษัท Merck, Germany
29. ไดเมทิลฟอร์มามาไมด์ (dimethyl formamide, DMF) บริษัท BIOBASIC, INC., USA

30. อะกาโรสเจล (agarose gel) บริษัท IUI, Japan
31. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany
32. 100 base pair DNA ladder บริษัท New England Biolabs, USA และ บริษัท Fermentas, USA
33. ไอโซโพรพานอล (isopropanol) บริษัท Merck, Germany
34. ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ [Phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1)] บริษัท USB, USA
35. อาร์เอ็นเอส เอ (Ribonuclease A, Rnase A) บริษัท Promega, USA
36. ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส (1 kilobase DNA ladder) บริษัท Bio-Rad, UK และ บริษัท Fermentas, USA
37. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) บริษัท Nacal tesque, Japan
38. ซุดเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* บริษัท Promega, USA
39. ทริสมา เบส {Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)} บริษัท Sigma, USA
40. เอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิด (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Sigma, USA
41. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS), ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3$) บริษัท Nacal tesque, Japan
42. โปรตีนเอส เค (Proteinase K) บริษัท US. Biological, USA
43. เอ็กซ์ กอล (X-gal, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) บริษัท BIO BASIC INC., Canada
44. ไอโซโพรพิล ไธโอ เบต้า ดี กาแลกโตไซด์ (Isopropyl thio- β -D-galactoside, IPTG) บริษัท BIO BASIC INC., Canada
45. ชุด Tag PCR Master Mix kit บริษัท Qiagen, Germany
46. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit บริษัท Qiagen, Germany
47. ชุด PCR purification kit QIAquick PCR purification kit บริษัท Qiagen, Germany
48. ชุด PCR cloning kit pGEM-T Easy Vector System II บริษัท Promega, USA
49. สาร cell proliferation reagent WST-1 บริษัท Roche, USA
50. กระดาษกรอง (filter paper) บริษัท Advantec, Japan
51. ฝาอะลูมิเนียมขนาด 20 มิลลิเมตร (20 mm Aluminum Crimp Seals) บริษัท National Scientefic, USA

52. เซฟตัม Teflon/silicone บริษัท National Scientific, USA

53. สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค DGGE บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA

ฟอร์มามาไมด์ ([Formamide (Deionized)])

สารละลาย 40% อะคริลาไมด์/บิส (40% Acrylamide/Bis solution, 37.5:1)

ยูเรีย (Urea)

แอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate)

N,N,N',N'-เททระ เมทิล เอทิลีนไดเอมีน (N,N,N',N'-Tetra-methyl-

ethylenediamine, TEMED)

ทีเออี เข้มข้น 50 เท่า (50xTAE)

สีติดตาม (Dye solution)

เอทิดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide solution) เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนผังของงานวิจัย



วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียที่ย่อยสลาย อะซีแนพติลิน อะซีแนพทิน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธิน พีแนนทริน แอนทราซีน ไพรีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน บนใบโมก

3.1.1 เก็บตัวอย่างใบโมก

เก็บใบโมกจากถนนพญาไท บริเวณหน้าคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีการจราจรหนาแน่น ทำให้อาจจะมีการปนเปื้อนของ PAHs หลายชนิดในอากาศสูง (Boonyatumanond และคณะ, 2007; Panther และคณะ, 1999) การเลือกเก็บใบโมกจะเก็บแบบสุ่ม ในตอนเช้า เลือกใบที่มีสีเขียวสด เจริญเติบโตเต็มที่ และไม่มีร่องรอยการติดโรคพืช หรือการกัดแทะของศัตรูพืช ใบโมกที่เก็บจะนำไปวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ตามข้อ 3.1, นับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ตามข้อ 3.2 และศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการกำจัด PAHs ในอากาศ ในขวดทดลอง ตามข้อ 3.3

3.1.2 สกัดแบคทีเรียจากใบโมก

สกัดแบคทีเรียจากใบไม้ตามวิธีของ Lambais และคณะ (2006) โดยนำใบโมกจากข้อ 3.1.1 น้ำหนัก 10 กรัม แช่ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 โมลาร์, pH 7.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที นาน 30 นาที และเขย่าด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง นาน 10 นาที เพื่อให้แบคทีเรียหลุดจากใบโมก จากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบ นาน 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมอาหารเหลว CFMM (ภาคผนวก ก) จนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารแขวนลอยแบคทีเรียที่ได้ นำไปวิเคราะห์ชนิดแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ตามข้อ 3.1.3-3.1.9.6 และนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ด้วยวิธี Most Probable Number (MPN) ตามข้อ 3.2

3.1.3 เพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่ย่อยสลาย อะซีแนพติลิน อะซีแนพทิน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธิน พีแนนทริน แอนทราซีน ไพรีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน

นำสารละลายแบคทีเรียจากข้อ 3.1.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมในอาหารเหลว CFMM 90 มิลลิลิตร จากนั้นเติม อะซีแนพติลิน อะซีแนพทิน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธิน พีแนนทริน แอนทราซีน ไพรีน หรือเบนโซ[เอ]ไพรีน ในไดเมทิลฟออร์มาไมด์ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm (ภาคผนวก ข) เพียง 1 ชนิด ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ppm เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรีย นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 สัปดาห์

3.1.4 สกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Tsai และ Olson (1991) โดยนำอาหารเหลว CFMM จากข้อ 3.1.3 ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งจนเกือบหมด เทสารละลายตะกอนแบคทีเรียที่เหลือใส่ในหลอดไมโครพิวล์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งจนหมด เติมบัฟเฟอร์ สำหรับสกัด (DNA extraction buffer) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมโปรตีนเนสเค (proteinase K) 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติม 20% SDS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แต่ทุก 20 นาที จะต้องมาผสมสารในหลอดไมโครพิวล์ เพื่อไม่ให้เซลล์แบคทีเรียตกตะกอน หลังจากนั้นนำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำมาละลายที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ทำการเยือกแข็ง-ละลายซ้ำอีก 2 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

เก็บส่วนน้ำใสใส่หลอดไมโครพิวล์ใหม่ ตกตะกอนโปรตีนด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Phenol-chloroform-isoamyl alcohol, 24:24:1) โดยเติมฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของส่วนน้ำใส ผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ นาน 1-2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใส ใส่หลอดไมโครพิวล์ใหม่ ทำซ้ำอีกครั้ง หรือจนกว่าจะไม่มีตะกอนโปรตีน

เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 0.8 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใส ผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ จนกว่าจะเห็นเส้นใยขาวๆ หรือทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ระบายเอทานอลออกจากดีเอ็นเอให้แห้ง โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ที่ผสมกับ RNase A ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.1.5 ตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยวิธี Gel Electrophoresis

เตรียมวุ้นความเข้มข้น 1% โดยชั่งผงวุ้นหนัก 1 กรัมละลายใน 100 มิลลิลิตร บัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 1 เท่า นำไปหลอมด้วยไมโครเวฟประมาณ 2-3 นาที ทิ้งให้สารละลายเย็นลง จนเหลืออุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทลงในภาชนะที่มีหัวเสียบอยู่ ปล่อยให้วุ้นแข็งตัวประมาณ 60 นาที วางแผ่นวุ้นลงในแทมเบอร์ เทปบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ให้ท่วมแผ่นวุ้นประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ผสมสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร กับสตีติดตาม (6X loading dye) 1 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) บนแผ่นพาราฟิล์ม หยอดลงในหลุมบนแผ่นวุ้น โดยหลุมแรกให้หยอดด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส (1 kb DNA marker) จากนั้นเปิดสวิทซ์ให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านแผ่นวุ้นและบัฟเฟอร์ TAE โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) นาน 15 นาที นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ด้วยเครื่องตรวจสอบเจล (Gel Documentation system)

3.1.6 ทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

เตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.9% โดยชั่งอะกาโรสผงหนัก 0.9 กรัมละลายใน 100 มิลลิลิตร บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า นำไปหลอมด้วยไมโครเวฟประมาณ 2-3 นาที เทลงในภาชนะที่มีหัวเสียบอยู่ ปล่อยให้วุ้นแข็งตัวประมาณ 60 นาที วางแผ่นอะกาโรสเจลลงในแทมเบอร์ เทปบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ให้ท่วมแผ่นอะกาโรสเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ผสมสารละลายดีเอ็นเอทั้งหมดกับสตีติดตาม หยอดลงในหลุมบนแผ่นวุ้น โดยหลุมแรกให้หยอดด้วย 1 kb DNA marker จากนั้นเปิดสวิทซ์ให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านแผ่นอะกาโรสเจลและบัฟเฟอร์ TAE โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมดีเอ็นเอด้วย สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่องตรวจสอบเจล

ตัดชิ้นอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ

3.1.7 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

3.1.7.1 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 3.1.6 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260} ต่อ A_{280} โดยหากอัตราส่วนที่ได้มีค่า

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Gel Electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้น 2% โดยซึ่งผงน้ำหนัก 2 กรัมละลายใน 100 มิลลิลิตร บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ทำตามวิธีในข้อ 3.1.5 แต่เปรียบเทียบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 เบสเพอร์ (100 bp DNA ladder)

3.1.8 วิเคราะห์ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

ใช้อุปกรณ์ของ DCode™ system (Biorad, USA) ในการวิเคราะห์ DGGE โดยเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 8% ที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 10-70% จากสารละลาย denaturant 0% และ 100% (ภาคผนวก ข) ซึ่งทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant โดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ เมื่อทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant ลงในชุดแซนวิชเตรียมเจลแล้ว เสียบหัวลงไประหว่างกระจกแซนวิช ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทั้งข้างคั้นให้พอลิอะคริลาไมด์แข็งตัว นำชุดเจลแซนวิชใส่ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 7 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนจนอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ผลผลิตผลิตภัณฑ์ PCR ทั้งหมดกับสีติดตาม หยอดลงในช่องวิ่ง จากนั้นเปิดสวิตซ์ให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านชุดเจลแซนวิชและบัฟเฟอร์ TAE จากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้ความต่างศักย์ 130 โวลต์ นาน 5 ชั่วโมง ย้อมดีเอ็นเอด้วย สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร นาน 15 นาที นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่องตรวจสอบเจล

3.1.9 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ขึ้นดีเอ็นเอเด่นจากโปรไฟล์ของ DGGE

3.1.9.1 เพิ่มจำนวนขึ้นดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน

ตัดชิ้นพอลิอะคริลาไมด์เจลบริเวณแถบดีเอ็นเอเด่นใส่ลงในหลอดไมโครพิพพ์ เติม TE buffer 20 ไมโครลิตร แซนวิชเจลไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 1-2 วัน เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายออกมาจากเจลให้มากที่สุด เพิ่มจำนวนขึ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยา ตามข้อ 3.1.7.2 แต่ไพรเมอร์ PRBA338F ไม่ต้องมี GC clamp เชื่อมต่อบริเวณ 5' และใช้ปริมาณใช้สารละลายดีเอ็นเอตั้งต้น 5 ไมโครลิตร จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

- | | |
|------------------------------|--|
| 1. Initial denaturation step | อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส นาน 52 นาที |
| 2. Denaturation step | อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที |
| 3. Annealing step | อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที |
| 4. Extension step | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที |

5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ

6. Final extension

อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Gel Electrophoresis ใช้วุ้นความเข้มข้น 2% โดยตั้งผงวุ้นหนัก 2 กรัมละลายใน 100 มิลลิลิตร บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ทำตามวิธีในข้อ 3.1.5 แต่เปรียบเทียบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 เบสแพร์ และทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีในข้อ 3.1.6

3.1.9.2 โคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR

นำสารละลายผลิตภัณฑ์ PCR จากข้อ 3.1.9.1 มาไลเกตเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy Vector System II (Promega, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือในไมโครพิวจ์ โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังนี้

2X ไลเกชันบัฟเฟอร์	5	ไมโครลิตร
เวกเตอร์ pGEM-T Easy Vector System II (50 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
สารละลายผลิตภัณฑ์ PCR จากข้อ 3.3.7.1	3	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (3 หน่วยต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	<u>10</u>	ไมโครลิตร

ทำการไลเกชันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บสารละลายไลเกชันที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.1.9.3 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 และคัดเลือกทรานสฟอร์มเม้นท์ (transformant) ที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ

การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์โดยวิธี Calcium chloride (Sambrook และ Russell, 2001) โดยลงเชื้อ *E. coli* JM109 ที่ยังไม่ผ่านการทรานสฟอร์ม บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Ψ b (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง เลือกลูกเชื้อโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* JM109 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Ψ b (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จนกระทั่ง OD_{600} มีค่าเท่ากับ 0.3-0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปยังอาหารเหลว Ψ b (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน arm flask นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่ง OD_{600} มีค่า

เท่ากับ 0.5 เมื่อเซลล์เจริญจนถึงค่า OD₆₀₀ ที่ต้องการ ให้ถ่ายเชื้อลงในขวดเซนตริฟิวจ์ 250 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ จากนั้นแช่น้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ต้องทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสตลอดเวลา) เทสารละลายส่วนน้ำใส่ทิ้ง เติมสารละลาย Tfb I (ภาคผนวก ข) ที่เย็น ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์ เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นแช่น้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทสารละลายส่วนน้ำใส่ทิ้ง เติมสารละลาย Tfb II (ภาคผนวก ข) ที่เย็น ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์อีกครั้ง เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นแช่น้ำแข็งนาน 15 นาที หรือมากกว่านั้น แบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่เย็น ปริมาตรหลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บคอมพีเทนต์เซลล์ไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 ด้วยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) โดยนำคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส มาแช่ในน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ ไม่เกิน 10 นาที เติมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไลเกตไว้แล้วจากข้อ 3.1.9.2 ปริมาตร 2-4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในน้ำแข็งนาน 30 นาที ทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 2 นาที แล้วเติมอาหารเหลว SOC (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 950 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 2 ชั่วโมง

คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ ด้วยวิธี Blue/White selection ((Sambrook และ Russell, 2001) ทำโดยนำสารละลายเซลล์ *E. coli* JM109 ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงอาหารแข็ง LB ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) เข้มข้น 2% (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) เข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์ หลังจากเกลี่ยเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง เก็บเชื้อ *E. coli* JM109 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.1.9.4 สักตริคอมบิแนนท์พลาสมิด

สักตริคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยชุดสกัดพลาสมิด QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ

ตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยวิธี Gel Electrophoresis ใช้วุ้นความเข้มข้น 1% โดยซึ่งผงวุ้นหนัก 1 กรัมละลายใน 100 มิลลิลิตร บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ทำตามวิธีในข้อ 3.1.5

3.1.9.5 ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่สกัดแทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังนี้

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy	1	ไมโครลิตร
10X บัฟเฟอร์	1	ไมโครลิตร
เอนไซม์ <i>EcoRI</i>	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	7	ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	<u>10</u>	ไมโครลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนผสมของปฏิกิริยาทั้งหมด (10 ไมโครลิตร) มาตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่สกัดแทรก ด้วยวิธี Gel Electrophoresis ใช้วุ้นความเข้มข้น 1% โดยซึ่งผงวุ้นหนัก 1 กรัมละลายใน 100 มิลลิลิตร บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ทำตามวิธีในข้อ 3.1.5 เปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่สกัดแทรกกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส

3.1.9.6 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่งดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย ผ่านทางบริษัท Ward Medic Ltd., Part โดยบริษัทนี้ใช้ระบบ LI-COR[®] NEN 4200 Global IR2 DNA Sequencing และเครื่อง ABI[®] PRISM DNA Sequencing ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ M13R (5' GGATAACAATTTTCACACAGG 3') ซึ่งจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pGEM-T Easy

เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแล้ว นำไปวิเคราะห์ลำดับเบสและจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank ใช้โปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.2 นับจำนวนแบคทีเรียบนใบโมกโดยวิธี Most Probable Number (MPN)

3.2.1 นับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

การนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบนใบไม้ ใช้อาหารเหลว NA ที่เพิ่มกลีเซอรอล เพื่อจำลองสภาวะให้คล้ายคลึงกับผิวใบไม้ที่ประกอบด้วยไขมัน (แว็กซ์) และให้แบคทีเรียทั้งหมดในกลุ่ม Heterotroph สามารถเจริญได้ (Yadav และคณะ, 2005) (ภาคผนวก ก) โดยเติมอาหารเหลว NA ที่เพิ่มกลีเซอรอลปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลุมไมโครไตเตอร์เพลต (96 well polystyrene microtiter plate) ชนิดกันแบน เติมน้ำสารละลายแบคทีเรียจากข้อ 3.1.2 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในหลุมแรกของไมโครไตเตอร์เพลต ผสมสารให้เข้ากัน ทำให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} เท่า จากนั้นดูดสารละลาย 20 ไมโครลิตร เติกลงในหลุมถัดไปที่มีอาหารเหลว NA ที่เพิ่มกลีเซอรอล 200 ไมโครลิตร ทำให้ได้ความเข้มข้น 10^{-2} ทำเช่นเดียวกันนี้จนได้ความเข้มข้นที่ 10^{-7} ทำซ้ำ 3 ชุดทดลอง จากนั้นปิดด้านบนของฝาไมโครไตเตอร์เพลตด้วยกระดาษทิชชูที่เปียกน้ำ แล้วห่อด้วยพลาสติกใสเพื่อป้องกันน้ำในอาหารระเหยออก บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทั้ง 3 ชุดทดลอง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมอาหารเหลว NA ที่เพิ่มกลีเซอรอล แต่ไม่ได้เติมน้ำสารละลายแบคทีเรีย นำค่าของ 3 ชุดทดลอง ใน 3 ระดับความเข้มข้น ไปเทียบกับตาราง MPN จะได้จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

3.2.2 นับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs

นับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ตามวิธีของ Johnsen และคณะ (2002) โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็น PAHs ชนิดต่างๆ ในอาหารเหลว CFMM และบ่มเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อให้แบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs เท่านั้นที่เจริญได้ โดยเติมน้ำสารละลาย อะซีแนฟลิคีน อะซีแนฟริน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธิน พีแนนทริน แอนทราซีน ไพรีน หรือเบนโซ[เอ]ไพรีน ที่ละลายในเฮกเซน เพราะเฮกเซนระเหยได้ง่าย ความเข้มข้น 5,000 ppm (ภาคผนวก ข) เพียง 1 ชนิด ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุมไมโครไตเตอร์เพลต เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน วางทิ้งไว้ที่ตู้ดูดควัน ประมาณ 60 นาที หรือจนเฮกเซนระเหยออกไปหมด เติมน้ำอาหารเหลว CFMM 200 ไมโครลิตร เติมน้ำสารละลายแบคทีเรียจากข้อ 3.1.2 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในหลุมแรกของไมโครไตเตอร์เพลต ผสมสารให้เข้ากัน ทำให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} เท่า จากนั้นดูดสารละลาย 20 ไมโครลิตร เติกลงในหลุมถัดไปที่มีอาหารเหลว CFMM 200 ไมโครลิตร ทำให้ได้ความเข้มข้น 10^{-2} ทำเช่นเดียวกันนี้จนได้ความเข้มข้นที่ 10^{-6} ทำซ้ำ 3 ชุดทดลอง จากนั้นปิดด้านบนของฝาไมโครไตเตอร์เพลต ด้วยกระดาษทิชชูที่เปียกน้ำ แล้วห่อด้วยพลาสติกใสเพื่อป้องกันน้ำในอาหารระเหยออก บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

เติมสารละลายอิเล็กตรอนโดเนอร์ (Electron donor solution) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) และเติมสาร cell proliferation reagent WST-1 (Roche, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลุมไมโครไตเตอร์เพลต นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ประมาณ 7-12 ชั่วโมง หรือจนเกิดสีเหลือง นำไปวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 450 และ 540 นาโนเมตร (A_{450} และ A_{540}) A_{450} เป็นความยาวคลื่นที่สาร cell proliferation reagent WST-1 ดูดกลืนได้มากที่สุด และ A_{540} เป็นความยาวคลื่นที่สาร cell proliferation reagent WST-1 ดูดกลืนได้น้อย คำนวณค่า A_{450} ลบ A_{540} เปรียบเทียบชุดควบคุมอาหารเหลว CFMM แต่ที่ไม่ได้เติมสารละลายแบคทีเรีย นำค่าของ 3 ชุดทดลอง ใน 3 ระดับความเข้มข้น ไปเทียบกับตาราง MPN จะได้จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

3.3 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียไบโอมอกที่สามารถกำจัด อะซีแนพทีลิน อะซีแนพทีน ฟลูออรีน และ พีแนนทรินในอากาศในขวดทดลอง

เป็นการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับประสิทธิภาพของแบคทีเรียไบโอมอกในการกำจัด PAHs 4 ชนิดได้แก่ อะซีแนพทีลิน อะซีแนพทีน ฟลูออรีน และพีแนนทริน ในอากาศ เนื่องจากมี PAHs เหล่านี้มีรายงานว่าปนเปื้อนในอากาศตามท้องถนน (Chang และคณะ, 2006) และอากาศภายในตัวอาคาร (Liu และคณะ, 2001) โดยใช้ไบโอมอกจากข้อ 3.1.1 ทำการทดสอบในขวดทดลองขนาดเล็ก 60 มิลลิลิตร โดยเติม PAHs ในกระดาศกรองที่ติดอยู่ด้านข้างขวด และทิ้งไว้ให้ PAHs ระเหยอยู่ในรูปก๊าซภายในขวดทดลอง

3.3.1 วิธีคำนวณความเข้มข้นของ PAHs ในหน่วย ppmV

เนื่องจากการศึกษาสารพิษในอากาศ จึงจำเป็นต้องคำนวณความเข้มข้นต่อปริมาตรอากาศ (ppmV) โดยคำนวณจากวิธีของ Tillman (2005)

$$ppmV = \frac{mg}{L} \times (10^3) \times \frac{Mass_{contaminant} [g]}{MolecularWeight_{contaminant} [g/mole]} \times 8.3144 \left[\frac{L \cdot kPa}{mol \cdot K} \right] \times T_{air} [K] \times \frac{1}{P_{air} [kPa]}$$

เมื่อ

$$ppm = \frac{mg}{L}$$

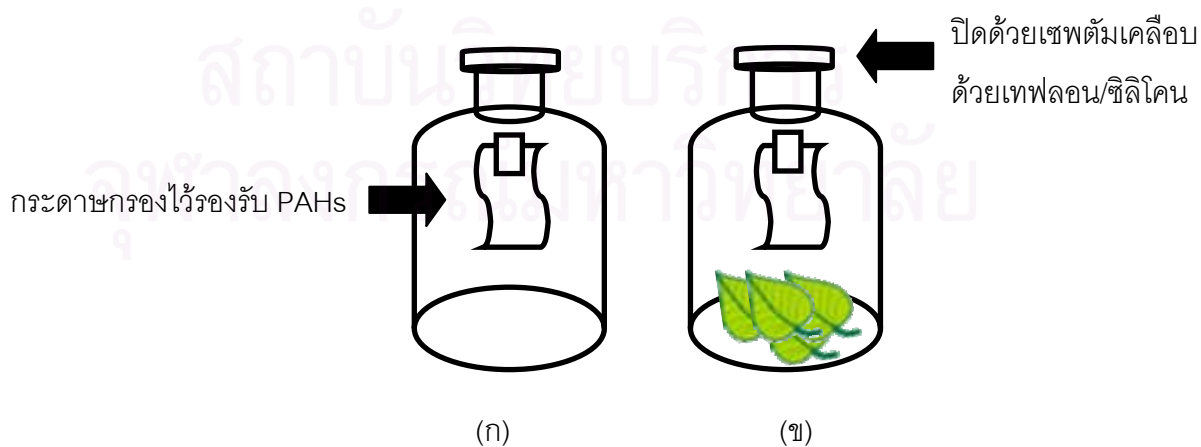
$$T_{air} [K] = 298.15$$

$$P_{air} [kPa] = 101.325$$

3.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนใบไมกในการกำจัด อะซีแนพธิน อะซีแนพธิน ฟลูออรีน และ พีแนนทรินในอากาศในขวดทดลอง

นำตัวอย่างใบไมกจากข้อ 3.1.1 บรรจุในขวดทดลอง (serum vial) ขนาด 60 มิลลิตรที่ภายในแปะกระดาษกรองขนาด 1x2 เซนติเมตร ไว้รองรับ PAHs ดังรูปที่ 3.1 ที่ด้านข้างขวดทดลอง แบ่งเป็น 3 ชุดทดลอง เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัด PAHs ของใบไมกแบบต่างๆ ดังนี้

- ชุดทดลองที่ 1 ใบไมกแห้ง โดยนำตัวอย่างใบไมกมาผ่านการฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วย 0.2% ทวิน 80 เป็นเวลา 3 นาที, 5% โซเดียมไฮโปคลอไรด์ เป็นเวลา 3 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้ออย่างน้อย 1 นาที จำนวน 3 ครั้ง ใบไมกที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อทดสอบการกำจัด PAHs ในอากาศโดยใบไมกแห้ง
- ชุดทดลองที่ 2 ใบไมกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ผิวใบ ด้วย 0.2% ทวิน 80 เป็นเวลา 3 นาที, 5% โซเดียมไฮโปคลอไรด์ เป็นเวลา 3 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้ออย่างน้อย 1 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำมากระเหยน้ำส่วนเกินที่ผิวใบ ในตู้ดูดควัน ประมาณ 30 นาที (Sandhu และคณะ, 2007) เพื่อทดสอบการกำจัด PAHs ในอากาศ โดยใบไมกและเมตาบอไลซึมของใบไมกที่ไม่มีแบคทีเรีย
- ชุดทดลองที่ 3 ใบไมกตามธรรมชาติ เพื่อทดสอบการกำจัด PAHs ในอากาศ โดยใบไมกและแบคทีเรียบนใบ



รูปที่ 3.1 ขวดทดลองขนาด 60 มิลลิลิตร ปิดด้วยเซพตัมที่เคลือบด้านล่างด้วยเทฟลอน/ซิลิโคน (Teflon/Silicone) และผนึกด้วยฝาอะลูมิเนียม ภายในมีกระดาศกรงขนาด 1x2 เซนติเมตร (ก) ชุดควบคุมที่ไม่ได้บรรจุไบโอม (ข) ชุดทดลองที่บรรจุไบโอมน้ำหนัก 0.5 กรัม

ซึ่งไบโอมแต่ละชุดทดลองหนัก 0.5 กรัม ใส่ขวดทดลอง 60 มิลลิลิตร ซึ่งมีกระดาศกรง นำสารละลายผสมอะซีแนพธิลีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน และ พีแนนทริน ในเมธานอล มาทำการเจือจางที่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อลดปริมาณเมธานอลที่จะระเหยอยู่ในอากาศ จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1760 ppm ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมนกระดาศกรง เพื่อได้ PAHs ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 400 ppmV ของอากาศภายในขวดทดลอง ปิดฝาขวดด้วยเซพตัมที่เคลือบด้านล่างด้วยเทฟลอน/ซิลิโคน (Teflon/silicone) และผนึกด้วยฝาอะลูมิเนียม ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้ PAHs ระเหยจากกระดาศไปสู่อากาศจนหมด เติมนสารละลายผสมอะซีแนพธิลีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน และ พีแนนทริน ความเข้มข้น 100 ppmV ทุก 24 ชั่วโมง ซึ่งคล้ายกับสภาพแวดล้อมจริงที่ได้รับ PAHs อย่างต่อเนื่อง เก็บตัวอย่าง PAHs ในอากาศด้วยเข็ม SPME และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ PAHs ที่เหลือในอากาศ ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟี (Gas chromatography, GC) ตามวิธีในข้อ 3.5 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือขวดทดลองที่ไม่ได้บรรจุไบโอม

หมายเหตุ ขวดทดลอง 60 มิลลิลิตรจะมีการนำมาใช้ซ้ำ โดยล้างขวดให้สะอาดด้วยน้ำเปล่า นำไปอบที่ 85 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 3 วัน เพื่อระเหย PAHs ที่ตกค้างออกไปให้หมด และจะเปลี่ยนเซพตัมใหม่ทุกครั้ง

3.4 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนกิ้งโมกในการกำจัด อะซีแนพธิลีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน และ พีแนนทรินในแชมเบอร์ และอิทธิพลของปุ๋ยพืชที่พ่นให้ทางใบ

เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่อยู่บนกิ้งโมกในการกำจัด PAHs 4 ชนิด ซึ่งเป็นการจำลองระบบปิดให้คล้ายคลึงกับต้นโมกในสภาพแวดล้อมจริงที่ได้รับ PAHs อย่างต่อเนื่องมากกว่า 4 วัน โดยขยายขนาดจากขวดทดลอง 60 มิลลิลิตร เป็นแชมเบอร์แก้วขนาด 14 ลิตร ทั้งนี้ยังได้ศึกษาผลของปุ๋ยพืชสูตร 20-20-20 (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม) ที่พ่นทางใบ ที่อาจจะเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญของแบคทีเรียบนกิ้งโมกได้

3.4.1 เก็บตัวอย่างกิ้งโมก

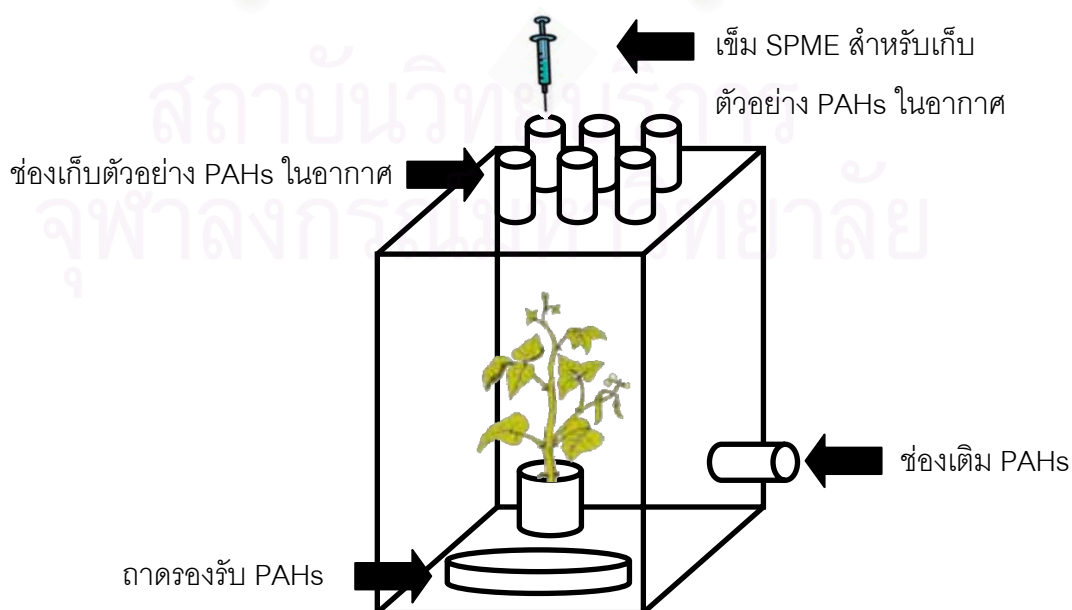
เก็บกิ้งโมกจากถนนพญาไท บริเวณหน้าคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลือกเก็บกิ้งโมกแบบสุ่ม ในตอนเช้า เลือกกิ้งโมกที่มีสีเขียวสด

เจริญเติบโตเต็มที่ ยาวประมาณ 30 เซนติเมตร ไม่มีร่องรอยการติดโรคพืช หรือการกัดแทะของ ศัตรูพืช และต้นโคมกต้องไม่ได้รับฝนอย่างน้อย 7 วัน

3.4.2 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนกิ่งโคมกในการกำจัด อะซีแนพติลิน อะซีแนพทิน ฟลูออรีน และ ฟิแนนทรีนในแชมเบอร์ และอิทธิพลของปุ๋ยพืชที่พ่นให้ทาง ใ

นำกิ่งโคมกจาก ข้อ 3.4.1 โดยแบ่งเป็น 3 ชุดทดลอง เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการ กำจัด PAHs ของกิ่งโคมกแบบต่างๆ ดังนี้

- ชุดทดลองที่ 1 กิ่งโคมกที่ปลอดเชื้อแบคทีเรีย ด้วย 0.2% ทวิน 80 เป็นเวลา 3 นาที, 5% โซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ เป็นเวลา 3 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น ปลอดเชื้ออย่างน้อย 1 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำมาระเหยน้ำส่วนเกินที่ตู้ดูด คิวบิก ประมาณ 30 นาที เพื่อทดสอบการกำจัด PAHs ในอากาศ โดยกิ่งโคมก และเมตาบอริซึมของกิ่งโคมกที่ไม่มีแบคทีเรีย
- ชุดทดลองที่ 2 กิ่งโคมกตามธรรมชาติ เพื่อทดสอบการกำจัด PAHs ใน อากาศ โดยกิ่งโคมกและแบคทีเรียบนกิ่งโคมก
- ชุดทดลองที่ 3 กิ่งโคมกตามธรรมชาติที่ได้รับปุ๋ยพืชที่พ่นให้ทางใบ ความ เข้มข้น 200 ppm (คิวยิลด์, ประเทศไทย) สูตร 20-20-20 และทิ้งไว้ให้ปุ๋ยพืช ซึมเข้าไปในกิ่งโคมกนาน 1 ชั่วโมง เพื่อทดสอบอิทธิพลของปุ๋ยพืชที่พ่นให้ทาง ใบ ต่อการกำจัด PAHs ในอากาศ



รูปที่ 3.2 แคมเบอร์แก้วขนาด 20 x 20 x 35 เซนติเมตร

ซึ่งกิ้งโมกแต่ละชุดทดลองหนัก 10 กรัม นำทั้ง 3 ชุดทดลอง ใส่ในขวดที่มีสารละลายอาหารสำหรับต้นพืช (CHRYSAL, Nertherlands) 50 มิลลิลิตร เพื่อให้กิ้งโมกได้รับสารอาหารเหมือนสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ และยึดอายุของกิ้งโมก บรรจุใส่ในแคมเบอร์ ดังรูปที่ 3.2 นำสารละลายผสมอะซีแนพธิน อะซีแนพธิน ฟลูออรีน และ พีแนทรีน ในเมธานอลความเข้มข้น 5,000 ppm มาทำการเจือจางที่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เติมนกกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร ที่วางไว้ในภาดภายในแคมเบอร์ จนได้ความเข้มข้น PAHs สุดท้ายเป็น 100 ppmV ของอากาศภายในแคมเบอร์ ปิดฝาให้สนิท ผนึกทับด้วยกระดาษทังส์ด้าน ทั้งไว้ 24 ชั่วโมงเพื่อให้ PAHs ระเหยไปในอากาศจนหมดและอยู่ในสภาวะสมดุล ทำการทดสอบ 3 แบบ

- ก. ทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของการกำจัด PAHs ของกิ้งโมกของชุดทดลองที่ 1 และ 2 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีกิ้งโมก เมื่อทิ้งไว้ 7 วัน
- ข. ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัด PAHs ในเวลาต่างๆ ใน 7 วันและมีการเติมสารละลายผสม อะซีแนพธิน อะซีแนพธิน ฟลูออรีน และ พีแนทรีน ความเข้มข้น 25 ppmV ทุก 24 ชั่วโมง ซึ่งคล้ายกับสภาพแวดล้อมจริงที่ได้รับ PAHs อย่างต่อเนื่อง ของชุดทดลองที่ 1, 2 และ 3 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ที่ไม่ได้บรรจุกิ้งโมก
- ค. หาอัตราการกำจัด PAHs ในอากาศกิ้งโมกของชุดทดลองที่ 1 และ 2 ภายใน 24 ชั่วโมง

เก็บตัวอย่าง PAHs ในอากาศด้วยเข็ม SPME ผ่านทางช่องเก็บตัวอย่างที่ปิดด้วยเซพตัมที่เคลือบด้านด้วยเทฟลอน/ซิลิโคน (Teflon/silicone) และผนึกด้วยฝาอะลูมิเนียม และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ PAHs ที่เหลือในอากาศ ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟี ตามวิธีในข้อ 3.5

หมายเหตุ แคมเบอร์จะมีการนำมาใช้ซ้ำ โดยล้างแคมเบอร์ให้สะอาดด้วยน้ำเปล่า นำไปตากแดดให้ PAHs ที่ตกค้างระเหยออกไปจนหมดเป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน และเปลี่ยนเซพตัมใหม่ที่ช่องเก็บตัวอย่างอากาศทุกครั้ง

3.5 วิเคราะห์ อะซีแนพทิลีน อะซีแนพทีน ฟลูออรีน และ พีแนนทรีนที่เหลื่ออยู่ในอากาศ

วิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพทิลีน อะซีแนพทีน ฟลูออรีน และ พีแนนทรีนที่เหลื่ออยู่ในอากาศ โดยใช้เข็ม Solid Phase Microextraction (SPME) โดยที่เข็มจะมีไฟเบอร์ที่เคลือบด้วย 100 ไมครอน Polydimethylsiloxane (PDMS) ซึ่งสามารถดูดซับสารระเหยไฮโดรคาร์บอนในอากาศได้ (Vaz, 2003; Kola และคณะ, 2004) โดยปักให้เข็มและไฟเบอร์ไว้ในชุดทดลองนาน 15 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟี โดยเสียบเข็มและไฟเบอร์ไว้ที่ Injector ที่ร้อน 250 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

วิเคราะห์ปริมาณ PAHs ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี โดยชุดเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น 6890N (บริษัท Agilent Technologies, USA) คอลัมน์ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนิลเมทิลไซโลเซน ความเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร เครื่องตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID)

วิเคราะห์ภายใต้สภาวะดังนี้

อุณหภูมิเริ่มต้น 120 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิขั้นที่ 1 เพิ่ม 25 องศาเซลเซียส/นาที จนอุณหภูมิ 160°ซ hold 3 นาที

อุณหภูมิขั้นที่ 2 เพิ่ม 3 องศาเซลเซียส/นาที จนอุณหภูมิ 220°ซ hold 2 นาที

อุณหภูมิขั้นที่ 3 เพิ่ม 40 องศาเซลเซียส/นาที จนอุณหภูมิ 300°ซ hold 2 นาที

ความดัน 9.1 ปอนด์

Injector ความร้อน 250 องศาเซลเซียส

Detector ความร้อน 250 องศาเซลเซียส

โดยใช้ฮีเลียม เป็นแก๊สตัวพาไหลด้วยอัตราเร็ว 1.9 มิลลิลิตรต่อนาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

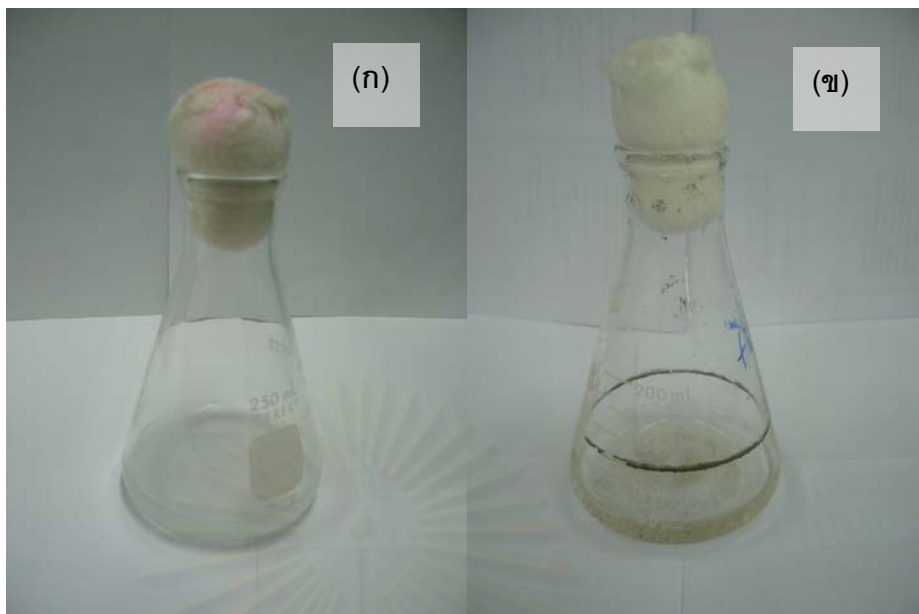
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียบนใบไมกที่ย่อยสลายอะซีแนพทีน อะซีแนพทีลิน ฟลูออรีน ฟลูออแรนทีน พีแนนทีน แอนทราซีน ไพรีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน

4.1.1 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายอะซีแนพทีน อะซีแนพทีลิน ฟลูออรีน ฟลูออแรนทีน พีแนนทีน แอนทราซีน ไพรีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน เพื่อนำไปศึกษาชนิดแบคทีเรียด้วยเทคนิค DGGE

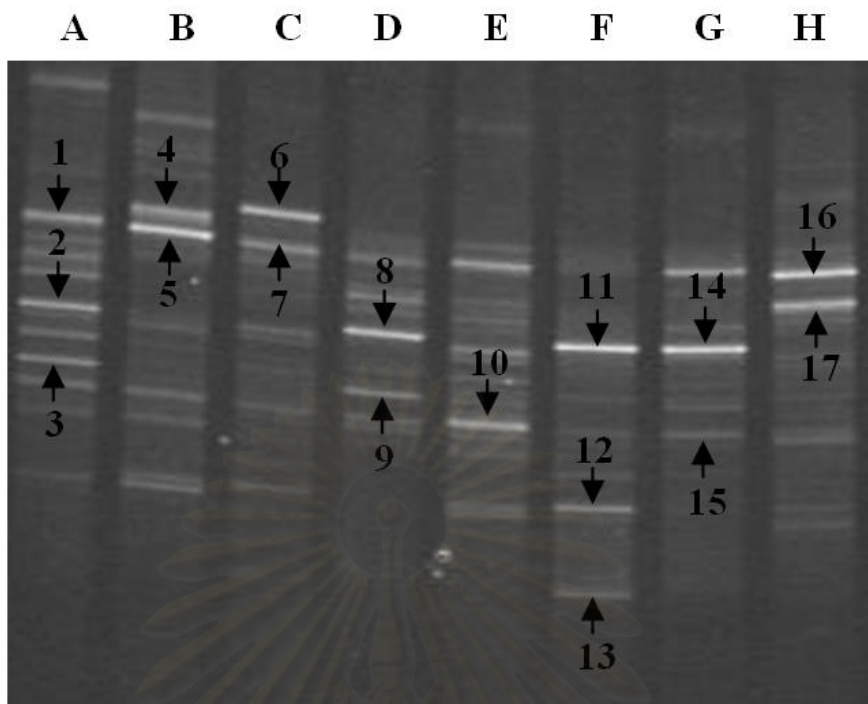
เมื่อนำตัวอย่างแบคทีเรียบนใบไมก มาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น PAH แต่ละชนิด ได้แก่ อะซีแนพทีน อะซีแนพทีลิน ฟลูออรีน ฟลูออแรนทีน พีแนนทีน แอนทราซีน ไพรีน หรือเบนโซ[เอ]ไพรีน เพื่อคัดแยกและเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อย PAHs แต่ละชนิด เพราะแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs บนใบไมกตามธรรมชาติจะมีจำนวนน้อย พบการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวและตะกอนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 3 สัปดาห์ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี PAHs ทุกชนิดจะเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีน้ำตาลอ่อนเนื่องจากแบคทีเรียมีการย่อยสลาย PAHs แล้วให้สารมัธยันต์ที่มีสี และมีตะกอนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียจากใบไมก ดังรูปที่ 4.1 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mueller และคณะ (1989) ที่พบว่าเมื่อฟลูออแรนทีนถูกย่อยสลายจะให้สารอนุพันธ์ที่มีสี และการศึกษาของ Goyal และ Zylstra (1997) ที่พบว่าสารอนุพันธ์ที่เกิดจากย่อยสลายพีแนนทีนแล้วให้สีน้ำตาล คือ 1,2 ไดไฮดรอกซีแนพทีลิน (1,2-dihydroxynaphthalene) และการศึกษาของ Denome และคณะ (1993) พบว่า Pseudomonas ย่อยสลายแนพทีลิน กลายเป็น 1-ไฮดรอกซี-2-แนพโทอิก อะซิด (1-hydroxy-2-naphthoic acid) ซึ่งเป็นสารสีน้ำตาล



รูปที่ 4.1 ลักษณะของอาหารเหลือ CFMM ที่เติม PAHs และบ่มเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ก) ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียจากไบโโมก (ข) ชุดทดลองมีการเติมแบคทีเรียจากไบโโมก

4.1.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียบนไบโโมกที่ย่อยสลายอะซีแนพทีน อะซีแนพทีลิน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธิน พีแนนทรีน แอนทราซีน ไพรีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน โดยวิธี DGGE

เพื่อศึกษาความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs บนไบโโมก ผู้วิจัยได้นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนได้จากข้อ 4.1.1 มาสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำไปเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ด้วยไพรเมอร์ 338F และ 512R (Muyzer และคณะ, 1993) ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 200 bp และนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่าความเข้มของผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มี PAHs แต่ละชนิด มีความเข้มใกล้เคียงกัน จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยเทคนิค DGGE โดยใช้เกรเดียนท์ของความเข้มข้น denaturant 10 – 70% พบว่าบนไบโโมกมีแบคทีเรียหลากหลายชนิด ที่สามารถย่อยสลาย PAHs สังเกตได้จากมีแถบดีเอ็นเอจำนวนมากบน DGGE โปรไฟล์ ดังรูปที่ 4.2 ซึ่งมีความเชื่อว่าดีเอ็นเอแต่ละแถบมาจากแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว และพบว่า PAHs ซึ่งมีจำนวนวงเบนซีนเพียงสองวง ได้แก่ อะซีแนพทีน อะซีแนพทีลิน และฟลูออรีน จะถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียหลากหลายชนิดมากกว่า PAHs ที่มีจำนวนวงเบนซีนสามวง ได้แก่ พีแนนทรีน ฟลูออแรนธิน และแอนทราซีน และที่มีจำนวนวงเบนซีนมากกว่าสามวง เช่น ไพรีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Juhasz และคณะ (2000) ที่พบว่า PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง จะมีแบคทีเรียย่อยสลายได้น้อยชนิด



รูปที่ 4.2 DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 10 – 70% denaturant แสดงความหลากหลายของแบคทีเรียจากไบโอมิกที่สามารถย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ ช่องวิ่ง A: อะซีแนพทีน ช่องวิ่ง B: อะซีแนพทีลิน ช่องวิ่ง C: ฟลูออรีน ช่องวิ่ง D: เบนไซ[เอ]ไพรีน ช่องวิ่ง E: แอนทราซีน ช่องวิ่ง F: ฟลูออแรนธิน ช่องวิ่ง G: ไพรีน ช่องวิ่ง H: พีแนนทรีน ตัวเลขแสดงแถบดีเอ็นเอเด่นที่นำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

4.1.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

เพื่อศึกษาชนิดของประชากรแบคทีเรียที่สำคัญในการย่อยสลาย PAHs บนไบโอมิก ผู้วิจัยได้เลือกแถบดีเอ็นเอเด่นของ DGGE จากข้อ 4.1.2 ในแต่ละช่อง มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังแสดงรูปที่ 4.2 เนื่องจากแถบดีเอ็นเอเด่นแสดงว่าแบคทีเรียชนิดนั้นเป็นประชากรหลักในการย่อยสลาย PAHs ชนิดนั้น โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่าแบคทีเรียที่จัดจำแนกชนิดได้ส่วนใหญ่มีรายงานว่าสามารถย่อยสลาย PAHs, น้ำมัน หรือสารประกอบที่มีวงเบนซินได้ ดังตารางที่ 4.1 ซึ่งแบคทีเรียที่ส่วนใหญ่จัดอยู่ในชั้น gammaproteobacteria แบคทีเรียบางส่วนจัดอยู่ในชั้น alphaproteobacteria นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียในชั้น betaproteobacteria และ actinobacteria ชนิดแบคทีเรียที่จำแนกได้ส่วนใหญ่ตรงกับรายงานของ Lambais และคณะ (2006) ที่พบแบคทีเรียชนิดนี้ในพืชชั้น magnoliopsida ซึ่งเป็นชั้นเดียวกับต้นโสม นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียบนไบโอมิกสายพันธุ์ *Acinetobacter*

calcoaceticus สามารถย่อยสลาย PAH ได้ 2 ชนิด คือ แอนทราซีนและอะซีแนพทีน และ Uncultured soil bacterium สามารถย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนและฟลูออแรนทีน

เนื่องการย่อยสลาย PAHs ทุกชนิดของแบคทีเรียต้องอาศัยเอนไซม์ ไดออกซิจีเนส (dioxygenase) ทำให้เกิดการเติมออกซิเจนเข้าไปในวงเบนซีน กลายเป็น ซิส-ไดไฮโดรไดออก (cis-dihydrodiol) จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นแคทีคอล (catechol) ด้วยเอนไซม์ ซิส-ไดไฮโดรไดออก ดีไฮโดรจีเนส (cis-dihydrodiol dehydrogenase) จากนั้นจะถูกย่อยสลายด้วย อินตราไดออกไดออกซิจีเนส (Intradiol dioxygenase) ผ่านทางวิธีการแตกวงเบนซีนแบบ *ortho* หรือ ถูกย่อยสลายด้วย เอกซ์ตราไดออกไดออกซิจีเนส (extradiol dioxygenase) ผ่านทางวิธีการแตกวงเบนซีนแบบ *meta* และเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกต่อไป (Cerniglia และคณะ, 1992) ทำให้แบคทีเรีย 1 ชนิดสามารถย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิด และยังพบอีกว่ามีแบคทีเรียที่ยังเพาะเลี้ยงไม่ได้แต่มีความสามารถย่อยสลายอะซีแนพทีนหรือไพรีน ทั้งนี้ชนิดแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs บนใบไม้มีส่วนใหญ่จะมีรายงานตรงกับแบคทีเรียที่ย่อย PAHs ที่แยกได้จากดินหรือน้ำ (Juhász และคณะ, 2000) ยกเว้น *Naxibacter indica*

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดดีเอ็นเอเด่นจากแบคทีเรียบนใบโสมกที่ย่อยสลาย PAHs ทั้ง 8 ชนิด

แถบ ดีเอ็นเอ	PAHs ที่ย่อยสลายได้	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequence identity (%)	แหล่งที่มา	สารที่ย่อยสลาย	ชั้น (class)	เอกสารอ้างอิง
1	อะซีแนพรีน	<i>Sphingomonas</i> sp. Enf55	DQ339616	100	พืชไม้พุ่มขนาดเล็ก	-	Alphaproteo bacteria	Kawauchi และคณะ, 2005
2	อะซีแนพรีน	<i>Acinetobacter</i> sp. BP10	EF198473	97	น้ำเสีย	เอสโตรเจน	Gammaproteo bacteria	Pauwels และคณะ, 2006
3	อะซีแนพรีน	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	AY346313	100	น้ำเสีย	ไฮโดรคาร์บอน	Gammaproteo bacteria	Purohit และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
4	อะซีแนพรีน	Uncultured bacterium	DQ129592	98	ฝุ่นละอองในอากาศ	-	-	Brodie และคณะ, 2005
5	อะซีแนพรีน	<i>Mycobacterium gilvum</i>	EU168037	99	-	PAHs	Actinobacteria	Hilyard และคณะ, 2007
6	ฟลูออรีน	<i>Naxibacter indica</i>	EF199744	99	ดิน	-	Betaproteo bacteria	Chauhan และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
7	ฟลูออรีน	<i>Acinetobacter</i> sp. FLL7	DQ834354	96	-	ไตรฟลูออรีน	Gammaproteo bacteria	Teng และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
8	เบนโซ[เอ]ไพรีน	Uncultured soil bacterium	DQ378242	94	ดิน	น้ำมัน	-	Nohit และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
9	เบนโซ[เอ]ไพรีน	<i>Acinetobacter</i> sp. Lhl-4r	EF080878	98	-	-	Gammaproteo bacteria	Sun, ไม่ตีพิมพ์

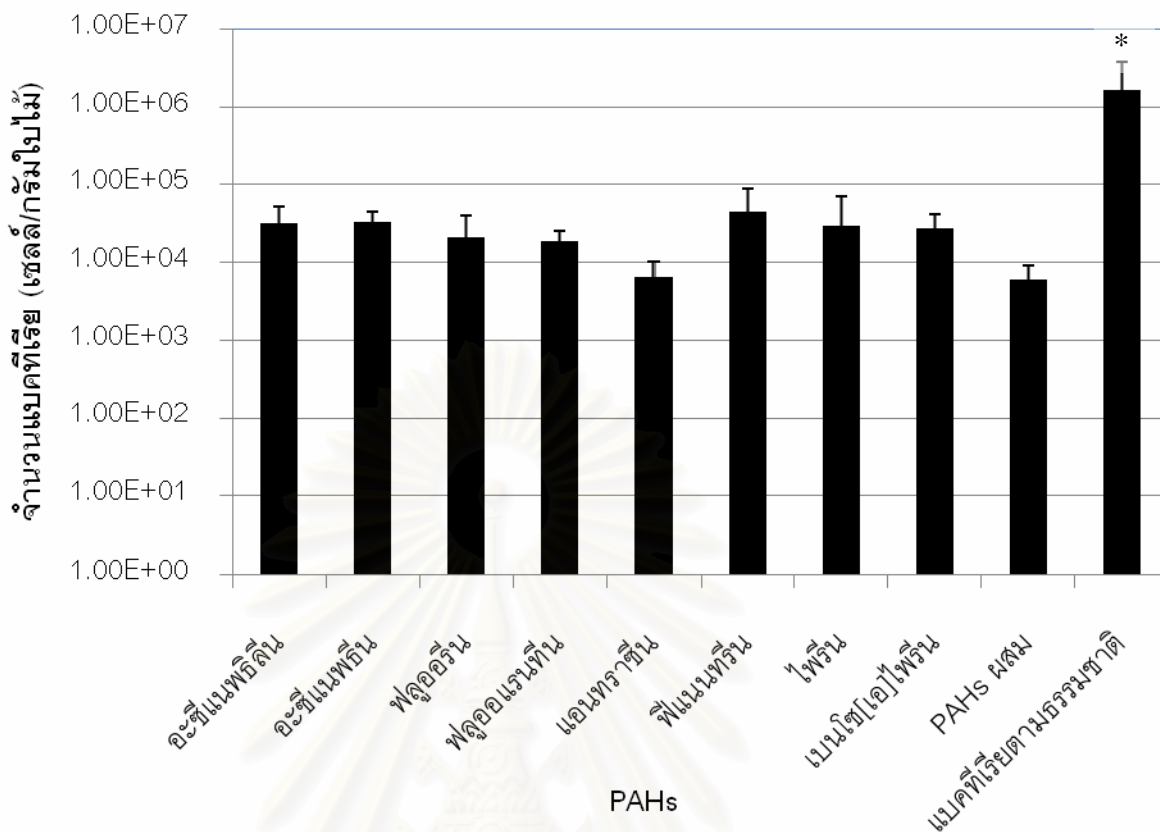
แถบ ดี เอ็นเอ	PAHs ที่ย่อยสลายได้	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequence identity (%)	แหล่งที่มา	สารที่ย่อยสลาย	ชั้น	เอกสารอ้างอิง
10	แอนทราซีน	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	AY346313	100	น้ำเสีย	ไฮโดรคาร์บอน	Gamma proteo bacteria	Purohit และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
11	ฟลูออแรนทีน	<i>Parvibaculum</i> sp.	EU375017	96	ดิน	น้ำมัน	Alpha proteo bacteria	Alonso-Gutierrez และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
12	ฟลูออแรนทีน	<i>Acinetobacter</i> sp. Y3A	EF127901	98	ดิน	น้ำมัน	Gamma proteo bacteria	Cao, ไม่ตีพิมพ์
13	ฟลูออแรนทีน	Uncultured bacterium	EU281646	95	พืช	-	-	Banyeras และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
14	ไพรีน	Uncultured soil bacterium	DQ378242	94	ดิน	น้ำมัน	-	Nohit และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
15	ไพรีน	<i>Acinetobacter</i> sp. EDP3	AY613433	97	น้ำเสีย	ฟีนอล	Gamma proteo bacteria	Geng และคณะ, 2004
16	พีแนนทีน	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	EU636773	96	-	บิวทาคลอร์	Gamma proteo bacteria	Yu และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
17	พีแนนทีน	<i>Pseudomonas</i> sp. CL7	EU784654	100	น้ำเสีย	คลอโรฟีนอล	Gamma proteo bacteria	Kam และคณะ, ไม่ตีพิมพ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การนับจำนวนแบคทีเรียตามธรรมชาติบนใบโสมกโดยวิธี Most Probable Number (MPN)

จากการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบนใบโสมกด้วยวิธี MPN โดยทดลองในไมโครไตเตอร์เพลต ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่เติมกลีเซอรอล และนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ซึ่งใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นเกล็ด PAHs ชนิดต่างๆ พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบนใบโสมกมีจำนวนสูงสุดถึง 1.61×10^6 เซลล์/กรัมใบโสมก สอดคล้องกับรายงานของ Steven และคณะ (2003) ที่พบว่าใบโสมกเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์หลายชนิด แต่แบคทีเรียมีปริมาณมากที่สุดทั้งชนิดและจำนวน ถึง 10^6 - 10^7 เซลล์/ตารางเซนติเมตร และอาจพบถึง 10^8 เซลล์/กรัม และ Yadav และคณะ (2008) รายงานว่าจำนวนแบคทีเรียตามธรรมชาติบนใบพืชในชั้น magnoliopsida 4 ชนิด ได้แก่ *Arbutus unedo* L. และ *Lavandula stoechas* L. พบว่ามีจำนวนแบคทีเรีย 1.3×10^4 CFU/กรัมใบโสมก และต้น *Melissa officinalis* L. และ *Calamintha nepeta* (L.) Savi พบว่ามีจำนวนแบคทีเรีย 1.3×10^5 CFU/กรัมใบโสมก

ในขณะที่เดียวกันพบว่าแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ทุกชนิดมีจำนวนน้อยกว่าแบคทีเรียทั้งหมดบนใบโสมก โดยจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายพีแนทรีนมีค่าสูงสุด ถึง 4.37×10^4 เซลล์/กรัมใบโสมก ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายแอนทราซีนมีจำนวนน้อยสุดเพียง 6.37×10^3 เซลล์/กรัมใบโสมก ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณแอนทราซีนไม่เพียงพอต่อการเจริญของแบคทีเรีย เนื่องจาก แอนทราซีนละลายในเฮกเซนได้น้อยกว่า PAHs อื่นๆมาก ทำให้มีเกล็ดของแอนทราซีนน้อยกว่า PAHs ชนิดอื่นๆ ในไมโครไตเตอร์เพลต และพบอีกว่าแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ผสม (อะซีแนพธิดีน, อะซีแนพธีน, ฟลูออรีน และพีแนทรีน ที่มีปริมาณเริ่มต้นของ PAHs แต่ละชนิดเท่ากัน) มีจำนวนเพียง 5.97×10^3 เซลล์/กรัมใบโสมก ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณ PAHs ที่มากเกินไปกว่าแบคทีเรียจะทนได้ และเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Duncan New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบนใบโสมก แตกต่างกับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs อย่างมีนัยสำคัญ เพราะจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs เป็นส่วนหนึ่งของแบคทีเรียทั้งหมดบนใบโสมก แต่จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs แต่ละชนิด ไม่มีความแตกต่างในทางสถิติ แสดงว่าบนใบโสมกมีจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs แต่ละชนิดไม่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 4.3

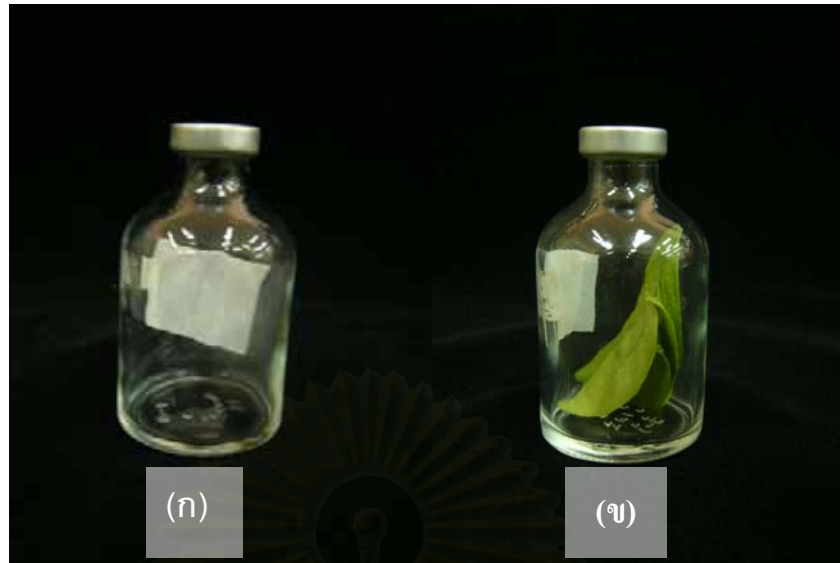


รูปที่ 4.3 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบนใบไม้และแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ, PAHs ผสม ประกอบด้วย อะซีแนฟทีลีน, อะซีแนฟทีน, ฟลูออรีนและพีแนนทรีน ความเข้มข้นเริ่มต้นทุกชนิด PAHs 500 ppm

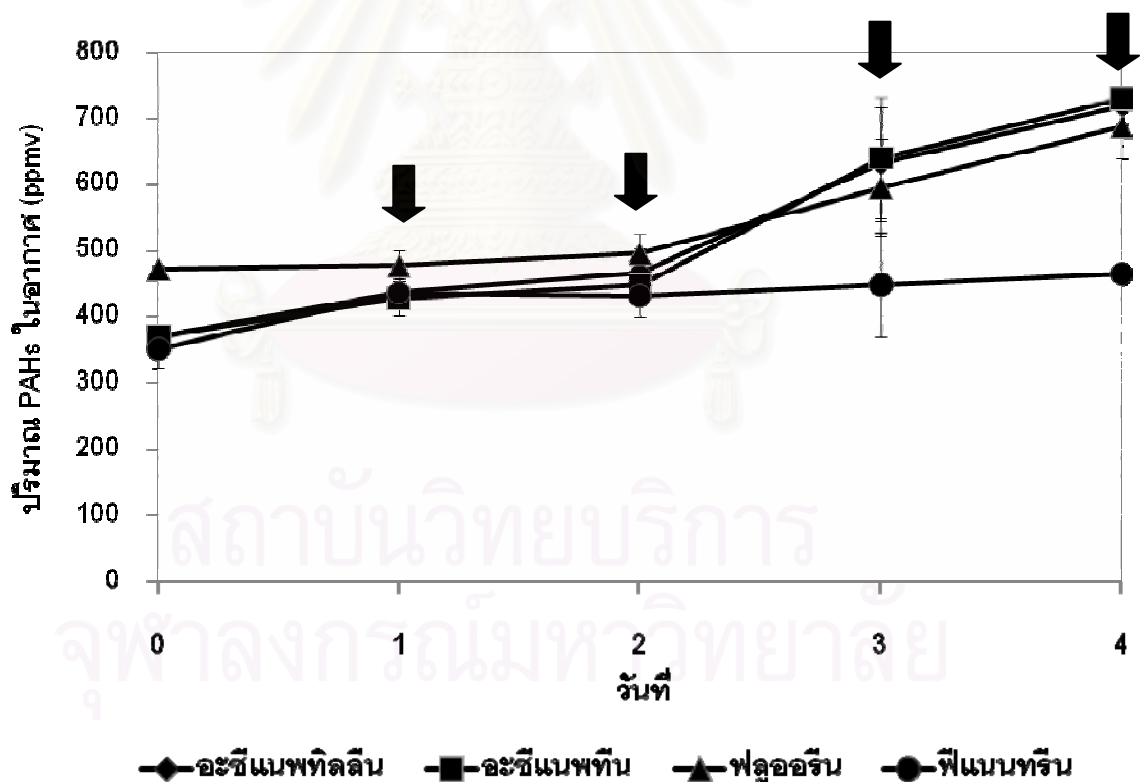
4.3 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนใบไม้ที่สามารถกำจัดอะซีแนฟทีลีน อะซีแนฟทีน ฟลูออรีน และพีแนนทรีนในอากาศ ในขวดทดลองขนาด 60 มิลลิลิตร

4.3.1 ชุดควบคุมที่ไม่มีใบไม้บรรจุในขวดทดลอง

เพื่อทดสอบการกำจัด PAHs ด้วยวิธีทางกายภาพ ผู้วิจัยได้นำสารผสม PAH 4 ชนิด ได้แก่ อะซีแนฟทีลีน อะซีแนฟทีน ฟลูออรีน และพีแนนทรีน ซึ่งมีรายงานว่าปนเปื้อนในอากาศปริมาณมาก มาฉีดที่กระดาษกรองขนาด 1x2 เซนติเมตร ภายในขวดทดลองที่ไม่ได้บรรจุใบไม้ ขนาด 60 มิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.4 ที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นทั้ง 4 ชนิดเป็น 400 ppmV และมีการเติม PAHs ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 100 ppmV ทุก 24 ชั่วโมง โดย PAHs ทั้งหมดเท่ากับ 800 ppmV ซึ่งคิดเป็นปริมาณ 352 ไมโครกรัม พบว่าปริมาณ PAHs ในอากาศทั้ง 4 ชนิด จะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยปริมาณอะซีแนฟทีลีน อะซีแนฟทีน ฟลูออรีน และพีแนนทรีน ในวันที่ 4 มีความเข้มข้น 719.0, 731.2, 687.6 และ 618 ppmV ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.5 ในขณะเดียวกัน



รูปที่ 4.4 ขวดทดลองขนาด 60 มิลลิลิตร ปิดด้วยเซพตัมที่เคลือบเทฟลอน/ซิลิคอนและฉนีกด้วยฝาอะลูมิเนียม ภายในมีกระดาษกรองขนาด 1x2 เซนติเมตร (ก) ชุดควบคุมที่ไม่ได้บรรจุใบไมก (ข) ชุดทดลองที่บรรจุใบไมกน้ำหนัก 0.5 กรัม

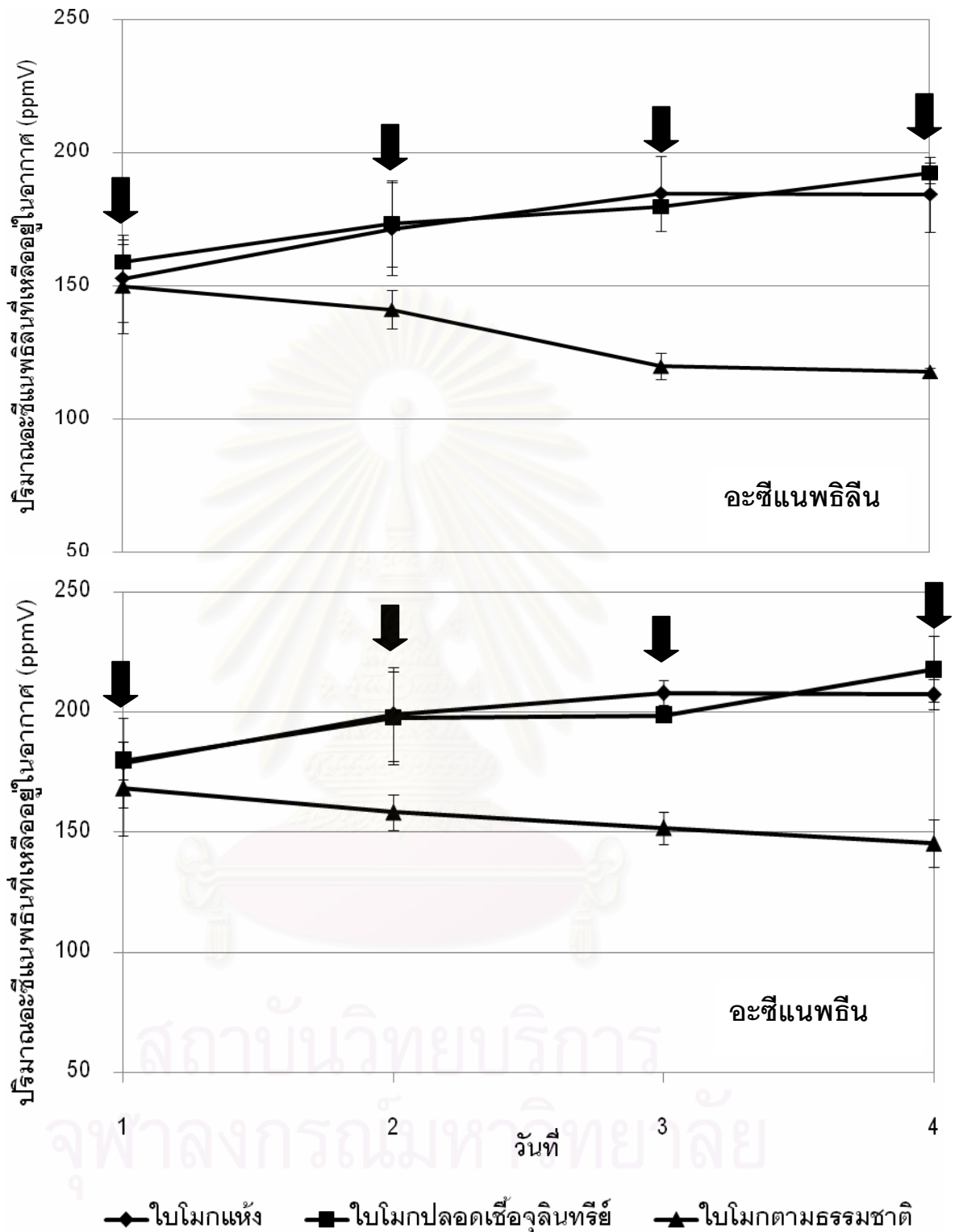


รูปที่ 4.5 ปริมาณอะซีแนฟทิลีน อะซีแนฟทีน ฟลูออรีน และพีแนนทรีน ที่ในอากาศ ณ เวลาต่างๆ ในขวดทดลองขนาด 60 มิลลิลิตรที่ไม่มีใบไมก, ↓ แสดงการเติม PAHs 100 ppmV ทุกๆ 24 ชั่วโมง

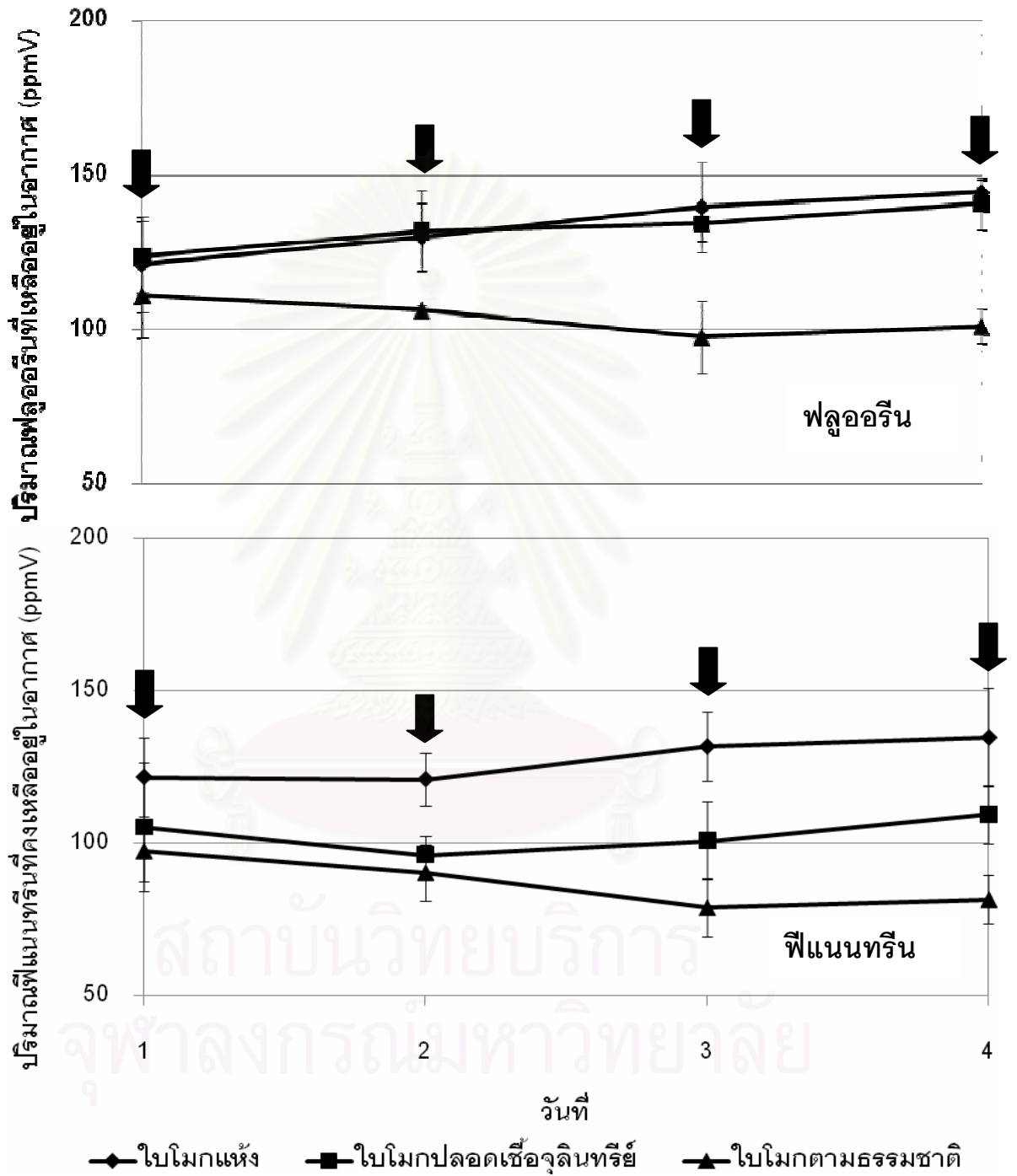
พบว่าปริมาณพีแนทรีนในอากาศจะน้อยกว่าอะซีแนพธิลีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน เนื่องจากพีแนทรีนมีความดันไอต่ำ ทำให้มีอัตราการระเหยที่น้อย (ATSDR, 1995) นอกจากนี้ปริมาณ PAHs ทั้ง 4 ชนิด ในวันที่ 4 ไม่เท่ากับ 800 ppmV เพราะ PAHs บางส่วนอาจมีการสลายตัวด้วยแสง (Photolysis) ซึ่งมีรายงานโดย Ristolw และคณะ (1996) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า PAHs สลายตัวด้วยวิธีกายภาพในปริมาณน้อยมาก

4.3.2 ชุดทดลองที่มีใบไมกในชุดทดลอง

เพื่อทดสอบการกำจัด PAHs ด้วยวิธีทางชีวภาพของใบไมกและแบคทีเรียบนใบไมก ผู้วิจัยได้นำตัวอย่างใบไม้ น้ำหนัก 0.5 กรัม บรรจุในขวด 60 มิลลิลิตร แบ่งเป็น 3 ชุดทดลอง คือ ใบไมกตามธรรมชาติ, ใบไมกแห่งที่ผ่านการอบด้วยความร้อน 85 องศาเซลเซียสและใบไมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ด้วย 5% โซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ จากนั้นฉีดสารผสม PAHs 4 ชนิด ได้แก่ อะซีแนพธิลีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน และพีแนทรีน ที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 400 ppmV และมีการเติม PAHs 4 ชนิด 100 ppmV ทุก 24 ชั่วโมง โดย PAHs ทั้งหมดเท่ากับ 800 ppmV ซึ่งคิดเป็นปริมาณ 352 ไมโครกรัม พบว่าปริมาณอะซีแนพธิลีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน และพีแนทรีนในชุดทดลองที่บรรจุใบไมกตามธรรมชาติจะลดลงอย่างต่อเนื่องจากวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 และเริ่มคงที่ในวันที่ 4 เนื่องจากใบไม้เริ่มเหี่ยวและมีบางส่วนเริ่มตายจากการขาดน้ำและอาหาร ทำให้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียเปลี่ยนไป แต่ในชุดทดลองที่บรรจุใบไมกแห้งและใบไมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาณ อะซีแนพธิลีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน และพีแนทรีน จะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ในอากาศ ณ เวลาต่างๆ โดยเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 400 ppmV
 ↓ แสดงการเติม PAHs 100 ppmV ทุกๆ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.6 (ต่อ)

เมื่อนำปริมาณ PAHs ทั้ง 4 ชนิด ที่เหลือในอากาศของชุดทดลองทั้ง 3 ชุดมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีใบโมก (%) ในวันที่ 4 มาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ด้วยวิธี Duncan New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% พบว่า อะซีแนฟธิลีน อะซีแนฟธิน และฟลูออรีน จากชุดทดลองที่บรรจุใบโมกตามธรรมชาติจะมีปริมาณน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับชุดทดลองที่บรรจุใบโมกแห้งและใบโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ในขณะที่ชุดทดลองที่บรรจุใบโมกแห้งและใบโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ปริมาณ PAHs ของทั้ง 3 ชนิดนี้มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่สำหรับพีแนนทรีนในชุดทดลองที่บรรจุใบโมกตามธรรมชาติ จะมีปริมาณน้อยกว่าในชุดทดลองที่บรรจุใบโมกแห้งอย่างมีนัยสำคัญเท่า่นั้น ซึ่งการศึกษาของ Wang และคณะ (2008) พบว่าพีแนนทรีนถูกดูดซึมโดยดินเซลล์พืชได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับอะซีแนฟธิลีน อะซีแนฟธิน ฟลูออรีน ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถนำพีแนนทรีนไปใช้ได้ และใบโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์มีความสามารถใกล้เคียงกับใบโมกตามธรรมชาติ

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบปริมาณ อะซีแนฟธิลีน อะซีแนฟธิน ฟลูออรีน และพีแนนทรีนที่คงเหลือในอากาศในชุดทดลอง (%) ในวันที่ 4 ที่บรรจุด้วยใบโมกแห้ง ใบโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และใบโมกตามธรรมชาติ

PAHs	ชุดทดลอง * (%)		
	ใบโมกแห้ง	ใบโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์	ใบโมกตามธรรมชาติ
อะซีแนฟธิลีน	25.6 % a	26.8 % a	16.4 % b
อะซีแนฟธิน	28.4 % a	29.8 % a	19.9 % b
ฟลูออรีน	21.0 % a	20.5 % a	14.7 % b
พีแนนทรีน	29.0 % a	23.5 % ab	17.5 % b

a,b หมายถึง อักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

* คำนวณเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ชุดทดลองที่ไม่มีใบโมก) โดยให้ชุดควบคุมเป็น 100% ในชุดควบคุมปริมาณอะซีแนฟธิลีน อะซีแนฟธิน ฟลูออรีน และพีแนนทรีน เท่ากับ 719.0, 731.2, 687.7 และ 466.0 ppmv ตามลำดับ

จากการทดลองนี้พบว่า การกำจัดอะซีแนฟลิดีน อะซีแนฟธิน ฟลูออรีน และพีแนนทริน ใน ขวดทดลองเกิดได้ 2 ทาง คือ การดูดซับโดยใบโสมก (ในชุดทดลองที่มีใบโสมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และชุดทดลองที่มีใบโสมกแห้ง) สอดคล้องกับรายงานของ Lin และคณะ (2007) ที่พบว่าใบข้าวโพด สามารถดูดซึมและสะสม อะซีแนฟธิน ฟลูออรีน และพีแนนทรินจากอากาศได้ โดยเฉพาะอะซีแนฟธินที่พบสะสมที่ใบถึง 0.05 ไมโครกรัม/กรัมใบไม้ และการศึกษาของ Wild และคณะ (2006) พบว่าใบข้าวโพดและใบผักขม (spinach) สามารถดูดซึมพีแนนทรินจากอากาศได้ โดยจะพบพีแนนทรินสะสมที่ผิวใบทั้งด้านหลังใบ (abaxial) และท้องใบ (adaxial) และเมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมงจะพบพีแนนทรินสะสมในเนื้อเยื่อพืชชั้นใน และการศึกษาของ Tao และคณะ (2005) พบว่าผักกาดขาวปลี สามารถดูดซึมและสะสม PAHs จากอากาศได้ โดยปริมาณ PAHs ที่วัดได้มีถึง 596 ± 231 นาโนกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งการดูดซึมด้วยใบโสมกจะสามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบคือ ดูดซึมในแว็กซ์ (ใบโสมกแห้ง) หรือดูดซึมในเซลล์พืชซึ่งเกิดโดยเมตาบอริซึมในเซลล์พืช (ใบโสมก ปลอดเชื้อจุลินทรีย์) ตรงกับรายงานของ Wang และคณะ (2008) ที่พบ PAHs สะสมที่ชั้นแว็กซ์ที่ ผิวใบ และในเนื้อเยื่อพืช และการกำจัด PAHs อีกทางคือการย่อยสลายโดยแบคทีเรียบนโสมก (ใน ชุดทดลองที่มีใบโสมกตามธรรมชาติ) คล้ายคลึงกับรายงานก่อนหน้าที่พบว่า แบคทีเรียบนใบไม้ สามารถย่อยสลายสารพิษในอากาศของ Kempeneer และคณะ (2003) ที่ทำการทดลองพ่นเชื้อ *Pseudomonas putida* TVA8 บนต้น *Azalea indica* เพื่อบำบัดโกลูอินในอากาศ ในระบบปิด พบว่าสามารถกำจัดโกลูอินได้ 95% ในระยะเวลาเพียง 27 ชั่วโมง และจากการศึกษาของ Sandhu และคณะ (2007) ที่ทำการทดลองพ่นแบคทีเรียย่อยสลายฟีนอล *Pseudomonas* sp. CF600 ให้กับใบต้นถั่วและข้าวโพด พบว่าฟีนอลในอากาศสลายไปมากถึงแปดเท่าเมื่อเทียบต้น พืชที่ไม่ได้รับการพ่นเชื้อ และพบว่าต้นถั่วและข้าวโพดที่ปลูกในบริเวณที่มีปริมาณสารอินทรีย์ใน อากาศสูง ใบถั่วและข้าวโพดจะสามารถกำจัดฟีนอลในอากาศได้มากกว่าใบถั่วและข้าวโพดที่ผ่าน การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ แสดงว่าจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติบนใบสามารถย่อยสลายฟีนอลใน อากาศได้ ดังนั้นในขวดทดลองที่บรรจุโสมกตามธรรมชาติจึงมีปริมาณอะซีแนฟลิดีน อะซีแนฟธิน ฟลูออรีน และพีแนนทริน น้อยที่สุด ซึ่งเหลือเพียง 117.8, 145.3, 101.1 และ 81.6 ppmV ตามลำดับ จากปริมาณ PAHs ที่เติมไปในระบบทั้งหมด 800 ppmV และพบว่ากำจัด PAHs ในอากาศ ของขวดทดลองที่บรรจุใบโสมกแห้งและใบโสมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกัน เกิดจาก PAHs (อะซีแนฟลิดีน อะซีแนฟธิน และฟลูออรีน) ในอากาศจะถูกดูดซึมด้วยเซลล์พืชได้น้อย ยก เว้นพีแนนทริน ในขณะที่เดียวกันพบว่าปริมาณพีแนนทรินทั้งชุดทดลองทั้ง 3 ชุดจะคงเหลือน้อยสุด เพราะพีแนนทรินมีความดันไอต่ำจึงมีการระเหยในอากาศได้น้อย (ATSDR, 1995) และจาก รายงานของ Wang และคณะ (2008) พบว่าพีแนนทรินถูกดูดซึมอยู่ในเซลล์พืชได้มากกว่า เมื่อ

เปรียบเทียบกับอะซีแนพธิน อะซีแนพธิน ฟลูออรีน จะถูกดูดโดนเซลล์พืชน้อยกว่า ซึ่งจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียบนใบไม้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัด PAHs ในอากาศ

4.4 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนกิ่งไม้ที่สามารถกำจัดอะซีแนพธิน อะซีแนพธิน ฟลูออรีน และพีแนนทรีนในอากาศ ในแชมเบอร์

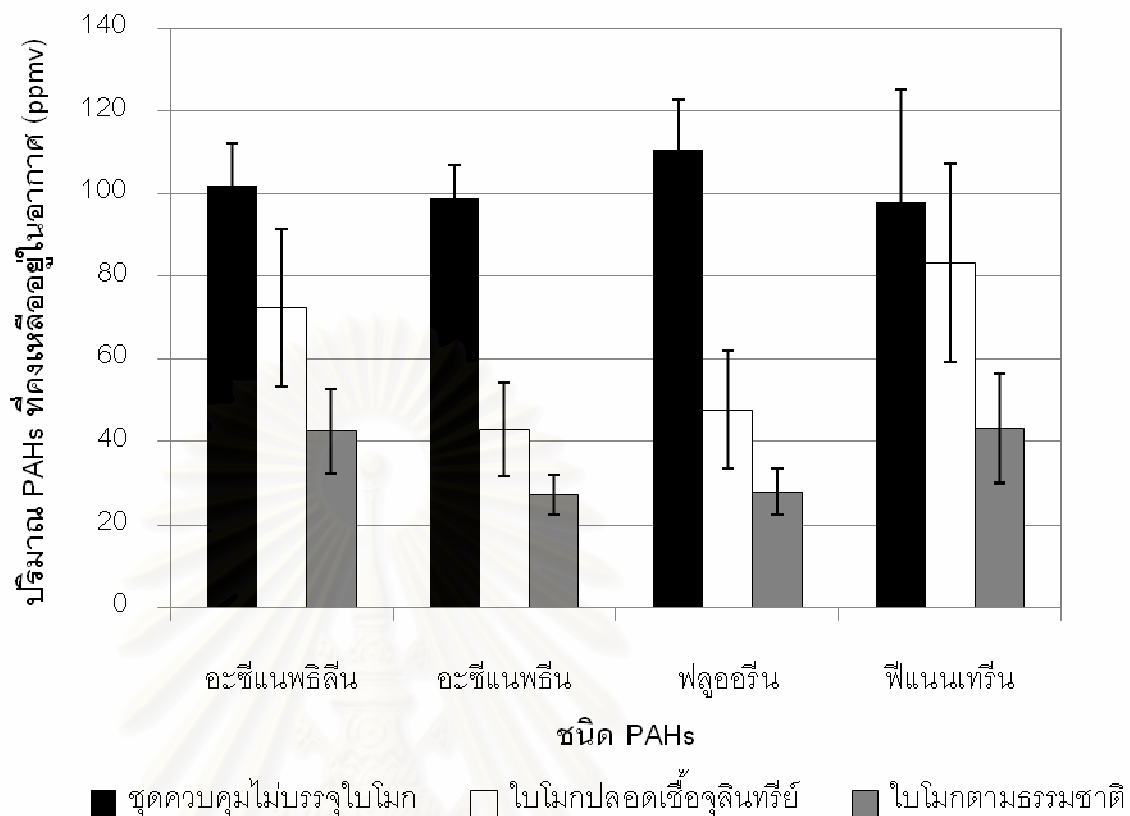
4.4.1 การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนกิ่งไม้ที่สามารถกำจัดอะซีแนพธิน อะซีแนพธิน ฟลูออรีน และพีแนนทรีน ในอากาศในแชมเบอร์ เมื่อทิ้งไว้ 7 วัน

การทดลองนี้เป็นการขยายขนาดของระบบทดลองจากขวด 60 มิลลิลิตร เป็นแชมเบอร์ขนาด 14 ลิตร โดยศึกษาแบคทีเรียบนกิ่งไม้ที่สามารถกำจัด PAHs 4 ชนิด ได้แก่ อะซีแนพธิน



รูปที่ 4.7 แชมเบอร์แก้วขนาด 20 x 20 x 35 เซนติเมตร ที่บรรจุกิ่งไม้ น้ำหนัก 10 กรัม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณอะซีแนฟทีลีน อะซีแนฟทีน ฟลูออรีน และฟีแนนทรีน ในอากาศในแชมเบอร์เมื่อทิ้งไว้ 7 วัน

อะซีแนฟทีน ฟลูออรีน และฟีแนนทรีน ในแชมเบอร์ขนาด 20 x 20 x 35 เซนติเมตร ดังรูปที่ 4.7 ซึ่งเป็นระบบปิด เพื่อจำลองให้คล้ายคลึงกับต้นไมกตามธรรมชาติที่ได้รับ PAHs ทั้งนี้กึ่งไมกจะแช่อยู่ในสารละลายอาหารสำหรับต้นพืช (CHRYSAL, Netherlands) เพื่อยืดอายุของกึ่งไมก ทำให้สามารถศึกษาการกำจัด PAHs ได้นานกว่า 4 วัน ซึ่งแตกต่างจากการข้อ 4.3 ที่เป็นการทดสอบในใบไมก ภายใน 4 วัน ทำการทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับการกำจัด PAHs ในอากาศของกึ่งไมกและแบบที่เรียบนกึ่งไมก เมื่อทิ้งไว้ 7 วัน เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการกำจัด PAHs ในอากาศของกึ่งไมกที่เวลามากกว่า 4 วัน โดยนำตัวอย่างกึ่งไมกน้ำหนัก 10 กรัม มาทดสอบการกำจัด อะซีแนฟทีลีน อะซีแนฟทีน ฟลูออรีน และฟีแนนทรีน ในอากาศในแชมเบอร์ ที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 100 ppmV ซึ่งคิดเป็นปริมาณ PHAs 9.856 มิลลิกรัม โดยแบ่ง 2 ชุดทดลอง คือ ชุดทดลองที่บรรจุกึ่งไมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ด้วย 5% โซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ และชุดทดลองที่บรรจุกึ่งไมกตามธรรมชาติและชุดควบคุมที่ไม่บรรจุกึ่งไมก วัดปริมาณ PAHs ที่เหลือในอากาศวันที่ 7 พบว่าในชุดควบคุมที่ไม่บรรจุ กึ่งไมกมีปริมาณ PAHs ทั้ง 4 ชนิดมากกว่า ชุดทดลองใบไมกที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์และใบ

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบปริมาณ อะซีแนฟทิลีน อะซีแนฟทีน ฟลูออรีน และพีแนนทรีนที่คงเหลือในอากาศในแซมเบอร์ (%) ในวันที่ 7 ที่บรรจุด้วยกึ่งโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์และกึ่งโมกตามธรรมชาติ

PAHs	ชุดทดลอง * (%)	
	กึ่งโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์	กึ่งโมกตามธรรมชาติ
อะซีแนฟทิลีน	70.2 % a	41.3 % b
อะซีแนฟทีน	42.8 % a	27.4 % b
ฟลูออรีน	42.4 % a	25.1 % b
พีแนนทรีน	84.4 % a	43.7 % b

a,b หมายถึง อักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

* คำนวณเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (แซมเบอร์ที่ไม่มีกึ่งโมก) โดยให้ชุดควบคุมเป็น 100% ในชุดควบคุมปริมาณอะซีแนฟทิลีน อะซีแนฟทีน ฟลูออรีน และพีแนนทรีน เท่ากับ 102.0, 99.0, 110.7 และ 98.2 ppmv ตามลำดับ

โมกตามธรรมชาติ ดังรูปที่ 4.8 และพบว่าปริมาณ อะซีแนฟทิลีน อะซีแนฟทีน ฟลูออรีน และพีแนนทรีนใน ชุดควบคุม คือ 102.0, 99.0, 110.7 และ 98.2 ppmV ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันชุดทดลองที่บรรจุโมกตามธรรมชาติมีปริมาณ อะซีแนฟทิลีน อะซีแนฟทีน ฟลูออรีน และพีแนนทรีนคงเหลือน้อยสุด คือ 42.4, 27.2, 28.0 และ 43.2 ppmV ตามลำดับ เมื่อนำปริมาณคงเหลือของ PAHs ทั้ง 4 ชนิดของชุดทดลองมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (%) วิเคราะห์ทางสถิติด้วย T-test พบว่าชุด ทดลองที่มีกึ่งโมกตามธรรมชาติมีค่าน้อยกว่าชุดทดลองที่มีกึ่งโมกที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญ ทั้ง 4 ชนิด PAHs ดังตารางที่ 4.3

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียบนกึ่งโมก ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัด PAHs ทั้ง 4 ชนิดในอากาศ สอดคล้องกับการทดลองที่ 4.3.2 ที่พบว่าแบคทีเรียบนโมกมีส่วนช่วยในการกำจัด PAHs ในชุดทดลอง

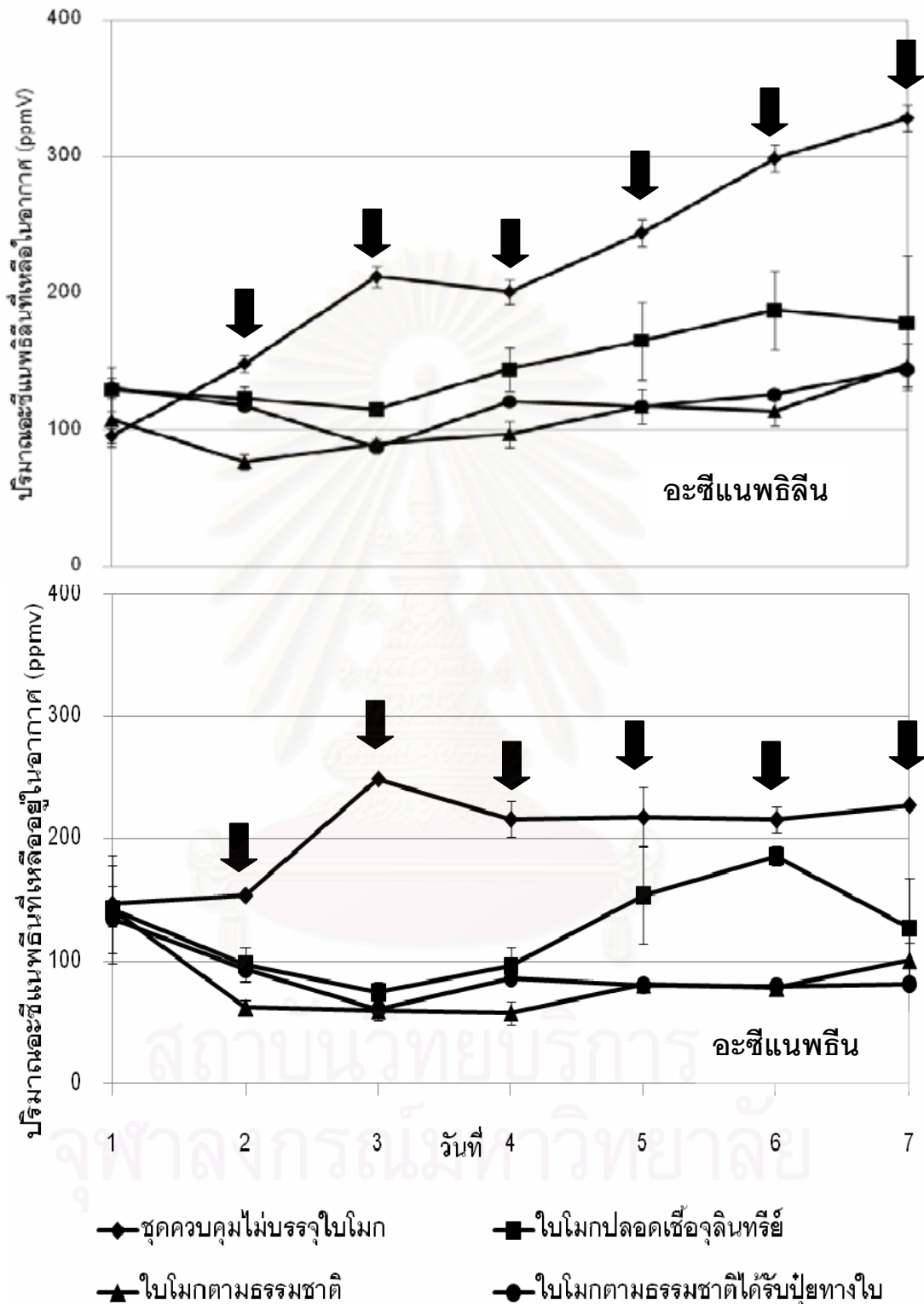
นอกจากนี้การทดลองนี้จะพบว่า ในชุดทดลองที่มีกึ่งโมก ปริมาณอะซีแนฟทิลีนและพีแนนทรีน (%) คงเหลือในอากาศมากกว่า อะซีแนฟทีน และฟลูออรีน อาจเกิดจากแบคทีเรียที่ย่อยสลายอะซีแนฟทิลีนและพีแนนทรีน ไม่สามารถทนต่อ PAHs ชนิดอื่นได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ 4.2.1 ที่พบว่าแบคทีเรียที่นับได้ในแหล่งคาร์บอนที่เป็น PAHs ผสม (อะซีแนฟทิลีน อะซีแนฟทีน ฟลูออรีน และพีแนนทรีน) มีจำนวนน้อยสุด เพียง 5.97×10^3 เซลล์/กรัมใบไม้ แต่เมื่อ

เปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนหรือพีแนนทรีนเพียงชนิดเดียว พบว่ามีถึง 3.17×10^4 และ 4.37×10^4 เซลล์/กรัมใบไม้ ตามลำดับ

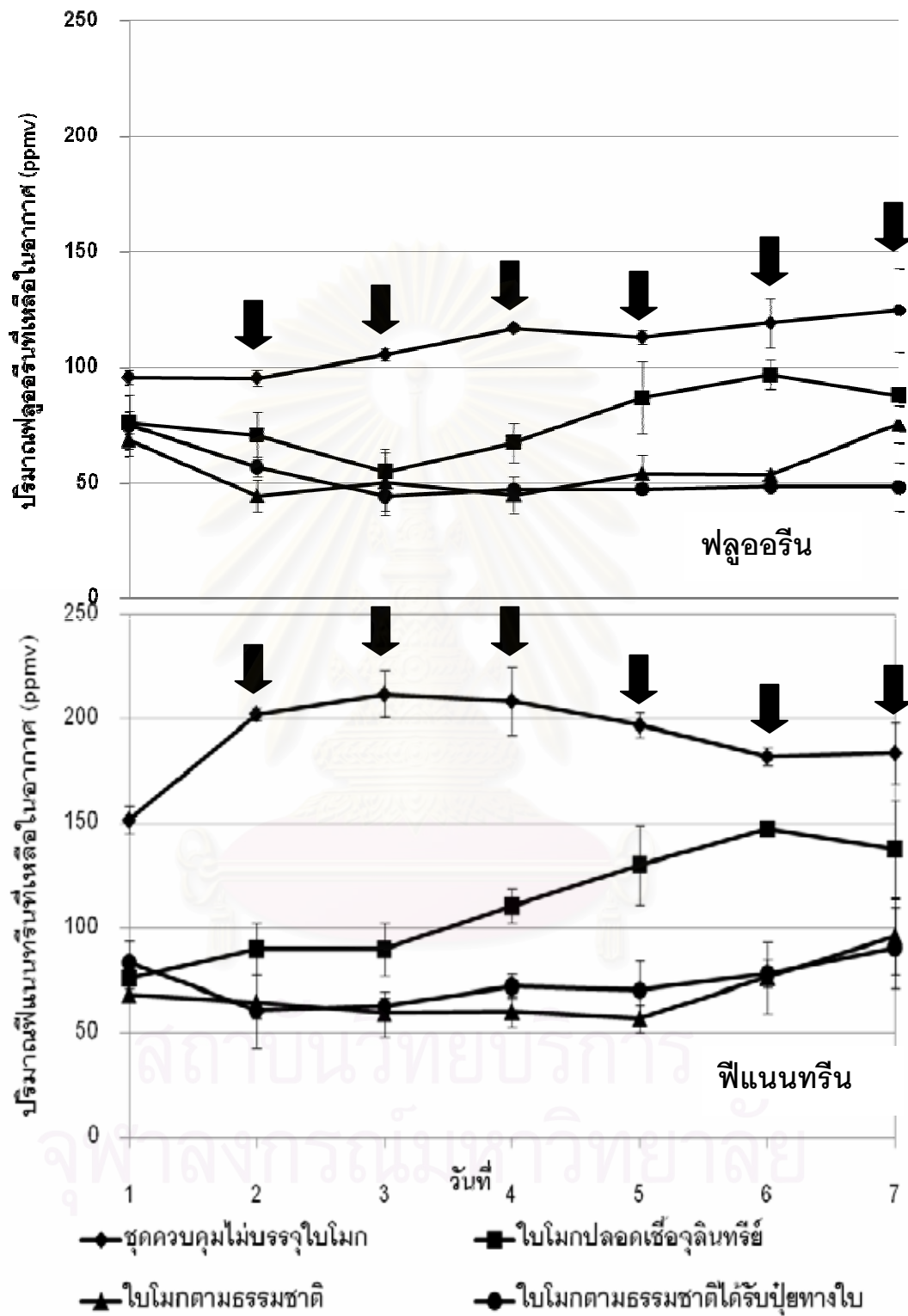
4.4.2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียบนกิ่งโมกที่กำลังกำจัดอะซีแนฟธิลีน อะซีแนฟธิน ฟลูออรีน และพีแนนทรีน ในอากาศในแชมเบอร์ เมื่อมีการเพิ่ม PAHs ทุก 24 โมง ใน 7 วัน และอิทธิพลของปุ๋ยที่พ่นให้ทางใบ

เพื่อทดสอบการกำจัด PAHs ในอากาศของกิ่งโมกและแบคทีเรียบนกิ่งโมก ซึ่งได้รับ PAHs ต่อเนื่องทุกวัน ผู้วิจัยได้ทำการทดลองให้คล้ายกับสภาพแวดล้อมจริงมากขึ้น โดยเลือกตัวอย่างกิ่งโมกน้ำหนัก 10 กรัม บรروجในแชมเบอร์ โดยแบ่งเป็น 3 ชุดทดลอง คือ ชุดทดลองที่บรروجกิ่งโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ด้วย 5% ไฮเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ ชุดทดลองที่บรروجกิ่งโมกตามธรรมชาติ และชุดทดลองที่บรروجกิ่งโมกตามธรรมชาติแล้วได้รับปุ๋ยพีชเข้มข้น 200 ppm (20-20-20) ที่พ่นให้ทางใบ และชุดควบคุมที่ไม่บรروجกิ่งโมก ให้อะซีแนฟธิลีน อะซีแนฟธิน ฟลูออรีน และพีแนนทรีน ที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 100 ppmV ในอากาศในแชมเบอร์ แล้วมีการเติม PAHs ทั้ง 4 ชนิด เพิ่มที่ 25 ppmV ทุกๆ 24 ชั่วโมง ซึ่ง PAHs หดเท่ากับ 350 ppmV คิดเป็นปริมาณ 24.64 มิลลิกรัม พบว่าปริมาณอะซีแนฟธิลีน อะซีแนฟธิน ฟลูออรีน และพีแนนทรีน ในชุดควบคุมจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากวันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ในขณะที่เดียวกันชุดทดลองทั้ง 3 ชุด ปริมาณอะซีแนฟธิลีน อะซีแนฟธิน ฟลูออรีน และพีแนนทรีน จะลดลงจากวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 จากนั้นจะค่อยๆเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 7 ดังแสดงในรูปที่ 4.9 ซึ่งคาดว่าเนื่องจากใน 3 วันแรก PAHs ทั้ง 4 ชนิด จะโดนกำจัดโดยการดูดซึมของเซลล์พืชและการย่อยสลายโดยแบคทีเรียบนกิ่งโมกแต่หลังจากวันที่ 3 การกำจัด PAHs จะเกิดจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว สังเกตได้จากหลังจากวันที่ 3 ปริมาณ PAHs ทั้ง 4 ชนิด ของชุดทดลองที่มีกิ่งโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นมากกว่าชุดทดลองที่มีกิ่งโมกตามธรรมชาติ และกิ่งโมกตามธรรมชาติแล้วได้รับปุ๋ยพีชที่พ่นให้ทางใบ

สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.9 ปริมาณ PAHs ในแซมเบอร์ ณ เวลาต่างๆ ใน 7 วัน โดยเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 100 ppmV
 ↓ แสดงการเติม PAHs 25 ppmV ทุกๆ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.9 (ต่อ)

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบปริมาณ อะซีแนพธิลีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีนและพีแนนทรีน ที่คงเหลือ ในอากาศในแซมเบอร์ (%) ในวันที่ 6 ที่บรรจุด้วยกิ่งโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ กิ่งโมกตามธรรมชาติ และกิ่งโมกตามธรรมชาติที่ได้รับปุ๋ยพืชที่พ่นให้ทางใบ

PAHs	ชุดทดลอง *		
	กิ่งโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์	กิ่งโมกตามธรรมชาติ	กิ่งโมกตามธรรมชาติที่ได้รับปุ๋ยพืชที่พ่นให้ทางใบ
อะซีแนพธิลีน	62.7 % a	37.9 % b	42.1 % b
อะซีแนพธีน	86.3 % a	36.4% b	36.9 % b
ฟลูออรีน	81.6 % a	45.1 % b	41.0 % b
พีแนนทรีน	81.0 % a	41.7 % b	42.9 % b

a,b หมายถึง ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

* คำนวณเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (แซมเบอร์ที่ไม่มีกิ่งโมก) โดยให้ชุดควบคุมเป็น 100% ในชุดควบคุมปริมาณอะซีแนพธิลีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน และพีแนนทรีน เท่ากับ 298.6, 216.2, 119.2 และ 182.1 ppmv ตามลำดับ

เนื่องจากในวันที่ 7 ปริมาณ PAHs ทั้ง 4 ชนิด ในชุดทดลองที่มีกิ่งโมกตามธรรมชาติและกิ่งโมกได้รับปุ๋ยพืชจะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เนื่องจากใบโมกบางส่วนร่วงและตายไป ทั้งนี้คาดว่าเป็นเพราะความเป็นพิษของ PAHs สอดคล้องกับรายงาน โดย Honour และคณะ (2009) ที่พบว่าไม้พุ่มขนาดเล็ก 12 ชนิดที่ปลูกบริเวณถนน ที่ได้รับไอเสียจากยานพาหนะ จะทำให้เกิดการหลุดร่วงของใบ และการออกดอกช้า ซึ่งส่งผลให้สภาพแหล่งที่อยู่ของแบคทีเรียเปลี่ยนแปลง การทดลองนี้จึงวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของปริมาณอะซีแนพธิลีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน และพีแนนทรีน ในวันที่ 6 ของชุดทดลองเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และพบว่าอะซีแนพธิลีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน และพีแนนทรีน ของชุดทดลองที่มีกิ่งโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์มีปริมาณ (%) สูงสุดถึง 62.7, 86.3, 81.6 และ 81.0 ppmV ตามลำดับ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่มีกิ่งโมกตามธรรมชาติและกิ่งโมกตามธรรมชาติที่ได้รับการพ่นปุ๋ยพืชทางใบ ในขณะที่ชุดทดลองที่มีกิ่งโมกตามธรรมชาติและกิ่งโมกตามธรรมชาติที่ได้รับการพ่นปุ๋ยพืชทางใบมีปริมาณ PAHs ทั้ง 4 ชนิดไม่แตกต่างเมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.4 จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียบนใบโมกตามธรรมชาติมีส่วนช่วยในการกำจัด PAHs ในอากาศ แต่ปุ๋ยพืชที่พ่นให้กับต้นโมก ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพกำจัด PAHs ที่ใบได้

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัด อะซีแนพธิลีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน และ ฟีนแอนทริน ของไบโอมกตามธรรมชาติในขวดทดลอง ในวันที่ 4 และกึ่งโอมกตามธรรมชาติและกึ่งโอมกตามธรรมชาติที่ได้รับปุ๋ยในแชมเบอร์ ในวันที่ 6

PAHs	ชุดทดลอง (%)		
	ไบโอมกตามธรรมชาติ ในขวดทดลอง *	กึ่งโอมกตามธรรมชาติ ในแชมเบอร์ **	กึ่งโอมกตามธรรมชาติที่ได้รับปุ๋ย พืชที่พ่นให้ทางไบโอมกตามธรรมชาติ ในแชมเบอร์ **
อะซีแนพธิลีน	16.4 % AB	37.9 % B	42.1 % B
อะซีแนพธีน	19.9 % B	36.4% B	36.9 % B
ฟลูออรีน	14.7 % A	45.1 % B	41.0 % B
ฟีนแอนทริน	17.5 % AB	41.7 % B	42.9 % B

A,B หมายถึง อักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

* คำนวณเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ขวดทดลองที่ไม่มีไบโอมก) โดยให้ชุดควบคุมเป็น 100% ในชุดควบคุมปริมาณอะซีแนพธิลีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน และฟีนแอนทริน เท่ากับ 719.0, 731.2, 687.7 และ 466.0 ppmv ตามลำดับ

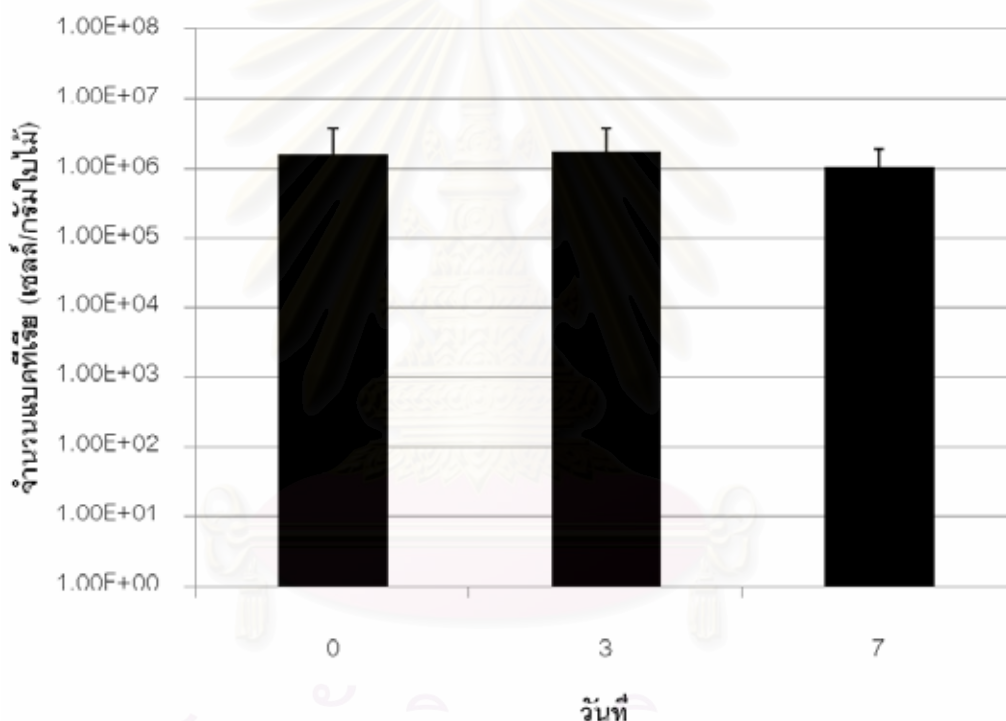
** คำนวณเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (แชมเบอร์ที่ไม่มีกึ่งโอมก) โดยให้ชุดควบคุมเป็น 100% ในชุดควบคุมปริมาณอะซีแนพธิลีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน และฟีนแอนทริน เท่ากับ 298.6, 216.2, 119.2 และ 182.1 ppmv ตามลำดับ

จากผลการทดลองข้อ 4.3-4.4 แสดงให้เห็นว่าไบโอมกและจุลินทรีย์บนไบโอมกสามารถกำจัด PAHs ทั้ง 4 ชนิด ที่อยู่ในอากาศได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าไบโอมกแห้งและไบโอมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อนำผลการทดลองดังกล่าวมาวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการกำจัด PAHs แต่ละชนิด พบว่าในขวดทดลองที่บรรจุไบโอมกตามธรรมชาติจะสามารถกำจัดฟลูออรีนได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ PAHs ชนิดอื่นๆ ในขณะเดียวกัน ประสิทธิภาพการกำจัดอะซีแนพธีนน้อยที่สุด แต่ในแชมเบอร์ที่บรรจุกึ่งโอมกตามธรรมชาติและกึ่งโอมกตามธรรมชาติที่ได้รับปุ๋ยพืชทางไบ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในการกำจัด PAHs ทั้ง 4 ชนิด เนื่องจากปริมาณ PAHs ทั้ง 4 ชนิดที่เติมลงไปแชมเบอร์น้อยกว่าในขวดทดลองมาก โดยในแชมเบอร์ปริมาณ PAHs ทั้งหมดเป็น 350 ppmv ในขณะที่ในขวดทดลองปริมาณ PAHs ทั้งหมดเป็น 800 ppmv ดังนั้นในแชมเบอร์จึงไม่มีความแตกต่างในการกำจัด PAHs แต่ละชนิด ดังแสดงในตาราง 4.5

4.4.3 จำนวนแบคทีเรียตามธรรมชาติและแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs บนใบไมก

หลังจากได้รับปุ๋ยพืชที่พ่นให้ทางใบ

เพื่อศึกษาว่าปุ๋ยมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียบนใบไมกหรือไม่ การทดลองนี้ได้นับจำนวนแบคทีเรียตามธรรมชาติจากใบไมก ที่ได้รับปุ๋ยพืชสูตร 20-20-20 ความเข้มข้น 200 ppm ที่เลี้ยงด้วยอาหาร NB ที่เพิ่มกลีเซอรอล ด้วยวิธี MPN เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นและจำนวนแบคทีเรียหลังจากได้รับปุ๋ยพืชไปแล้ว 3 และ 7 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียตามธรรมชาติในวันที่ 0, 3 และ 7 เป็น 1.61×10^6 , 1.8×10^6 และ 1.06×10^6 เซลล์/กรัมใบไม้ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยวิธี Duncan New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ดังรูปที่ 4.10 แสดงว่าปุ๋ยพืชที่ให้ไป ไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียตาม

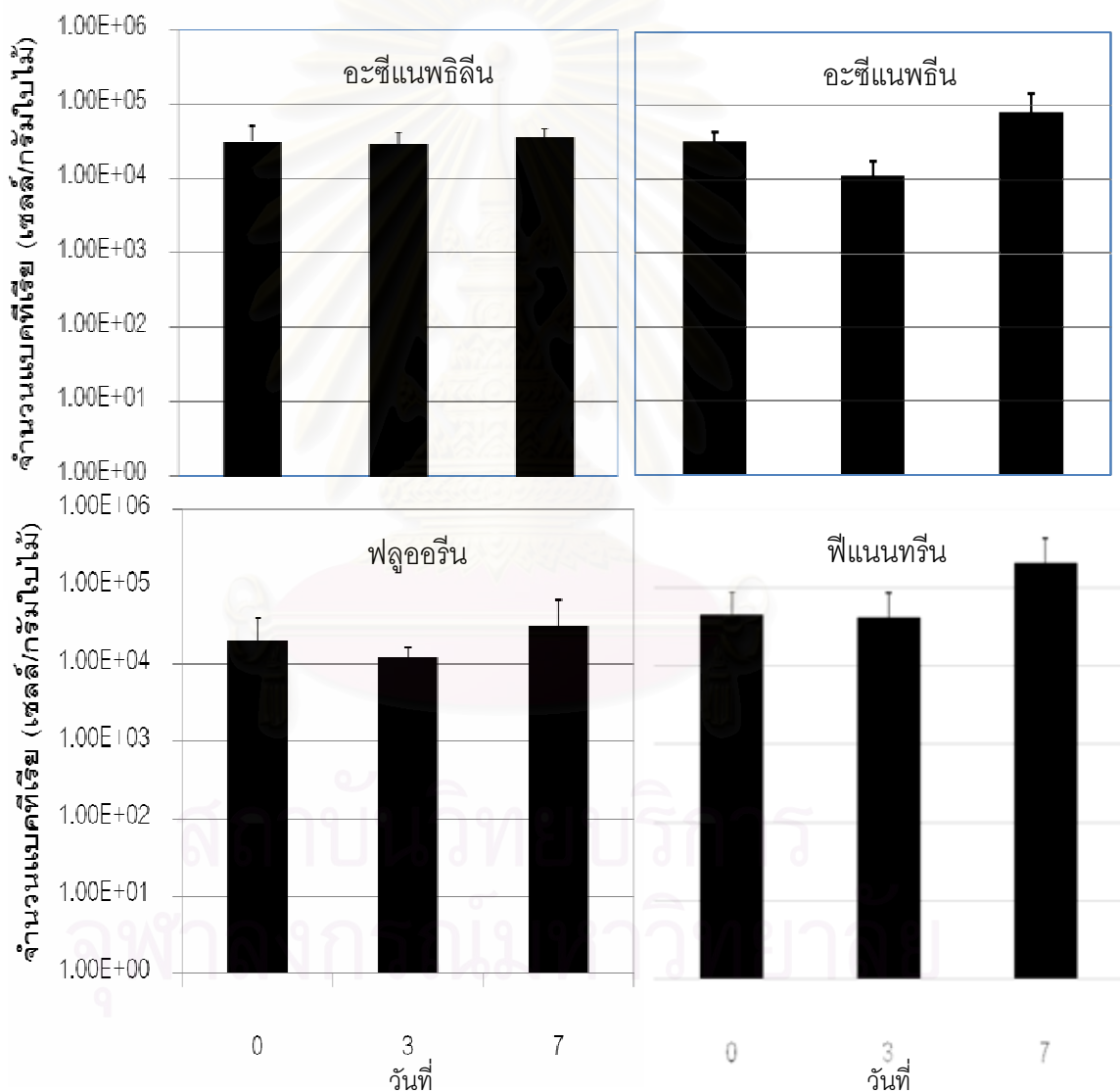


รูปที่ 4.10 จำนวนแบคทีเรียตามธรรมชาติบนใบไมกหลังจากได้รับปุ๋ยพืช ในวันต่างๆ

ธรรมชาติ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ 4.4.2 ที่พบว่าประสิทธิภาพการกำจัด PAHs ทั้ง 4 ชนิดในแชมเบอร์ของชุดทดลองที่มีกิ้งไมกตามธรรมชาติและกิ้งไมกตามธรรมชาติที่ได้รับการพ่นปุ๋ยพืชทางใบ ไม่แตกต่างกัน

สำหรับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย อะซีแนฟลิลิน อะซีแนฟลิน ฟลูออรีน และพีแนนทรีนจากใบไมกเมื่อได้รับปุ๋ยพืชที่พ่นทางใบแล้ว พบว่ามีจำนวนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยวิธี Duncan New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ดังแสดงในรูปที่ 4.11 แสดงว่าปุ๋ยพืชที่ให้ไป ไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ซึ่ง

สอดคล้องกับการทดลองที่ 4.4.2 ที่พบว่าประสิทธิภาพการกำจัด PAHs ทั้ง 4 ชนิด ในแชนเบอร์ของชุดทดลองที่มีกิ่งโมกตามธรรมชาติและกิ่งโมกตามธรรมชาติที่ได้รับปุ๋ยไม่แตกต่างกัน ซึ่งเกิดจากพืชสามารถดูดซึมปุ๋ยพืชที่พ่นให้ทางใบได้เร็วกว่าแบคทีเรียจะนำไปใช้ได้ สอดคล้องกับรายงานของ Franke (1986) และ Wojcik (2004) ที่พบว่าพืชสามารถดูดซึมปุ๋ยได้ภายใน 1 ชั่วโมง ทำให้การพ่นปุ๋ยพืชไม่มีส่วนช่วยเพิ่ม ทั้งจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดตามธรรมชาติ และแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs



รูปที่ 4.11 จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs บนใบโมกหลังจากได้รับปุ๋ยพืช ในวันต่างๆ

4.4.4 อัตราการกำจัดอะซีแนพทีลิน อะซีแนพทีน ฟลูออรีนและพีแนนทีริน ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ของแบคทีเรียบนกิ้งโมก ในแชมเบอร์

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบอัตราการลดลงของอะซีแนพทีลิน อะซีแนพทีน ฟลูออรีนและพีแนนทีริน ในอากาศในแชมเบอร์ ภายใน 24 ชั่วโมง ที่บรรจุด้วยกิ้งโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และกิ้งโมกตามธรรมชาติ

PAHs	อัตราการกำจัด PAHs ของ กิ้งโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ (มิลลิกรัม/กรัมกิ้งโมก/ชั่วโมง)	อัตราการกำจัด PAHs ของ กิ้งโมกตามธรรมชาติ (มิลลิกรัม/กรัมกิ้งโมก/ชั่วโมง)
อะซีแนพทีลิน	0.26 a	0.38 b
อะซีแนพทีน	0.32 a	0.57 b
ฟลูออรีน	0.17 a	0.29 b
พีแนนทีริน	0.16 a	0.15 a

a,b หมายถึง อักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

* อัตราการกำจัด PAHs ของแบคทีเรียหาจากนำอัตราการกำจัด PAHs ของกิ้งโมกตามธรรมชาติ หักลบกับอัตราการกำจัด PAHs ของกิ้งโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์

จากการทดลองที่ 4.4.2 แสดงให้เห็นว่าการกำจัด PAHs ของในแต่ละชุดทดลองในแต่ละวัน จะคงที่ ดังนั้นการทดลองนี้จึงหาอัตราการกำจัด PAHs ในอากาศของกิ้งโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และกิ้งโมกตามธรรมชาติ โดยนำกิ้งโมกน้ำหนัก 10 กรัม มาใส่ในแชมเบอร์ โดยแบ่งเป็น 2 ชุดทดลองคือ ชุดทดลองที่บรรจุกิ้งโมกตามธรรมชาติและกิ้งโมกที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ด้วย 5% โซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ เติม PAHs ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ppmV ซึ่งคิดเป็นปริมาณ 9.856 มิลลิกรัม โดยหาอัตราการกำจัด PAHs จากความชันของกราฟ (slope) ระหว่างปริมาณ PAHs ที่เหลือในอากาศ (มิลลิกรัม) และเวลาที่ชั่วโมงต่างๆ ดังรูปในภาคผนวก จ พบว่าชุดทดลองที่บรรจุ กิ้งโมกตามธรรมชาติและกิ้งโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ PAHs ทั้ง 4 ชนิด มีอัตราการลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 20 แต่อัตราการลดลงของชุดทดลองบรรจุกิ้งโมกตามธรรมชาติจะมากกว่า เพราะการกำจัด PAHs เกิดจากการดูดซึมโดยเซลล์พืชและการย่อยสลาย โดยแบคทีเรียที่ใบ แต่ชุดทดลองที่บรรจุกิ้งโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์ การกำจัด PAHs เกิดจากการดูดซึมโดยเซลล์พืชเพียงอย่างเดียว ดังนั้นภายใน 24 ชั่วโมงอัตราการลดลงของอะซีแนพทีลิน อะซีแนพทีน ฟลูออรีนของชุดทดลองที่บรรจุกิ้งโมกตามธรรมชาติเป็น 0.38, 0.57 และ 0.29 มิลลิกรัม/

กรัมกึ่งโมก/ชั่วโมง ซึ่งมากกว่าชุดทดลองที่บรรจุกึ่งโมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญ ดังตาราง 4.6 ยกเว้นพีแนทรีนซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติเนื่องจากเซลล์พืชสามารถดูดซึมพีแนทรีนได้ดีกว่า PAHs อื่นๆ ดังนั้นแบคทีเรียจึงนำไปใช้ไม่ได้ สอดคล้องกับผลการทดลองที่ 4.3.2 ที่พบว่าปริมาณ (%) ของพีแนทรีน วันที่ 4 ของชุดทดลองที่บรรจุไบโอมกปลอดเชื้อจุลินทรีย์และไบโอมกตามธรรมชาติที่เหลือในอากาศ ไม่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 4.2

จากการทดลองหาอัตราการกำจัด PAHs ในอากาศ โดยแบคทีเรียบนไบโอมก ดังตารางที่ 4.6 ซึ่งสามารถคำนวณเพื่อใช้บำบัด PAHs ในอากาศในสภาพแวดล้อมจริงได้ เช่น อากาศภายในอาคารแห่งหนึ่งปนเปื้อนอะซีแนพทีน 100 มิลลิกรัม หากปลูกต้นโมกน้ำหนัก 20 กรัมจะสามารถกำจัดอะซีแนพทีนได้หมดในเวลา 9 ชั่วโมง แต่ในขณะเดียวกันภายใน 9 ชั่วโมง แบคทีเรียบนไบโอมกจะย่อยสลาย อะซีแนพทีน 43.85 มิลลิกรัม ที่เหลือจะโดนดูดซึมโดยไบโอมก ซึ่งในความเป็นจริงอาจใช้เวลาน้อยกว่านี้ เพราะในดินมีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้ ดังมีรายงานของ Orwell และคณะ (2004) ได้ศึกษาพบว่าแบคทีเรียในดินในกระถางที่ปลูกต้นไม้ เป็นตัวหลักในการกำจัดเบนซีนในอากาศได้ถึง 12-27 ppm ต่อวัน นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลดังกล่าวไปใช้เป็นแนวทางในการจัดการมลพิษทางอากาศที่เกิดจาก PAHs ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

สารประกอบ PAHs เกิดขึ้นจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ และปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งดิน น้ำ และอากาศ ปัจจุบันมีรายงานปริมาณ PAHs ปนเปื้อนในอากาศมากขึ้น Boonyatumanond และคณะ (2007) และ Chang และคณะ (2006) พบว่าบริเวณถนนในกรุงเทพมหานครที่มีการจราจรหนาแน่นเป็นแหล่งผลิตและสะสม PAHs หลายชนิด สอดคล้องกับการศึกษาของ Laowagul และคณะ (2000) รายงานการปนเปื้อน PAHs ในกรุงเทพมหานครในเขตเมืองมี PAHs สูงกว่าเขตอุตสาหกรรมถึง 3 เท่า ในขณะที่เดียวกัน Waight (2005) พบว่าแบคทีเรียตามธรรมชาติบนใบเสริมในประเทศไทยสามารถย่อยสลายพีแนทรีนที่ตกค้างบนใบได้ การศึกษาของ นุชนาฎ ทองธรรมชาติ (2550) พบว่าใบโมกมีจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายพีแนทรีนมากที่สุดและมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดพีแนทรีน ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ได้ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียจากใบโมกในการกำจัด PAHs 4 ชนิด ได้แก่ อะซีแนฟลิซิน อะซีแนฟลิน ฟลูออรีน และพีแนทรีน ที่อยู่ในอากาศ และอิทธิพลของปุ๋ยพืชที่พ่นให้ทางใบ รวมถึงการนับจำนวนและจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ดังกล่าว

พบว่าแบคทีเรียบนใบโมกมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดอะซีแนฟลิซิน อะซีแนฟลิน ฟลูออรีน และพีแนทรีน โดยการศึกษาในขวดทดลองขนาด 60 มิลลิลิตร พบว่าใบโมกธรรมชาติสามารถกำจัด PAHs ในอากาศให้เหลือเพียง 14.7% -19.9% ของปริมาณ PAHs ในชุดควบคุมที่ไม่มีใบโมก และพบว่าแม้ว่าจะเติม PAHs ทุกๆ วันเป็นเวลา 7 วัน ในการทดลองที่ใช้แชมเบอร์ แบคทีเรียบนใบโมกก็ยังสามารถกำจัด PAHs ได้อย่างต่อเนื่อง โดยพบว่าปริมาณ PAHs ที่เหลือในแชมเบอร์วันที่ 7 เพียง 36.4% - 45.1% ของปริมาณ PAHs ในชุดควบคุมที่ไม่มีใบโมก และปุ๋ยพืชที่พ่นให้ทางใบไม่เพิ่มประสิทธิภาพการกำจัด PAHs ในอากาศในแชมเบอร์ ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ที่ไม่เพิ่มขึ้น แม้จะได้รับปุ๋ยพืชไปแล้ว 7 วัน ในขณะเดียวกันแชมเบอร์ที่บรรจุกิ่งโมกตามธรรมชาติมีอัตราการกำจัด PAHs สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับใบโมกที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งการกำจัด PAHs โดยแบคทีเรียบนใบโมกจะมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ใบโมกอย่างเดียว เพราะเป็นการย่อยสลาย PAHs กลายเป็นพลังงาน ในขณะที่การกำจัดของใบพืชเป็นเพียงการดูดซึม (Absorption) ทำให้อาจเกิดการหลุดได้ (Desorption) และเมื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียบนใบโมกที่สามารถย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ ได้แก่ อะซีแนฟลิซิน อะซีแนฟลิน ฟลูออรีน พีแนทรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนทีน ไพรีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน พบว่าอยู่ในกลุ่ม *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Naxibacter*, *Parvibaculum*

และ *Pseudomonas* ซึ่งเมื่อนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ บนใบไมก พบว่ามีจำนวนตั้งแต่ 6.37×10^3 - 4.37×10^4 เซลล์/กรัมใบไม้ โดยจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ทุกชนิด มีค่าน้อยกว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบนใบ ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรีย 1.61×10^6 เซลล์/กรัมใบไม้

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียที่อยู่บนใบไมกมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัด PAHs ที่ปนเปื้อนในอากาศ ซึ่งก่อนหน้านี้มีเพียงรายงานที่แบคทีเรีย *Pseudomonas putida* TVA8 บนใบ *Azalea indica* สามารถย่อยสลายโทลูอีนในอากาศได้โดย Kempeneer และคณะ (2003) และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. CF600 และแบคทีเรียตามธรรมชาติ บนใบถั่วและข้าวโพด สามารถย่อยสลายฟีนอลในอากาศได้ โดย Sandhu และคณะ (2007) ดังนั้นงานวิจัยสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัด PAHs ที่ปนเปื้อนในอากาศทั้งแบบภายในอาคารและภายนอกอาคาร และอาจนำไปประยุกต์ใช้บำบัดสารพิษในอากาศอื่นๆได้ เช่น เบนซิน

ข้อจำกัดในการวิจัยนี้

- ประสิทธิภาพในการกำจัด PAHs ของใบไมกในแต่ละการทดลอง มีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย เนื่องจากจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นบนใบไมกในระยะเวลาที่เก็บมาศึกษาอาจจะไม่เท่ากัน ดังมีรายงานของ Yadav และคณะ (2004) ที่พบว่าจำนวนแบคทีเรียบนใบพืชแต่ละเดือนมีจำนวนไม่เท่ากัน เนื่องจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น ปริมาณความชื้น แสง อุณหภูมิ ฤดูกาล แหล่งอาหาร และสรีรวิทยาของพืช
- งานวิจัยนี้ใช้เมธานอลเป็นตัวทำละลายของ PAHs และเนื่องจากการทดลองในระบบปิด (ขวดทดลองและแชมเบอร์) ทำให้ในอากาศมีทั้งเมธานอลและ PAHs ระเหยรวมกันอยู่ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อแบคทีเรียและใบไมก นอกจากนี้เมธานอลในอากาศจะเข้าไปจับแ่งกับ PDMS ที่เติม SPME ทำให้ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ PAHs ลดลง
- จากการศึกษาก่อนปริมาณ PAHs ในอากาศของกรุงเทพมหานคร พบว่ามีค่า 41-189 นาโนกรัม/ลูกบาศก์เมตร (Boonyatumanond และคณะ, 2007; Tantawiroon และคณะ, 2007) ซึ่งน้อยกว่าปริมาณ PAHs ที่ใช้ในการศึกษานี้ ทั้งนี้เนื่องจากการใช้ PAHs ความเข้มข้นน้อยในอากาศ จะไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างการกำจัดโดยแบคทีเรียบนใบไมกและใบไมกได้ โดยเมื่อใช้ความเข้มข้นของ PAHs น้อย จะถูกใบไมกดูดซับทั้งหมดเนื่องจากดูดซับโดยใบไมกเกิดได้ตลอดเวลา ทำให้ไม่มี PAHs เหลือสำหรับแบคทีเรียนำไปใช้

- การศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัด PAHs ของไบโอมก ไม่สามารถทดสอบในระยะเวลา มากกว่า 7 วัน เนื่องจากความเป็นพิษของ PAHs ทำให้ไบโอมกร่วง ทำให้ยังไม่สามารถ ประเมินประสิทธิภาพระยะยาวของการกำจัด PAHs โดยไบโอมกและแบคทีเรียบนไบโอมก ได้
- การศึกษานี้เป็นการวัดสารพิษในอากาศ ซึ่งการควบคุมปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมทำได้ยาก มาก ทำให้ค่าที่วัดได้มีความแปรปรวนสูง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยต่อไป

- ศึกษาจำนวนและชนิดของแบคทีเรียในแต่ละเดือนบนใบโมก เพื่อนำไปวิเคราะห์หาช่วงเวลาของต้นโมกที่มีแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs มีจำนวนมากที่สุดในแต่ละเดือน ซึ่งน่าจะมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัด PAHs และให้มีการปลูกต้นโมกในช่วงนั้น
- ศึกษาจำนวนและชนิดของแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ในต้นพืชชนิดอื่นๆ เพื่อหาต้นพืชที่มีจำนวนและชนิดแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs สูงสุด แล้วอาจจะส่งเสริมให้มีการปลูกไม้ประดับชนิดต่างๆ หมุนเวียนกันไป
- ศึกษาต้นพืชชนิดอื่นที่ทนต่อ PAHs ได้มากกว่านี้ เช่น ต้นเข็ม ต้นแก้ว เพื่อหาชนิดพืชที่สามารถทนต่อปริมาณ PAHs สูงๆ และทนต่อการได้รับ PAHs อย่างต่อเนื่อง เพื่อนำปลูกในสภาพแวดล้อมจริง พืชจะสามารถทนต่อ PAHs ได้นาน
- ศึกษาการใช้แบคทีเรียบนต้นโมกและต้นพืชชนิดอื่นๆ ในการกำจัดสารพิษชนิดอื่นๆ ในอากาศ เช่น ไดออกซิน โทลูอิน ฟีนอล เบนซิน เพื่อหาชนิดสารพิษในอากาศที่แบคทีเรียบนต้นโมกสามารถกำจัดได้ดีที่สุด
- ออกแบบแชมเบอร์ให้ไม่มีการรบกวนด้วยเมธานอล ดังวิธีของ Lin และคณะ (2007) ที่นำทราย 100 กรัม มาผสมกับพีแชนทรีนที่ละลายในอะซีโตน (5 กรัม/ลิตร) แล้วนำไประเหยให้แห้งที่ตู้ดูดควัน 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบรรจุในคอลัมน์แก้ว จากนั้นนำไปต่อกับแชมเบอร์โดยให้ด้านหนึ่ง ต่อกับพัดลมเป่าอากาศ และมีการเป่าอากาศให้ผ่านทราย เพื่อพัดให้พีแชนทรีนที่ระเหยออกมาเข้าไปในแชมเบอร์ โดยกำหนดอัตราการให้อากาศ

รายการอ้างอิง

- นุชนาฏ ทองธรรมชาติ. 2550. ใบไม้ประดับและแมคที่เรื้อย่อยสลายพีแนนทรินบนผิวใบ. วิทยานิพนธ์ปริญญา
มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Alfani, A., De Nicola F., Maisto G. and Vittoria Prati M. (2005) Long-term PAH accumulation after bud
break in *Quercus ilex* L. leaves in a polluted environment. *Atmospheric Environment*. **39**: 307–
314.
- ATSDR. 1995. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. acenaphthene,
acenaphthylene, anthracene, benzo(a)anthracene, benzo(a)pyrene, benzo(b)fluoranthene,
benzo(g,i,h)perylene, benzo(k)fluoranthene, chrysene, dibenzo(a,h)anthracene, fluoranthene,
fluorene, indeno(1,2,3-c,d)pyrene, phenanthrene, pyrene: Clement International Corporation,
under Contract NO. 205-88-0608. ATSDR/TP-90-20.
- Boonyatumanond, R., Murakami M., Wattayakorn G., Togo A. and Takada H. (2007) Sources of
polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in street dust in a tropical Asian mega-city,
Bangkok, Thailand. *Science of the Total Environment*. **384**: 420-432.
- Chang, K.-F., Fang G.-C., Chen J.-C. and Wu Y.-S. (2006) Atmospheric polycyclic aromatic
hydrocarbons (PAHs) in Asia: A review from 1999 to 2004. *Environmental Pollution* **142**: 388-
396
- Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**: 351-368.
- Cornelissen, G., Rigterink H., Ferdinandy M. M. A., and van Noort P. C. M. (1998) Rapidly Desorbing
Fractions of PAHs in Contaminated Sediments as a Predictor of the Extent of Bioremediation
Environ. Sci. Technol., **32**: 966-970
- Diane M., Wagrowski, and Ronald A. (1997) Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Accumulation in Urban,
Suburban, and Rural Vegetation. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 279-282.
- De Kempeneer, L., Sercu B., Vanbrabant W., Van Langenhove H., and Verstraete W. (2004)
Bioaugmentation of the phyllosphere for the removal of toluene from indoor air. *Applied
Microbiology and Biotechnology*. **64**: 284-288.
- Franke, W. (1986) The basic of foliar absorption of fertilizers with special regard to the mechanism.
Foliar Fertilization: Proceedings of the First International Symposium on Foliar Fertilization. 17-
25.
- Gaspari L., Chang Seong-S., Santella Regina M., Garte S., Pedotti P. and Taioli E. (2003) Polycyclic
aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human sperm as a marker of DNA damage and
infertility. *Mutation Research* **535**: 155–160 .

- Garivait, H., Laowagul W., Sukasem P., Ngod-Ngam S., Polprasert C. and Reutergardh L. B. (2000) Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) In Bangkok Urban Air. *Environmental Research and Training Center*. 58-73.
- Gao, Y., Yu X.Z., Wu S.C., Cheung K.C., Tam N.F.Y., Qian P.Y. , Wong M.H. (2006) Interactions of rice (*Oryza sativa* L.) and PAH-degrading bacteria (*Acinetobacter* sp.) on enhanced dissipation of spiked phenanthrene and pyrene in waterlogged soil. *Science of the Total Environment*. **372**: 1–11.
- Gao, Y., & Zhu, L. (2004). Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere*, **55**: 1169–1178
- Honour, S. L., J. Bell N. B., Ashenden T. W., J. Cape N. and Power S. A. (2009) Responses of herbaceous plants to urban air pollution: Effects on growth, phenology and leaf surface characteristics. *Environmental Pollution* 1–8.
- Jiao, X.C., Xu F.L., Dawson R., Chen S.H. and Tao S., (2007) Adsorption and absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to rice roots. *Environ. Pollut.* **148**: 230–235.
- Juhasz A. L. and Naidu R. (2000) Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation* **45**: 57-88.
- Kirchner, M., Matisova E., Kotianova P., Lesko J. and Puxbaum H. (2003) Headspace Solid Phase Microextraction of atmospheric organic aerosols. *Petroleum and coal* **45**:119-124
- Kola, k., Ciganek M. and Malecha J. (2004) Air/polymer distribution coefficients for polycyclic aromatic hydrocarbons by solid-phase microextraction sampling. *Journal of Chromatography A*. **1029**: 263-266 .
- Kuiper, I., Ellen L. L., Guido V. B. and Ben J. J. Lugtenberg (2004) Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction. *MPMI*. **17**: 6–15.
- Lambais, M. R., Crowley D. E., Cury J. C., Bull R. C. and Rodrigues R. R. (2006) Bacterial Diversity in Tree Canopies of the Atlantic Forest www.sciencemag.org. **16**: 1917.
- Laowagul, W., Sukasem P., Ngodngam S. and Srirattana Tabucanon M. (2000) Investigation of PAHs in Ambient Air in Industrial and Urban Area. *Environmental Research and Training Center*. 16-17.
- Ledakowicz, S., Miller, J. S. and Olejnik D. (1999) Oxidation of PAHs in water solution by ozone combined with ultraviolet radiation International. *Journal of Photoenergy* **3**: 96-101

- Li-bin, L., Yan L., Jin-mings L., Ning T., Kazuichi H. and Tsuneaki M. (2007) Development of analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in airborne particulates: A review. *Journal of Environmental Sciences* **19**: 1-11.
- Lin, H., Tao S., Zuo Q. and Coveney R.M. (2007) Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by maize plants. *Environmental Pollution* **148**: 614-619.
- Lindow, S.E., and Brandl, M.T. (2003) Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 1875-1883.
- Liste, H.-H. and Alexander M. (2000) Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere*. **40**: 7-10.
- Liu, M., Cheng S.B., Ou D.N., Hou L.J., Gao L., Wang L.L., Xie Y.S., Yang Y. and Xu S.Y. (2007) Characterization, identification of road dust PAHs in central Shanghai areas, China *Atmospheric Environment* **41**: 8785–8795.
- Liu, Y., Zhu L. and Shen X. (2001) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Indoor and Outdoor Air of Hangzhou, China. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 840-844.
- Miller, J.S. and Olejnik D.(2000) Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Wat. Res.* **35**: 233-243
- Mueller, J. G., Chapman, P. J., and Pritchard, P. H. 1989. Action of fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 3085-3090.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 695-700.
- Nicola, De F., Maisto G., Prati M.V. and Alfani A. (2007) Leaf accumulation of trace elements and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in *Quercus ilex* L. *Environmental Pollution*. **12**: 1-8.
- Norramit, P., Cheevaporn V., Itoh N. and Tanaka K. (2005) Characterization and carcinogenic risk Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the respirable fraction of airborne particle in Bangkok metropolitan area. *Journal of health science* **51**: 437-446
- Nowak, D. J., Crane D. E. and Stevens J. C. (2006) Air pollution removal by urban trees and shrubs in the United States. *Urban Forestry & Urban Greening*. **4**: 115–123
- Oanh, N.T. K. and Dung N. T. (1999) Emission of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Particulate Matter from Domestic Combustion of Selected Fuels. *Environ. Sci. Technol.* **33**: 2703-2709

- Oanh, N.T. K., L. Reuterga B., Dung N.T., Y u M.-H. and Yao W.-X. (2000) Polycyclic aromatic hydrocarbons in the airborne particulate matter at a location 40km north of Bangkok, Thailand. *Atmospheric Environment* **34**: 4557-4563.
- Orwell, R.L., Wood R.L., Tarren J., Torpy F., and Burchett, M.D. (2004) Removal of benzene by the indoor plant/substrate microcosm and implications for air quality. *Water Air Soil Pollution*. **157**: 193-207.
- Ristolw, T., Pellinenc J., Ptricia L., Hoof V., and Kukkoneno J. (1996) Characterization of lake Ladoga sediment. II. Toxic chemicals. *Chemosphere* **32**: 179-192.
- Ruchirawat, M., Mahidol C., Tangjarukij C., Pui-ock S., Jensen O., Kampeerawipakorn O., Tuntaviroon J., Aramphongphan A. and Autrup H. (2002) Exposure to genotoxins present in ambient air in Bangkok, Thailand -particle associated polycyclic aromatic hydrocarbons and biomarkers. *The Science of the Total Environment*. **287**: 121-132
- Ruchirawat, M., Settachan D., Navasumrit P., Tuntawiroon J. and Autrup H. (2007) Assessment of potential cancer risk in children exposed to urban air pollution in Bangkok, Thailand. *Toxicology Letters*. **168**: 200–209.
- Rosaria, M. M., and Santino O. (2008) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in indoor dust matter of Palermo (Italy) area: Extraction, GC–MS analysis, distribution and sources *Atmospheric Environment* **42**: 1801–1817.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sandhu, A., Halverson L.J. and Beattie G.A. (2007) Bacterial degradation of airborne phenol in the phyllosphere. *Environmental Microbiology*. **9**: 383-392.
- Smith K. E. C., Gareth O. Thomas, and Kevin C. J. (2001) Seasonal and Species Differences in the Air-Pasture Transfer of PAHs. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 2156-2165.
- Straif, K., Baan R., Grosse Y., Secretan B., El Ghissassi F. and Coglianò V. (2006) Carcinogenicity of household solid fuel combustion and of high-temperature frying, *Lancet-Oncology* **7**: 977–978.
- Steven, E., Lindow and Brandl M. T. (2003) Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 1875-1883.
- Tao, S., Jiao, X.C., Chen, S.H., Xu, F.L., Li, Y.J., Liu, F.Z., (2005). Uptake of vapor and particulate polycyclic aromatic hydrocarbons by cabbage. *Environ. Pollut.* **140**, 13-15
- Tillman F. Indoor air unit conversion. National Research Council {online} http://www.epa.gov/athens/learn2model/part-two/onsite/ia_unit_conversion_detail.htm. Accessed 19 February 2009

- Trejo, M., and Quintero, R. 2000. Bioremediation of contaminated soils. In: J.O.Eugenia, G. Sanchez and H. Elizabeth (eds.), Environmental biotechnology and cleaner bioprocess, 179-189. London: Taylor and Francis.
- Tuntawiroon¹, J., Mahidol C., Navasumrit P., Autrup H. and Ruchirawat M. (2007) Increased health risk in Bangkok children exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons from traffic-related sources. *Carcinogenesis* **28**: 816–822
- Vaz, J.M. (2003) Screening direct analysis of PAHS in atmospheric particulate matter with SPME. *Talanta* **60**: 687-693
- Waight, K. 2005. Plant leaves and their associated bacteria for the degradation of PAH deposited on leaf surface. Master Thesis. Environmental Management. Chulalongkorn University, Thailand.
- Wang, Y.Q., Tao S., Jiao X.C., Coveney R.M., Wu S.P. and Xing B.S. (2008) Polycyclic aromatic hydrocarbons in leaf cuticles and inner tissues of six species of trees in urban Beijing. *Environmental Pollution* **151**: 158-164
- Wild, E., Dent J., Thomas G. O. and Jones K. C. (2006) Visualizing the Air-To-Leaf Transfer and Within-Leaf Movement and Distribution of Phenanthrene: Further Studies Utilizing Two-Photon Excitation Microscopy. *Environ. Sci. Technol.* **40**: 907-916
- Wilson, S. C. and Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Environ. Pollut.*, **81**: 229-249.
- Wojcik, P. (2004) Uptake of mineral nutrients from foliar fertilization. *J. Fruit Ornam. Plant Res. Special ed.* **12**: 201-218
- Yadav, R.K.P., Karamanoli K. and Vokou D. (2005) Bacterial colonization of the phyllosphere of Mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features. *Microbial Ecology*. **50**: 185-196
- Yadav, R.K.P., Halley J.M., Karamanoli K., Constantinidou H.-I. and Vokou D. (2004) Bacterial populations on the leaves of Mediterranean plants: quantitative features and testing of distribution models. *Environmental and Experimental Botany* **52**: 63–77
- Yang, C.-H., Crowley D.E., Borneman J., and Keen N.T. (2001) *Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. Proceedings of the National Academy of Sciences.* **98**: 3889-3894.
- Zhang, Y. and Tao S. (2009) Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. *Atmospheric Environment* **43**: 812–819



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว carbon free mineral medium (CFMM) pH 7.0

สารละลาย A

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.8	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH 7.0 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย B

เฟอร์ริกคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม/มิลลิลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม/มิลลิลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม/มิลลิลิตร

สารละลาย B แต่ละชนิดทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง ผ่านหัวกรอง ขนาด 0.20 ไมโครเมตร และเติมสารละลาย B ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย A ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria Bertani (LB) pH 7.0

ทริปโตเน (Tryptone)	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria Bertani (LB) pH 7.0

เติมผงวุ้น 15 กรัม ในอาหารเหลว LB pH 7.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SOC

สารละลาย A

ทริปโตน (Tryptone)	20	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.58	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	2.46	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl)	2	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.18	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 980 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย B

กลูโคส (Glucose)	3.6	กรัม
น้ำปลอดประจุ	20	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมกับน้ำปลอดประจุ จนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรอง ขนาด 0.20 ไมโครเมตร ผสมสารละลาย A และ B ทั้งหมดด้วยกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Ψ b pH 7.0

ทริปโตน (Tryptone)	20	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	5	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH 7.0 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Ψ b pH 7.0

เติมผงวุ้น 15 กรัม ในอาหารเหลว Ψ b pH 7.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB

สารสกัดจากเนื้อวัว (Beef Extract)	3	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
กลีเซอรอล (Glycerol)	25	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารละลายอะซีแนพทีนในเฮกเซน ความเข้มข้น 5,000 ppm

อะซีแนพทีน	0.05	กรัม
เฮกเซน	1	มิลลิลิตร

ละลายอะซีแนพทีนจนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายอะซีแนพทีลินในเฮกเซน ความเข้มข้น 5,000 ppm

อะซีแนพทีลิน	0.0.5	กรัม
เฮกเซน	1	มิลลิลิตร

ละลายอะซีแนพทีลินจนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายฟลูออรีนในเฮกเซน ความเข้มข้น 5,000 ppm

ฟลูออรีน	0.05	กรัม
เฮกเซน	1	มิลลิลิตร

ละลายฟลูออรีนจนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายฟีนแธนทรินในเฮกเซน ความเข้มข้น 5,000 ppm

ฟีนแธนทริน	0.05	กรัม
เฮกเซน	1	มิลลิลิตร

ละลายฟีนแธนทรินจนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายแอนทราซีนในเฮกเซน ความเข้มข้น 5,000 ppm

แอนทราซีน	0.05	กรัม
เฮกเซน	1	มิลลิลิตร

ละลายแอนทราซีน แล้วนำไปสั่นด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ที่ใส่ขั้วมคีน ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายฟลูออแรนธินในเฮกเซน ความเข้มข้น 5,000 ppm

ฟลูออแรนธิน	0.05	กรัม
เฮกเซน	1	มิลลิลิตร

ละลายฟลูออแรนธินจนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายไพรีนในเฮกเซน ความเข้มข้น 5,000 ppm

ไพรีน	0.05	กรัม
เฮกเซน	1	มิลลิลิตร

ละลายไพรีนแล้วนำสั่นด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงประมาณ 15-30 นาที จนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายเบนโซ[เอ]ไพรีนในเฮกเซน ความเข้มข้น 5,000 ppm

เบนโซ[เอ]ไพรีน	0.05	กรัม
เฮกเซน	1	มิลลิลิตร

ละลายเบนโซ[เอ]ไพรีนแล้วนำสั่นด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงประมาณ 15-30 นาที จนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายเบนโซ[เอ]ไพรีนในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ความเข้มข้น 10,000 ppm

เบนโซ[เอ]ไพรีน	0.1	กรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์	10	มิลลิลิตร

ละลายเบนโซ[เอ]ไพรีนจนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายอะซีแนพทีนในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ความเข้มข้น 10,000 ppm

อะซีแนพทีน	0.1	กรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์	10	มิลลิลิตร

ละลายอะซีแนพทีนจนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายอะซีแนพทีลินในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ความเข้มข้น 10,000 ppm

อะซีแนพทีลิน	0.1	กรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์	10	มิลลิลิตร

ละลายอะซีแนพทีลินจนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายฟลูออรีนในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ความเข้มข้น 10,000 ppm

ฟลูออรีน	0.1	กรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์	10	มิลลิลิตร

ละลายฟลูออรีนจนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายพีแนนทีนในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ความเข้มข้น 10,000 ppm

พีแนนทีน	0.1	กรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์	10	มิลลิลิตร

ละลายพีแนนทีนจนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายแอนทราซีนในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ความเข้มข้น 10,000 ppm

แอนทราซีน	0.1	กรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์	10	มิลลิลิตร

ละลายแอนทราซีนแล้วนำสันด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงประมาณ 15-30 นาที จนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายฟลูออเรนีนในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ความเข้มข้น 10,000 ppm

ฟลูออเรนีน	0.1	กรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์	10	มิลลิลิตร

ละลายฟลูออเรนีนแล้วนำสันด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงประมาณ 15-30 นาที จนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายไพรีนในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ความเข้มข้น 10,000 ppm

ไพรีน	0.1	กรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์	10	มิลลิลิตร

ละลายไพรีนแล้วนำสันด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงประมาณ 15-30 นาที จนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายเบนโซ[เอ]ไพรีนในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ความเข้มข้น 10,000 ppm

เบนโซ[เอ]ไพรีน	0.1	กรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์	10	มิลลิลิตร

ละลายเบนโซ[เอ]ไพรีนแล้วนำสันด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงประมาณ 15-30 นาที จนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายเบนโซ[เอ]ไพรีนในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ความเข้มข้น 10,000 ppm

เบนโซ[เอ]ไพรีน	0.1	กรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์	10	มิลลิลิตร

ละลายเบนโซ[เอ]ไพรีนแล้วนำสันด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงประมาณ 15-30 นาที จนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายผสม PAHs (อะซีแนพทีน อะซีแนพทีลีน ฟลูออรีนและพีแนนทรีน) ในเมทานอล ความเข้มข้น 5,000 ppm

อะซีแนพทีน	0.1	กรัม
อะซีแนพทีลีน	0.1	กรัม
ฟลูออรีน	0.1	กรัม
พีแนนทรีน	0.1	กรัม
เมทานอล	20	มิลลิลิตร

ละลายเบนโซ[เอ]ไพรีนจนได้สารละลายใส ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

โปรตีนเนสเค (proteinase K) 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

โปรตีนเนสเค (proteinase K)	20	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	1	มิลลิลิตร

ละลายโปรตีนเนสเค (proteinase K) จนได้สารละลายใส เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

20% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS)

Sodium dodecyl sulfate	20	กรัม
------------------------	----	------

ค่อยๆละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จนได้สารละลายใส หลังจากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

70% เอทานอล

99.9% เอทานอล	700	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	300	มิลลิลิตร

สารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

Tris base ($C_4H_{11}NO_3$)	1.2	กรัม
-------------------------------	-----	------

ละลาย Tris base ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH 8.0 หลังจากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนั่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์

EDTA (C ₁₀ H ₁₄ O ₈ Na ₂ •2H ₂ O)	186.1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติม โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) คนให้เข้ากัน ทิ้งให้เย็น แล้วปรับ pH 8.0 หลังจากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

TE buffer

Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	10	มิลลิลิตร
EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์	0.2	มิลลิลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

TE buffer ที่ผสมกับ RNase A

TE buffer	1	มิลลิลิตร
RNase A	2	ไมโครลิตร

เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 50 เท่า

Tris base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	242	กรัม
EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์	100	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตรปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	20	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	200	มิลลิลิตร

ละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) จนเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในภาชนะปิดสนิทในที่มืด (ขณะเตรียมควรสวมถุงมือป้องกันเนื่องจากเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นสารก่อมะเร็ง)

สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin, Ap)

แอมพิซิลิน	100	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร
กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปขนาด 0.22 ไมโครเมตร		

2% 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal)

X-gal	20	มิลลิกรัม
ไดเมทิลฟออร์มาไมด์ (DMF)	1	มิลลิลิตร
กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร		

isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) เข้มข้น 1 โมลาร์

IPTG	238	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร
กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปขนาด 0.22 ไมโครเมตร		

สารละลาย TfbI

โพแทสเซียมอะซิเตต (CH_3COOK)	0.295	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl)	1.21	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.148	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ (MnCl_2)	0.99	กรัม
กลีเซอรอล	15	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จน pH เท่ากับ 5.8 และปรับปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สารละลาย TfbII

2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid (MES)	0.29	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl)	0.121	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.103	กรัม
กลีเซอรอล	15	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สีติดตาม (6X loading dye)

Sucrose	20	กรัม
Bromphenol blue (ละลาย 4 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร)	12.5	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วย TE buffer จนได้ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15

ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายอิเล็กตรอนโดเนอร์ (Electron donor solution)

กลูโคส	1.22	กรัม
Succinate	0.8	กรัม
Pyruvate	0.75	กรัม
Tris base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	1.94	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง จน pH เท่ากับ 6.5 และปรับปริมาตรสุดท้าย 400 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

5 M โซเดียมคลอไรด์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	292	กรัม
-----------------------	-----	------

ละลายสารในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

DNA extraction buffer

Tris base 1 โมลาร์, pH 8	15	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมฟอสเฟต 1 โมลาร์	15	มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์, pH 8.0	30	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์	45	มิลลิลิตร
CTAB 5% (w/v)	30	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ	15	มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ DGGE**0% Denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล**

40% อะคริลาไมด์เจล/บิส	20	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	2	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	78	มิลลิลิตร

100% Denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล

40% อะคริลาไมด์เจล/บิส	20	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	2	มิลลิลิตร
ฟอร์มามาไมด์	40	มิลลิลิตร
ยูเรีย	42	มิลลิลิตร
เติมน้ำปลอดประจุ จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร		

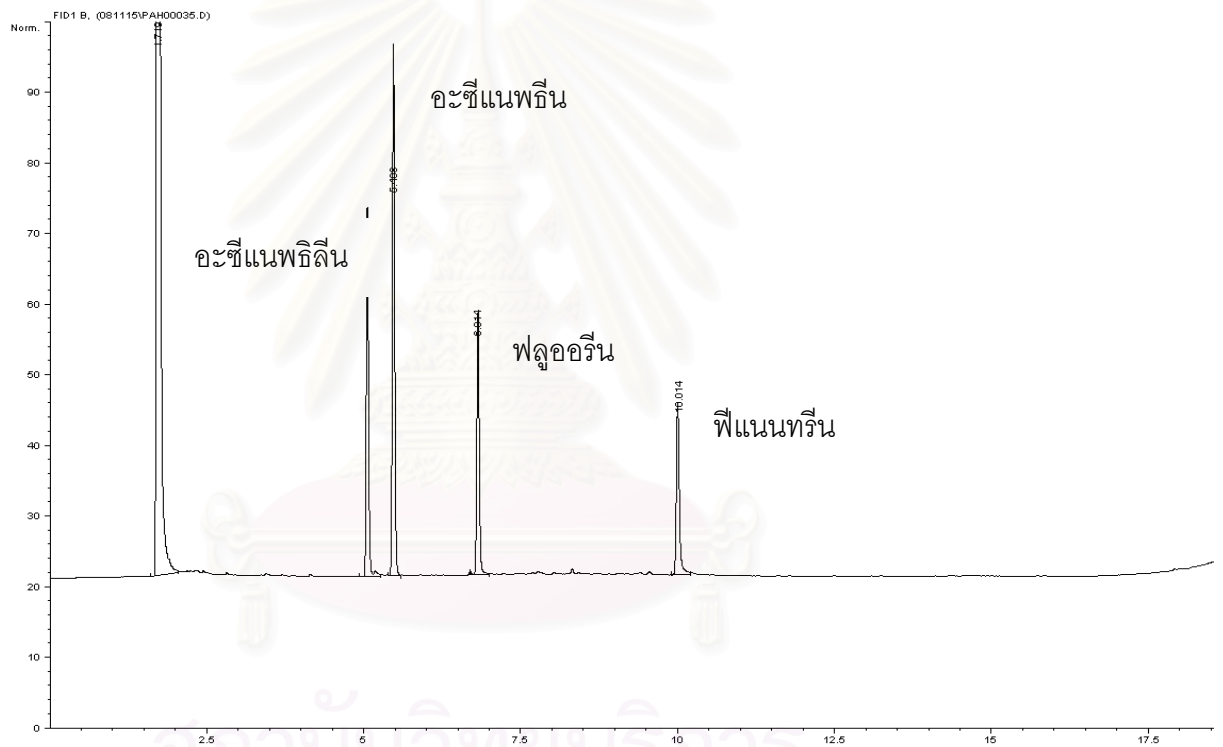
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10%

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

GC โครมาโตแกรม

จากการทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับการวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ในอากาศในเขตทดลอง ขนาด 60 มิลลิลิตร โดยเข็ม SPME และวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟี เพื่อหาปริมาณ PAH 4 ชนิด พบว่าเวลาที่อะซีแนพทีลิน อะซีแนพทีน ฟลูออรีน และพีแนนทีริน แต่ละชนิดค้างในคอลัมน์ (retention time) เป็น 5, 5.5, 6.8 และ 10 นาที ตามลำดับ และพบว่าไม่มีการปนเปื้อนสารชนิดอื่น ในอากาศ ดังรูปที่ 4.4

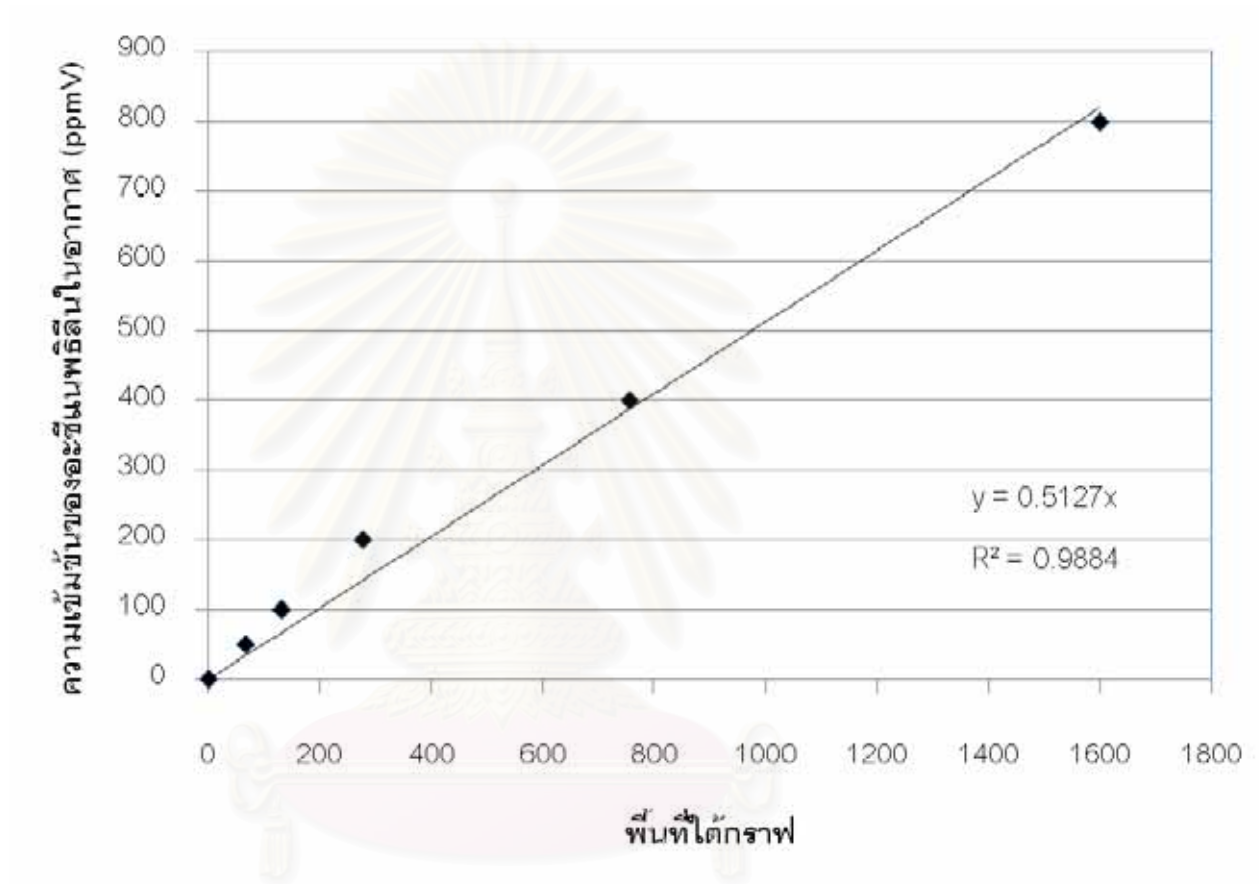


รูปที่ ค.1 โครมาโทแกรม GC จากการวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพทีลิน อะซีแนพทีน ฟลูออรีน และพีแนนทีริน ความเข้มข้น 100 ppmV

ภาคผนวก ง

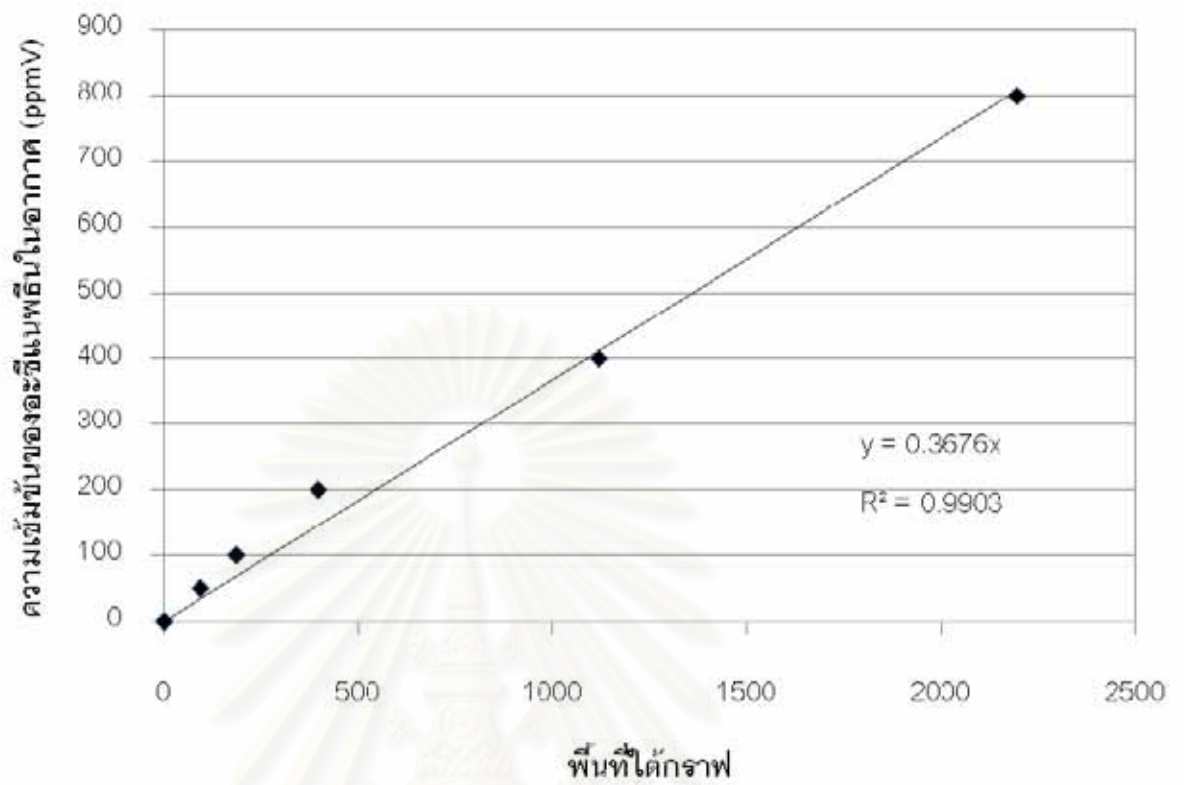
กราฟมาตรฐาน

รูปที่ ง.1 กราฟมาตรฐานอะซีแนพริลีนในขวดทดลอง 60 มิลลิลิตร

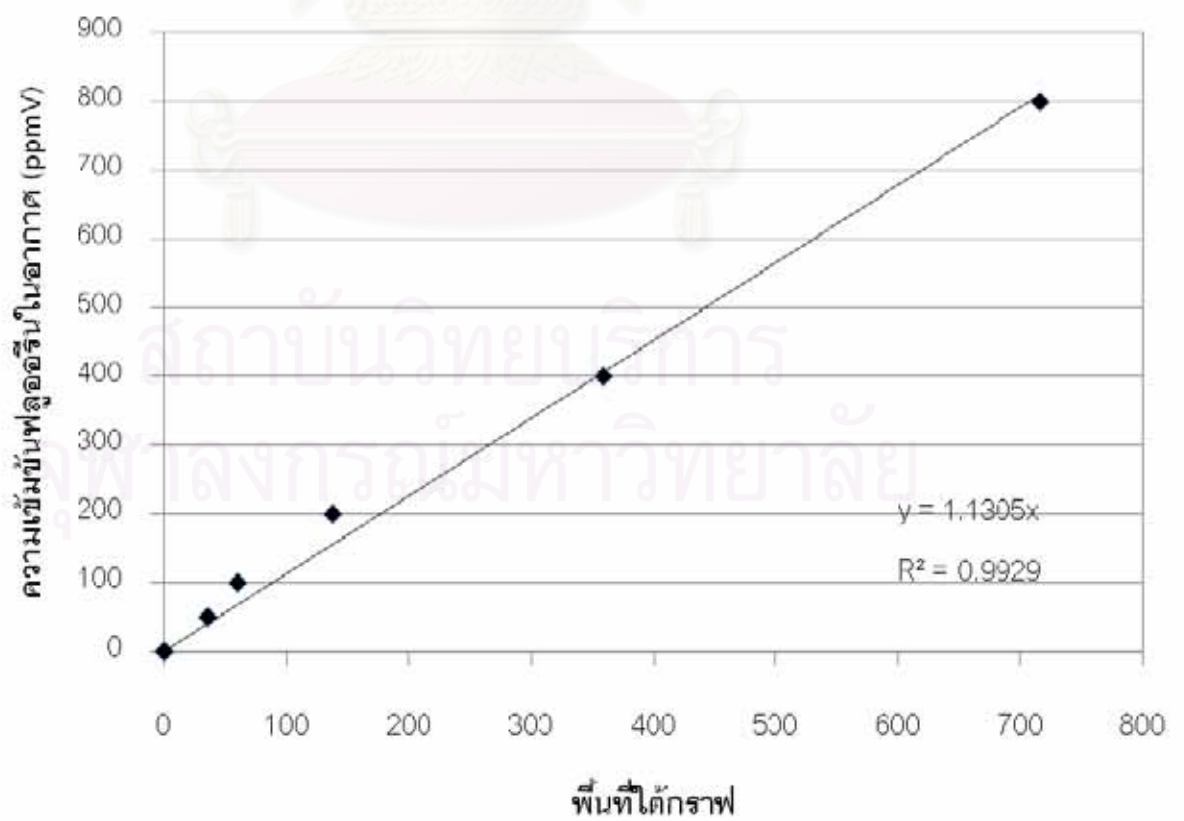


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

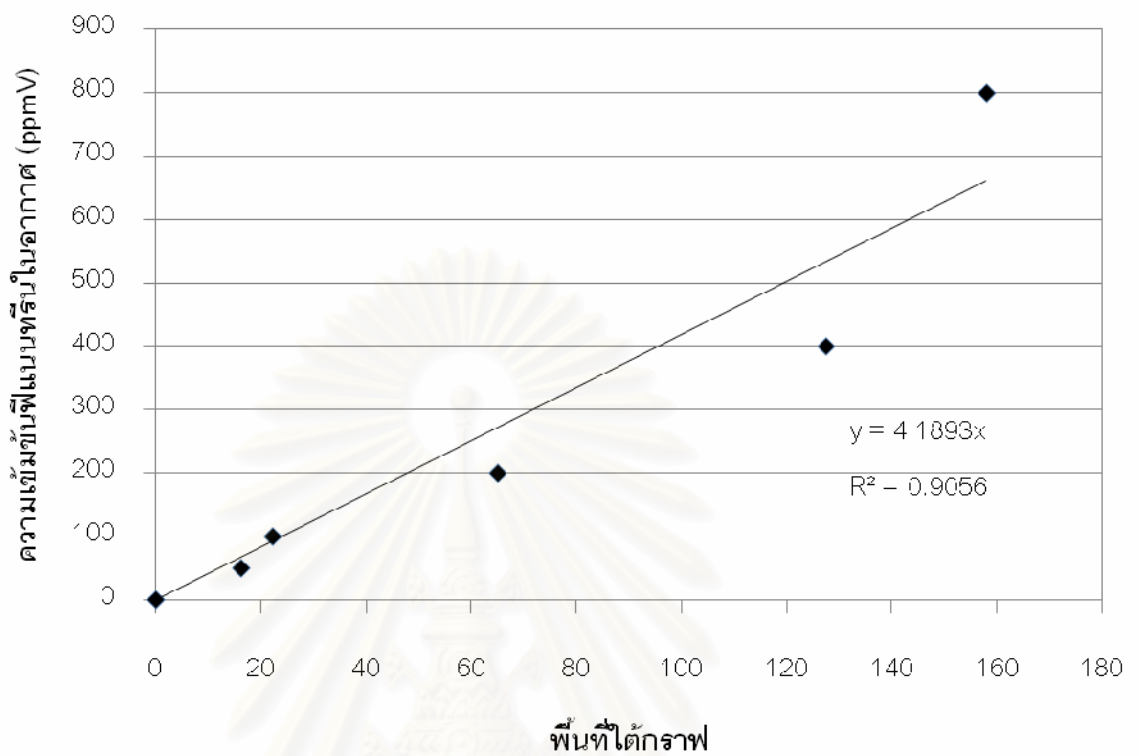
รูปที่ ง.2 กราฟมาตรฐานอะซีแนพรีนในขวดทดลอง 60 มิลลิลิตร



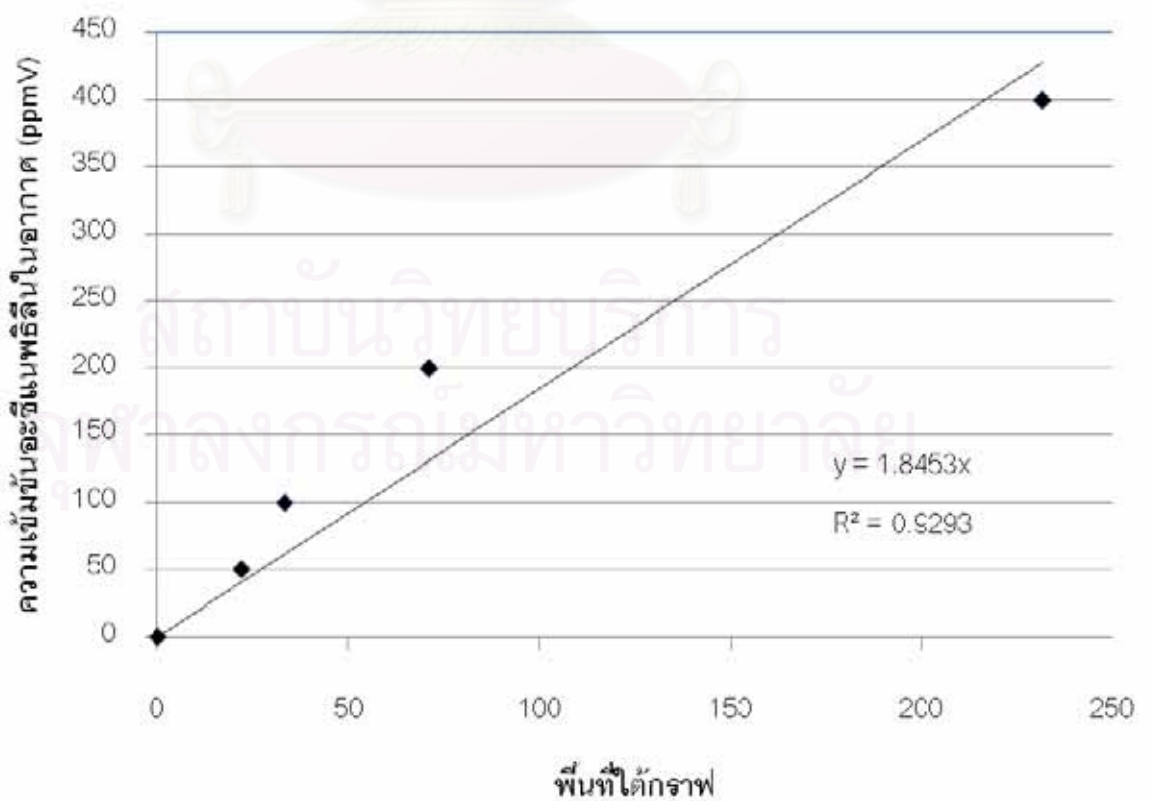
รูปที่ ง.3 กราฟมาตรฐานฟลูออรีนในขวดทดลอง 60 มิลลิลิตร



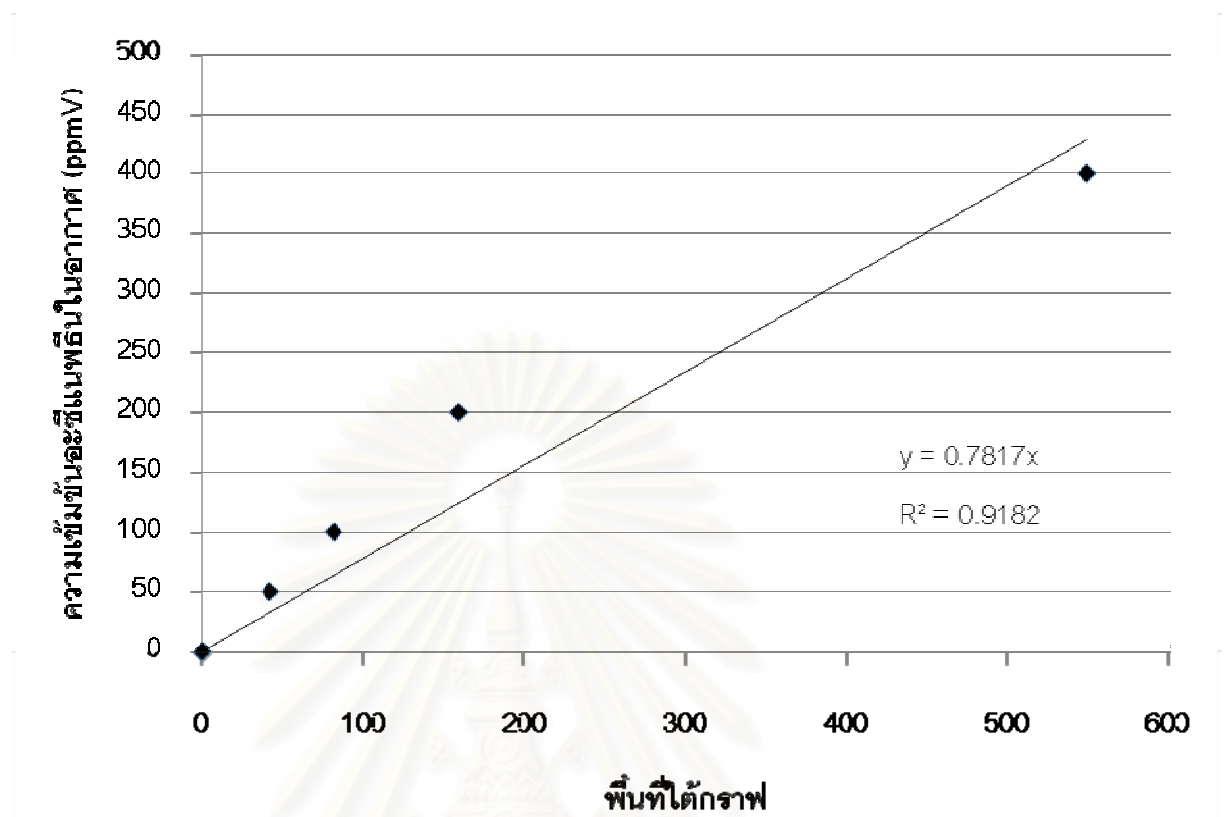
รูปที่ ๓.4 กราฟมาตรฐานพีแนนทรินในขวดทดลอง 60 มิลลิลิตร



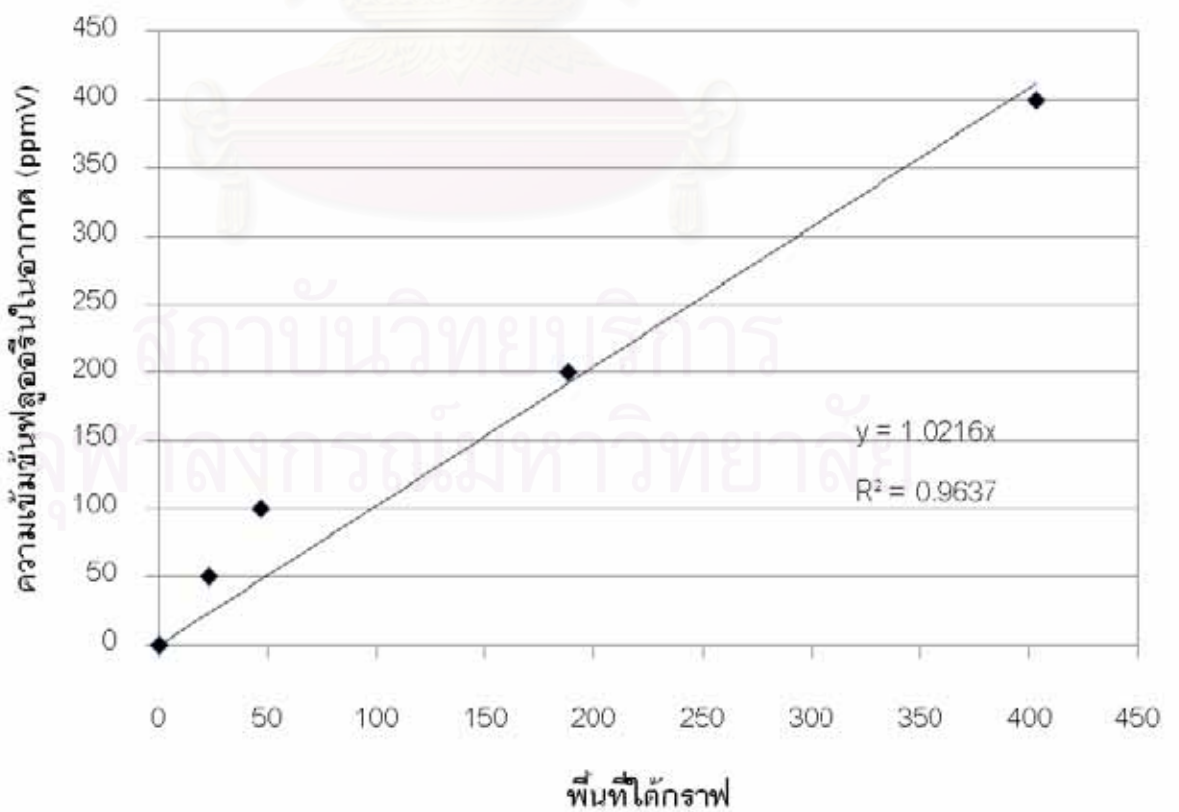
รูปที่ ๓.5 กราฟมาตรฐานอะซีแนฟิธินในแชมเบอร์ 14 ลิตร



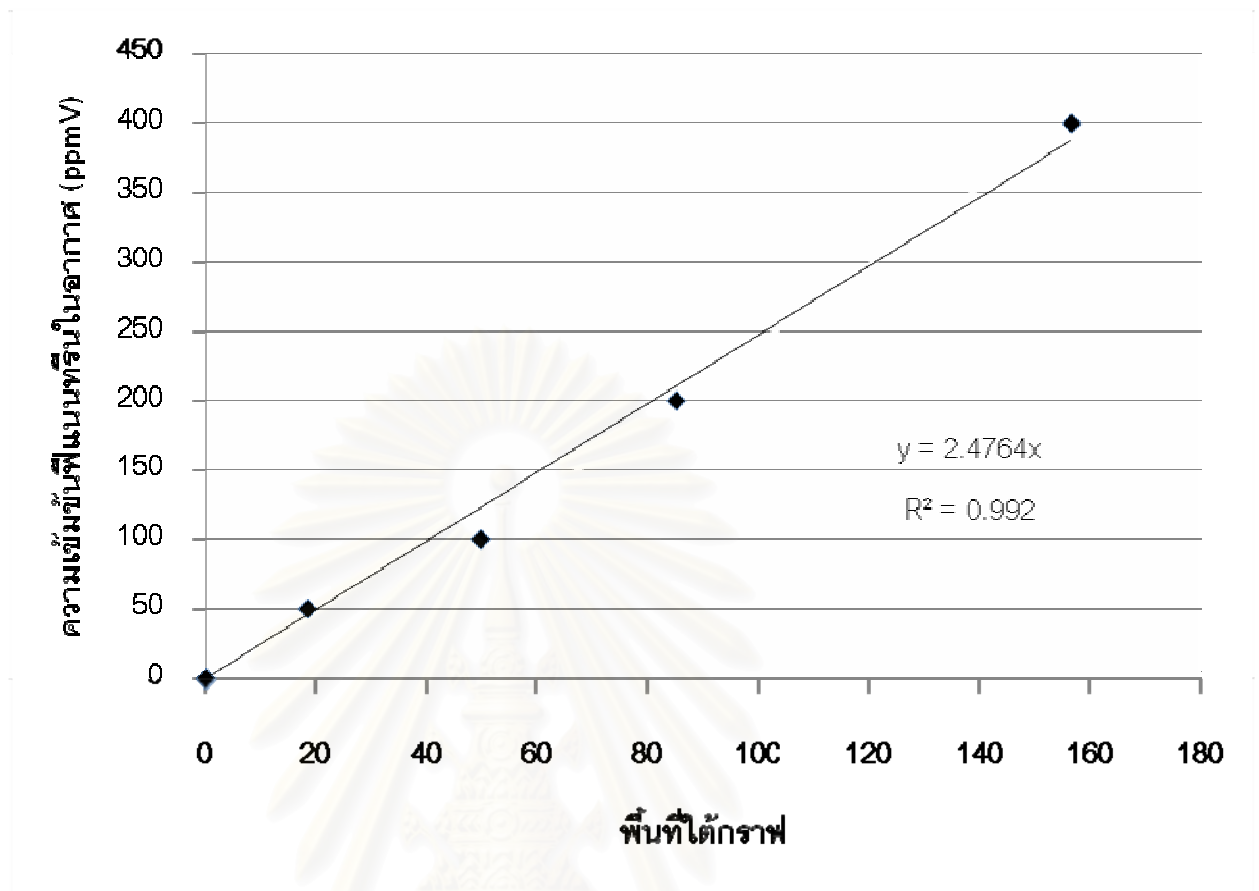
รูปที่ ๖.6 กราฟมาตรฐานอะซีแนพทีนในแชมเบอร์ 14 ลิตร



รูปที่ ๖.7 กราฟมาตรฐานฟลูออรีนในแชมเบอร์ 14 ลิตร



รูปที่ ๘.๘ กราฟมาตรฐานพีแนนทรีนในแชมเบอร์ 14 ลิตร

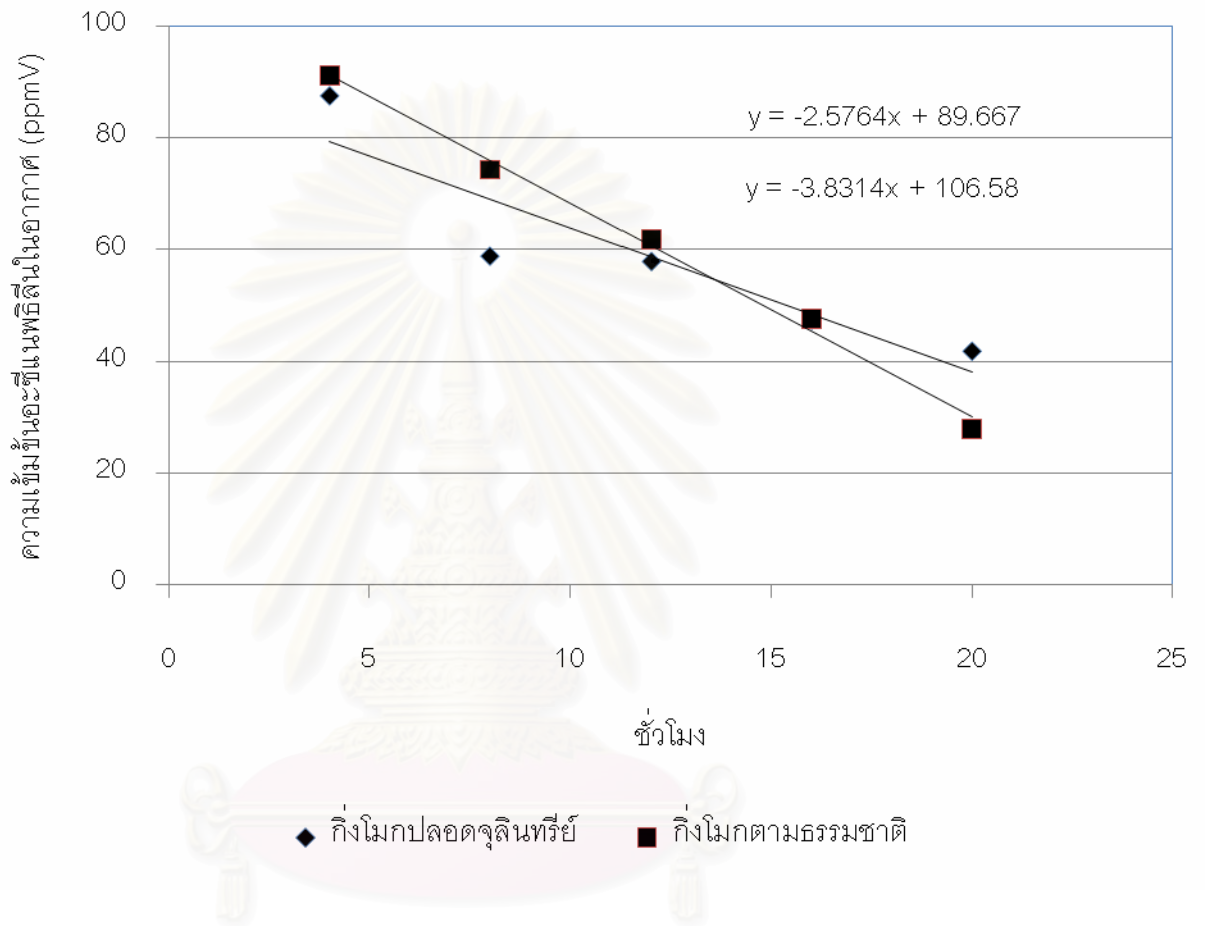


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

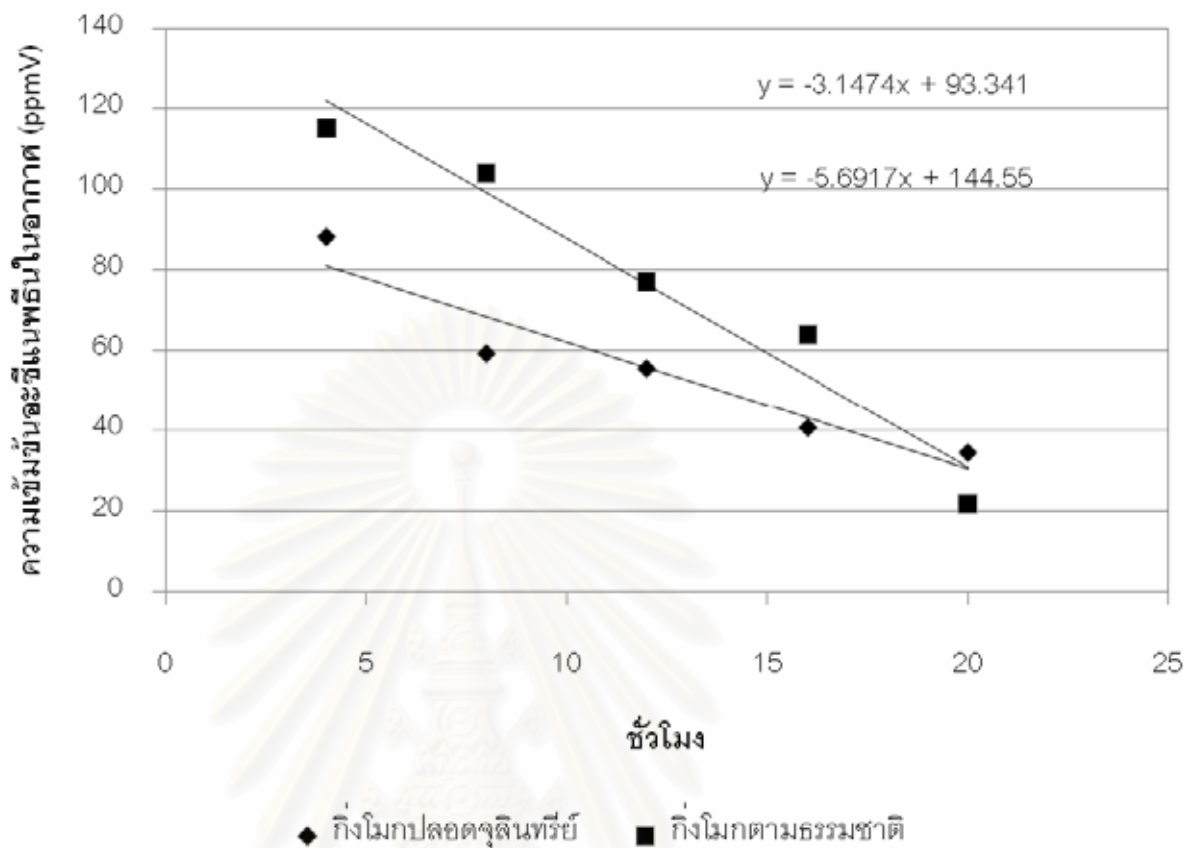
กราฟอัตราการกำจัด PAH ในอากาศในแคมเบอร์ภายใน 24 ชั่วโมง

รูปที่ จ. 1 กราฟอัตราการกำจัดอะซีแนพทีนในอากาศในแคมเบอร์ภายใน 24 ชั่วโมง



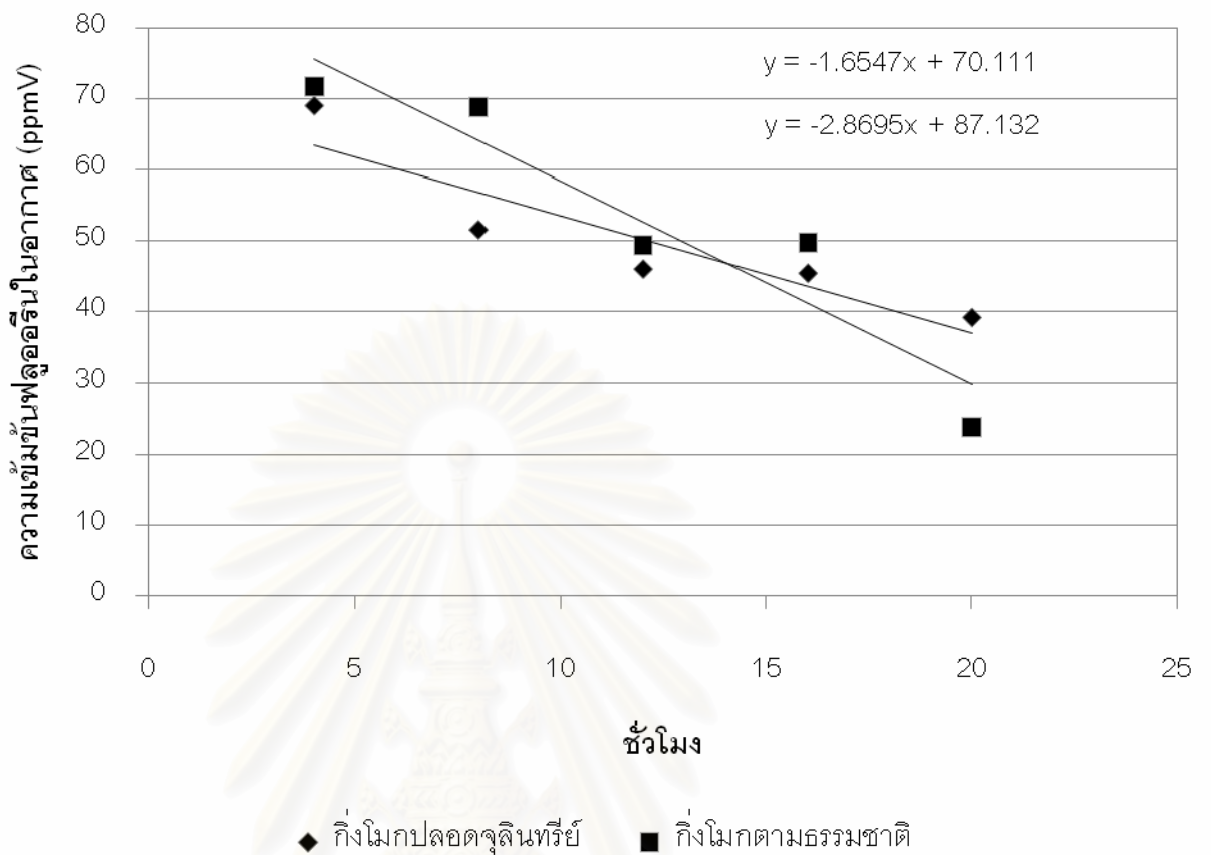
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ๑. 2 กราฟอัตราการกำจัดอะซีแนพรีนในอากาศในเซมเบอร์ภายใน 24 ชั่วโมง



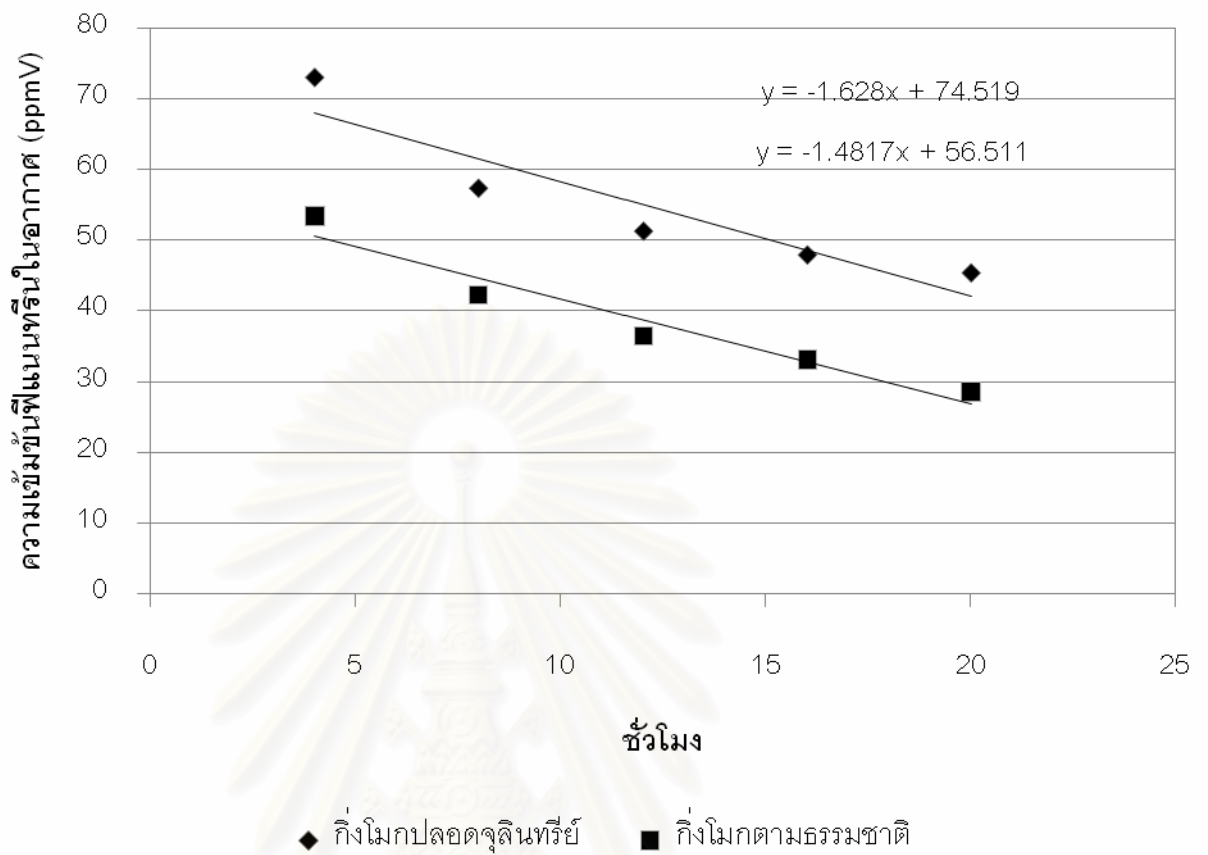
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ๑.3 กราฟอัตราการกำจัดฟลูออรีนในอากาศในแคมเบอร์ภายใน 24 ชั่วโมง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ๑. 4 กราฟอัตราการกำจัดพีแนนทรีนในอากาศในแคมเบอร์ภายใน 24 ชั่วโมง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Parvibaculum* sp.

101 CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TCTTGGACAA TGGGGGCAAC CCTGATCCAG
 151 CCATGCCGCG TGAGTGATGA AGGCCTTAGG GTTGTAAAGC TCTTTCACCC
 201 GGGAAGATAA TGACGGTACC GGGAGAAGAA GCCCCGGCTA ACTCCGTGCC
 251 AGCAGCCGCG GTAATAATCA CTAGTGAATT CGCGGCCGCC TGCAGGTCGA

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Acinetobacter* sp. Y3A

101 ACGGGAGGCA GCAGTGGGGA ATATTGGACA ATGGGCGGAA GCCTGATCCA
 151 GCCATGCCGC GTGTGTGAAG AAGGCCTTTT GGTTGTAAAG CACTTTAAGC
 201 GAGGAGGAGG CTACCTAGAT TAATACTTTA GGATAGTGGA CGTTACTCGC
 251 AGAATAAGCA CCGGCTAACT CTGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATCACTAGTG

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ Uncultured bacterium

101 GCTGCTGGCA CGTAGTTAGC CGGTGCTTCT TATCAAGGTA CCGTCAACCT
 151 CACCCGGTAT TAACGGATAA GTTTTCTTTC CTTGCGAAAG AGCTTTACAA
 201 CCCGAAGGCC TTCTTCACTC ACGCGGAATG GCTGGATCAG GGTTTCCCCC
 251 ATTGTCCAAA ATTCCCCTACT GCTGCCTCCG TAGGAGTAAT CACTAGTGAA

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Sphingomonas* sp. Enf55

101 CCGCGGCTGC TGGCACGGAG TTAGCCGGAG CTTATTCTCC CGGTA CTGTC
 151 ATTATCATCC CGGGTAAAAG AGCTTTACAA CCCTAAGGCC TTCATCACTC
 201 ACGCGGCATT GCTGGATCAG GCTTTGCCCC ATTGTCCAAT ATTCCCCTACT
 251 GCTGCCTCCC GTAGGAGTAA TCACTAGTGA ATTCGCGGCC GCCTGCAGGT

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Acinetobacter* sp. BP10

101 ACCGCGGCTG CTGGCACAGA GTTAGCCGGT GCTTATTCTG CGAGTAACGT
 151 CCACTTATCC CAGGTATTAA CCAGGTAAGC CTCCTCCTCG CTTAAAGTGC
 201 TTTACAACCA AAAGGCCTTC TTCACACACG CGGCATGGCT GGATCAGGGT
 251 TCCCCCATT GTCCAATATT CCCCACTGCT GCCTCCCGTA GGAGTAATCA

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Acinetobacter calcoaceticus*

101 CGCGGCTGCT GGCACAGAGT TAGCCGGTGC TTATTCTGCG AGTAACGTCC
 151 ACTATCTCTA GGTATTA ACT AGAGTAGCCT CCTCCTCGCT TAAAGTGCTT
 201 TACAACCATA AGGCCTTCTT CACACACGCG GCATGGCTGG ATCAGGCTTG
 251 CGCCCATTGT CCAATATTCC CCACTGCTGC CTCCCGTAGG AGTAATCACT

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ uncultured bacterium

101 ACGGGAGGCA GCAGTGGGGA ATATTGGACA ATGGGCGCAA GCCTGATCCA
 151 GCCATGCCGC GTGTGTGAAG AAGGCCTTTT GGTTGTAAAG CACTTTAAGC
 201 GAGGAGGAGG CTTACCTGGT TAATACCTAG GATAAGTGGA CGTACTCGC
 251 AGAATAAGCA CCGGCTAACT CTGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATAATCACTA

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Mycobacterium gilvum*

101 GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGGACAATG GCGCAAGCC TGATGCAGCG
 151 ACGCCGCGTG AGGGATGACG GCCTTCGGGT TGTAACCTC TTTCGCCAGG
 201 GACGAAGCGC AAGTGACGGT ACCTGGAGAA GAAGGACCGG CCAACTACGT
 251 GCCAGCAGCC GCGGTAATAA TCACTAGTGA ATTCGCGGCC GCCTGCAGGT

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Acinetobacter calcoaceticus*

101 CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGGACAA TGGGCGCAAG CCTGATCCAG
 151 CCATGCCGCG TGTGTGAAGA AGGCCTTATG GTTGTAAAGC ACTTTAAGCG
 201 AGGAGGAGGC TACTCTAGTT AATACCTAGA GATAGTGGAC GTTACTCGCA
 251 GAATAAGCAC CGGCTAACTC TGTGCCAGCA GCCGCGGTA TAATCACTAG

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Pseudomonas stutzeri*

101 TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGGAC AATGGGCGAA AGCCTGATCC
 151 AGCCATACCG CGTGGGTGAA GAAGGTCTTC GGATTGTAAA GCACTTTAAT
 201 TGGGGAGGAA GGGCAGTAGG TTAATACCTT GTTGTTTTGA CGTTACCAAC
 251 AGAATAAGCA CCGGCTAACT TCGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATAATCACTA

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Pseudomonas sp. CL7*

101 CGCGGCTGCT GGCACGAAGT TAGCCGGTGC TTATTCTGTT GGTAACGTCA
 151 AAACAGCAAG GTATTAAGT ACTGCCCTTC CTCCCAACTT AAAGTGCTTT
 201 ACAATCCGAA GACCTTCTTC ACACACGCGG CATGGCTGGA TCAGGCTTTC
 251 GCCCATTGTC CAATATTCCC CACTGCTGCC TCCCGTAGGA GTAATCACTA

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Naxibacter indica*

101 GCGGCTGCTG GCACGTAGTT AGCCGGTGCT TATTCTTCAG GTACCGTCAT
 151 TAATGGGAGA TATTAGCTCC CACCGTTTCT TCCCTGACAA AAGAGCTTTA
 201 CAACCCGAAG GCCTTCTTCA CTCACGCGGC ATTGCTGGAT CAGGCTTGCG
 251 CCCATTGTCC AAAATTCCCC ACTGCTGCCT CCCGTAGGAG TAATCACTAG

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Acinetobacter sp. FLL7*

101 GAGGCAGCAG TGGGGAATAT TGGACAATGG GGGGAACCCT GATCCAGCCA
 151 TGCCGCGTGT GTGAAGAAGG CCTCTTGGTT GTAAAGCACT TTAAGCGAGG
 201 AGGAGGCTTA CCTGGTAAAT ACCTGGGATA AGTGGACGTT ACTCGCAGAA
 251 TAAGCACCGG CTAAGTCTGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGGAGCCAGC

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ uncultured soil bacterium

101 TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGGAC AATGGGGGAA ACCCTGATCC
 151 AGCCATTCCG CGTGAGTGAA GAAGGCCTTC GGGTTGTAAA GCTCTTTTCG
 201 AAGGAAAGAA AACTTATCCG TTAATACCGG GTGAGGTTGA CGGTACCTTG
 251 ATAAGAAGCA CCGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATAATCACTA

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Acinetobacter* sp. EDP3

101 TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGGAC AATGGGCGCA AGCCTGATCC
 151 AGCCATGCCG CGTGTGTGAA GAAGGCCTTT TGGTTGAAA GCACTTTAAG
 201 CGAGGAGGAG GTTTACCTGG TTAATACCTG GGATAAGTGG ACGTTACTCG
 251 CAGAATAAGC ACCGGCTAAC TCTGTGCCAG CAGCCGCGGT AATAATCACT

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ uncultured soil bacterium

101 GGCTGCTGGC ACGTAGTTAG CCGGTGCTTC TTATCAAGGT ACCGTCAACC
 151 TCACCCGGTA TTAACGGATA AGTTTTCTTT CCTTGCGAAA GAGCTTTACA
 201 ACCCGAAGGC CTTCTTCACT CACGCGGAAT GGCTGGATCA GGGTTTCCCC
 251 CATTGTCCAA AATTCCCCAC TGCTGCCTCC CGTAGGAGTA ATCACTAGTG

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Acinetobacter* sp. Lhl-4r

101 GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT ATTGGACAAT GGGGGGAACC CTGATCCAGC
 151 CATGCCGCGT GTGTGAAGAA GGCCTTATGG TTGTAAGGCA CTTTAAGCGA
 201 GGAGGAGGCT ACCTAGATTA ATACTTTAGG ATAGTGGACG TTAICTCGCAG
 251 AATAAGCACC GGCTAACTCT GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT AATCACTAGT

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายชนมวิศว์ศักดิ์ ยุตธรรมโม เกิดเมื่อวันศุกร์ ที่ 18 มีนาคม พ.ศ. 2526 ที่จังหวัดน่าน ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2549 และสำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551 ปัจจุบันอาศัยอยู่ที่บ้านเลขที่ 39/1 ถนน ราษฎร์อำนวย ตำบล ในเวียง อ. เมืองน่าน จ. น่าน 5500



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย