การทำแห้งเยื่อกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และความสามารถในการสลายไพรีนและฟีแนนทรีน

นางสาวประภัสสร ปานมีทรัพย์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FREEZE-DRYING OF BACTERIAL CONSORTIUM RRM-V3 AND ITS ABILITY TO DEGRADE PYRENE AND PHENANTHRENE

Miss Prapassorn Panmeesarp

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 2007

Copyright of Chulalongkorn University

501574

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และความสามารถในการสลายไพรีนและฟีแนนทรีน
โดย	นางสาวประภัสสร ปานมีทรัพย์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. กาญณา จันทองจีน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประภัสสร ปานมีทรัพย์ : การทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และความสามารถในการสลายไพรีนและฟีแนนทรีน. (FREEZE-DRYING OF BACTERIAL CONSORTIUM RRM-V3 AND ITS ABILITY TO DEGRADE PYRENE AND PHENANTHRENE) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. กาญจณา จันทองจีน, 92 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้สารป้องกันความเย็น 3 ชนิดคือ 12% ซูโครส 10% นมปลอดมันเนย และ 5% ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ หลังการทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยมี 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็นพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 รอดชีวิต 99.54% และสามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จนหมดภายในเวลา 7 วัน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 หลังการทำแห้งเยือกแข็งคือ -20 องศาเซลเซียส ในขณะที่ซิลิกาเจลไม่มีผลต่อการเก็บรักษา กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งสามารถเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 6 เดือน โดยจะมีชีวิตรอด 83.38% และสามารถย่อยสลายสาร PAHs ทั้งสองชนิดได้หมดภายในเวลา 14 วัน กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครสและเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือน จะสามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน 0.05 มิลลิกรัมต่อกรัม ในดิน โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 21 พบปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนเหลือ 12.68 และ 7.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งดีกว่าการใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด การทำแห้งเยือกแข็งจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เป็นเวลานาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต ประภัสสร ปานมีทรัพย์
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4872354923 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: BACTERIAL CONSORTIUM / BIODEGRADATION / PYRENE/PHENANTHRENE / SOIL / FREEZE DRYING

PRAPASSORN PANMEESARP : FREEZE-DRYING OF BACTERIAL CONSORTIUM RRM-V3 AND ITS ABILITY TO DEGRADE PYRENE AND PHENANTHRENE. THESIS ADVISOR : ASST.PROF. KOBCHAI PATTARAGULWANIT, Dr.rer.nat, THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. KANCHANA JUNTONGJIN, Ph.D., 92 pp.

The objective of this study is to preserve bacterial consortium RRM-V3 by freeze-drying along with three cryoprotective agents including 12% sucrose, 10% skim milk and 5% dimethylsulfoxide. After freeze-drying bacterial consortium RRM-V3 with 12% sucrose as cryoprotectant, the maximum viability of 99.54%, was archieved and the freeze-dried cell could degrade pyrene and phenanthrene of 0.05 mg/ml within 7 days. The optimum storage temperature of freeze-dried RRM-V3-consortium was -20 ^{0}C whereas silica gel had no effect during storage. Freeze-dried RRM-V3 could be kept at -20 ^{0}C for 6 months with viability of 83.38% and could degrade both PAHs within 14 days. After 1 month preservation, at -20 ^{0}C, the freeze-dried RRMV3 consortium with 12% sucrose as cryoprotectant could degrade pyrene and phenanthrene 0.05 mg/g soil in soil to 12.68 and 7.68 % respectively after 21 days which were better than those of freshly cultivated cell. Therefore, freeze-drying could be a suitable method for long term preservation of bacterial consortium RRM-V3.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department: Microbiology Student's signature: ประภัสสร ปานสีทนันชัย
Field of study: Industrial Microbiology Advisor's signature: K. Pattaragulwanit
Academic year: 2007 Co-advisor's signature: Kanchana Juntongjin

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำรวมถึงข้อคิดเห็นต่างๆ ในทุกขั้นตอนของการทดลอง ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ญทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และอาจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย ที่กรุณารับเป็นประธานและกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์และให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆแก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอบคุณโครงการพัฒนาส่งเสริมผู้มีความรู้ความสามารถทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการศึกษา ตลอดจนค่าใช้จ่ายในการศึกษาระดับปริญญาโท

ขอบคุณพี่สุทธิรักษ์ นิยมฤทธิ์ ที่ให้คำแนะนำและสอนวิธีในการทำแห้งเยือกแข็ง ตลอดจนเตรียมอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำแห้งเยือกแข็ง ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จเป็นงานวิจัยได้

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับความห่วงใยและความช่วยเหลือและกำลังใจที่มีให้ตลอดเวลา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาและครอบครัวที่ให้การสนับสนุน ความช่วยเหลือ รวมทั้งให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญภาพ..... ฎ

สัญลักษณ์และคำย่อ..... ฒ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์..... 4

บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย..... 18

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง..... 18

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ..... 20

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย..... 21

3.3.1 กลุ่มแบคทีเรียและการเพาะเลี้ยง..... 21

3.3.2 การทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 (ดัดแปลงจาก Gherna, 1994)..... 21

3.3.3 ภาวะที่เหมาะสมของการทำแห้งเยือกแข็งและการเก็บรักษาหลังการทำแห้งเยือกแข็ง..... 21

3.3.3.1 สารป้องกันความเย็น..... 21

3.3.3.2 การเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรียหลังการทำแห้งเยือกแข็งและการใช้ซิลิกาเจลเป็นสารดูดความชื้น..... 22

3.3.3.3 ระยะเวลาการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 หลังการทำแห้งเยือกแข็ง..... 22

3.3.4 ความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง..... 22

3.3.5 ความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง..... 23

หน้า

3.3.5.1 การเตรียมดิน..... 23
3.3.5.2 ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดิน..... 24
3.3.6 การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรีย..... 24
3.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีน..... 25
3.3.7.1 การสกัดไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM (ดัดแปลงจาก Deangrueng, 2005)..... 25
3.3.7.2 การสกัดไพรีนและฟีแนนทรีนในดิน..... 25
3.3.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนโดยแก๊สโครมาโตกราฟี..... 25
บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 26
4.1 ทดสอบความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในการบำบัดไพรีนและฟีแนนทรีน..... 26
4.2 การทำแห้งเยือกแข็งของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3..... 28
4.2.1 จำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตภายหลังการทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3..... 28
4.2.2 การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 หลังการทำแห้งเยือกแข็งในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน..... 29
4.3 การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง..... 31
4.4 เปรียบเทียบผลการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง..... 37
4.4.1 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง..... 37
4.4.2 เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง..... 38

4.4.3 เปรียบเทียบปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง..... 39
4.5 ภาวะที่เหมาะสมของการทำแห้งเยือกแข็งและการเก็บรักษาหลังการทำแห้งเยือกแข็ง..... 40
4.5.1 อุณหภูมิการเก็บรักษาและผลของสารดูดความชื้น..... 40
4.5.2 การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บในภาวะต่างๆ..... 42
4.6 เปรียบเทียบผลการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บในภาวะต่างๆ..... 49
4.6.1 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บในภาวะต่างๆ..... 49
4.6.2 เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บในภาวะต่างๆ..... 50
4.6.3 เปรียบเทียบปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บในภาวะต่างๆ..... 51
4.7 ระยะเวลาการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งในภาวะที่เหมาะสม..... 52
4.7.1 การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่เวลาต่างๆ 53
4.8 เปรียบเทียบผลการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่เวลาต่างๆ..... 59
4.8.1 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

หน้า

ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่เวลาต่างๆ..... 59
4.8.2 เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่เวลาต่างๆ..... 60
4.8.3 เปรียบเทียบปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่เวลาต่างๆ..... 61
4.9 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง..... 62
4.9.1 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่ใช้ในการทดลอง..... 62
4.9.2 การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง..... 63
4.10 เปรียบเทียบผลการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3..... 68
4.10.1 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3..... 68
4.10.2 เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3..... 69
4.10.3 เปรียบเทียบปริมาณฟีแนนทรีนจากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3..... 70
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 71
บทที่ 6 ข้อเสนอแนะในงานวิจัย..... 78
รายการอ้างอิง..... 79
ภาคผนวก..... 87
ภาคผนวก ก..... 88
ภาคผนวก ข..... 90
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 92

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

4.1 การรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้สารป้องกันความเย็นชนิดต่างๆ..... 28

4.2 การรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้สารป้องกันความเย็น 12% ซูโครส และเก็บไว้ในภาวะต่างๆ เป็นเวลา 1 เดือน..... 41

4.3 จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้สารป้องกันความเย็น 12 % ซูโครส และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ..... 52

4.4 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่นำมาใช้ในการทดลอง..... 62

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ หน้า

2.1 โครงสร้างโมเลกุล PAHs ที่สำคัญ 16 ชนิด ตามรายงานสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, EPA) (Wilson และ Jones, 1993)..... 5

2.2 โครงสร้างโมเลกุลของไดเมธิลซัลฟอกไซด์..... 12

2.3 โครงสร้างโมเลกุลของซูโครส..... 14

4.1 การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM โดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสดเทียบกับไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3..... 27

4.2 การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน..... 30

4.3 ก ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น..... 33

4.3 ข ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 10% นมปลอดมันเนยเป็นสารป้องกันความเย็น..... 34

4.3 ค ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 5% ไดเมธิลซัลฟอกไซด์เป็นสารป้องกันความเย็น..... 35

4.3 ง ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยไม่ใช้สารป้องกันความเย็น..... 36

4.4 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมโดยวิธีต่างๆ..... 37

4.5 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมโดยวิธีต่างๆ..... 38

4.6 ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมโดยวิธีต่างๆ..... 39

หน้า

4.7 ก ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยไม่ใช้ซิลิกาเจลเป็นเวลา 1 เดือน..... 45

4.7 ข ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเวลา 1 เดือน..... 46

4.7 ค ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส โดยไม่ใช้ซิลิกาเจลเป็นเวลา 1 เดือน..... 47

4.7 ง ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเวลา 1 เดือน..... 48

4.8 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บในภาวะต่างๆ..... 49

4.9 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บในภาวะต่างๆ..... 50

4.10 ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บในภาวะต่างๆ..... 51

4.11 ก ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้เป็นเวลา 0 เดือน..... 55

4.11 ข ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้เป็นเวลา 1 เดือน..... 56

4.11 ค ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือน..... 57

4.11 ง ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้เป็นเวลา 6 เดือน..... 58

4.12 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่เวลาต่างๆกัน..... 59

หน้า

4.13 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่เวลาต่างๆกัน..... 60
4.14 ปริมาณฟีแนนทรีนจากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่เวลาต่างๆกัน..... 61
4.15 ก ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อ และการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมโดยวิธีต่างๆ ในดินไม่ปลอดเชื้อ..... 65
4.15 ข การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด... 66
4.15 ค การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง..... 67
4.16 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3..... 68
4.17 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ของการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3..... 69
4.18 ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ของการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3..... 70

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ

% = เปอร์เซ็นต์

มก. = มิลลิกรัม

มล. = มิลลิลิตร

ชม. = ชั่วโมง

CFU = colony forming unit

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประเทศไทยมีการเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจอย่างรวดเร็ว เน้นโครงสร้างทางเศรษฐกิจ ภาคอุตสาหกรรมที่ทันสมัย สังคมเกษตรกรรมและชนบทปรับเปลี่ยนเป็นสังคมเมืองอุตสาหกรรม มีการใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างฟุ่มเฟือย ทำให้ทรัพยากรธรรมชาติและคุณภาพสิ่งแวดล้อมเสื่อมโทรมลงเป็นอย่างมาก ก่อให้เกิดปัญหามลพิษทางอากาศ น้ำ และดิน ดังนั้นสังคมไทยควรเร่งระดมเพื่อบริหารจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมให้ดีขึ้น (สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม, 2549)

ความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีได้ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตทรัพยากรธรรมชาติ มีการนำสารเคมีมาใช้ในปริมาณมากและขาดการจัดการที่เหมาะสม ทำให้เกิดของเสีย หรือกากที่เกิดจากกระบวนการใช้และการผลิตในอุตสาหกรรม รวมทั้งของเสียที่เกิดจากมนุษย์ทั้งในด้านการอุปโภคและบริโภค ของเสียหรือขยะจึงถูกระบายสู่สิ่งแวดล้อม เช่น พื้นดิน แหล่งน้ำ และบรรยากาศ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่เกิดปัญหามลพิษทางน้ำ อากาศ และดิน ปัญหามลพิษสิ่งแวดล้อมมีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของมนุษย์ ความเสื่อมโทรมทางร่างกายและจิตใจ (เกื้อ วงศ์บุญสิน, 2545) อุตสาหกรรมต่างๆ มีการพัฒนาอย่างมากโดยเฉพาะอุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมสารปราบศัตรูพืช อุตสาหกรรมปิโตรเลียม อุตสาหกรรมพลาสติก อุตสาหกรรมโลหะ อุตสาหกรรมผลิตชิ้นส่วนยานยนต์ อุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น ก่อให้เกิดของเสียอันตรายเพิ่มอย่างรวดเร็ว แนวโน้มของเสียอันตรายที่เกิดจากโรงงานอุตสาหกรรมจะมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในแต่ละปี ดังจะเห็นได้จากปริมาณของเสียอันตรายซึ่งมีแหล่งกำเนิดจากโรงงานอุตสาหกรรมในปี พ.ศ. 2534 2539 และ 2544 มีปริมาณ 0.84 1.49 และ 2.58 ล้านตัน ตามลำดับ โดยชนิดที่มีปริมาณมากสุด ได้แก่ กากตะกอนและของแข็งที่มีส่วนประกอบของโลหะหนัก รองลงมา ได้แก่ น้ำมัน ขยะติดเชื้อ ตัวทำละลาย ของเสียที่เป็นกรด กากตะกอนและของแข็งอินทรีย์ (กรมควบคุมมลพิษ, 2545) และในปี 2548 คาดว่ามีปริมาณของเสียอันตรายชุมชนเกิดขึ้นประมาณ 0.4 ล้านตัน ร้อยละ 34 เกิดในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล แหล่งกำเนิดที่สำคัญ ได้แก่ อู่ซ่อมรถ บ้านเรือนและสถานบริการน้ำมัน และแนวโน้มของเสียอันตรายปี 2549 คาดว่ายังคงมีปริมาณใกล้เคียงกับปี 2548 จากข้างต้นจะเห็นว่าปัญหาสารเคมีและของเสียอันตรายเป็นปัญหาเร่งด่วนที่ควรแก้ไข เพราะอาจก่ออันตรายต่อชีวิตมนุษย์ (กรมควบคุมมลพิษ, 2548)

พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) เป็นสารประกอบอินทรีย์มีโครงสร้างประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนมารวมกันเป็นวงเบนซีนอย่างน้อย 2 วง เชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง มุมงอ หรือต่อกันเป็นกลุ่ม (Sim และ Overcash, 1983) พบปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในดิน น้ำ และอากาศ (Cerniglia, 1992) ของเสียอันตรายชนิดนี้จัดเป็นสารพิษอันตราย PAHs ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (ประกอบด้วยวงเบนซีนน้อยกว่า 4 วง) ก่อให้เกิดพิษอย่างเฉียบพลัน มีผลต่ออัตราการสืบพันธุ์ และการตายของสัตว์น้ำ (Sim และ Overcash, 1983) และชนิดที่น้ำหนักโมเลกุลสูง (ประกอบด้วยวงเบนซีน อย่างน้อย 4 วง) เป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) สายก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) และเกิดทารกในครรภ์ที่มีรูปวิปริต (teratogen) (Wilson และ Jones, 1993)

ไพรีนและฟีแนนทรีนจัดเป็น PAHs ชนิดหนึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 4 วงและ 3 วงมาเชื่อมต่อกันตามลำดับ ไพรีนเป็นสารที่มีมวลโมเลกุลสูง ละลายน้ำยากจึงทนทานต่อการย่อยสลาย ส่วนฟีแนนทรีนเป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ระเหย ละลายน้ำ และย่อยสลายได้ง่ายกว่า PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Trzesicka-Mlynarz และ Ward, 1996) เมื่อปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมสามารถจับกับตะกอนต่าง ๆ และดินทั้งในระบบนิเวศบนบกและในน้ำ (Means และคณะ, 1980) ซึ่งอาจก่อให้เกิดการสะสมและถ่ายทอดมาสู่มนุษย์ได้ ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุที่จะต้องเร่งบำบัดเมื่อปนเปื้อนเข้าสู่สิ่งแวดล้อม

การบำบัดทางชีวภาพ (bioremediation) เป็นกระบวนการหลักในการย่อยสลายสาร PAHs ในธรรมชาติโดยเกิดจากการที่จุลินทรีย์ใช้สารนี้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ การย่อยสลายอาจเกิดจากจุลินทรีย์ชนิดเดี่ยวหรือกลุ่มจุลินทรีย์ (Cerniglia, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ได้ดีกว่าการใช้แบคทีเรียบริสุทธิ์ เพราะว่ากลุ่มแบคทีเรียจะมีความสามารถสูงในการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมและทำงานร่วมกันเพื่อย่อยสลายสารพิษและสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้น (Guo และคณะ, 2005)

แม้ว่ากลุ่มแบคทีเรียจะมีศักยภาพสูงในการย่อยสลายสารพิษ แต่เมื่อนำกลุ่มแบคทีเรียที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการไปใช้ในพื้นที่จริงกลับมีปัญหาเกิดขึ้น เช่น การมีชีวิตอยู่รอดของแบคทีเรียความสามารถการย่อยสลายสารพิษไม่ดีเท่าเหมือนในห้องปฏิบัติการ (Bengtsson และ Zerhouni, 2003) สาเหตุอาจเนื่องมาจากสภาวะการแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นในบริเวณที่ปนเปื้อนเพื่อแย่งสารอาหาร หรืออาจถูกฆ่าโดยโปรโตซัวและแบคทีริโอฝาจ รวมทั้งปัจจัยทางทางสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ที่ไม่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่เติมลงไป เช่น อุณหภูมิ ปริมาณน้ำ สารอาหาร ความเป็นกรด-ด่าง ตลอดจนปริมาณสารพิษที่อยู่บริเวณที่ปนเปื้อน จึงได้มีงานวิจัยเพื่อช่วยให้แบคทีเรียมีชีวิตรอดและยังคงมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารพิษ เช่น การใช้วัสดุทางการเกษตรบางชนิดเพื่อ

เป็นแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์โดยจุลินทรีย์จะเกาะติดอยู่กับวัสดุนั้นและสามารถใช้สารอินทรีย์จากวัสดุทางการเกษตรเหล่านั้นเจริญได้ ทำให้จุลินทรีย์สามารถอยู่รอดได้และเพิ่มความสามารถย่อยสลายของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปในดินปนเปื้อนได้ (Van Veen และคณะ, 1997)

แต่วิธีดังกล่าวข้างต้นต้องอาศัยการเตรียมแบคทีเรียสดเพื่อใช้ในการบำบัด ซึ่งไม่สะดวกในการเพาะเชื้อหลายครั้งต่อเนื่องกัน และอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมดั้งเดิมของจุลินทรีย์ วิธีหนึ่งที่สามารถทำให้แบคทีเรียอยู่รอดและไม่เปลี่ยนแปลงกิจกรรมดั้งเดิมของจุลินทรีย์ ก็คือการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze-drying) ซึ่งทำโดยนำจุลินทรีย์ผสมกับสารป้องกันความเย็น (cryoprotectant) และนำไปแช่เยือกแข็ง หลังจากนั้นนำสารแขวนลอยที่แข็งเข้าเครื่องทำแห้งเยือกแข็งเพื่อระเหิดเอาน้ำออก ในสภาพสุญญากาศ จุลินทรีย์ที่ได้จะอยู่ในสภาพที่แห้งและแข็ง (Gherna, 1994)

จิรทีปฆ์ แสนรัก (2547) ได้คัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไพรีนจากใบจามจุรี ประกอบด้วยเชื้อบริสุทธิ์อย่างน้อย 7 ชนิด โดยจัดอยู่ใน 4 สกุล ได้แก่ *Comamonas, Rugamonas, Flavimonas* และ *Pseudomonas* ส่วนที่เหลือไม่สามารถจำแนกได้ กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการย่อยสลายไพรีนความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ได้หมดภายในระยะเวลา 14 วัน

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ด้วยวิธีการทำแห้งเยือกแข็งและใช้สารป้องกันความเย็นชนิดต่าง ๆ ศึกษาอัตราการรอดชีวิตและกิจกรรมการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนเทียบกับกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมสด รวมทั้งศึกษาความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในการบำบัดไพรีนและฟีแนนทรีนในระบบบำบัดดินจำลอง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

หาภาวะเหมาะสมในการทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ภาวะที่เหมาะสมในการทำแห้งเยือกแข็งและการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน

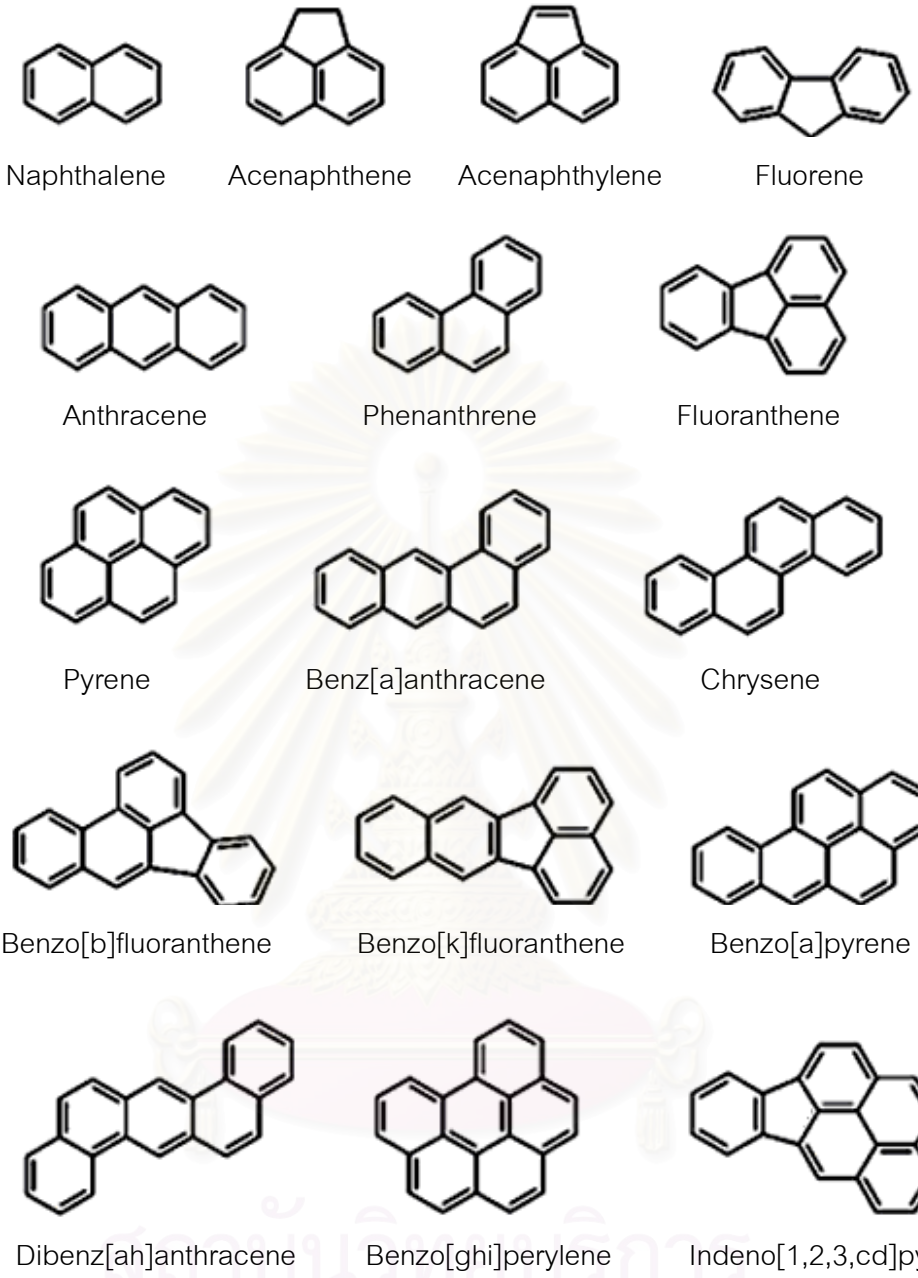
บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนมารวมกันเป็นวงเบนซีนอย่างน้อย 2 วงเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง มุมงอ หรือต่อกันเป็นกลุ่ม (Sim และ Overcash, 1983) PAHs พบปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ในอากาศ น้ำ และดิน โดยมีแหล่งกำเนิดมาจากอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิง ยานพาหนะ โรงงานก๊าซ โรงงานถ่านหิน โรงงานน้ำมัน ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม ผลิตภัณฑ์รักษาเนื้อไม้ (creosote) และจากแหล่งที่มาจากธรรมชาติ เช่น การเกิดไฟไหม้ป่า ภูเขาไฟระเบิด เชื้อเพลิงฟอสซิล การผลิตแร่ธาตุตามธรรมชาติ การรั่วซึมจากแหล่งน้ำมันดิบใต้ดิน เป็นต้น (Cerniglia, 1992) PAHs จัดเป็นสารพิษอันตราย PAHs ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (ประกอบด้วยวงเบนซีนน้อยกว่า 4 วง) ก่อให้เกิดพิษอย่างเฉียบพลัน มีผลต่ออัตราการสืบพันธุ์ และการตายของสัตว์น้ำ PAHs บางชนิดให้ผลคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน จึงทำให้ระบบร่างกายของสัตว์ตอบสนองต่อ PAHs เหมือนกับการได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งทำให้สัตว์มีลักษณะเหมือนเพศเมีย (Sim และ Overcash, 1983) PAHs ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (ประกอบด้วยวงเบนซีนอย่างน้อย 4 วง) เป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) สายก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) และเกิดทารกในครรภ์ที่มีรูปวิปริต (teratogen) (Wilson และ Jones, 1993) และจากสมบัติการไม่ละลายน้ำของ PAHs ทำให้เมื่อปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมสามารถจับกับตะกอนต่าง ๆ และดินทั้งในระบบนิเวศบนบกและในน้ำ (Means และคณะ, 1980) ซึ่งก่อให้เกิดการสะสมและถ่ายทอดไปตามห่วงโซ่อาหาร และอาจถ่ายทอดมาสู่มนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคขั้นสูงสุด ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุที่จะต้องเร่งบำบัดเมื่อปนเปื้อนเข้าสู่สิ่งแวดล้อม

จากข้อมูลของ National Institute of Standards and Technology สารในกลุ่ม PAHs ประกอบ ด้วยสาร 660 ชนิด แต่ประมาณ 30-50 ชนิดที่พบปนเปื้อนอยู่ในแหล่งธรรมชาติ และจากรายงานของสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, EPA) มี PAHs ทั้งหมด 16 ชนิด ที่ควรให้ความสำคัญในการป้องกันการรั่วไหลและเร่งกำจัดเมื่อปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม (Wilson และ Jones, 1993) ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุล PAHs ที่สำคัญ 16 ชนิด ตามรายงานสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, EPA) (Wilson และ Jones, 1993)

ไพรีน

ไพรีน (Pyrene) เป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มสารประกอบ PAHs มีชื่อทางเคมีเบนโซ(ดี,อี,เอฟ)ฟีแนนทรีน (benzo[d,e,f]phenanthrene) น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 202.26 กรัมต่อโมล สูตรเคมีคือ C_6H_{10} และมีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 4 วง เชื่อมต่อกันเป็นกลุ่ม (Verschueren, 1997)

ไพรีนบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นผลึกของแข็งสีขาว หรือสีเหลืองอ่อน มีโครงสร้างโมเลกุลที่เสถียร ละลายน้ำได้น้อยมาก จึงทนทานต่อการย่อยสลาย (Trzesicka-Mlynarz และ Ward, 1996; Verschueren, 1997) ไพรีนละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล เฮกเซน อะซีโตน เป็นต้น ได้ดีแตกต่างกัน (Patnaik, 1992) พบปนเปื้อนทั่วไปในดิน น้ำ และอากาศ โดยมีแหล่งกำเนิดมาจากน้ำมันดิบ การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของน้ำมันเชื้อเพลิง (IARC, 1983) นอกจากนี้เนื่องจากโมเลกุลของไพรีนรับและเปล่งคลื่นแสงได้ดีจึงถูกนำมาใช้เป็นตัวติดตามโดยเป็นตัวขยายสัญญาณทางพันธุศาสตร์ (Yamana และคณะ, 2000) การได้รับไพรีนส่วนใหญ่เกิดจากการหายเอาควันที่เกิดจากการเผาไหม้เข้าไปโดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีการจราจรแออัดหรือบริเวณใกล้กับแหล่งอุตสาหกรรม การสัมผัสทางผิวหนัง หรืออาจปนเปื้อนมากับอาหารและน้ำดื่ม (Chen, 1983) ไพรีนจัดเป็นสารพิษอันตราย ก่อให้เกิดการระคายเคืองผิวหนังหากสัมผัสโดยตรง (skin irritant) มีบางรายงานว่าไพรีนก่อให้เกิดมะเร็งผิวหนังในหนู mice และ mouse ได้ (Moorthy และ Randerath, 1997) และสามารถกระตุ้นเบนโซ[เอ]ไพรีนให้ก่อมะเร็งได้ (cocarcinogenic potential) (Faust, 1998)

ฟีแนนทรีน

ฟีแนนทรีน (Phenanthrene) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าฟีแนนทริน (Phenanthrin) จัดเป็นสารอินทรีย์ในกลุ่มสาร PAHs น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 178.23 กรัมต่อโมล สูตรเคมีคือ $C_{14}H_{10}$ มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 3 วง เชื่อมต่อกันเป็นมุมงอ (U.S. EPA, 1987)

ฟีแนนทรีนเป็นสารที่มีลักษณะเป็นผลึกของแข็งสีขาว น้ำหนักโมเลกุลต่ำจึงระเหย ละลายและย่อยสลายได้ง่ายกว่า PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง สามารถละลายได้ดีใน เบนซีน โทลูอีน แอลกอฮอล์ อีเทอร์ เฮกเซน คาร์บอนไดซัลไฟด์ คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และกรดอะซีติก (Trzesicka-Mlynarz และ Ward, 1996) ฟีแนนทรีนมีแหล่งกำเนิดมาจากถ่านหิน การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงและไม้ (U.S. EPA, 1987) นอกจากนี้ยังมีการใช้ฟีแนนทรีนในการผลิตสีย้อมพลาสติก ยาฆ่าแมลง วัตถุระเบิด อุตสาหกรรมยา เช่นใช้สังเคราะห์ phenanthrenequinone, diphenic acid (Sax และ Lewis, 1987) ผลิตน้ำดี คลอเรสเตอรอล และสเตียรอยด์ (IARC, 1983) ฟีแนนทรีนสามารถแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน น้ำ และอากาศ มนุษย์

สามารถได้รับฟีแนนทรีนจากการสูดดมหายใจ ทางผิวหนัง และทางการกิน เนื่องจากการปนเปื้อนมากับอาหารและน้ำดื่ม ฟีแนนทรีนก่อให้เกิดการระคายเคืองผิวหนังและระบบทางเดินหายใจ ผิวหนังมีความไวต่อแสงมากกว่าปกติ นอกจากนี้ด้วยสมบัติที่ละลายไขมันได้ดีจึงสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ต่างๆ ได้ จึงทำให้ง่ายต่อการดูดซึมเข้าทางเดินอาหาร และปอด (U.S. EPA, 1987)

การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อม

ความทนทานของ PAHs ในสิ่งแวดล้อมขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น สมบัติของสารประกอบทั้งทางกายภาพและทางเคมี โดยความเสถียรของ PAHs จะขึ้นอยู่กับการจัดเรียงตัวของวงแหวน โดยถ้าการต่อกันของวงแหวนเป็นเส้นตรงจะไม่เสถียร แต่ถ้าหากเป็นมุมงอจะมีความสเถียรมากที่สุด (Wilson และ Jones, 1993) การเปลี่ยนแปลงของสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อมสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้หลายวิธี ทั้งโดยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ (Cerniglia, 1992)

1. การเปลี่ยนแปลงสารประกอบ PAHs ทางกายภาพ

1.1 การดูดซับ (adsorption)

เนื่องจากสมบัติในการไม่ชอบน้ำ จึงทำให้ PAHs สามารถถูกดูดซับโดยติดกับอนุภาคดินหรือตะกอนได้ดี โดยความแน่นในการจับจะมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุลที่เพิ่มขึ้นและความไม่มีขั้วของสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจึงติดแน่นเป็นเวลานานกว่าน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Pignatello และ Xing, 1996; Luthy และ คณะ, 1997) ดังนั้นจึงมีผู้ศึกษาการใช้พืชเข้ามาช่วยดูดซับไว้ก่อนนำไปทำลาย ตัวอย่างเช่น *Populus tremula* มาดูดซับไพรีน โดยมีความสามารถดูดซับไพรีนได้มากกว่า 50% ซึ่งวิธีนี้สามารถพัฒนานำไปใช้บำบัดการปนเปื้อนสาร PAHs ในแหล่งน้ำต่างๆ (Boving และ Zhang, 2004) แต่ผลเสียของวิธีนี้อาจมีกากที่เหลือที่ต้องมีค่าใช้จ่ายในการกำจัดขั้นต่อไป

1.2 การระเหย (Volatization)

PAHs ที่ปนเปื้อนในดินจะระเหยช้ากว่าน้ำ เนื่องจากเกาะติดแน่นอยู่ในอนุภาคดิน และสารโมเลกุลต่ำก็ระเหยได้ง่ายกว่าสารโมเลกุลสูง (Ashok และ Saxena, 1995) วิธีนี้อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์จากการปนเปื้อนของสาร PAHs ในอากาศ

1.3 การสลายตัวโดยแสง (Photodegradation)

กลไกลการย่อยสลายจะอาศัยออกซิเจนและแสงเป็นตัวทำให้เกิดปฏิกิริยา (Reyes และ คณะ, 1998; Warner และคณะ, 2004) รวมถึงการใช้รังสีต่างๆ เช่นรังสีแกมมา (Melcher และ

คณะ, 2002) แต่วิธีนี้อาจก่อให้เกิดสารพิษชนิดใหม่จากการสลายตัวของสารนั้น และนอกจากนี้ขั้นตอนการบำบัดยังเสียค่าใช้จ่ายสูง (Lee และ Cutright, 1996)

2. การเปลี่ยนแปลงสารประกอบ PAHs ทางเคมี

2.1 การใช้โอโซน สารชนิดนี้จัดเป็นตัวออกซิไดซ์ที่แรง จึงสามารถแตกโมเลกุลของ PAHs ข้อเสียของวิธีการนี้คือใช้ได้เฉพาะ PAHs โมเลกุลต่ำ (Nam และ Kukor, 2000)

2.2 การใช้สารเคมี เช่น สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งสารนี้จะให้อนุพันธ์ที่มีสมบัติให้เกิดไฮดรอกซีเรดิเคิล และสามารถแตกสลายสาร PAHs ได้ แต่ประสิทธิภาพยังไม่ดีนักและยังเสียค่าใช้สูง (Nadarajah และคณะ, 2002)

3. การเปลี่ยนแปลงสารประกอบ PAHs ทางชีวภาพ

3.1 การย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation)

วิธีการนี้เป็นกระบวนการหลักในการย่อยสลายสาร PAHs ในธรรมชาติ เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ เป็นต้น จุลินทรีย์สามารถใช้ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ ทำให้ PAHs ถูกกำจัดไปอย่างถาวร (mineralization) จนได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ หรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็นสารอื่นที่มีพิษลดลง (transformation) (Cerniglia, 1992)

เนื่องจากจุลินทรีย์มีความสามารถย่อยสลาย PAHs ทางชีวภาพได้ จึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีในการบำบัดชีวภาพซึ่งมีด้วยกันหลายวิธีดังต่อไปนี้ (Trejo และ Quintero, 2000)

1. Bioaugmentation เป็นวิธีที่มีการเติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษลงไปบริเวณที่มีการปนเปื้อน ซึ่งวิธีนี้มีข้อเสียก็คือ เมื่อเติมจุลินทรีย์ลงไปในดินมักอยู่รอดได้น้อยและเกิดได้ไม่ดีเท่าห้องปฏิบัติการ (Bengtsson และ Zerhouni, 2003) สาเหตุอาจเนื่องมาจากสภาวะการแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นในบริเวณที่ปนเปื้อนเพื่อแย่งสารอาหาร หรืออาจถูกฆ่าโดยโปรโตซัวและแบคทีริโอฝาจ รวมทั้งปัจจัยทางทางสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ที่ไม่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่เติมลงไป เช่น อุณหภูมิ ปริมาณน้ำ สารอาหาร ความเป็นกรดด่าง ตลอดจนปริมาณสารพิษที่อยู่บริเวณที่ปนเปื้อน (Van Veen และคณะ, 1997)

2. Biostimulation เป็นวิธีที่มีการเติมสารอาหารหรือปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ลงไปในบริเวณที่มีการปนเปื้อน เช่น การเติมธาตุอาหารที่จำเป็นเช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือการให้ออกซิเจน เป็นต้น โดยสารที่เติมลงไปนี้จะช่วยในการกระตุ้นให้จุลินทรีย์มีการเพิ่มจำนวน ช่วยลดระยะเวลาที่แบคทีเรียใช้ปรับตัวในการย่อยสลายสาร PAHs และเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs เพิ่มขึ้น หรือมีกิจกรรมในการย่อยสลาย

สารพิษได้ดีขึ้น (Haigh, 1996) นอกจากนี้ยังถึงการเติมสารลดแรงตึงผิว เพื่อช่วยเพิ่ม bioavailability โดยเพิ่มการละลายน้ำทำให้จุลินทรีย์สามารถนำสารพิษมาใช้ได้เพิ่มขึ้น (Van Hamme และ Ward, 2001) เป็นต้น แต่วิธีการนี้ก็ยังมีข้อเสียคือ ค่าใช้จ่ายของสารที่เติมลงไป

3. **Biofilter** เป็นวิธีที่มีการใช้คอลัมน์ยาวที่มีจุลินทรีย์เพื่อบำบัดสารปนเปื้อนก่อนที่จะปล่อยสู่อากาศภายนอก วิธีนี้ข้อเสียคือ มีค่าใช้จ่ายสูง

4. **Bioreactor** เป็นการย่อยสลายในถังหมัก โดยเอาสิ่งที่ปนเปื้อนใส่ในถังหมักและจัดภาวะให้เหมาะสมกับการทำงานของจุลินทรีย์ ข้อเสียของวิธีนี้คือต้องใช้พื้นที่และต้องมีค่าขนส่งในการขนย้ายสิ่งที่ปนเปื้อนมาสู่ถังหมัก

5. **Composting** เป็นวิธีการบำบัดโดยใช้มีการเติมปุ๋ยหมักหรือวัสดุทางการเกษตรร่วมกับการใช้จุลินทรีย์ โดยวัสดุการเกษตรที่เติมลงไปนั้นจะเป็นแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์โดยเกาะติดอยู่กับวัสดุนั้นและสามารถใช้สารอินทรีย์จากวัสดุทางการเกษตรเหล่านั้นเจริญได้ ทำให้จุลินทรีย์สามารถอยู่รอดได้และเพิ่มความสามารถย่อยสลายของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปในดินปนเปื้อนได้ (Van Veen และคณะ, 1997)

ในปัจจุบันมีรายงานแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs จำนวนมาก เช่น *Acinetobacter calcoaceticus, Alcaligenes denitrificans, Mycobacterium* sp., *Pseudomonas putida, P. fluorescens, P. vesicularis, P. cepacia, P. paucimobilis, Rhodococcus* sp., *Corynebacterium renale, Moraxella* sp., *Bacillus cereus, Beijerinckia* sp., *Micrococcus* sp., *Vibrio* sp. และ *Sphingomonas* sp. เป็นต้น (Jain และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ทั้งชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและสูงได้ดีกว่าการใช้แบคทีเรียบริสุทธิ์ เพราะว่ากลุ่มแบคทีเรียจะมีความสามารถสูงในการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อม และทำงานร่วมกันเพื่อย่อยสลายสารพิษและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้น (Guo และคณะ, 2005)

Yu และคณะ (2005) สามารถแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และไพรีนจากตะกอนดินป่าชายเลนในฮ่องกง ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *Rhodococcus* sp., *Acinetobacter* sp. และ *Pseudomonas* sp. เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีการเติมตะกอนดินลงไปด้วยจะมีความสามารถย่อยสลายฟลูออรีน ฟีแนนทรีนและไพรีน ความเข้มข้นชนิดละ 10 มก./ลิตร ได้สมบูรณ์ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยการย่อยสลายไพรีนอย่างสมบูรณ์จะใช้เวลานานกว่าฟลูออรีนและฟีแนนทรีน แสดงให้เห็นว่า PAHs น้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ สามารถย่อยสลายได้ง่ายกว่าน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ

Guo และคณะ (2005) ได้ทำการแยกกลุ่มแบคทีเรียจากตะกอนดินป่าชายเลน 3 แห่งในฮ่องกง โดยกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *Rhodococcus* sp., *Sphingmonas* sp. และ *Paracoccus* sp. โดยกลุ่มแบคทีเรียที่แยกมาจากบริเวณที่มีความเข้มข้น PAHs สูงที่สุดจะมีความสามารถย่อยสลายสารฟีแนนทรีนและฟลูออแรนธีนความเข้มข้นชนิดละ 10 มก./ลิตร ได้ 90% ในระยะเวลา 7 วัน และมีความสามารถในการย่อยสูงกว่าแบคทีเรียบริสุทธิ์

Ozaki และคณะ (2007) คัดแยกกลุ่มแบคทีเรียจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม โดยกลุ่มแบคทีเรียนี้ประกอบด้วย *Pandoraea* sp., *Hyphomicrobium facile* Y3, *Burkholderia multivorans* Y4 และ *Brachymonas* sp. F มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร ได้ 65% ภายในระยะเวลา 14 วัน

Jacques และคณะ (2007) คัดแยกกลุ่มแบคทีเรียจากดินในบริเวณพื้นที่เกษตรกรรมที่มีการปนเปื้อนสารประกอบ PAHs ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์ *Mycobacterium fortuitum, Bacillus cereus, Microbacterium* sp., *Gordonia polyisoprenivorans, Microbacteriaceae bacterium*, *Napthalene-utilizing bacterium* และ *Fusarium oxysporum* และพบว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอนทราซีน ไพรีน และฟีแนนทรีน ได้ 99 96 และ 99 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ภายในระยะเวลา 70 วัน

จิรทีปฆ์ แสนรัก (2547) ได้คัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไพรีนจากใบจามจุรี โดยพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการย่อยสลายไพรีนความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ได้หมดภายในระยะเวลา 14 วัน นอกจากนี้ยังมีความสามารถย่อยสลายอะซีแนพธีน 100 มก./ลิตร ได้หมดในระยะเวลา 8 วัน ฟลูออรีน 100 มก./ลิตร ได้หมดภายในระยะเวลา 8 วัน ฟีแนนทรีน 100 มก./ลิตร ได้เกือบหมดภายในระยะเวลา 12 วัน และฟลูออแรนธีน ความเข้มข้น 100 มก./ลิตร ได้ 34% ภายในระยะเวลา 14 วัน และสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้อย่างน้อย 7 ชนิด โดยจัดอยู่ใน 4 สกุล ได้แก่ *Comamonas, Rugamonas, flavimonas* และ *Pseudomonas* ส่วนที่เหลือไม่สามารถจำแนกได้

แต่เนื่องจากการเติมกลุ่มแบคทีเรียโดยตรงในดินปนเปื้อนทำให้ แบคทีเรียอาจไม่สามารถรอดชีวิตหรือความสามารถการย่อยสลายสารพิษไม่ดีเท่าเหมือนในห้องปฏิบัติการ (Bengtsson และ Zerhouni, 2003) สาเหตุอาจเนื่องมาจากสภาวะการแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นในบริเวณที่ปนเปื้อนเพื่อแย่งสารอาหาร หรืออาจถูกฆ่าโดยโปรโตซัวและแบคทีริโอฝาจ รวมทั้งปัจจัยทางทางสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ที่ไม่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่เติมลงไป เช่น อุณหภูมิ ปริมาณน้ำ สารอาหาร ความเป็นกรดด่าง ตลอดจนปริมาณสารพิษที่อยู่บริเวณที่ปนเปื้อน (Van Veen และคณะ, 1997)

จึงได้มีงานวิจัยเพื่อค้นหาวิธีทำให้จุลชีพมีชีวิตรอดในสิ่งแวดล้อมที่ต้องการบำบัดและมีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษได้ ดังเช่น การเติมอินทรีย์วัตถุต่างๆ ลงในดินปนเปื้อน เป็นต้น

Hupe และคณะ (1996) พบว่าการเติมปุ๋ยหมักลงในดินที่ปนเปื้อนด้วยแนพธาลีน แอนทราซีน ฟลูออแรนธีน และไพรีน สามารถย่อยสลายได้ดีกว่าดินที่ไม่เติมปุ๋ยหมัก ทั้งนี้เพราะปุ๋ยหมักมีคุณสมบัติช่วยในการส่งผ่านออกซิเจนในดิน เป็นแหล่งที่มีจุลินทรีย์จำนวนมาก ช่วยปรับปรุงคุณภาพดิน ควบคุมความเป็นกรดด่าง ช่วยให้ดินอุ้มน้ำได้ดีขึ้น อีกทั้งยังเป็นแหล่งสารอาหารและแร่ธาตุที่สำคัญเช่น ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส

Haderlein และคณะ (2001) รายงานว่าใบเมเปิลและหญ้าอัลฟัลฟ่าสามารถช่วยให้การย่อยสลายไพรีนในดินที่ปนเปื้อนเร็วกว่าที่ไม่ได้เติมสารอินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ถึง 8 เท่า

Pattanasupong และคณะ (2004) ได้ใช้ใยบวบเป็นแหล่งที่ให้กลุ่มแบคทีเรียเกาะติดเพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายสาร carbendazim และ 2,4 dichlorophenoxyacetic acid โดยสามารถย่อยสลายได้สมบูรณ์ภายในระยะเวลา 5.5 และ 1.5 วัน ตามลำดับ

Charoenchang และคณะ (2004) ได้ศึกษาการเติมอินทรียวัตถุที่ได้จากการเกษตร เช่น เปลือกถั่วลิสงและใบจามจุรีลงในดินที่ปนเปื้อน PAHs พบว่าสามารถช่วยย่อยสลายฟีแนนทรีน 0.1 มก./กรัม ได้หมดภายใน 28 วัน และสามารถย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนธีนความเข้มข้นชนิดละ 0.1 มก./กรัม ได้หมดภายในระยะเวลา 42 วัน

Ying และคณะ (2007) ใช้ฟางข้าวมาเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดดินโคลนตะกอนจากโรงงานบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนด้วยสาร PAHs โดยสามารถลดสาร PAHs ทั้ง 16 ชนิด ได้ 94% ภายใน 56 วัน ในระบบที่มีการให้อากาศเป็นช่วง ๆ

เสาวลักษณ์ อ้นเมฆ (2550) ได้ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ร่วมกับใบจามจุรีในการบำบัดไพรีนและฟีแนนทรีนในดิน พบว่าสามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินได้หมดภายในระยะเวลา 21 วัน โดยสามารถย่อยสลายได้เร็วกว่าการใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสดเพียงอย่างเดียว

นอกจากการเติมอินทรีย์วัตถุในดินจะมีส่วนช่วยในการย่อยสลาย PAHs แล้ว สิ่งสำคัญสิ่งหนึ่งก็คือ ภาวะของสิ่งแวดล้อมในดิน โดย Vidali (2001) ได้สรุปภาวะของสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดินที่มีประสิทธิภาพคือ ความชื้น 70-80% ของค่าความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ ความกรดด่าง 6-8 ปริมาณออกซิเจน 10-40% ของอากาศที่อยู่ในช่องว่างของอนุภาคดิน อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส 100:10:11 อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส

ในวิธีการต่างๆ ที่กล่าวมานั้นต้องอาศัยการเตรียมแบคทีเรียสดเพื่อใช้ในการบำบัด ซึ่งไม่สะดวกในการเพาะเชื้อหลายครั้งต่อเนื่องกัน และอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมดั้งเดิมของจุลินทรีย์ วิธีหนึ่งที่สามารถทำให้แบคทีเรียอยู่รอดและไม่เปลี่ยนแปลงกิจกรรมดั้งเดิมของจุลินทรีย์ ก็คือการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze-drying)

การทำแห้งเยือกแข็ง (freeze-drying)

หลักการคือ ทำให้น้ำระเหิดไปจากสารแขวนลอยเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งแล้ว ในสภาพสุญญากาศ จุลินทรีย์จะอยู่ในสภาพที่แห้งและแข็ง (Gherna, 1994)

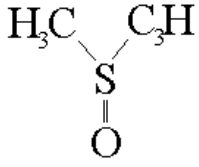
ในระหว่างกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งนั้น จะต้องมีการทำให้สารแขวนลอยเซลล์อยู่ในสภาพแข็ง ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ โดยเกิดจากผลึกน้ำแข็งทำให้เซลล์แตกและสารต่างๆ ในเซลล์รั่วไหลออกมา สูญเสียความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้การมีผลึกน้ำแข็งนอกเซลล์ ยังก่อให้เกิดความเข้มข้นของสารละลายนอกเซลล์มาก จึงทำให้มีการแพร่ของน้ำออกจากเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำ และอาจทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด (Steponkus, 1984; Steponkus และ Webb, 1992; Uemura และคณะ, 1995)

ดังนั้นการทำแห้งเยือกแข็งจำเป็นต้องมีสารป้องกันความเย็น โดยสารนี้เป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ดี และมีจุดหลอมเหลวต่ำ สารนี้จะช่วยลดปัจจัยที่ทำให้เกิดการเสียหายเนื่องจากน้ำแข็ง (Brand และ Diller, 2004) สารป้องกันความเย็นที่ใช้สามารถแบ่งได้ 2 ชนิด คือ ชนิดที่สามารถเจาะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และชนิดที่ไม่เจาะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์

1. **สารป้องกันความเย็นชนิดที่สามารถเจาะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์**

สารป้องกันความเย็นชนิดนี้จะเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก สามารถเจาะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ขนาดโมเลกุลของสารชนิดนี้มักจะมีขนาดน้อยกว่า 100 ดาลตัน สารป้องกันความเย็นชนิดนี้ปกป้องเซลล์โดยการลดขนาดของผลึกน้ำแข็งและลดการขาดน้ำของเซลล์ (McGann, 1978) ตัวอย่างของสารป้องกันความเย็นชนิดนี้คือ ไดเมธิลซัลฟอกไซด์

ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เป็นสารเคมีมีลักษณะเป็นของเหลวไม่มีสี สูตรโมกุลคือ $(CH_3)_2SO$ และมีโครงสร้างโมเลกุลดังรูป 2.2



รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของไดเมธิลซัลฟอกไซด์

ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ มีสมบัติในการละลายได้ดีทั้งสารที่มีขั้วและไม่มีขั้ว สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีพอกับน้ำ โดยการก่อตัวเป็นไมเซล มีรายงานการใช้ไดเมธิลซัลฟอกไซด์เป็นสารป้องกันความเย็นหลายงานวิจัย ยกตัวอย่างเช่น

Kotula และคณะ (1979) ได้ศึกษาการใช้สารไดเมธิลซัลฟอกไซด์ด้วยความเข้มข้นต่างๆ เป็นสารป้องกันความเย็นเพื่อรักษาปริมาณจุลินทรีย์ *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* และ *Clostridium perfringens* ในตัวอย่างเนื้อแช่แข็งที่นำมาตรวจจุลินทรีย์ในระหว่างการขนส่ง โดยพบว่า 5% ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ ให้อัตราการอยู่รอดของเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *C. perfringens* ดีที่สุด โดยให้อัตราการอยู่รอดใกล้เคียงกับตอนที่เก็บตัวอย่างในพื้นที่

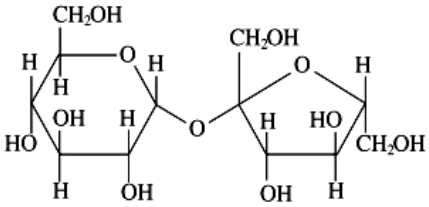
Shin และคณะ (2001) ศึกษาการใช้สารป้องกันความเย็น 10% กลีเซอรอล และ 10% ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ ในการเก็บแบคทีเรียจากทะเล โดยการแช่เยือกแข็งที่ -70 องศาเซลเซียส แบคทีเรียที่แยกได้ประกอบด้วยแบคทีเรียทนเกลือ 6 ชนิด และแบคทีเรียที่ชอบเกลือ 4 ชนิด และพบว่าสารทั้งสองชนิดนี้สามารถเป็นสารป้องกันความเย็นที่ดี ให้การอยู่รอดแบคทีเรียได้ดี โดยอัตราการอยู่รอดก็ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียด้วย โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความเหมาะสมต่อสารป้องกันความเย็นต่างกัน

จากข้างต้นจะเห็นว่าไดเมธิลซัลฟอกไซด์มีประสิทธิภาพในการเป็นสารป้องกันความเย็นในกระบวนการแช่เยือกแข็ง ดังนั้นน่าจะมีความเป็นไปได้ในการใช้สารนี้เป็นสารป้องกันความเย็นในการทำแห้งเยือกแข็ง เพราะการทำแห้งเยือกแข็งนั้น ก็ต้องผ่านการแช่เยือกแข็งมาก่อนที่จะทำให้แห้ง แต่จะต้องเลือกใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมและต้องระวังไม่ให้มีการสัมผัสกับเซลล์นานเกินไป

2. สารป้องกันความเย็นชนิดที่ไม่สามารถเจาะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์

สารป้องกันความเย็นชนิดนี้เป็นสารโมเลกุลใหญ่ มีหน้าที่ช่วยยับยั้งการเกิดผลึกของน้ำ-แข็งลดการสูญเสียน้ำเช่นเดียวกับสารป้องกันความเย็นชนิดที่เจาะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ แต่จะไม่สามารถเข้าเซลล์ได้ สารป้องกันความเย็นชนิดนี้จะมีความเป็นพิษน้อยกว่าสารป้องกันความเย็นชนิดที่เจาะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (McGann, 1978) ตัวอย่างของสารป้องกันความเย็นชนิดนี้คือ ซูโครส (sucrose) และ นมปลอดมันเนย (skim milk) เป็นต้น

ซูโครส เป็นสารที่เกิดจากการรวมตัวของกลูโคสกับฟรุคโตส ซูโครสบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นผลึกของแข็งสีขาว สูตรโมเลกุลคือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ และมีโครงสร้างโมเลกุลดังรูปที่ 2.3 (Yudkin และคณะ 1973)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างโมเลกุลของซูโครส

ซูโครสช่วยในการรักษาโครงสร้างของเซลล์เมมเบรน ช่วยคงรูปโดยการจับกับฟอสโฟไลปิดของเมมเบรน ทำหน้าที่เสมือนเป็นบัฟเฟอร์ของแรงดันออสโมติกโดยช่วยคงแรงดันออสโมติก (Liebermann และคณะ, 2003) นอกจากนี้สารป้องกันความเย็นชนิดนี้ยังสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของจุลินทรีย์ได้ และมีรายงานการวิจัยการใช้ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็นดังนี้

Chavarri และคณะ (1988) ทดสอบเก็บรักษา *Streptococcus lactis* ที่อุณหภูมิ -40 กับ -70 องศาเซลเซียส โดยใช้สารป้องกันความเย็น 6 ชนิด พบว่า สารป้องกันความเย็นซูโครสและแลคโตสสามารถรักษาความมีชีวิตและความสามารถในการผลิตกรดได้ดีที่สุด

Leslie และคณะ (1995) รายงานว่าสารป้องกันความเย็นซูโครสและทรีฮาโลส ความเข้มข้น 100 mM สามารถปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์ในระหว่างกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งของ *Escherichia coli* DH5 α และ *Bacillus thuringiensis* HD-1 ได้ดี โดยให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเมื่อใช้สารป้องกันความเย็นทรีฮาโลส คือ 70 และ 57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อใช้สารป้องกันความเย็นซูโครส มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้งสองคือ 56 และ 44 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

Kurosawa และคณะ (1997) ได้เก็บรักษา *Thiobacillus thiooxidans* โดยการทำแห้งเยือกแข็งและนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายซัลไฟด์ พบว่าทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 10% ซูโครสและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สามารถคงความมีชีวิตและประสิทธิภาพในการย่อยสลายซัลไฟด์ได้ดีที่สุด

Costa และคณะ (2000) ทดสอบทำแห้งเยือกแข็ง *Pantoea agglomerans* CPA-2 กับสารป้องกันความเย็นชนิดต่างๆ พบว่าสารป้องกันความเย็นซูโครสสามารถรักษาความมีชีวิตและความสามารถในการยับยั้งโรคพืชได้ดี

Li และ Ricke (2004) ได้ใช้สารป้องกันความเย็นซูโครส ทรีฮาโลส และกลีเซอรอล ในการเก็บรักษา *E.coli* สายพันธุ์ที่ไม่ผลิตไลซีนพื่อแช่เยือกแข็ง โดยพบว่าสารป้องกันความเย็นซูโครสและทรีฮาโลส สามารถรักษา *E.coli* สายพันธุ์นี้ได้ดี

Schoug และคณะ (2006) ทดลองเก็บรักษา *Lactobacillus coryniformis* Si3 โดยวิธีทำแห้งเยือกแข็ง ด้วยสารป้องกันเย็นซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ และลองเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อรากับเชื้อแบคทีเรียตัวอื่นที่มีขายในเชิงการค้า พบว่าความเข้มข้นสุดท้าย 12% จะสามารถคงความมีชีวิตและประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดีเท่ากับแบคทีเรียที่มีขายเชิงการค้า

จากข้างต้นซูโครสสามารถเป็นสารป้องกันความเย็นในการแช่เยือกแข็งได้ดี และไม่มีรายงานความพิษ และความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมที่ใช้โดยทั่วไป คือ 12% (Gherna, 1994)

นมปลอดมันเนย (skim milk) เป็นนมที่ทำจากน้ำนมที่มีการแยกมันเนยออกเกือบหมด นิยมใช้ในการผลิตน้ำนมคืนรูป น้ำนมปรุงแต่ง น้ำนมแปลงไขมัน และผลิตภัณฑ์นมอื่น ๆ ดังนั้นจึงประกอบด้วยสารอาหารหลายอย่างทั้งโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต สามารถจับกับเมมเบรนต่างๆ ได้ดี เพราะประกอบด้วยส่วนทั้งมีขั้วและไม่มีขั้ว (Harold, 2004) นอกจากนี้นมปลอดมันเนยยังสามารถเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ได้ และได้มีการใช้สารชนิดนี้มาเป็นสารป้องกันความเย็นโดยมีรายงานการวิจัย ดังนี้

Shinohara และ คณะ (2000) ได้ทำการศึกษาการรอดชีวิตจากการเก็บรักษาจุลินทรีย์ด้วยทำแห้งเยือกแข็ง โดยใช้นมปลอดมันเนย และโซเดียมกลูตาเมทความเข้มข้นสุดท้าย 10 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เป็นสารป้องกันความเย็น ทดสอบกับจุลินทรีย์ 10 ชนิด และเก็บรักษาจุลินทรีย์ไว้ในช่วง 0-20 ปี ซึ่งผลการทดลองพบว่า *S. cerevisiae* มีอัตราการรอดชีวิต 10% หลังจากการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง แต่อัตราการรอดชีวิตนี้ไม่ได้ลดลงเมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 10 ปี แบคทีเรียแกรมบวก *Brevibacterium flavum, B. lactofermentum, Corynebacterium acetoacidophilum, C. gultamicum* และ *Streptococcus mutans* มีอัตราการรอดชีวิตประมาณ 80% โดยที่อัตราการรอดชีวิตของ *Brevibacterium* และ *Corynebacterium* มีอัตราการรอดชีวิตไม่ค่อยลดลงในช่วง 0-10 ปี ในขณะที่ *S. mutans* มีอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือ 20% เมื่อเก็บไว้นานมากกว่า 10 ปี แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli, Pseudomonas putida, Serratia marcescens* และ *Alcaligenes faecalis* มีอัตราการรอดชีวิตประมาณ 50% และลดลงเมื่อเก็บรักษาได้ช่วง 0-5 ปี และหลังจากนั้นจะมีอัตราการรอดชีวิตค่อนข้างคงที่ประมาณ 10% ซึ่งก็แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้ก็สามารถที่จะคงความมีชีวิตได้นาน โดยเฉพาะถ้าเก็บไว้ในระยะไม่เกิน 10 ปี ก็สามารถที่จะรักษาความมีชีวิตไว้ได้ดี แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับชนิดจุลินทรีย์ด้วย

Jacques และคณะ (2004) รายงานว่า *Geocardium candidum* RO294 มีการรอดชีวิตสูง เมื่อทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้สารป้องกันความเย็น ทรีฮาโลส มอลโตส ซูโครส และนมปลอดมันเนย

จากข้างต้นจะเห็นว่านมปลอดมันเนยใช้เป็นสารป้องกันความเย็นที่ให้การรอดชีวิตได้ดี ดังนั้นจึงน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้เป็นสารป้องกันความเย็นในการทำแห้งเยือกแข็ง

เนื่องจากการทำแห้งเยือกแข็งสามารถคงความมีชีวิตและประสิทธิภาพต่างๆ ของจุลินทรีย์ได้ดี จึงมีการนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ มากมาย ดังตัวอย่างรายงานการวิจัย

Sembries และคณะ (1996) ใช้สปอร์ของ *Clostridium bifermentans* ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 10% นมปลอดมันเนยเป็นสารป้องกันความเย็น และเก็บไว้เป็นเวลา 4 เดือน และนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย 2,4,6-ไตรไนโตรโทลูอีน 50 ppm พบว่าสามารถย่อยสลายสารนี้ได้หมด ภายในระยะเวลา 50 ชั่วโมง

Tserovska และ Dimkov (1998) ได้ทดลองใช้กลุ่มแบคทีเรีย 189AC ในรูปการทำแห้งเยือกแข็งย่อยสลายไดเมธิลเทียพธาเลท (Dimethylterephthalate) พบว่าเมื่อใช้กลุ่มแบคทีเรีย 0.5 กรัม/ลิตร สามารถย่อยสลายไดเมธิลเทียรพธาเลท 50 มก./มล. ได้หมดภายในระยะเวลา 100 ชั่วโมง โดยมีประสิทธิภาพการย่อยสลายเท่ากับการใช้เชื้อที่เตรียมสด

Croan (2000) ศึกษาการใช้เทคนิคการทำแห้งเยือกแข็งในการเก็บรักษาเส้นใยของรา Basidiomycetes โดยใช้สารป้องกันความเย็น 10% นมปลอดมันเนยผสมกับ 10% ทรีฮาโลส โดยพบว่าสามารถเก็บรักษาราชนิดนี้โดยคงความมีชีวิต อัตราการเจริญ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางเคมีได้เหมือนเดิม

Tauriainen และคณะ (2000) ใช้ Rhizobium *meliloti* ที่อยู่ในรูปการทำแห้งเยือกแข็งเพื่อใช้ตรวจสอบ metal และ metalloids จากแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยแบคทีเรียจะรีดิวซ์ thiazole tetrazolium dye MTT ให้สารสีน้ำเงินซึ่งสามารถติดตามด้วย spectrophotometer

Trsic-Milanovic และคณะ (2001) ใช้การทำแห้งเยือกแข็งในการรักษาและเตรียมหัวเชื้อ *Bifodobacterium breve* A71 โดยพบว่าวิธีการนี้สามารถรักษาแบคทีเรียให้มีชีวิตรวมทั้งมีประสิทธิภาพในการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียชนิดนี้ได้ดี

Dyk และ Kangas (2002) ใช้ *E.coli* ที่มียีน lux*CDABE* ในรูปการทำแห้งเยือกแข็งเพื่อใช้ตรวจสอบสารพิษในสิ่งแวดล้อม

Zhang และคณะ (2005) ศึกษาการใช้ *Cryptococcus nodaensis* OH 182.9 ในรูปทำแห้งเยือกแข็ง ในการควบคุมโรคใบไหม้จากเชื้อการใช้ *Gibberella zeae* พบว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้ในรูปทำแห้งเยือกแข็งมีความสามารถในการยับยั้งโรคไม่แตกต่างจากจุลินทรีย์ในรูปปกติ โดย

สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Cryptococcus nodaensis* OH 182.9 ได้ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง

นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ในรูปการทำแห้งเยือกแข็งแบคทีเรียใช้ในการบำบัดชีวภาพ เช่น ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Alken-Murrray โดยมีออกมาหลายผลิตภัณฑ์ ยกตัวอย่างเช่น ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารฟีนอล คีโตน เบนซีน ไซลีน แนพธาลีน เป็นต้น โดยผลิตภัณฑ์ต่างเหล่านี้ประกอบด้วย vegetative cell ของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ และสปอร์ของแบคทีเรีย โดยอยู่ในรูปการทำแห้งเยือกแข็ง ซึ่งผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เหล่านี้จะมีอายุนาน 2 ปี และบริษัทได้ทดลองนำผลิตภัณฑ์มาใช้ในบริเวณที่ปนเปื้อนเบนซีน ความเข้มข้น 80 มก./ลิตร และโทลูอีนซึ่งมีความเข้มข้น 40 มก./ลิตร พบว่าสามารถย่อยสลายสารทั้งสองได้ภายในระยะเวลา 4 และ 20 วัน ตามลำดับ ซึ่งเกิดได้รวดเร็วกว่าการย่อยสลายโดยใช้จุลินทรีย์แบบธรรมชาติ (Edward, 2001)

จากการที่การทำแห้งเยือกแข็งสามารถรักษาประสิทธิภาพและการรอดชีวิตได้ดี ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมุ่งพัฒนาวิธีการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs หลายชนิด ด้วยวิธีการทำแห้งเยือกแข็งและใช้สารป้องกันความเย็นชนิดต่าง ๆ และเก็บในภาวะที่เหมาะสม เนื่องจากภาวะการเก็บหลังการทำแห้งเยือกแข็งมีส่วนสำคัญในการรักษาความมีชีวิตและประสิทธิภาพของแบคทีเรีย เพราะมีรายงานของ Kurosawa และคณะ (1997) แบคทีเรียที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า -20 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารซัลไฟด์ของแบคทีเรียจะลดลง และ Gherna (1994) รายงานว่าแบคทีเรียที่ทำแห้งเยือกแข็งควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส และหลีกเลี่ยงที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บในภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดไพรีนและฟีแนนทรีนในระบบบำบัดดินจำลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA.
2. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท Mettler-Toledo, Switzerland.
3. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น Kokusan, Japan.
4. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany.
5. ตู้อบแห้ง (Oven) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand.
6. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ของบริษัท Memmert, Germany.
7. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO laminar flow รุ่น BVT-124 ของบริษัท International Scientific Supply, USA และรุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
8. เครื่องเขย่า (Gyrotory shaker) รุ่น G10 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.
9. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
10. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilization) รุ่น Modullyod-230 ของบริษัท Itochu, Japan.
11. ตู้แช่แข็งจุดเยือกต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -20 ^{0}ซ ของบริษัท Sanyo Electric, Japan.
12. ตู้แช่แข็งจุดเยือกต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -70 ^{0}ซ รุ่น ULT1786 ของบริษัท Forma Scientific, USA.
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.
14. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Bench-top centrifuge) รุ่น Pico บริษัท Kendro, Germany.
15. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งพื้น (Centrifuge) ของบริษัท Kubota, Japan.
16. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
17. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 20,100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France.
18. กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มล. ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.

19. ขวดฝาเกลียว (Vial) ขนาด 22 มล. (Screw cap with teflon finer) ของบริษัท Lab System, Thailand.
20. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
21. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
22. ชุดเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี (Gas Chromatography, GC)
    - เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น 6890N ของบริษัท Agilent Technologies, USA
    - คอลัมน์ (column) ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนนิลเมธิลไซโลเซน ความเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร
    - เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID)
    - เข็มฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) ขนาด 10 ไมโครลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. ฟีแนนทรีน (phenanthrene) ของบริษัท Sigma, USA.
2. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
3. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
4. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
5. แบคโตอะการ์ (Bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
6. สารปฏิชีวนะนิสเตติน (nystatin) ของบริษัท Bio Basic INC., Canada.
7. ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (CH_3SOCH_3) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
8. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
9. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
10. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany.
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany.
12. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท Merck, Germany.
13. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
14. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3.6H_2O$) ของบริษัท May & Baker, England.
15. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
16. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
17. เมธานอล (CH_3OH) ของบริษัท Merck, Germany.
18. นอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) ของบริษัท J.T. Baker, USA.
19. Triton X-100 ของบริษัท Sigma, USA.
20. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท Merck, Germany.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 กลุ่มแบคทีเรียและการเพาะเลี้ยง

กลุ่มแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ คือ กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ซึ่งแยกได้จากใบจามจุรี ประกอบด้วยกลุ่มแบคทีเรียอย่างน้อย 7 ชนิด โดยจัดอยู่ใน 4 สกุล ได้แก่ *Comamonas, Rugamonas, Flavimonas* และ *Pseudomonas* (จีรทีปฆ์ แสนรัก, 2547)

เลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว carbon free mineral medium (CFMM) (Komukai-Nakamura และคณะ, 1996) ที่เติมไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก. /มล. (ภาคผนวก ก) เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้จุลินทรีย์ บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-5 วัน

ในกรณีที่ต้องการเก็บเชื้อ เลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB เป็นเวลา 18 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นผสมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 0.5 มล.กับ 50% กลีเซอรอล 0.5 มล. และเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 หรือ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง

3.3.2 การทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 (ดัดแปลงจาก Gherna, 1994)

นำกลุ่มแบคทีเรียที่เลี้ยงตามข้อ 3.3.1 ปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อจำนวน 20 มล. 2 ครั้ง แขวนลอยเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM และเจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 ซึ่งจะมีกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ประมาณ 10^8 CFU/มล. นำกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ได้มาใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 13x100 มิลลิเมตร จำนวน 1 มล. ในกรณีที่ใช้สารป้องกันความเย็น ผสมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 0.5 มล. กับสารป้องกันความเย็น 0.5 มล. จากนั้นนำกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ไปทำแห้งเยือกแข็ง โดยนำไปทำให้แข็งที่ตู้แช่จุดเยือกต่ำที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำตัวอย่างที่แข็งใส่ในเครื่องทำแห้งเยือกแข็งเพื่อระเหิดเอาน้ำออกภายใต้อุณหภูมิ –45 องศาเซลเซียส ในสุญญากาศ ประเมินความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนและหาจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตหลังการทำแห้งเยือกแข็งตามวิธีในข้อ 3.3.4 และ 3.3.6 ตามลำดับ

3.3.3 ภาวะที่เหมาะสมของการทำแห้งเยือกแข็งและการเก็บรักษาหลังการทำแห้งเยือกแข็ง

3.3.3.1 สารป้องกันความเย็น

ทดสอบสารป้องกันความเย็น 3 ชนิดที่ความเข้มข้นสุดท้ายต่างๆ ได้แก่ 12% ซูโครส (Gherna, 1994) 10% นมปลอดมันเนย (skim milk) (Sembries และ คณะ, 1996) 5%

ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (Gherna, 1994) จากนั้นประเมินความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนและหาจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตหลังการทำแห้งเยือกแข็งตามวิธีในข้อ 3.3.4 และ 3.3.6

3.3.3.2 การเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 หลังการทำแห้งเยือกแข็งและการใช้ซิลิกาเจลเป็นสารดูดความชื้น

ทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้สารป้องกันความเย็นที่เหมาะสมตามข้อ 3.3.3.1 เก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 หลังการทำแห้งเยือกแข็งที่อุณหภูมิห้อง 4 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน ในกรณีที่ใช้ซิลิกาเจล ใช้ซิลิกาเจล 400 กรัม ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่ในถุงพลาสติกซิปล็อค นำหลอดที่มีกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง จำนวน 10 หลอด ใส่ถุงพลาสติกซิปล็อคที่มีซิลิกาเจลอยู่ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิข้างต้นเป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นประเมินความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนและหาจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตหลังการทำแห้งเยือกแข็งตามวิธีในข้อ 3.3.4 และ 3.3.6

3.3.3.3 ระยะเวลาการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 หลังการทำแห้งเยือกแข็ง

ทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้สารป้องกันความเย็นที่เหมาะสมตามข้อ 3.3.3.1 และเก็บรักษาตามอุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อ 3.3.3.2 เป็น 1 เดือน 3 เดือน และ 6 เดือน จากนั้นประเมินความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนและหาจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตหลังการทำแห้งเยือกแข็งตามวิธีในข้อ 3.3.4 และ 3.3.6

3.3.4 ความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง

ตรวจสอบการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้สารป้องกันความเย็นชนิดต่างๆ โดยละลายกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง ด้วย CFMM หลอดละ 1 มล. ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อจำนวน 1 มล. 2 ครั้ง ทำการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM 5 มล. ที่มีไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. ปลูกเชื้อจำนวน 10^6-10^7 CFU/มล. (โดยคำนวณจากจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตหลังการทำแห้งเยือกแข็ง) ในกลุ่มควบคุมใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสดและปลูกเชื้อในจำนวนที่เท่ากัน (กลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมสดเตรียมโดยเลี้ยงใน CFMM ที่เติมไพรีนและฟีแนนทรีน เป็นเวลา 3-5 วัน ตามวิธีในข้อที่ 3.3.1 และนำมาปั่นล้างเซลล์ด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์) แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุด

ชุดควบคุมที่ 1 ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM 5 มล. ที่เติมไพรีนและฟีแนนทรีนเท่านั้น เพื่อศึกษาการสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนทางกายภาพ

ชุดควบคุมที่ 2 ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM 5 มล. ที่เติมไพรีนและฟีแนนทรีนและกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด เพื่อศึกษาความสามารถในย่อยสลายของไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

ชุดควบคุมที่ 3 ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM 5 มล. ที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง เพื่อศึกษาผลของสารป้องกันความเย็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย

ชุดทดลอง ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM 5 มล. ที่เติมไพรีนและฟีแนนทรีนและกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้หรือไม่ใช้สารป้องกันความเย็นชนิดต่างๆ

บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบ/นาที ทำการทดลองสองซ้ำ เก็บตัวอย่างที่ 0 3 7 10 และ 14 วัน เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี viable plate count ตามวิธีในข้อ 3.3.6 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB สกัดไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM วิเคราะห์หาปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโต-กราฟี ตามวิธีในข้อ 3.3.7

3.3.5 ความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง

3.3.5.1 การเตรียมดิน

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณสวนมะม่วงจังหวัดนครปฐม โดยขุดลึกจากผิวดินประมาณ 10 ซม. แยกเศษใบไม้และหินออก คัดกรองดินด้วยเครื่องคัดกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.84 มิลลิเมตร ตรวจสอบการปนเปื้อน PAHs โดยสกัดตามวิธีของ Deangrueng (2005) โดยใช้ n-hexane และ Triton X-100 วิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ตามวิธีในข้อ 3.3.7 วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดิน โดยส่งตัวอย่างดินประมาณ 0.2 กิโลกรัม เพื่อวิเคราะห์ลักษณะเนื้อดิน ความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ (maximum water holding capacity) วัดค่าความเป็นกรดด่าง ที่ฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์ สารอินทรีย์คาร์บอน ไนโตรเจน โปแทสเซียม ฟอสเฟต และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ที่ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน จากนั้นเก็บตัวอย่างดินที่ผ่านการวิเคราะห์แล้วไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง และนำไปใช้โดยไม่ต้องผ่านการฆ่าเชื้อ

3.3.5.2 ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดิน

แขวนลอยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งในภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 3.3.3.2 และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน ใน CFMM จำนวน 1 มล. ปลูกเชื้อโดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^8 CFU/กรัม และไม่ผ่านการล้างเซลล์ลงในดินไม่ปลอดเชื้อ 2 กรัม ปรับความชื้นให้มีค่าเท่ากับ 70% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7 ด้วย 1 นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์ และผสมกับไพรีนหรือฟีแนนทรีนความเข้มข้นชนิดละ 0.05 มก./กรัม

แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุด ดังต่อไปนี้

ชุดควบคุมที่ 1 ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับมีไพรีนและฟีแนนทรีนเท่านั้น เป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาการสลายตัวของ PAHs เมื่อมีปัจจัยทางชีวภาพและกายภาพในดิน

ชุดควบคุมที่ 2 ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด

ชุดควบคุมที่ 3 ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง เพื่อศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในดิน

ชุดทดลองที่ 1 ดินไม่ปลอดเชื้อผสมไพรีนและฟีแนนทรีน และกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด

ชุดทดลองที่ 2 ดินไม่ปลอดเชื้อผสมไพรีนและฟีแนนทรีน และกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง

ทุกชุดการทดลองใช้จำนวนแบคทีเรียที่เท่ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 0 1 3 7 14 21 วัน นับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี viable plate count ตามวิธีในข้อ 3.3.6 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB วิเคราะห์หาปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนตามวิธีในข้อ 3.3.7

3.3.6 การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรีย

ตรวจหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธี viable plate count โดยแขวนลอยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งด้วย CFMM หลอดละ 1 มล. และไม่ผ่านการล้างเซลล์ เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ เกลี่ยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน (LB) นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

ในกรณีที่นับจำนวนแบคทีเรียจากดิน ให้เติม 0.85% โซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อจำนวน 18 มล. ลงในดิน ถือเป็นการเจือจาง 10 เท่า เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเจือจางต่อไปให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม และดำเนินการต่อไปตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

3.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีน

3.3.7.1 การสกัดไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM (ดัดแปลงจาก Deangrueng, 2005)

สกัดไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 5 มล. โดยใช้ n-hexane ปริมาตร 5 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำส่วนใสชั้นบนหรือชั้น n-hexane แบ่งใส่หลอดใหม่ เติม anhydrous Na_2SO_4 ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ข้ามคืนและทิ้งไว้ให้เย็น เพื่อกำจัดน้ำที่เหลือออกจากชั้น n-hexane แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ anhydrous Na_2SO_4 จากนั้นกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

3.3.7.2 การสกัดไพรีนและฟีแนนทรีนในดิน

สกัดไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลือในดิน 2 กรัม โดยใช้ n-hexane ปริมาตร 4 มล. และ 15% Triton X-100 ปริมาตร 1.5 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 2 นาที นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่เยือกแข็งนาน 24 ชั่วโมง เติม anhydrous Na_2SO_4 ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ข้ามคืนและทิ้งไว้ให้เย็น เพื่อกำจัดน้ำที่เหลือออกจากชั้น n-hexane แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ anhydrous Na_2SO_4 และกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Deangrueng, 2005)

3.3.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนโดยแก๊สโครมาโตกราฟี

วิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่สกัดโดยแก๊สโครโมโตกราฟี ด้วยชุดเครื่องแก๊ส-โครโมโตกราฟี รุ่น 6890N (บริษัท Agilent Technologies, USA) คอลัมน์ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนนิลเมธิลไซโลเซน ความเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร เครื่องตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID) โดยวิเคราะห์ภายใต้สภาวะดังนี้

อุณหภูมิเริ่มต้น 80 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิขั้นที่ 1	25 องศาเซลเซียส	จนอุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส คงไว้ 3 นาที
อุณหภูมิขั้นที่ 2	30 องศาเซลเซียส	จนอุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส คงไว้ 2 นาที
อุณหภูมิขั้นที่ 3	40 องศาเซลเซียส	จนอุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส คงไว้ 7 นาที

โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพาไหลด้วยอัตราเร็ว 1.7 มิลลิเมตรต่อนาที

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในแต่ละวัน โดยกำหนดให้ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนในวันที่ 0 เท่ากับ 100%

บทที่ 4

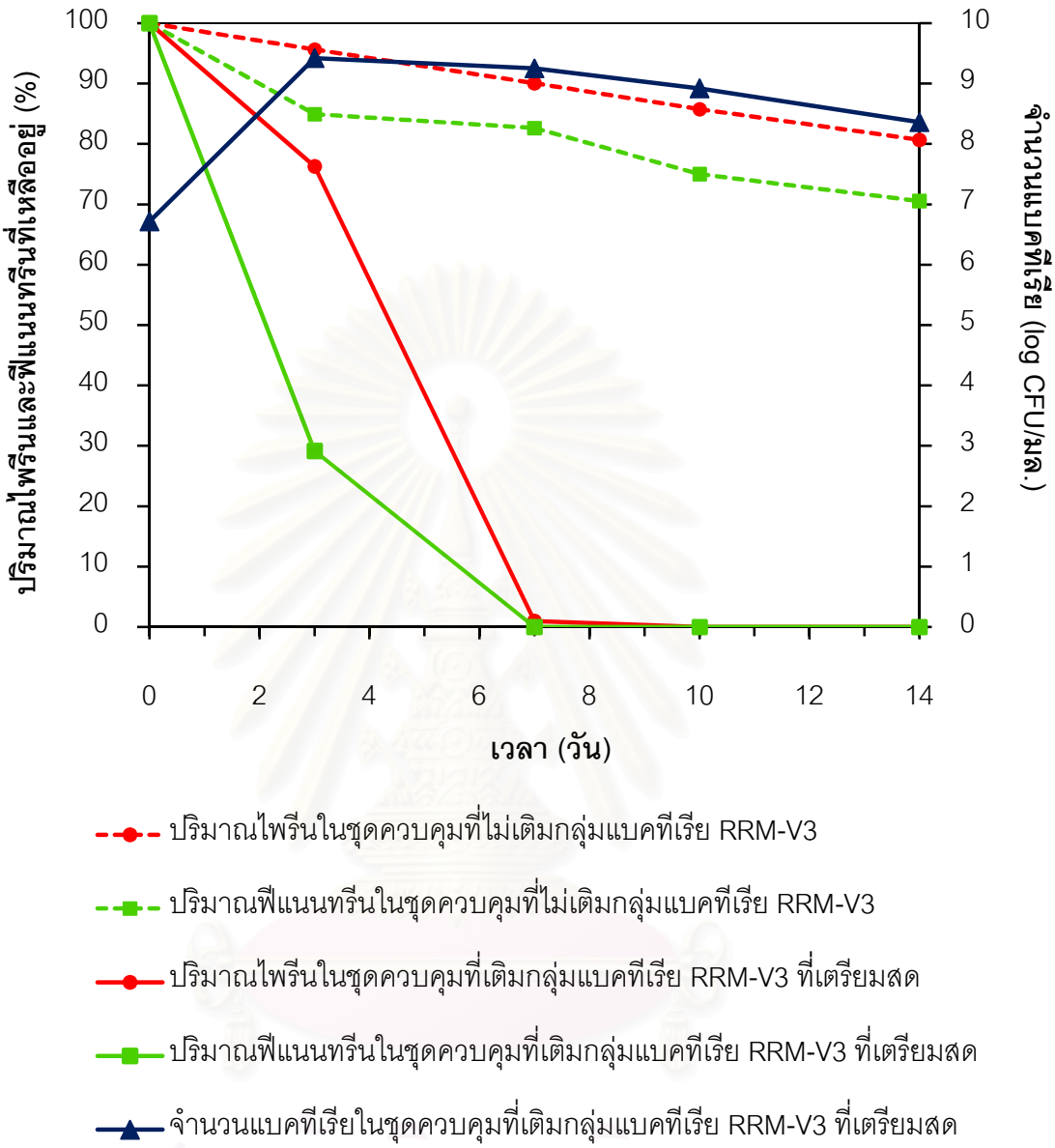
ผลการทดลอง

การบำบัดทางชีวภาพเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยในการย่อยสลายสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อม โดยวิธีการนี้เกิดจากจุลินทรีย์ใช้สาร PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ และมีรายงานจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสาร PAHs รวมทั้งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน (จีรทีปฆ์ แสนรัก, 2547) แต่เมื่อนำแบคทีเรียไปใช้ในดิน พบว่าการมีชีวิตอยู่รอดของแบคทีเรียต่ำและความสามารถไม่ดีเท่าห้องปฏิบัติการ จึงได้มีผู้ทดลองใช้วัสดุทางการเกษตรเป็นแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์โดยเกาะติดจุลินทรีย์กับวัสดุนั้น แต่วิธีการดังกล่าวต้องอาศัยการเตรียมแบคทีเรียที่เตรียมสด ซึ่งไม่สะดวกในการเพาะเชื้อหลายครั้ง และอาจก่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมดั้งเดิม วิธีหนึ่งที่น่าสนใจคือการทำแห้งเยือกแข็ง ซึ่งวิธีการนี้สามารถรักษาความมีชีวิตและคงสภาพดั้งเดิมจุลินทรีย์ได้ดี จึงเหมาะที่จะนำมาทดลองเพื่อหาวิธีการเก็บกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เหมาะสม

4.1 ทดสอบความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในการบำบัดไพรีนและฟีแนนทรีน

ผลการทดลองพบว่าในชุดควบคุมที่มีเฉพาะไพรีนและฟีแนนทรีนพบการสลายตัวตามธรรมชาติได้เล็กน้อย โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนเหลือ 80.72 และ 70.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.1) จากชุดที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสดเพื่อย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM พบว่าปริมาณฟีแนนทรีนลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยตรวจพบปริมาณฟีแนนทรีนเหลืออยู่เพียง 29.16% และลดลงจนไม่สามารถตรวจโดยได้โดยแก๊สโครมาโตกราฟีในวันที่ 7 ของการทดลอง ในขณะที่ไพรีนถูกย่อยสลายไม่มากในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยเหลือปริมาณ 76.30% แต่หลังจากนั้นไพรีนลดลงอย่างรวดเร็วจนวันที่ 7 ของการทดลองเหลืออยู่เพียง 0.97% และลดลงจนหมดในวันที่ 10 ของการทดลอง ในขณะที่จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดในวันเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 6.72 log CFU/มล. พบการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สูงสุดในวันที่ 3 ซึ่งมีจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เท่ากับ 9.42 log CFU/มล. จากนั้นจำนวนแบคทีเรียเริ่มลดลงจนสิ้นสุดการทดลองมีจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เท่ากับ 8.36 log CFU/มล. (รูปที่ 4.1)

จากผลการทดลองข้างต้น จึงสามารถยืนยันได้ว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้ และสามารถนำไปทำแห้งเยือกแข็งเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.1 การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM โดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสดเทียบกับไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

4.2 การทำแห้งเยือกแข็งของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

4.2.1 จำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตภายหลังการทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยไม่ใช้สารป้องกันความเย็น เตรียมโดยใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 1 มล. ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 10^8 CFU/มล. นำกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ได้มาใส่ในหลอดฝาเกลียว ในกรณีที่ใช้สารป้องกันความเย็น ผสมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 0.5 มล. กับสารป้องกันความเย็น 0.5 มล. จากนั้นนำกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ไปทำแห้งเยือกแข็ง ตามวิธีในข้อ 3.3.2 หลังการทำแห้งเยือกแข็ง ตรวจสอบการรอดชีวิตกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยวิธี viable plate count ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้สารป้องกันความเย็นชนิดต่างๆ

สารป้องกันความเย็น	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/มล.)	% log จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่รอดชีวิตเทียบกับ log จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้น
ก่อนทำแห้งเยือกแข็ง	$3.15x10^8$	100
12% ซูโครส	$2.88x10^8$	99.54
10% นมปลอดมันเนย	$2.21x10^8$	98.19
5% ไดเมธิลซัลฟอกไซด์	$2.50x10^3$	39.99
ไม่มีสารป้องกันความเย็น	$1.23x10^3$	36.36

จากการทดลองพบว่า กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็นมีการรอดชีวิตสูงสุดคือมีจำนวนกลุ่มแบคทีเรียทั้งหมด $2.88x10^8$ CFU/มล. โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของ log จำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตเทียบกับ log จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 99.54% เซลล์ (Morgan และคณะ, 2006) กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยไม่ใช้สารป้องกันความเย็นมีการรอดชีวิตต่ำสุด โดยมีจำนวนกลุ่มแบคทีเรียทั้งหมด $1.23x10^3$ CFU/มล. โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของ log จำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตเทียบกับ log จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้น เท่ากับ 36.36% (ตารางที่4.1)

4.2.2 การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 หลังการทำเยือกแข็งในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน

การทดลองนี้ทำขึ้นเพื่อทดสอบกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถเจริญได้โดยใช้สารป้องกันความเย็นในการเจริญ ทำโดยปลูกเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งความเข้มข้น 10^6- 10^7 CFU/มล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM 5 มล. ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบ/นาที นำมานับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ทุก 0 3 7 10 และ 14 วัน

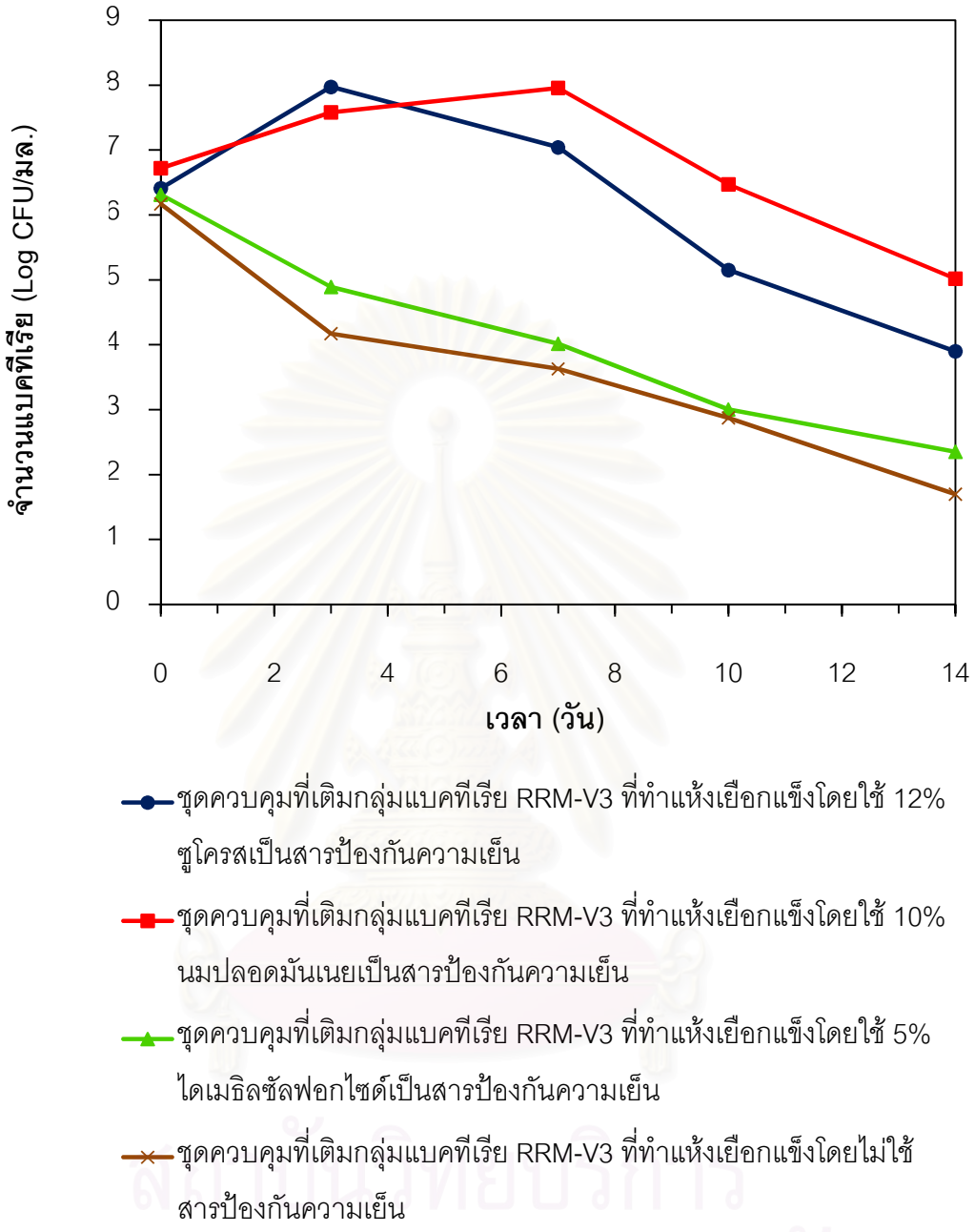
การเจริญในชุดการควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น พบการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ใน 3 วันแรกของการทดลอง โดยจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก 6.41 เป็น 7.97 log CFU/มล. จากนั้นจำนวนแบคทีเรียเริ่มลดลงจนสิ้นการทดลองในวันที่ 14 เหลือจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 3.90 log CFU/มล. (รูปที่ 4.2)

ในชุดการควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 10% นมปลอดมันเนยเป็นสารป้องกันความเย็นพบการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ใน 7 วันแรกของการทดลอง โดยจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 6.72 เป็น 7.96 log CFU/มล. หลังจากนั้นค่อยๆ ลดลงจนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 14 พบจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 5.01 log CFU/มล. (รูปที่ 4.2)

ชุดการควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 5% ไดเมธิซัล-ฟอกไซด์ พบการลดลงของจำนวนแบคทีเรียจาก 6.31 log CFU/มล. เป็น 2.35 ในวันที่ 14 ของการทดลอง (รูปที่ 4.2)

ชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยไม่ใช้สารป้องกันความเย็น พบการลดลงของจำนวนแบคทีเรียจาก 6.17 เป็น 1.70 log CFU/มล. ในวันที่ 14 ของการทดลอง เช่นเดียวกับในชุดการทดลองที่ใช้ 5% ไดเมธิลซัลฟอกไซด์เป็นสารป้องกันความเย็น (รูปที่ 4.2)

จากข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารป้องกันความเย็นมีผลต่อการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยแบคทีเรียสามารถใช้ซูโครสและนมปลอดมันเนยเป็นแหล่งคาร์บอนอีกแหล่งในการเจริญได้



รูปที่ 4.2 การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยไม่มีแหล่งคาร์บอน

4.3 การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง

หลังจากการทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้สารป้องกันความเย็นต่างๆ ทดสอบความสามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน แบ่งเป็น 6 ชุดการทดลองดังนี้

ชุดควบคุมที่ 1 มีไพรีนและฟีแนนทรีนเท่านั้น เพื่อศึกษาการสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนโดยธรรมชาติ

ชุดควบคุมที่ 2 มีไพรีนและฟีแนนทรีนและกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด เพื่อศึกษาความสามารถในย่อยสลายของไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

ชุดทดลองที่ 1 มีไพรีนและฟีแนนทรีนและกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้สารป้องกันความเย็น 12% ซูโครส

ชุดทดลองที่ 2 มีไพรีนและฟีแนนทรีนและกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้สารป้องกันความเย็น 10% นมปลอดมันเนย

ชุดทดลองที่ 3 มีไพรีนและฟีแนนทรีนและกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้สารป้องกันความเย็น 5% ไดเมธิลซัลฟอกไซด์

ชุดทดลองที่ 4 มีไพรีนและฟีแนนทรีนและกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยไม่ใช้สารป้องกันความเย็น

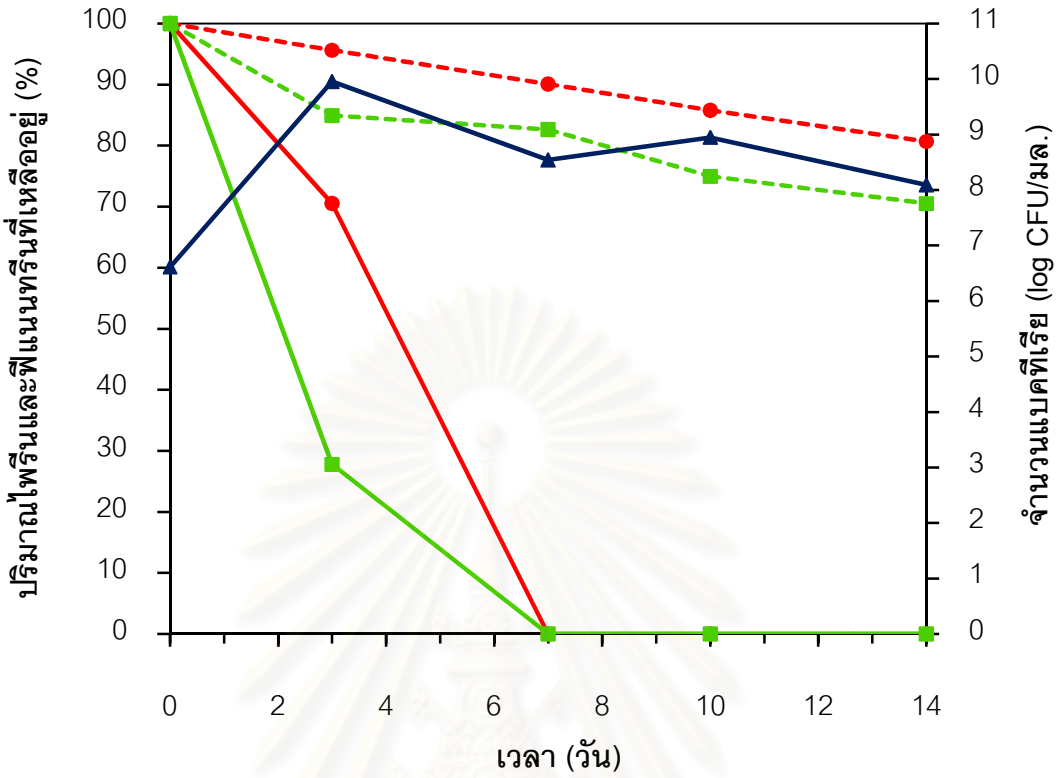
เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งในแต่ละชุดการทดลองให้ได้จำนวนแบคทีเรีย RRM-V3 เริ่มต้นประมาณ $10^6 - 10^7$ CFU/มล. โดยคำนวณจากตารางที่ 4.1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างทุก 0 3 7 10 และ 14 วัน

ผลการทดลองในชุดควบคุมที่ 1 และ 2 ให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 4.1 ส่วนในชุดการทดลองที่ใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น ถูกย่อยสลายได้โดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง โดยที่ปริมาณฟีแนนทรีนถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วในวันที่ 3 ของการทดลองเหลือ 27.82% และลดลงจนหมดในวันที่ 7 ของการทดลอง ไพรีนถูกย่อยสลายเพียงเล็กน้อยในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยมีปริมาณเหลือ 70.53% และลดลงจนหมดในวันที่ 7 ของการทดลอง จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดในวันเริ่มต้นของชุดการทดลองที่ใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็นมีค่าเท่ากับ 6.61 log CFU/มล. พบการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สูงสุดในวันที่ 3 ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 9.95 log CFU/มล. จากนั้นจำนวนแบคทีเรียเริ่มลดลงจนสิ้นสุดการทดลองมีจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เท่ากับ 8.09 log CFU/มล. (รูปที่ 4.3 ก)

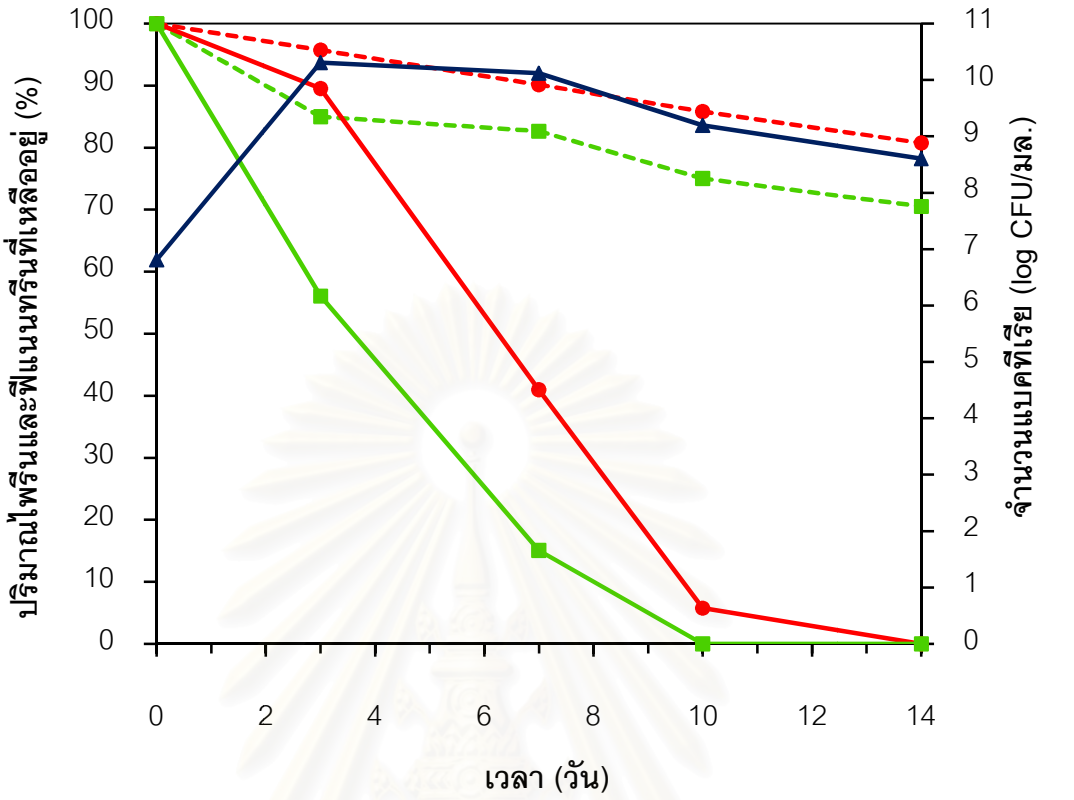
เมื่อใช้ 10% นมปลอดมันเนยเป็นสารป้องกันความเย็น พบปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนลดลงในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยตรวจพบปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนเหลืออยู่ 89.51 และ 56.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในวันที่ 7 ของการทดลองปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนเหลือ 40.97 และ 15.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ วันที่ 10 ของการทดลอง ฟีแนนทรีนถูกย่อยสลายจนหมด ส่วนไพรีนยังคงเหลืออยู่เล็กน้อยเพียง 5.81% และลดลงจนหมดในวันที่ 14 ของการทดลอง จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดของการทดลองที่ใช้ 10% นมปลอดมันเนยเป็นสารป้องกันความเย็นในวันเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 6.81 log CFU/มล. พบการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สูงสุดในวันที่ 3 ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 10.30 log CFU/มล. จากนั้นจำนวนแบคทีเรียเริ่มลดลงจนสิ้นสุดการทดลองมีจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เท่ากับ 8.60 log CFU/มล. (รูปที่ 4.3 ข)

ในชุดการทดลองที่ใช้ 5% ไดเมธิลซัลฟอกไซด์เป็นสารป้องกันความเย็น ไพรีนและฟีแนนทรีนถูกย่อยสลายได้โดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งเพียงเล็กน้อย ในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยมีปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนเหลืออยู่ 98.17 และ 78.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นสารทั้งสองชนิดค่อยๆลดลง จนสารไพรีนและฟีแนนทรีนถูกย่อยสลายจนไม่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 14 ของการทดลอง จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดในวันเริ่มต้นของชุดการทดลองที่ใช้ 5% ไดเมธิลซัลฟอกไซด์เป็นสารป้องกันความเย็นมีค่าเท่ากับ 6.46 log CFU/มล. พบการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สูงสุดในวันที่ 7 ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 9.31 log CFU/มล. จากนั้นจำนวนแบคทีเรียเริ่มลดลงจนสิ้นสุดการทดลองมีจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เท่ากับ 8.44 log CFU/มล. (รูปที่ 4.3 ค)

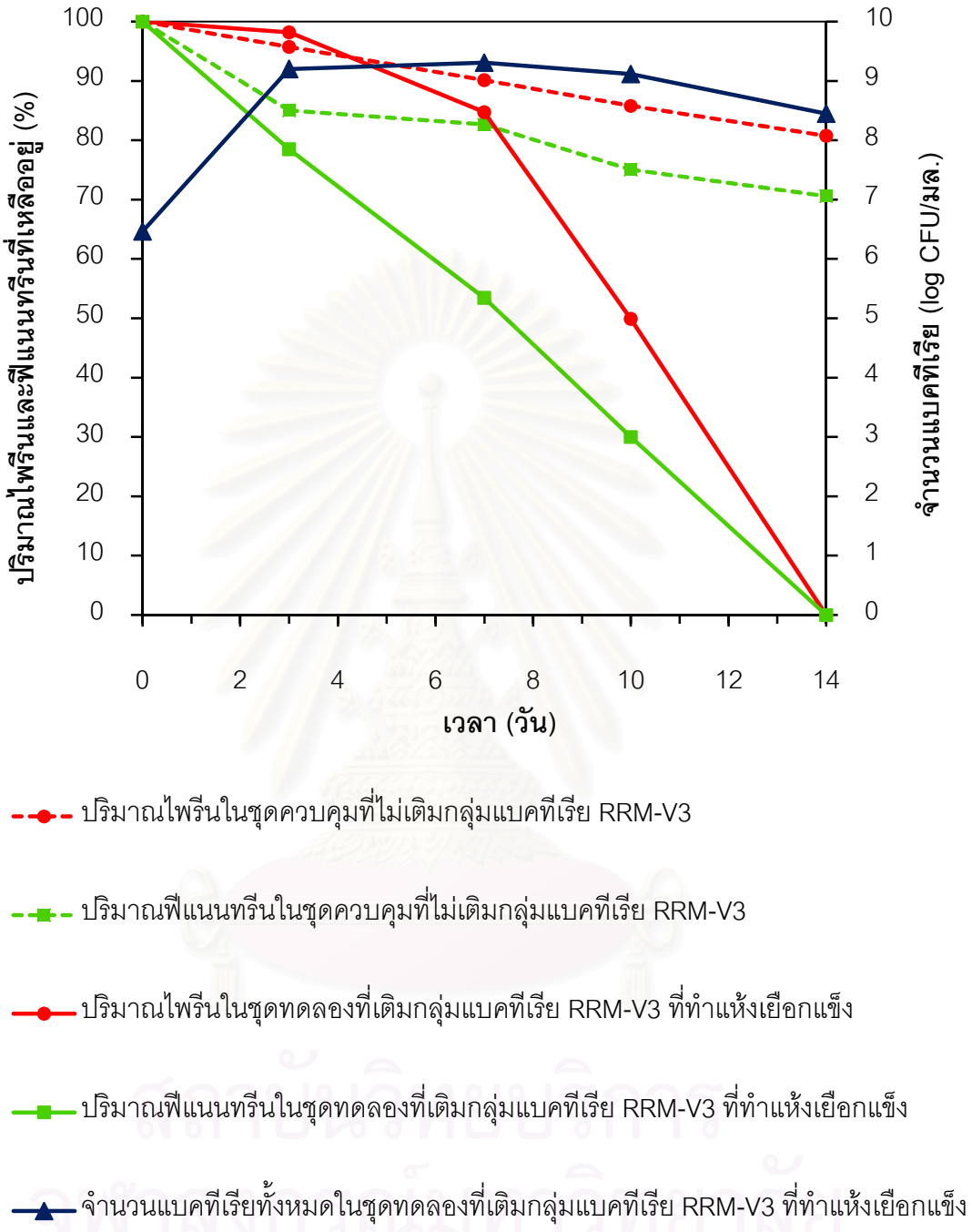
ชุดการทดลองที่ไม่ใช้เป็นสารป้องกันความเย็น พบแนวโน้มการทดลองของไพรีนและฟีแนนทรีนเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ใช้ 5% ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ กล่าวคือเกิดการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนเล็กน้อยในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยตรวจพบปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนเหลืออยู่ 82.87 และ 74.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นสารทั้งสองชนิดค่อยๆ ลดลง จนสารทั้งสองชนิดถูกย่อยสลายจนหมดในวันที่ 14 ของการทดลอง จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดของการทดลองที่ไม่ใช้เป็นสารป้องกันความเย็นในวันเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 6.51 log CFU/มล. พบการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สูงสุดในวันที่ 3 ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 9.37 log CFU/มล. จากนั้นจำนวนแบคทีเรียเริ่มลดลงจนสิ้นสุดการทดลองมีจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เท่ากับ 8.49 log CFU/มล. (รูปที่ 4.3 ง)



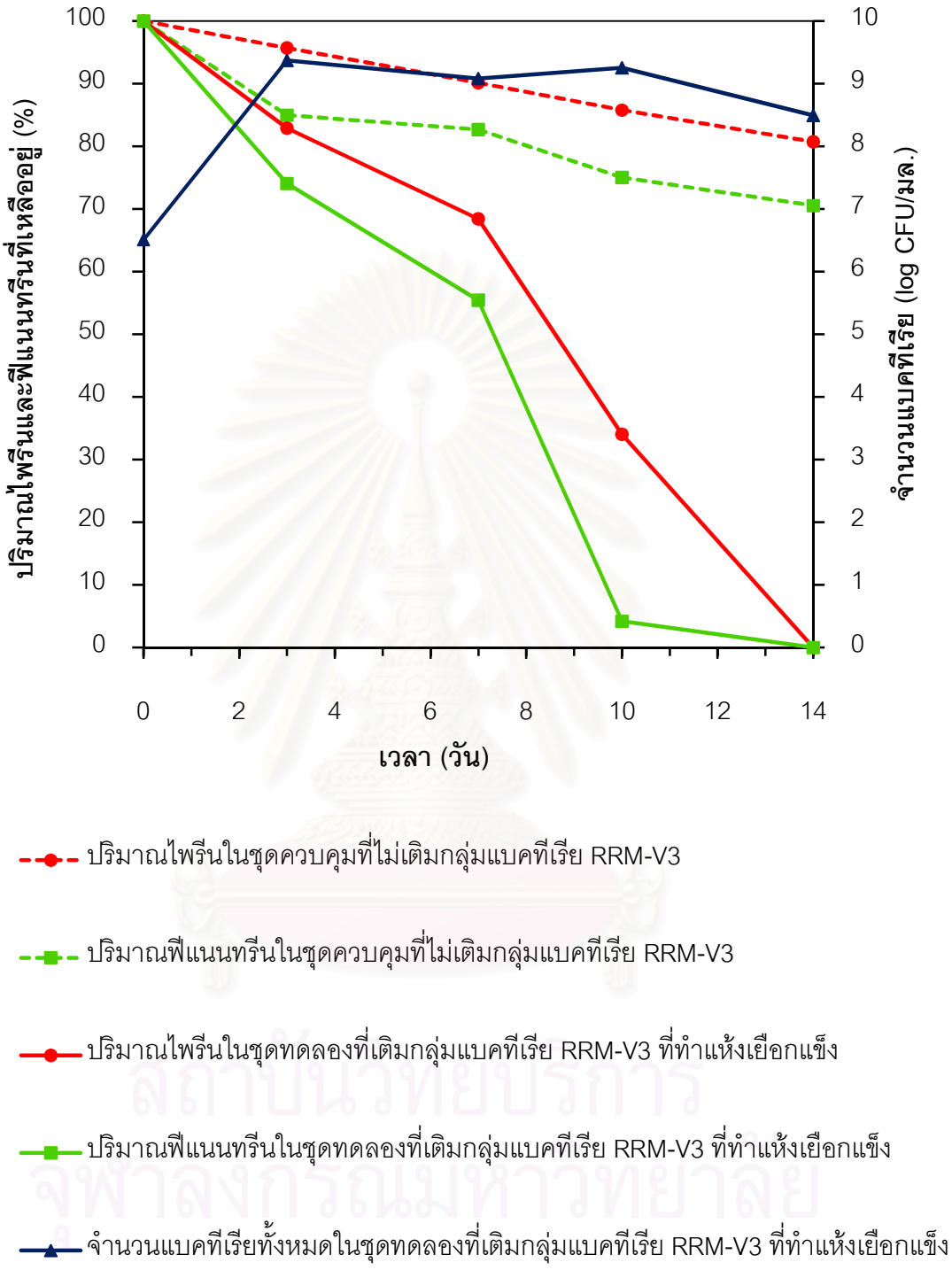
รูปที่ 4.3 ก ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น



รูปที่ 4.3 ข ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 10% นมปลอดมันเนยเป็นสารป้องกันความเย็น



รูปที่ 4.3 ค ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 5% ไดเมธิลซัลฟอกไซด์เป็นสารป้องกันความเย็น

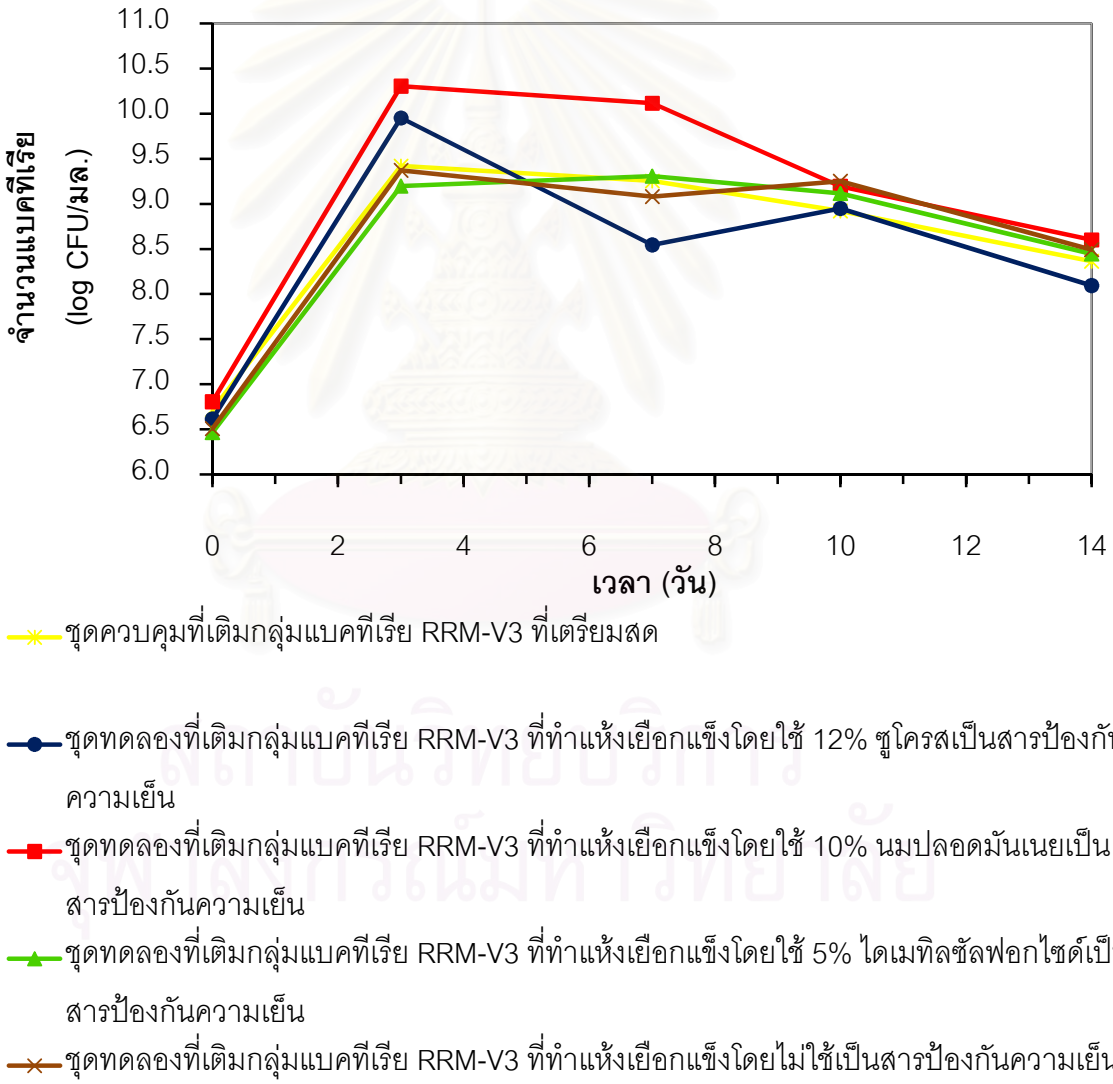


รูปที่ 4.3 ง ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยไม่ใช้สารป้องกันความเย็น

4.4 เปรียบเทียบผลการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง

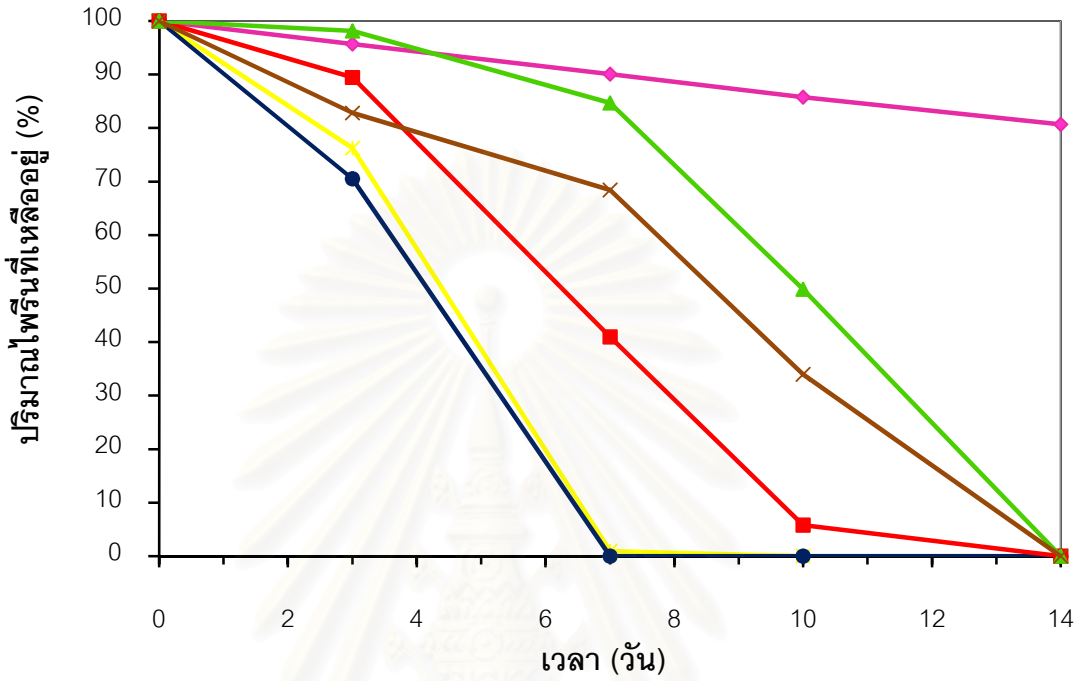
จากรูปที่ 4.4-4.6 จะเห็นได้ว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งซึ่งใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น สามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้สูงที่สุดในระยะเวลาสั้นที่สุด นอกจากนี้จำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตยังสูงที่สุดอีกด้วย ดังนั้นจึงเลือกใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันกันความเย็นในการทดลองต่อไป

4.4.1 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง



รูปที่ 4.4 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมโดยวิธีต่างๆ

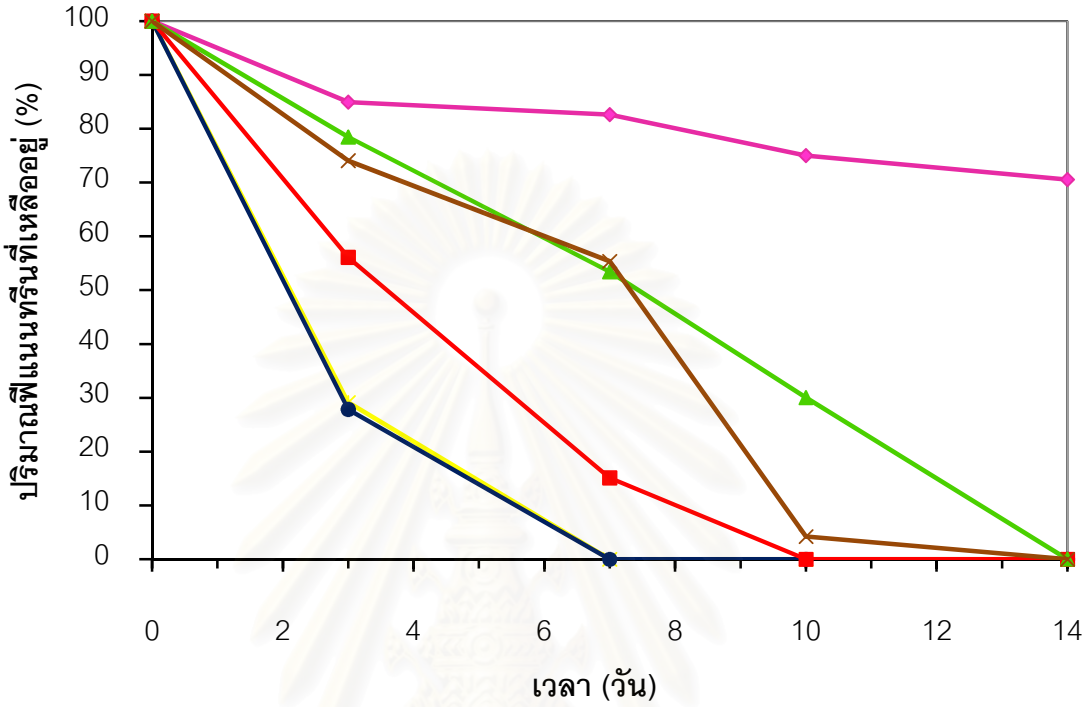
4.4.2 เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง



- ชุดควบคุมที่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3
- ชุดควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด
- ชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น
- ชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 10% นมปลอดมันเนยเป็นสารป้องกันความเย็น
- ชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 5% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์เป็นสารป้องกันความเย็น
- ชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยไม่ใช้เป็นสารป้องกันความเย็น

รูปที่ 4.5 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมโดยวิธีต่างๆ

4.4.3 เปรียบเทียบปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง



ชุดควบคุมที่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

ชุดควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด

ชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น

ชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 10% นมปลอดมันเนยเป็นสารป้องกันความเย็น

ชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 5% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์เป็นสารป้องกันความเย็น

ชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยไม่ใช้เป็นสารป้องกันความเย็น

รูปที่ 4.6 ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมโดยวิธีต่างๆ

4.5 ภาวะที่เหมาะสมของการทำแห้งเยือกแข็งและการเก็บรักษาหลังการทำแห้งเยือกแข็ง

4.5.1 อุณหภูมิการเก็บรักษาและผลของสารดูดความชื้น

ทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตามวิธีที่ระบุในข้อ 4.2 โดยใช้ 12% ซูโครส เป็นสารป้องกันความเย็น แปรผันอุณหภูมิการเก็บรักษาและการใช้สารดูดความชื้น ดังต่อไปนี้

ภาวะที่ 1 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยไม่มีสารดูดความชื้น (ซิลิกาเจล)

ภาวะที่ 2 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีสารดูดความชื้น (ซิลิกาเจล)

ภาวะที่ 3 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสโดยไม่มีสารดูดความชื้น (ซิลิกาเจล)

ภาวะที่ 4 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยมีสารดูดความชื้น (ซิลิกาเจล)

ภาวะที่ 5 เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (29 องศาเซลเซียส) โดยไม่มีสารดูดความชื้น (ซิลิกาเจล)

ภาวะที่ 6 เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (29 องศาเซลเซียส) โดยมีสารดูดความชื้น (ซิลิกาเจล)

เมื่อครบเวลาการเก็บรักษา 1 เดือน ตรวจสอบการรอดชีวิตโดยวิธี viable plate count และความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน ตามวิธีในข้อ 3.3.6 และ 3.3.7 ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่า การรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บรักษาในภาวะ -20 องศาเซลเซียส ไม่มีซิลิกาเจล เป็นเวลา 1 เดือน ให้การรอดชีวิตสูงที่สุด คือมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเหลือ 2.41×10^{8} CFU/มล. คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ log การรอดชีวิตเทียบกับ log จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 98.63% ส่วนภาวะที่ให้ผลการรอดชีวิตต่ำสุด คือ 4 องศาเซลเซียส มีซิลิกาเจล เป็นเวลา 1 เดือน โดยมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 1.24×10^{8} CFU/มล. และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ log การรอดชีวิตเทียบกับ log จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้น 94.29% (ตารางที่ 4.2)

สำหรับภาวะที่ 5 และ 6 ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (29 องศาเซลเซียส) เมื่อผ่านไป 1 เดือน ไม่พบการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง แสดงให้เห็นว่าภาวะนี้น่าจะไม่เหมาะในการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง

ตารางที่ 4.2 การรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้สารป้องกันความเย็น 12% ซูโครส และเก็บไว้ในภาวะต่างๆ เป็นเวลา 1 เดือน

ภาวะที่ทดสอบ	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/มล.)	% log จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่รอดชีวิตเทียบกับ log จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้น
กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ก่อนทำแห้งเยือกแข็ง	$3.15x10^{8}$	100
กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครส เป็นสารป้องกันความเย็น เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ไม่ใช้ซิลิกา	$1.24x10^{8}$	95.23
กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครส เป็นสารป้องกันความเย็น เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้ซิลิกา	$1.03x10^{8}$	94.29
กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครส เป็นสารป้องกันความเย็น เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ไม่ใช้ซิลิกา	$2.41x10^{8}$	98.63
กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครส เป็นสารป้องกันความเย็น เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ใช้ซิลิกา	$2.40x10^{8}$	98.61
กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครส เป็นสารป้องกันความเย็น เก็บที่อุณหภูมิห้อง (29 องศาเซลเซียส) ไม่ใช้ซิลิกา	0	0
กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครส เป็นสารป้องกันความเย็น เก็บที่อุณหภูมิห้อง (29 องศาเซลเซียส) ใช้ซิลิกา	0	0

4.5.2 การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บในภาวะต่าง ๆ

การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 ชุด

ชุดควบคุมที่ 1 มีไพรีนและฟีแนนทรีนเท่านั้น เพื่อศึกษาการสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนโดยธรรมชาติ

ชุดควบคุมที่ 2 มีไพรีนและฟีแนนทรีนและกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด เพื่อศึกษาความสามารถในย่อยสลายของไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

ชุดทดลองที่ 1 กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้สารป้องกันความเย็น 12% ซูโครส และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่ใช้ซิลิกา เป็นเวลา 1 เดือน

ชุดทดลองที่ 2 กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้สารป้องกันความเย็น 12% ซูโครส และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ซิลิกา เป็นเวลา 1 เดือน

ชุดทดลองที่ 3 กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้สารป้องกันความเย็น 12% ซูโครส และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไม่ใช้ซิลิกา เป็นเวลา 1 เดือน

ชุดทดลองที่ 4 กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้สารป้องกันความเย็น 12% ซูโครส และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ใช้ซิลิกา เป็นเวลา 1 เดือน

ปลูกเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งในแต่ละชุดการทดลองให้ได้แบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 10^6-10^7 CFU/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างวันที่ 0 3 7 10 และ 14 วัน เพื่อตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ตามวิธีในข้อ 3.3.6 และ 3.3.7 ตามลำดับ

ชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่ใช้ซิลิกา พบการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน โดยพบปริมาณฟีแนนทรีนลดลงค่อนข้างรวดเร็วในวันที่ 3 ของการทดลองโดยตรวจพบปริมาณฟีแนนทรีนเหลืออยู่ 49.42% และลดลงจนไม่สามารถตรวจพบในวันที่ 7 ของการทดลอง ส่วนไพรีนถูกย่อยสลายเพียงเล็กน้อยในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยมีปริมาณเหลือ 92.01% หลังจากนั้นไพรีนลดลงอย่างรวดเร็วจนวันที่ 7 ของการทดลองเหลืออยู่เพียง 13.57% และลดลงจนไม่สามารถตรวจพบในวันที่ 10 ของการทดลองจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดในวันเริ่มต้นของชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่ใช้ซิลิกา มีค่าเท่ากับ 7.08 log CFU/มล. และพบการเจริญสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยพบจำนวนกลุ่ม

แบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดเท่ากับ 9.81 log CFU/มล. จากนั้นแนวโน้มค่อยๆลดลง จนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 14 โดยมีจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดเท่ากับ 8.53 log CFU/มล. (รูปที่ 4.7 ก)

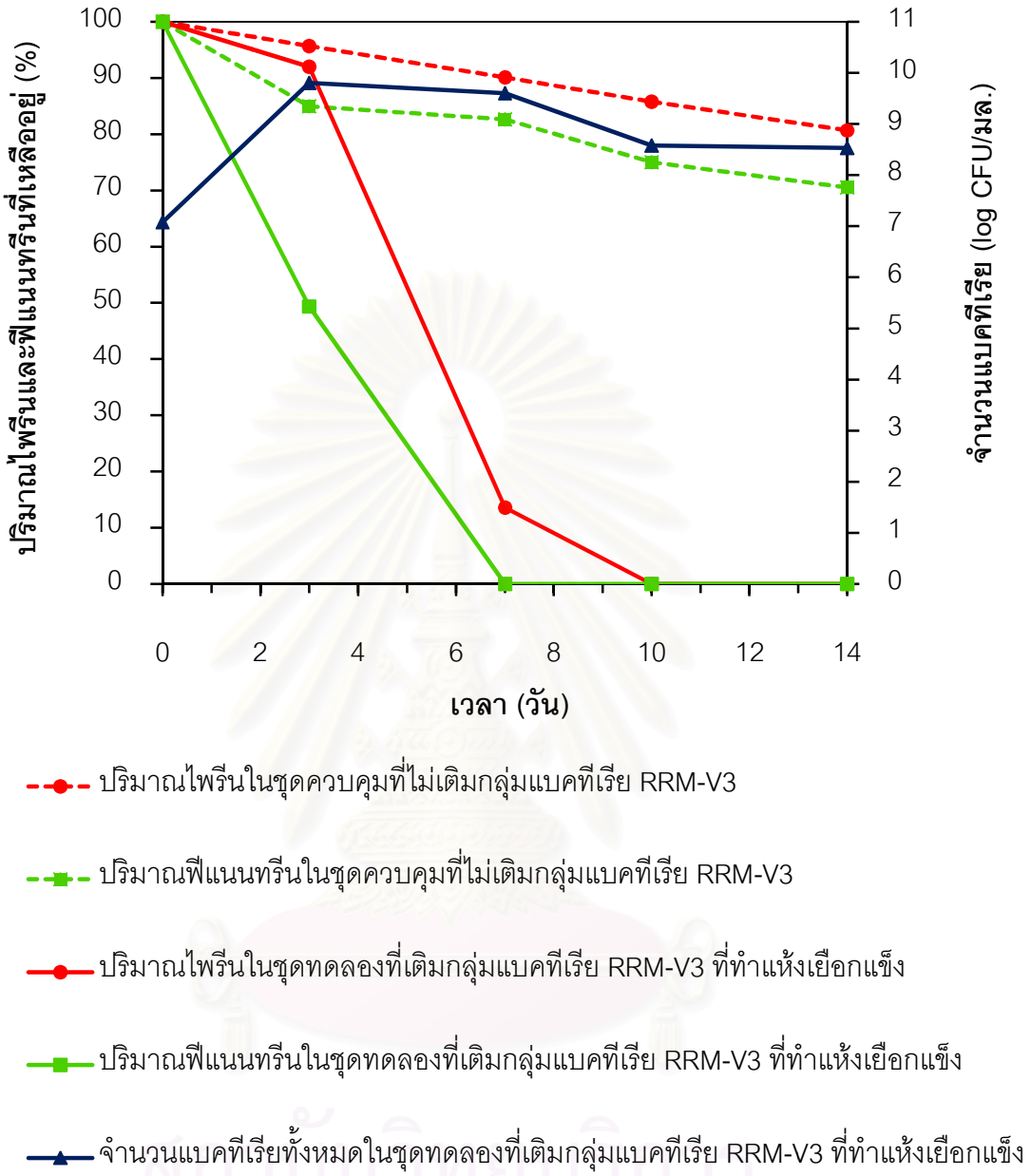
ผลการทดลองในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ซิลิกา พบแนวโน้มการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนเช่นเดียวกับ ชุดการทดลองที่ 1 กล่าวคือ พบปริมาณฟีแนนทรีนลดลงค่อนข้างรวดเร็วในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยมีปริมาณ 51.75% และถูกย่อยสลายจนหมดและไม่สามารถตรวจพบในวันที่ 7 ของการทดลอง ในขณะที่ไพรีนถูกย่อยสลายเพียงเล็กน้อยในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยเหลือปริมาณ 91.26% หลังจากนั้นถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วจนวันที่ 7 ของการทดลองพบปริมาณเหลืออยู่เพียง 13.61% และลดลงจนหมดในวันที่ 10 ของการทดลอง จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ซิลิกาในวันเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 7.13 log CFU/มล. จากนั้นพบการเจริญสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยพบจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดเท่ากับ 9.26 log CFU/มล. และมีแนวโน้มค่อยๆ ลดลง จนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 14 โดยมีจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดเท่ากับ 8.38 log CFU/มล. (รูปที่ 4.7 ข)

จากผลการทดลองพบว่าในชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไม่ใช้ซิลิกา ไพรีนและฟีแนนทรีนถูกย่อยสลายได้ โดยพบปริมาณฟีแนนทรีนลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยมีปริมาณเหลืออยู่ 30.59% และลดลงจนไม่สามารถตรวจพบในวันที่ 7 ของการทดลอง ส่วนไพรีนถูกย่อยสลายเพียงเล็กน้อยในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยมีปริมาณ 85.10% หลังจากนั้นพบการย่อยสลายอย่างรวดเร็วจนไม่สามารถตรวจพบในวันที่ 7 ของการทดลอง จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดในวันเริ่มต้นของชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไม่ใช้ซิลิกา มีค่าเท่ากับ 7.35 log CFU/มล. และพบการเจริญสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยพบจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมด เท่ากับ 9.98 log CFU/มล. จากนั้นจำนวนแบคทีเรียเริ่มลดลงจนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 14 มีจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดเท่ากับ 8.13 log CFU/มล. (รูปที่ 4.7 ค)

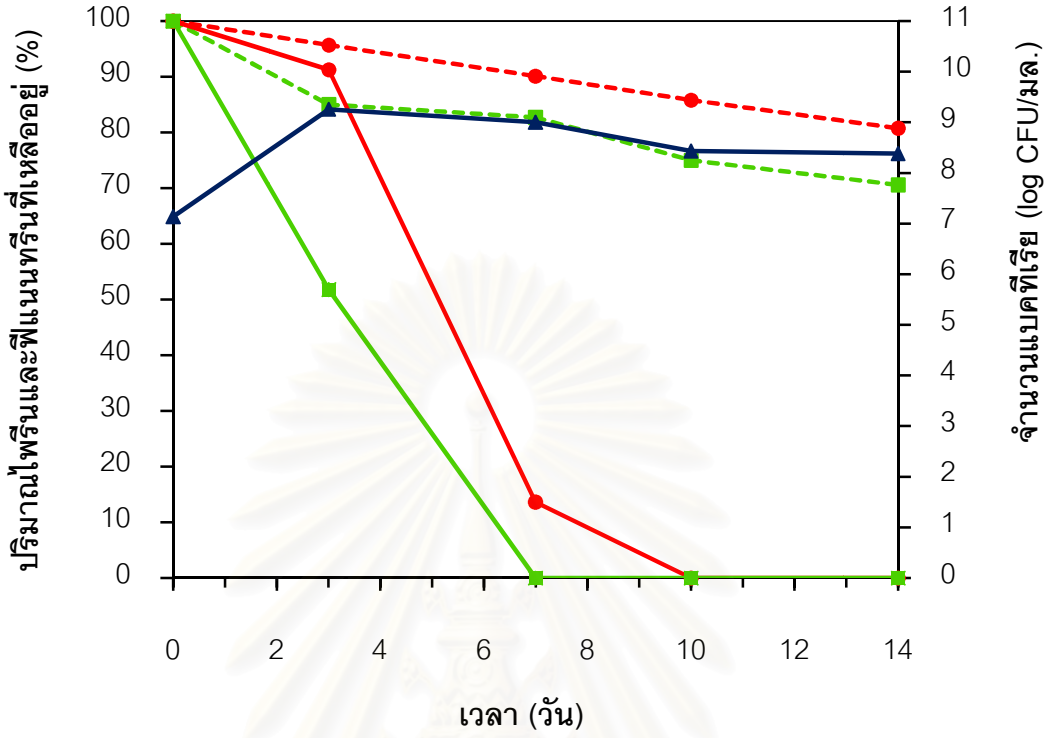
ในชุดการทดลองที่ 4 ซึ่งใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ใช้ซิลิกา พบว่าการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนมีแนวโน้มเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 3 โดยพบการย่อยสลายฟีแนนทรีนอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยมีปริมาณเหลืออยู่เพียง 25.08% และลดลงจนไม่สามารถตรวจพบในวันที่ 7 ของการ

ทดลอง ในขณะที่ไพรีนถูกย่อยสลายเพียงเล็กน้อยในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยเหลือปริมาณ 77.13% แต่หลังจากนั้นไพรีนลดลงอย่างรวดเร็วจนเกือบหมดในวันที่ 7 ของการทดลองโดยเหลืออยู่เพียง 0.40% และย่อยสลายไพรีนจนหมดในวันที่ 10 ของการทดลอง จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ใช้ซิลิกาของวันเริ่มต้น มีค่าเท่ากับ 7.00 log CFU/มล. จากนั้นพบการเจริญสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยพบจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดเท่ากับ 10.15 log CFU/มล. และจำนวนแบคทีเรียเริ่มจนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 14 พบจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดเท่ากับ 8.33 log CFU/มล.(รูปที่ 4.7 ง)

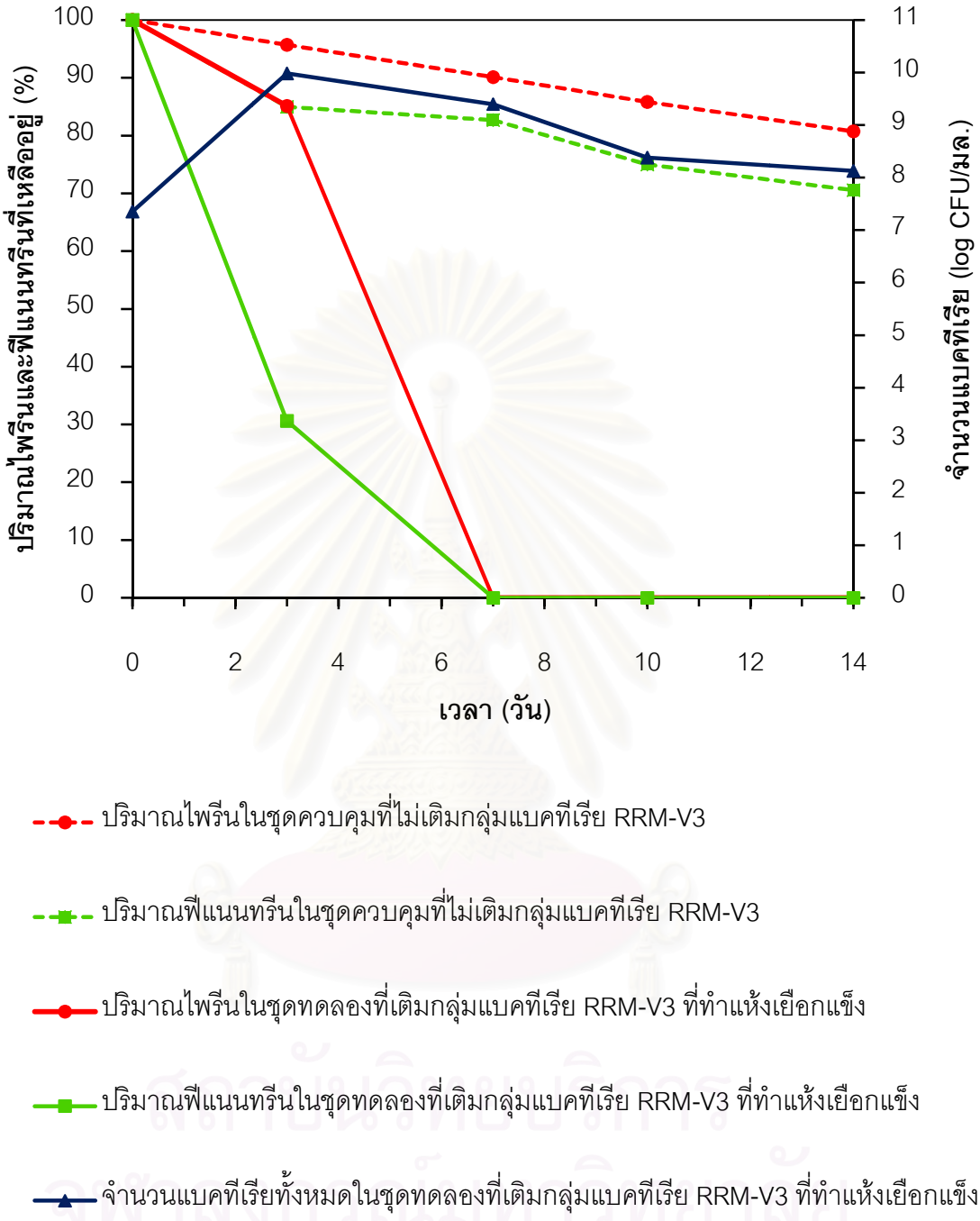
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



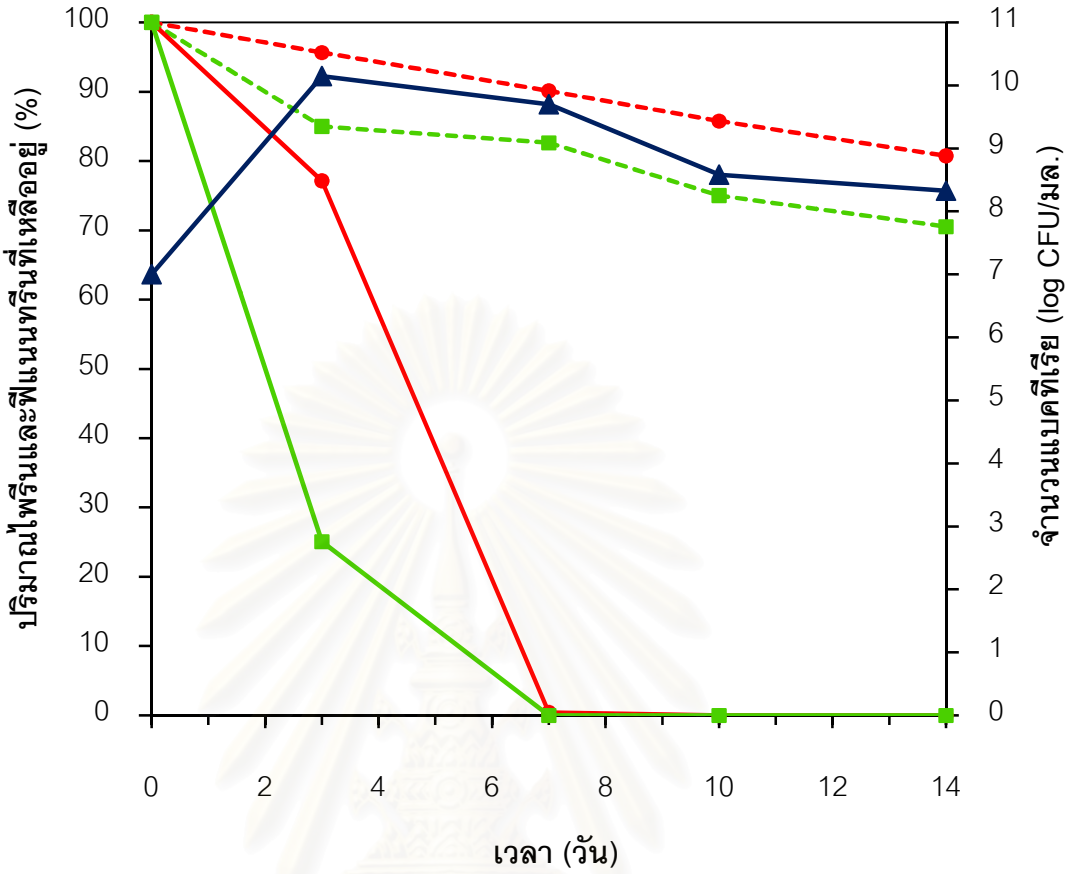
รูปที่ 4.7 ก ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยไม่ใช้ซิลิกาเจลเป็นเวลา 1 เดือน



รูปที่ 4.7 ข ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเวลา 1 เดือน



รูปที่ 4.7 ค ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส โดยไม่ใช้ซิลิกาเจลเป็นเวลา 1 เดือน

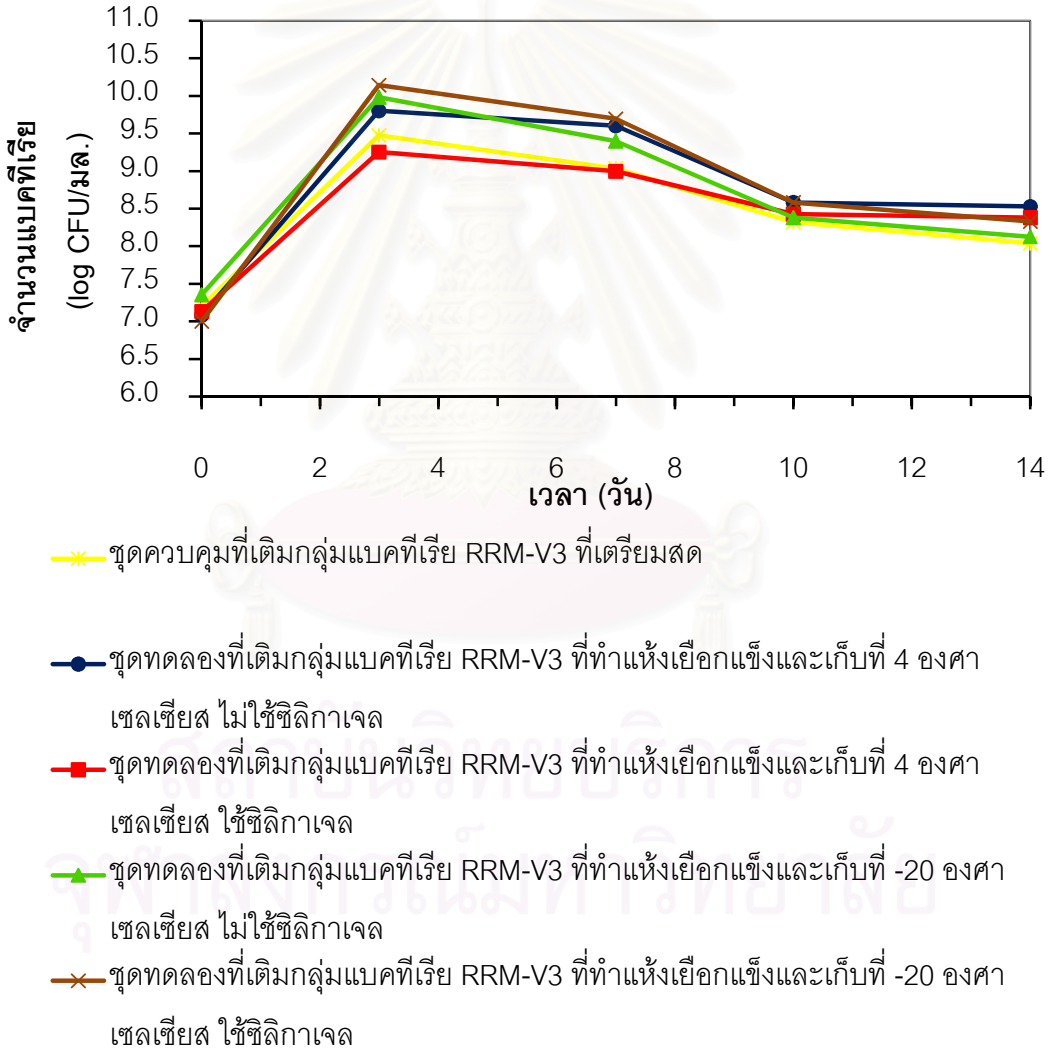


รูปที่ 4.7 ง ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเวลา 1 เดือน

4.6 เปรียบเทียบผลการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บในภาวะต่างๆ

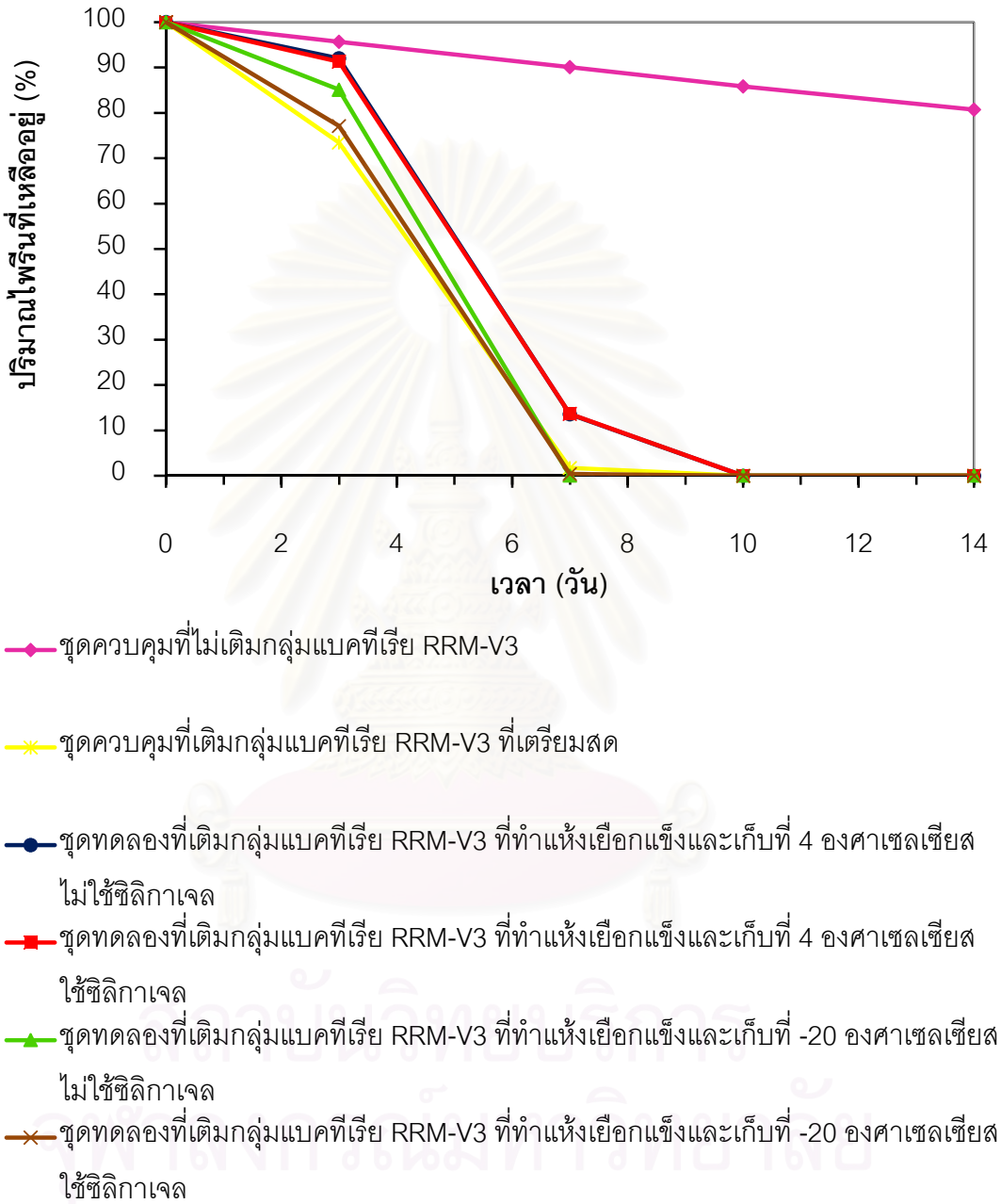
จากข้างต้น แสดงว่าอุณหภูมิน่าจะมีผลต่อการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เพราะให้ผลการรอดชีวิตและการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนที่แตกต่างกัน ส่วนการมีหรือไม่มีซิลิกาเจลนั้นไม่มีผลใดๆ ต่อการรอดชีวิตและการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาคือ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและไม่มีซิลิกาเจล

4.6.1 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บในภาวะต่างๆ



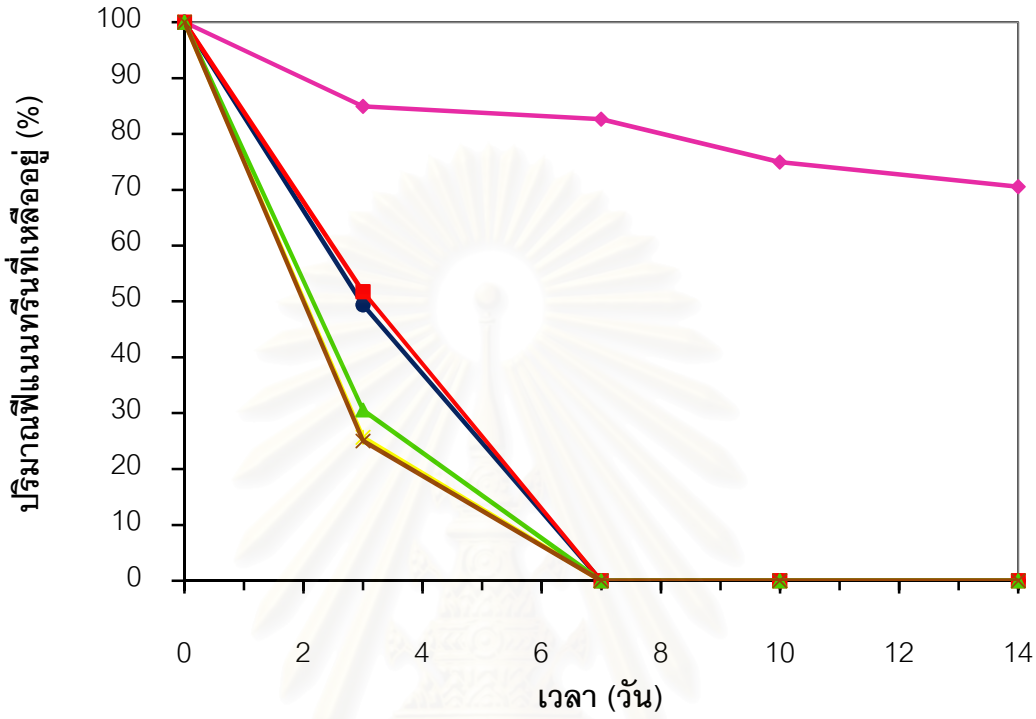
รูปที่ 4.8 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บในภาวะต่างๆ

4.6.2 เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บในภาวะต่างๆ



รูปที่ 4.9 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บในภาวะต่างๆ

4.6.3 เปรียบเทียบปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บในภาวะต่างๆ



ชุดควบคุมที่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

ชุดควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด

ชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ไม่ใช้ซิลิกาเจล

ชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้ซิลิกาเจล

ชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ไม่ใช้ซิลิกาเจล

ชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ใช้ซิลิกาเจล

รูปที่ 4.10 ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บในภาวะต่างๆ

4.7 ระยะเวลาการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งในภาวะที่เหมาะสม

เก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครส ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 และ 6 เดือน และนำมาตรวจสอบการรอดชีวิตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB และความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนตามวิธีในข้อ 3.3.6 และ 3.3.7 ผลการทดลองพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งสามารถมีชีวิตรอดได้นานถึง 6 เดือน โดยเมื่อเวลาผ่านไป 3 และ 6 เดือน พบเปอร์เซ็นต์ log จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่รอดชีวิตเทียบกับจำนวนเริ่มต้นเท่ากับ 92.90 และ 83.38 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้สารป้องกันความเย็น 12% ซูโครส และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ

ระยะเวลาในการเก็บรักษา	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/มล.)	% log จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ที่รอดชีวิตเทียบกับ log จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้น
กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ก่อนทำแห้งเยือกแข็ง	3.15×10^{8}	100
กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 หลังทำแห้งเยือกแข็ง	2.88×10^{8}	99.54
กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน	2.41×10^{8}	98.63
กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน	7.85×10^{7}	92.90
กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน	1.22×10^{7}	83.38

4.7.1 การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่เวลาต่างๆ

ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเก็บไว้เป็นเวลา 0 1 3 และ 6 เดือน โดยเติมหัวเชื้อทุกชุดการทดลองเท่ากับ $10^6 - 10^7$ CFU/มล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 5 มล. ที่มีไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. บ่มทุกชุดการทดลองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างที่วันที่ 0 3 7 10 และ 14 วัน เพื่อตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ตามวิธีในข้อ 3.3.6 และ 3.3.7 ตามลำดับ

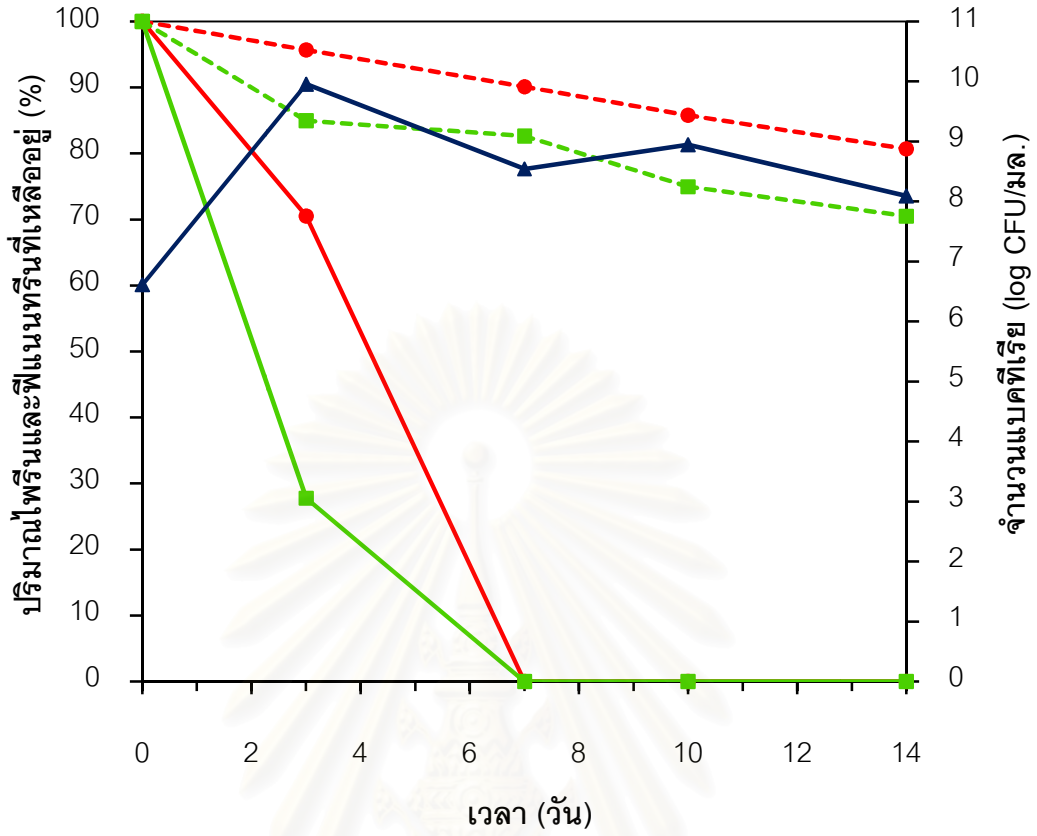
ชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเก็บไว้เป็นเวลา 0 เดือน จะใช้ผลการทดลองจากข้อ 4.3 กล่าวคือ การย่อยสลายฟีแนนทรีนถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วในวันที่ 3 ของการทดลองเหลือ 27.82% และลดลงจนหมดในวันที่ 7 ของการทดลอง ไพรีนถูกย่อยสลายเพียงเล็กน้อยในวันที่ 3 ของการทดลอง เหลือ 70.53% และลดลงจนหมดในวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับผลการเจริญโดยมีการเจริญคือ มีจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดในวันเริ่มต้นเท่ากับ 6.61 log CFU/มล. พบการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สูงสุดในวันที่ 3 ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 9.95 log CFU/มล. จากนั้นจำนวนแบคทีเรียเริ่มลดลงจนสิ้นสุดการทดลองมีจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เท่ากับ 8.09 log CFU/มล.(รูปที่ 4.11 ก)

ผลการทดลองในชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเก็บไว้เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ปริมาณฟีแนนทรีนลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยมีปริมาณเหลือเพียง 27.84% และลดลงจนไม่สามารถตรวจพบในวันที่ 7 ของการทดลอง ส่วนไพรีนพบการลดลงไม่มากในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยมีปริมาณเหลือ 72.29% ขณะที่หลังจากนั้นเกิดการย่อยสลายอย่างรวดเร็ว จนไม่สามารถตรวจพบในวันที่ 7 ของการทดลอง โดยการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในชุดการทดลองนี้เริ่มต้นด้วยจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 6.53 log CFU/มล. และพบการเจริญสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยมีจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมด เท่ากับ 9.89 log CFU/มล. และมีแนวโน้มค่อยๆลดลงจนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 14 มีจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดเท่ากับ 7.91 log CFU/มล. (รูปที่ 4.11 ข)

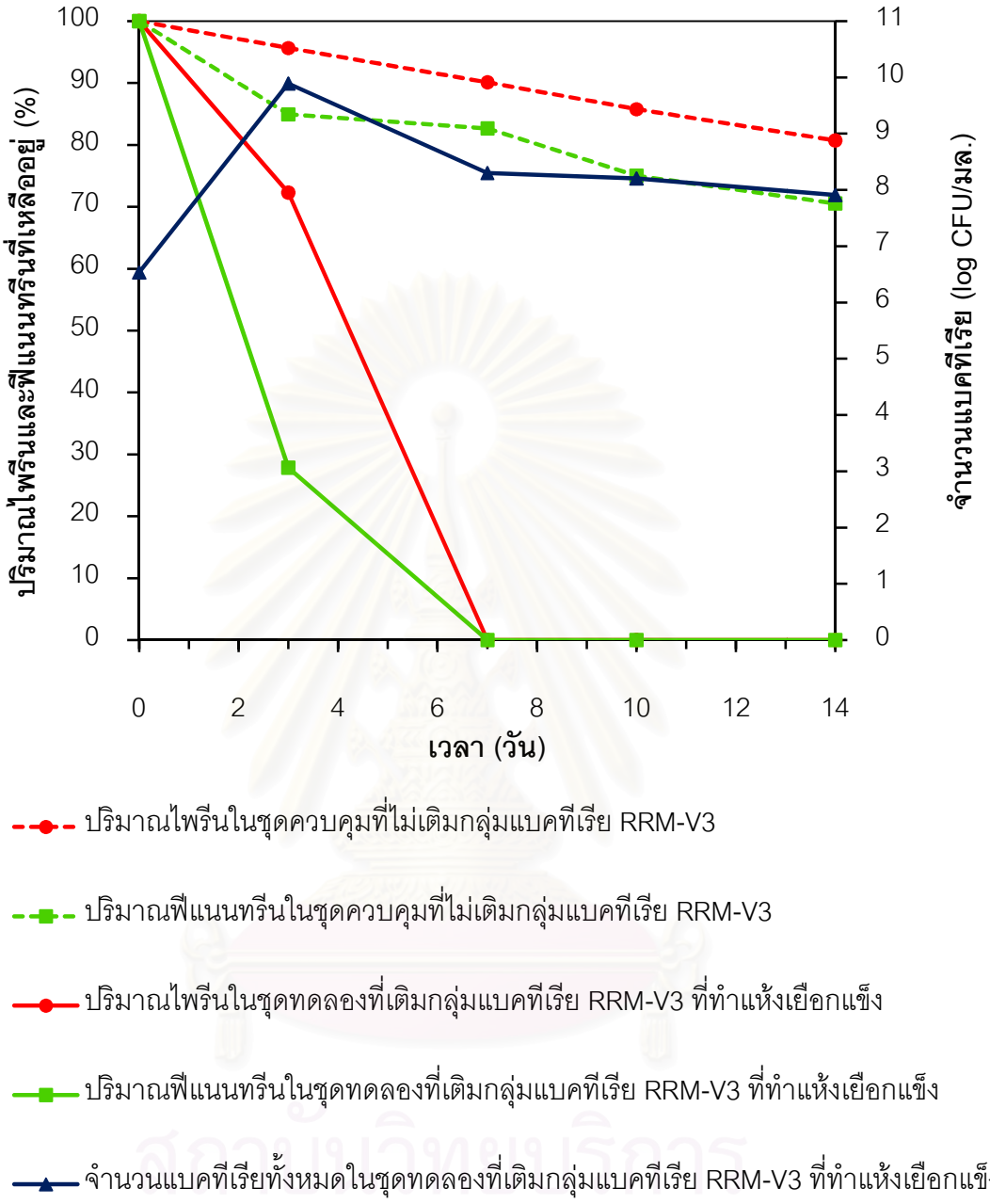
ผลการทดลองพบว่าในชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือน ยังเกิดการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้ดี โดยมีปริมาณฟีแนนทรีนลดลงค่อนข้างรวดเร็วในวันที่ 3 ของการทดลอง ซึ่งมีปริมาณเหลืออยู่ 36.99% และลดลงจนหมดในวันที่ 10 ของการทดลอง ขณะที่ไพรีนพบการย่อยสลายไม่มากในวันที่ 3 ของการทดลองโดยมีปริมาณ 78.34% จากนั้นถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วจนหมดในวันที่ 10 ของการทดลองเช่นเดียวกับฟีแนนทรีน สำหรับการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในชุดการทดลองนี้ มีจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดในวันเริ่มต้นเท่ากับ 6.81 log CFU/มล. และพบการเจริญสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยพบจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมด เท่ากับ 10.00 log CFU/มล. จากนั้นจำนวนแบคทีเรียเริ่มลดลงและเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 14 พบจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดเท่ากับ 8.42 log CFU/มล. (รูปที่ 4.11 ค)

ในชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเก็บไว้เป็นเวลา 6 เดือน ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนเริ่มลดลง โดยในวันที่ 3 ของการทดลองมีปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนเหลือ 89.55 และ 53.69 เปอร์เซ็นต์ และสารทั้งสองค่อยๆ ลดลง จนไม่สามารถตรวจพบในวันที่ 14 ของการทดลอง ส่วนการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดในวันเริ่มต้นเท่ากับ 6.49 log CFU/มล. แต่พบการเจริญสูงสุดในวันที่ 7 ของการทดลอง โดยพบจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมด เท่ากับ 9.51 log CFU/มล. หลังจากนั้นมีแนวโน้มค่อยๆลดลง จนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 14 มีจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ทั้งหมดเท่ากับ 8.00 log CFU/มล. (รูปที่ 4.11 ง)

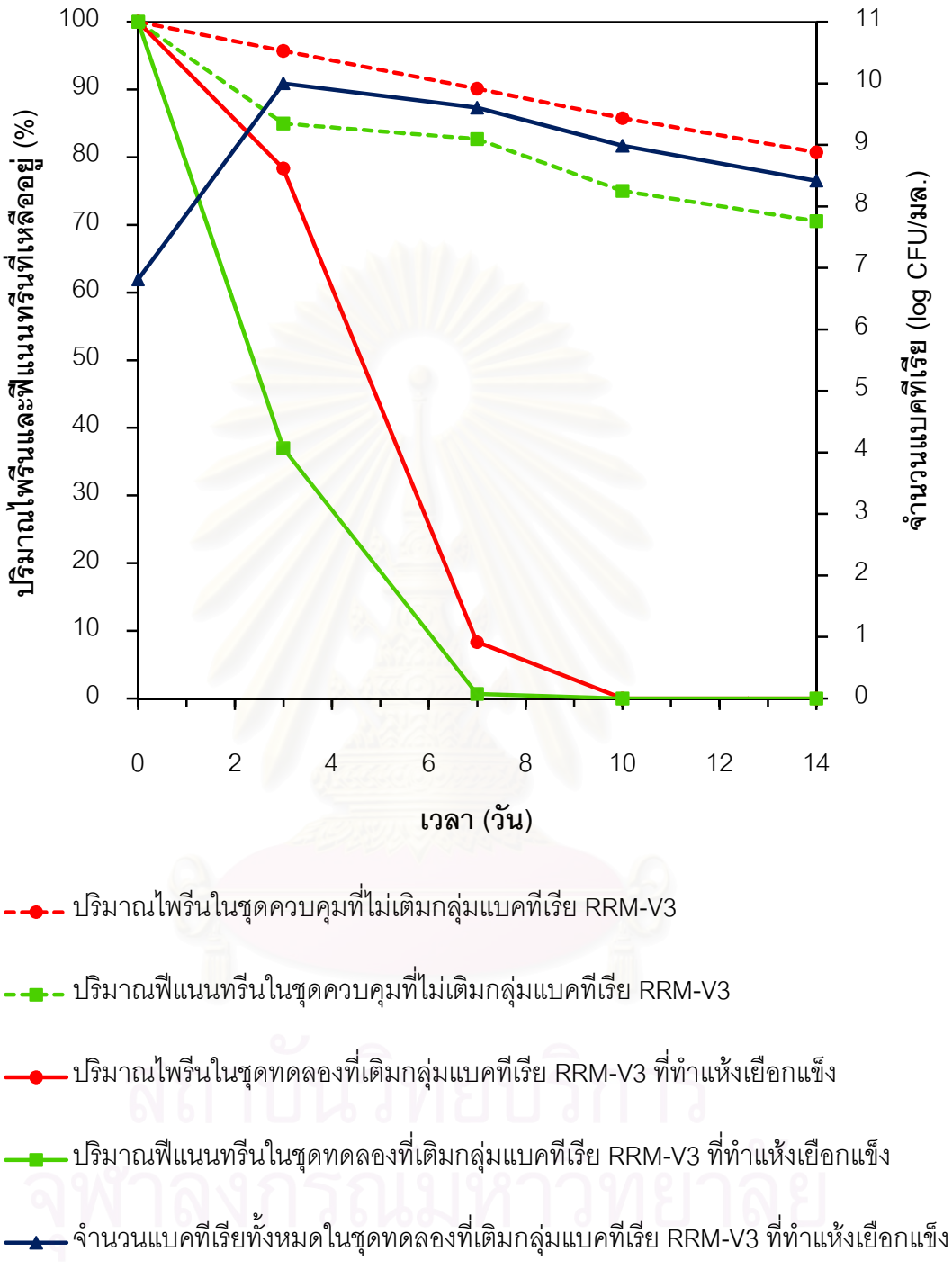
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



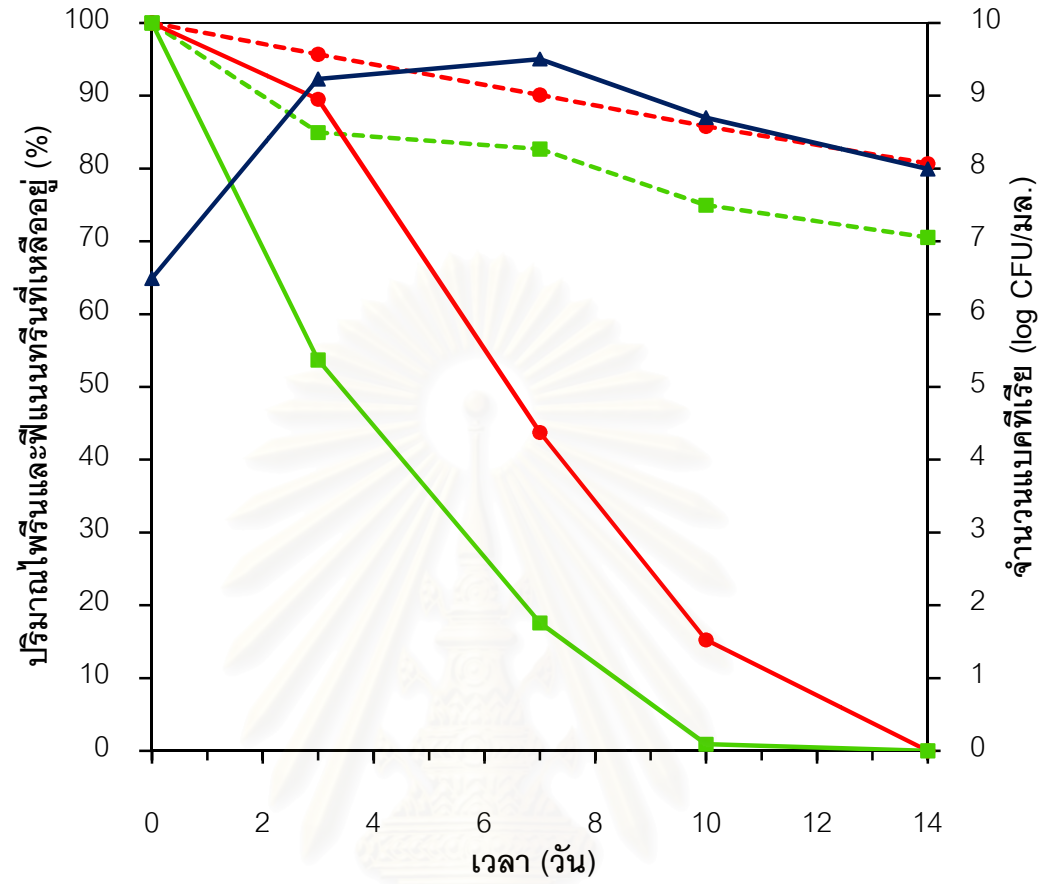
รูปที่ 4.11 ก ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้เป็นเวลา 0 เดือน



รูปที่ 4.11 ข ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้เป็นเวลา 1 เดือน



รูปที่ 4.11 ค. ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือน

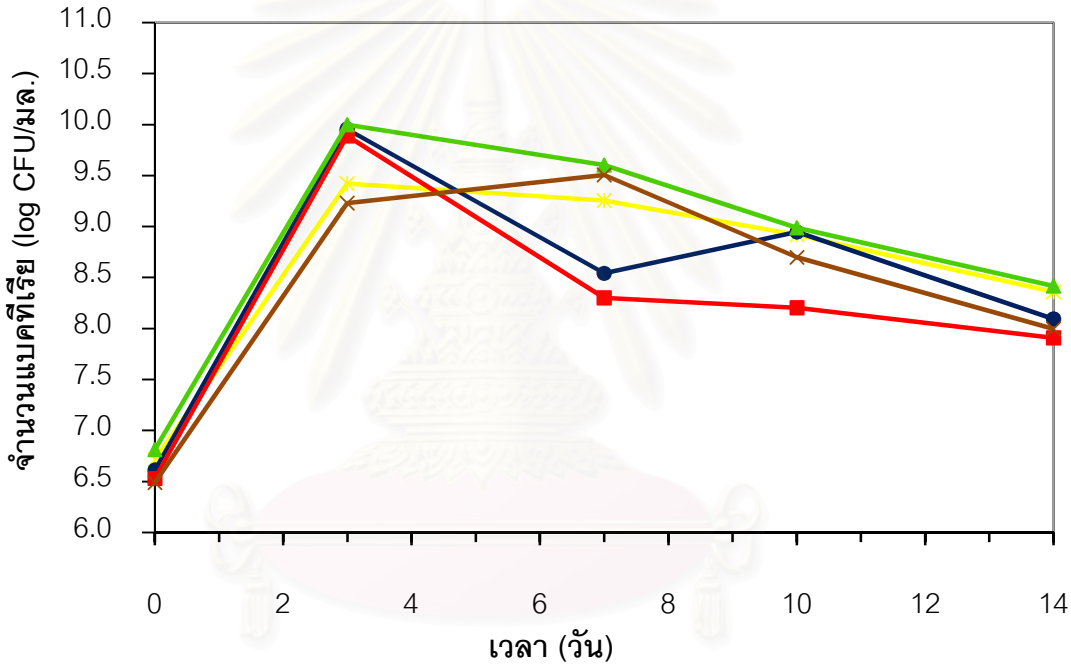


รูปที่ 4.11 ง ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้เป็นเวลา 6 เดือน

4.8 เปรียบเทียบผลการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่เวลาต่าง ๆกัน

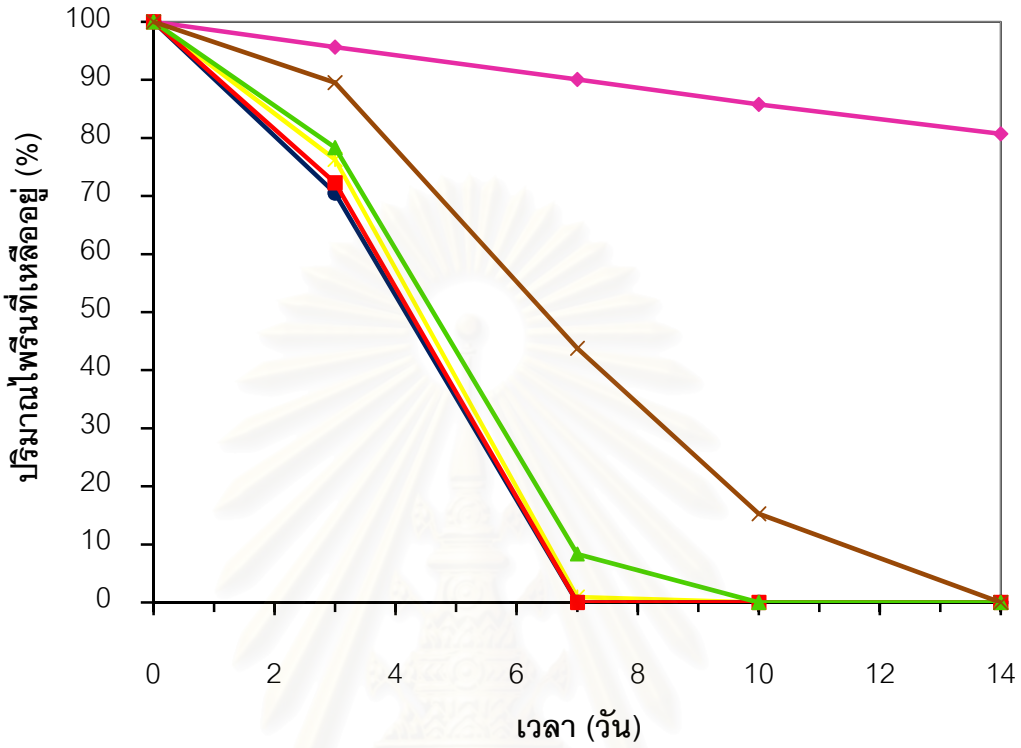
ผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน ยังสามารถคงประสิทธิภาพในการรอดชีวิตและความสามารถการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้ดี จึงเหมาะที่จะเลือกภาวะนี้ไปประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและนำไปศึกษาการบำบัดในระบบบำบัดดินจำลองต่อไป

4.8.1 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่เวลาต่างๆกัน



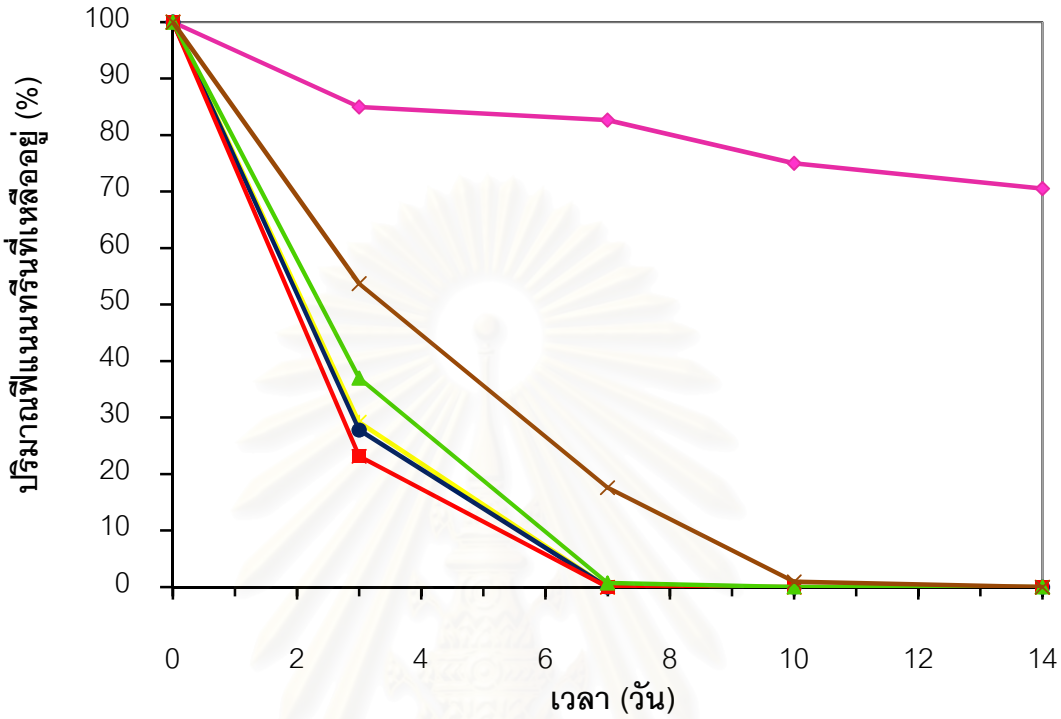
รูปที่ 4.12 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่เวลาต่างๆกัน

4.8.2 เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่เวลาต่างๆกัน



รูปที่ 4.13 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่เวลาต่างๆกัน

4.8.3 เปรียบเทียบปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่เวลาต่างๆกัน



รูปที่ 4.14 ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่เวลาต่างๆกัน

4.9 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง

ประเมินความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครส เป็นสารป้องกันความเย็นและเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน ในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินที่ไม่ปลอดเชื้อ โดยทำการทดลองดังนี้

4.9.1 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่ใช้ในการทดลอง

ดินที่เก็บมาจากสวนมะม่วงในพื้นที่จังหวัดนครปฐม มีลักษณะสีน้ำตาล เป็นดินร่วน และมีผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีจากฝ่ายวิเคราะห์ดิน กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่นำมาใช้ในการทดลอง

พารามิเตอร์	ผลการวิเคราะห์
ค่าความเป็นกรดด่าง	4.7 [1]
ค่าความจุอุ้มน้ำ (%)	42.23 % [1]
ปริมาณสารอินทรีย์ (%)	3.59 % [2]
ปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอน (%)	2.09 % [2]
ปริมาณไนโตรเจน (%)	0.05 % [2]
ปริมาณฟอสฟอรัส (%)	0.07 % [2]
ปริมาณโปแทสเซียม (%)	1.03 % [2]
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (%)	41.8 % [2]

หมายเหตุ 1 วิเคราะห์โดยฝ่ายดิน กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

2 วิเคราะห์โดย ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.9.2 การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง

ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินโดยแขวนลอยเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM 1 มล. และไม่ผ่านการล้างเซลล์ จากนั้นนำมาปลูกเชื้อในจำนวนเซลล์ที่เท่ากันคือประมาณ 10^8 CFU/กรัม ในดินไม่ปลอดเชื้อ 2 กรัม ที่ผ่านการปรับความชื้นให้มีค่าเท่ากับ 70% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7 ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นชนิดละ 0.05 มก./กรัม แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุด

ชุดควบคุมที่ 1 ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับมีไพรีนและฟีแนนทรีนเท่านั้น เป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาการสลายของ PAHs โดยปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพในดิน

ชุดควบคุมที่ 2 ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด

ชุดควบคุมที่ 3 ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น

ชุดทดลองที่ 1 ดินไม่ปลอดเชื้อผสมไพรีนและฟีแนนทรีน และกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด

ชุดทดลองที่ 2 ดินไม่ปลอดเชื้อผสมไพรีนและฟีแนนทรีน และกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง

บ่มทุกชุดการทดลองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่วันที่ 0 1 3 7 14 และ 21 วัน เพื่อตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินตามวิธีในข้อ 3.3.6 และ 3.3.7 ตามลำดับ

ผลการทดลองพบว่าไพรีนและฟีแนนทรีนในชุดที่มีเฉพาะสารไพรีนและฟีแนนทรีนในดินจะลดลงเล็กน้อย เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนเหลืออยู่ 83.11 และ 77.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในดินเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 4.69 เป็น 5.02 log CFU/กรัม ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียที่อยู่ในดินไม่น่าจะมีผลต่อการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนเพราะพบการเจริญของแบคทีเรียในดินเพียงเล็กน้อย แต่ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่ลดลงนั้นน่าจะเกิดการสลายทางกายภาพ (รูปที่ 4.15 ก)

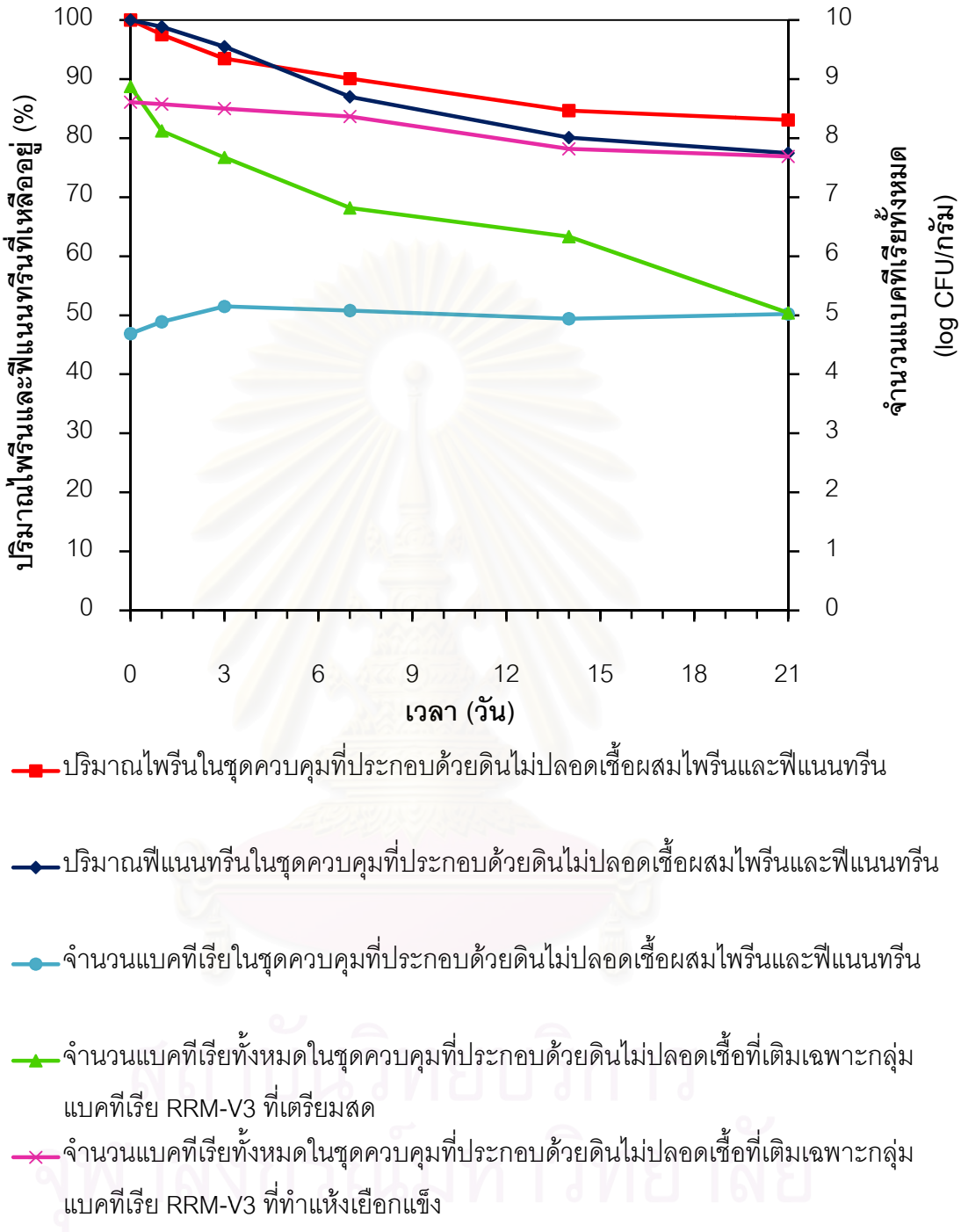
ในขณะที่ชุดควบคุมที่ 2 ที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสดและไม่เติมไพรีนและฟีแนนทรีน จำนวนแบคทีเรียในวันเริ่มต้นเท่ากับ 8.88 log CFU/กรัม พบว่าการเจริญแบคทีเรียมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ เนื่องจากไม่มีแหล่งอาหาร และเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 5.04 log CFU/กรัม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในดินไม่น่าจะมีแหล่งอาหารใดๆ ที่กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ใช้ในการเจริญได้ (รูปที่ 4.15 ก)

จากผลการทดลองในชุดควบคุมที่ 3 ที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและไม่เติมไพรีนและฟีแนนทรีน โดยมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น 8.61 log CFU/กรัม และมีการลดลงเล็กน้อย และสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 21 พบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 7.69 log CFU/กรัม แสดงว่าสารป้องกันความเย็นนั้นมีส่วนช่วยส่งเสริมในการเจริญ การอยู่รอดได้บ้างในดิน (รูปที่ 4.15 ก)

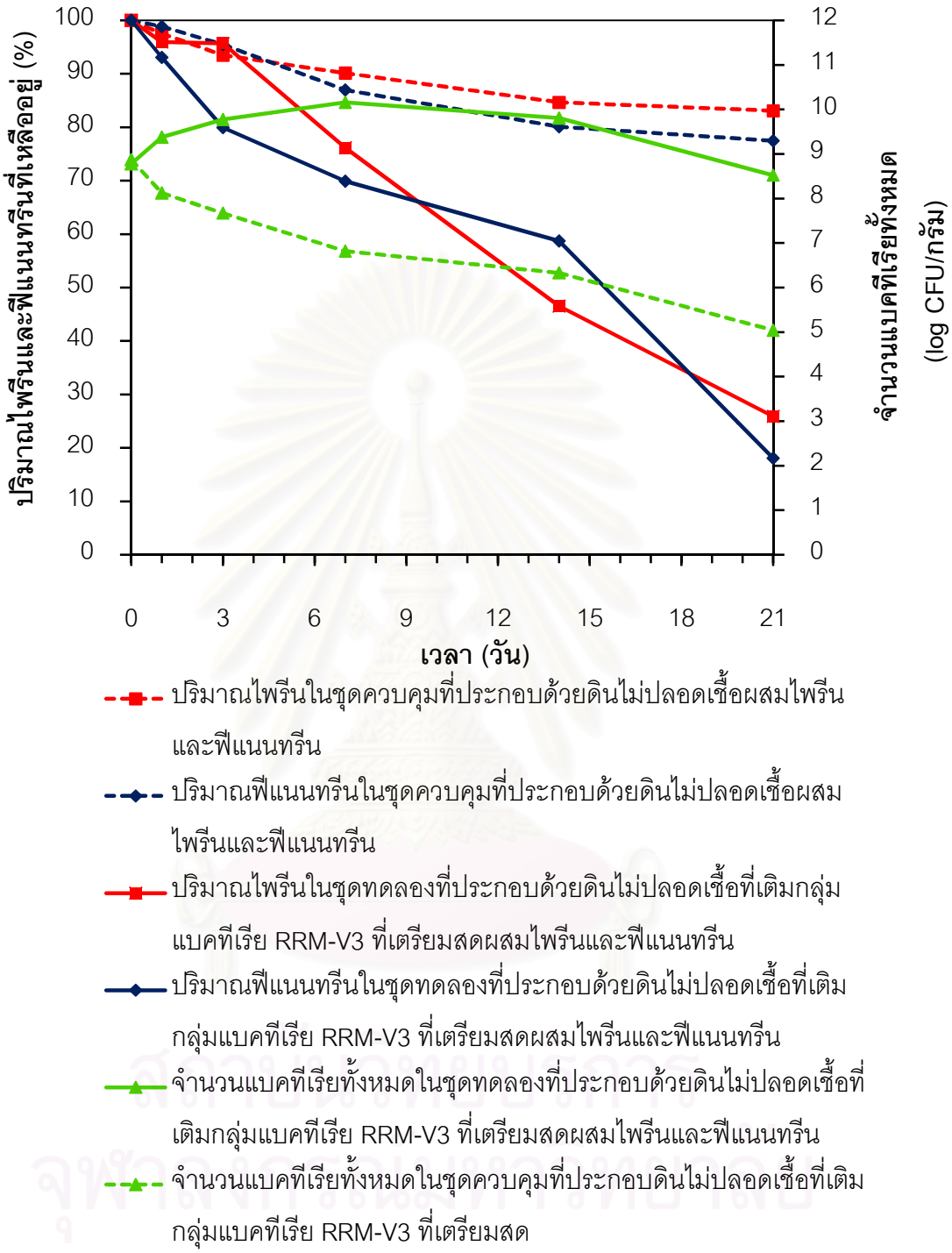
ในชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด พบการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน ปริมาณสารทั้งสองค่อยๆลดลง จนเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 21 พบปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนเหลือ 25.90 และ 18.07 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการเจริญ เพราะพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสดสามารถอยู่รอดและเพิ่มจำนวนได้ โดยมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 8.78 log CFU/กรัม และพบการเจริญสูงสุดในวันที่ 7 ของการทดลอง และมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 10.16 log CFU/กรัม และมีแนวโน้มค่อยๆลดลง จนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 21 มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 8.53 log CFU/กรัม (รูปที่ 4.15 ข)

ชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง พบปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนค่อยๆ ลดลง จนในวันที่ 21 ของการทดลอง ตรวจพบปริมาณของไพรีนและฟีแนนทรีนเท่ากับ 12.68 และ 7.06 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเจริญนั้นพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถอยู่รอดและเจริญได้ดี โดยในวันเริ่มต้นของการทดลองมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 8.60 log CFU/กรัม และพบการเจริญสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลอง 10.77 log CFU/กรัม หลังจากนั้นมีแนวโน้มค่อยๆลดลง จนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 21 มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 8.78 log CFU/กรัม (รูปที่ 4.15 ค)

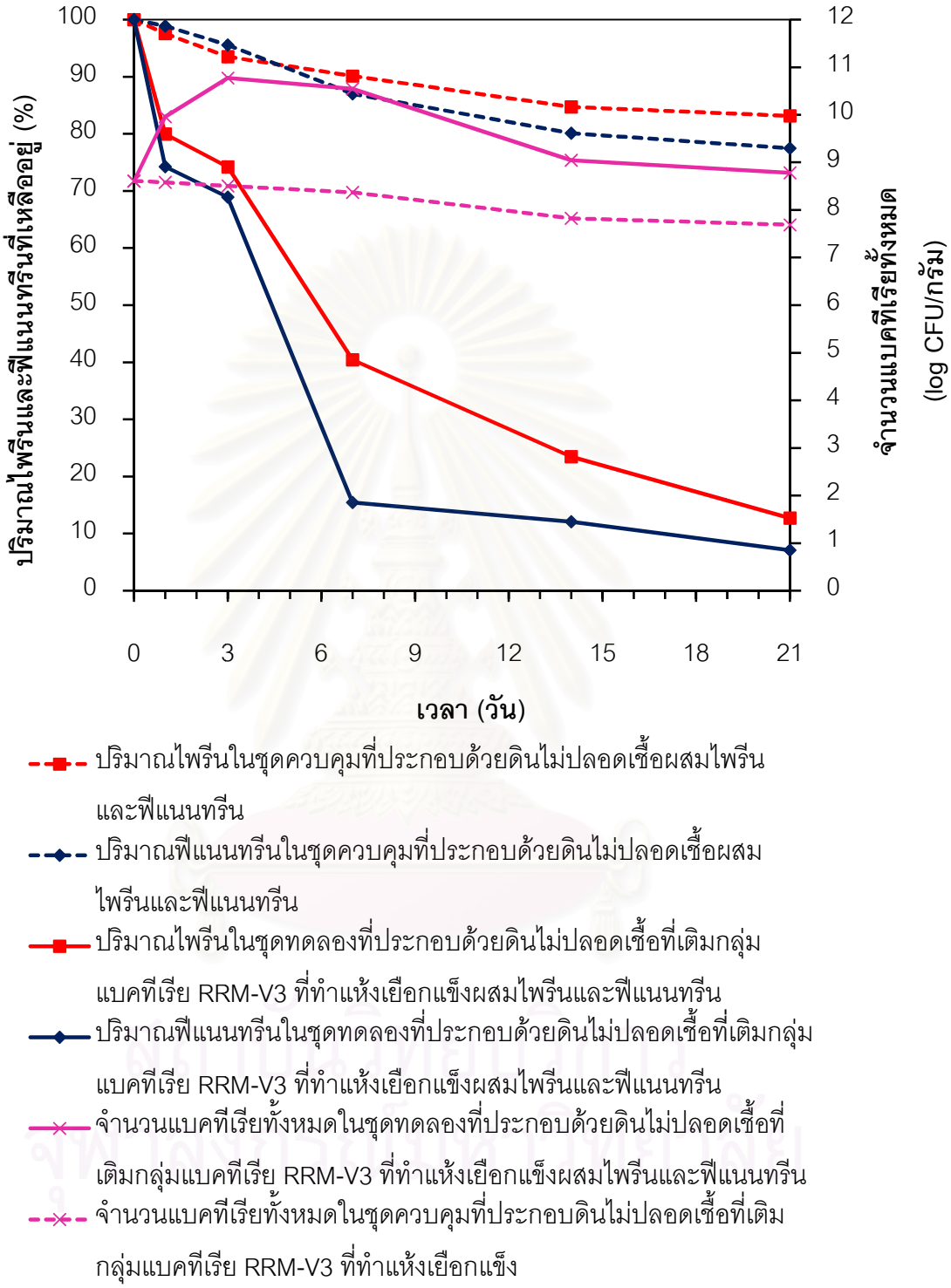
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.15 ก ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อ และการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมโดยวิธีต่างๆ ในดินไม่ปลอดเชื้อ



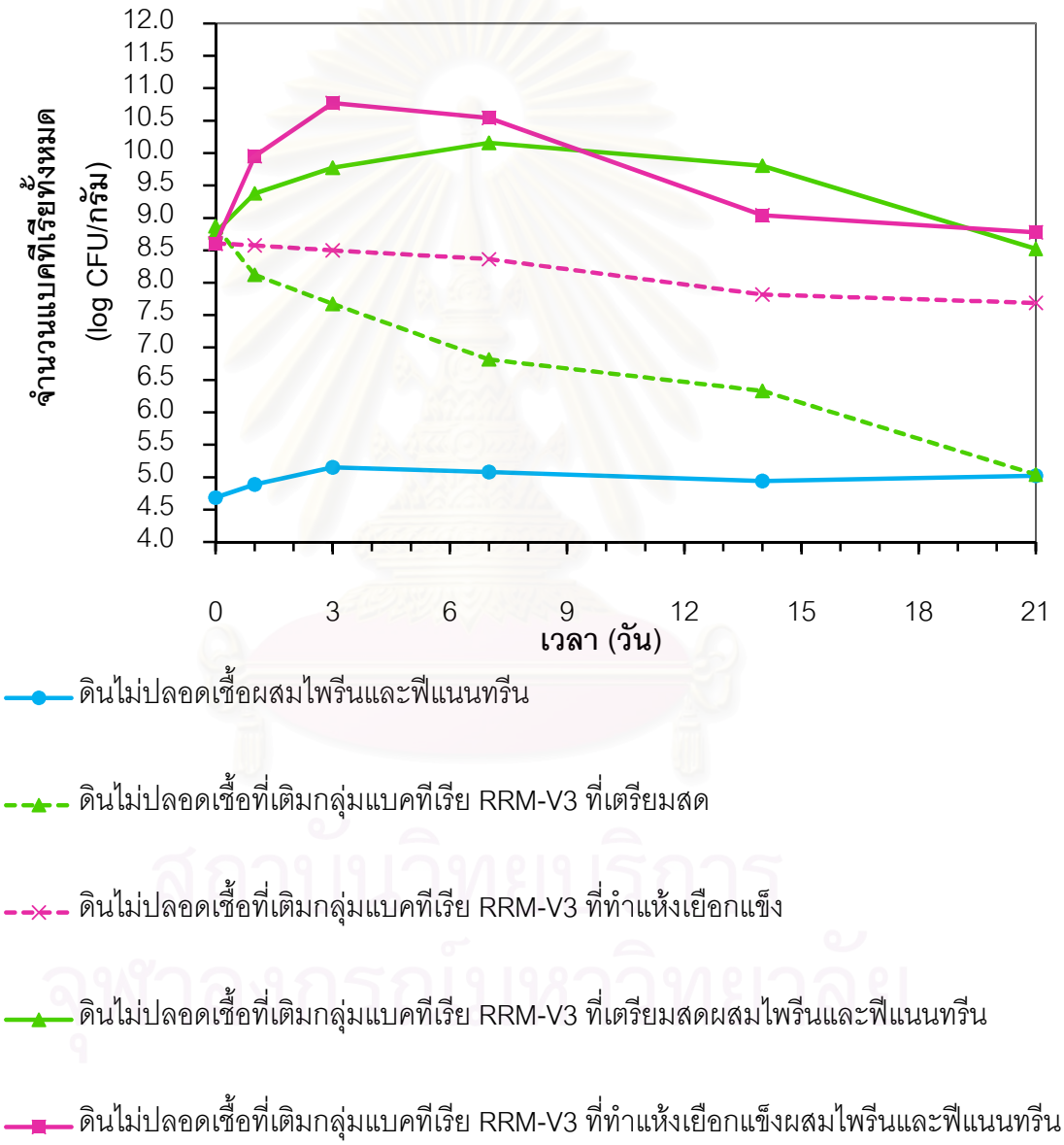
รูปที่ 4.15 ข การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด



รูปที่ 4.15 ค การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง

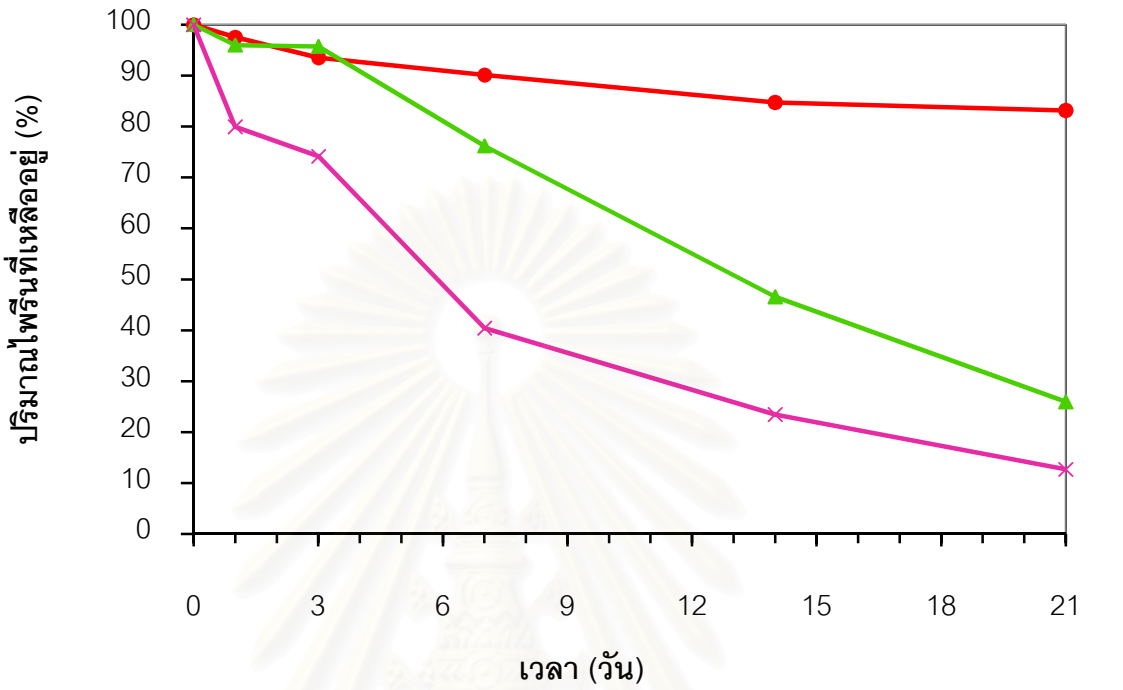
4.10 เปรียบเทียบผลการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

4.10.1 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3



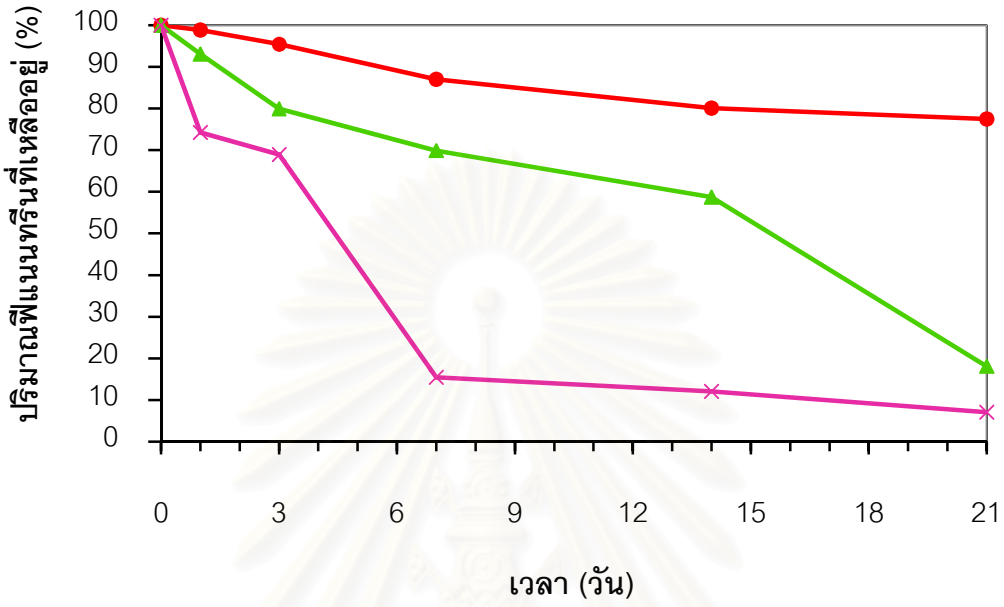
รูปที่ 4.16 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

4.10.2 เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ของการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3



รูปที่ 4.17 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ของการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

4.10.3 เปรียบเทียบปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ของการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3



ดินไม่ปลอดเชื้อผสมไพรีนและฟีแนนทรีน

ดินไม่ปลอดเชื้อที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสดผสมไพรีนและฟีแนนทรีน

ดินไม่ปลอดเชื้อที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งผสมไพรีนและฟีแนนทรีน

รูปที่ 4.18 ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ของการทดลองการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ความเจริญก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีและวิทยาการต่างๆ ในประเทศไทยอย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ ทั้งทางด้านมลพิษทางอากาศ น้ำ และดิน มีการนำสารเคมีมาใช้ในปริมาณมาก และก่อให้เกิดปัญหาสารเคมีอันตรายสะสมปริมาณมาก (เกื้อ วงศ์บุญสิน, 2545) สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน หรือ PAHs จัดเป็นสารเคมีอันตรายชนิดหนึ่ง ซึ่งเมื่อปนเปื้อนเข้าสู่สิ่งแวดล้อมสามารถจับกับตะกอนต่าง ๆ และดินทั้งในระบบนิเวศบนบกและในน้ำ และอาจก่อให้เกิดการสะสมและถ่ายทอดมาสู่มนุษย์ได้ (Means และคณะ, 1980) ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุที่จะต้องเร่งบำบัดเมื่อปนเปื้อนเข้าสู่สิ่งแวดล้อม การบำบัดทางชีวภาพ (bioremediation) เป็นกระบวนการหลักในการย่อยสลายสาร PAHs ในธรรมชาติ โดยเกิดจากการที่จุลินทรีย์ใช้สารนี้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ การย่อยสลายอาจเกิดจากจุลินทรีย์ชนิดเดี่ยวหรือกลุ่มจุลินทรีย์ (Cerniglia, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ได้ดีกว่าการใช้แบคทีเรียบริสุทธิ์ เพราะว่ากลุ่มแบคทีเรียจะมีความสามารถสูงในการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมและทำงานร่วมกันเพื่อย่อยสลายสารพิษและสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้น (Guo และคณะ, 2005) แต่เมื่อนำไปใช้ในพื้นที่จริงอาจจะมีปัญหาเรื่องการมีชีวิตอยู่รอดและความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs (Bengtsson และ Zerhouni, 2003) จึงได้มีงานวิจัยหาวิธีทำช่วยให้แบคทีเรียมีชีวิตรอดและยังคงมีประสิทธิภาพในการบำบัดสารพิษ เช่น การใช้วัสดุทางการเกษตรบางชนิดเพื่อเป็นแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะเกาะติดอยู่กับวัสดุนั้นและสามารถใช้สารอินทรีย์จากวัสดุทางการเกษตรเหล่านั้นเจริญได้ (Van Veen และคณะ, 1997) แต่วิธีดังกล่าวข้างต้นต้องอาศัยการเตรียมแบคทีเรียสดเพื่อใช้ในการบำบัด ซึ่งไม่สะดวกในการเพาะเชื้อหลายครั้งต่อเนื่องกัน และอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมดั้งเดิมของจุลินทรีย์ (Gherna, 1994) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้วิธีการทำแห้งเยือกแข็งเพื่อเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากใบจามจุรีและมีความสามารถย่อยสลายไพรีน ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ได้หมดภายในระยะเวลา 14 วัน (จีรทีปฆ์ แสนรัก, 2547) โดยใช้สารป้องกันความเย็นชนิดต่าง ๆ ศึกษาอัตราการรอดชีวิตและกิจกรรมการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนเทียบกับกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมสด รวมทั้งศึกษาความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในการบำบัดไพรีนและฟีแนนทรีนในระบบบำบัดดินจำลอง

เบื้องต้นได้ศึกษาความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน (การทดลองที่ 4.1) พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้น 0.05 มก./มล. ได้หมดภายในระยะเวลา 10 วันและ 7 วันตามลำดับ ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก 6.72 log CFU/มล. เป็น 9.42 log CFU/มล. ส่วนในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 พบการลดลงของไพรีนและฟีแนนทรีนตามธรรมชาติเพียงเล็กน้อย โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 14 พบปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนเหลือ 80.72 และ 70.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.1) โดยปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่น้อยกว่าอาจเป็นเพราะโครงสร้างโมเลกุลของฟีแนนทรีนประกอบด้วยวงเบนซีนเพียง 3 วง ซึ่งมีความซับซ้อนน้อยกว่าไพรีนที่ประกอบด้วยวงเบนซีน 4 วง อีกทั้งน้ำหนักโมเลกุลยังต่ำกว่า จึงทำให้เกิดการระเหยได้ง่ายกว่าไพรีน (Trzesicka-Mlynarz และ Ward, 1996) แสดงให้เห็นว่าไพรีนและฟีแนนทรีนที่ลดลงน่าจะเกิดจากกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถใช้สารสองชนิดนี้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ โดยการย่อยสลายฟีแนนทรีนเกิดได้รวดเร็วกว่าไพรีน โดยเมื่อเปรียบเทียบจากวันที่ 3 ของการทดลอง พบว่าปริมาณฟีแนนทรีนเหลืออยู่เพียง 29.16% และย่อยสลายจนไม่สามารถตรวจพบในวันที่ 7 ของการทดลอง ในขณะที่ไพรีนยังคงเหลือปริมาณสูงในวันที่ 3 ของการทดลอง คือมีปริมาณ 76.30% และหลังจากนั้นค่อยเกิดการย่อยสลายอย่างรวดเร็ว จนไม่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 10 ของการทดลอง ทั้งนี้เนื่องจากฟีแนนทรีนมีน้ำหนักโมกุลที่ต่ำกว่าและโครงสร้างซับซ้อนน้อยกว่าไพรีน (Trzesicka-Mlynarz และ Ward, 1996) นอกจากนี้การที่ไพรีนเหลืออยู่ปริมาณสูงมากกว่า 70% ในวันที่ 3 ของการทดลอง เกิดขึ้นเนื่องจากกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ต้องการเวลาปรับตัวในการย่อยสลายสารไพรีนประมาณสองวัน (จิรทีปฆ์, 2547) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ยังมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้ดีกว่าที่ได้เคยมีรายงานโดยจีรทีปฆ์ แสนรัก (2547) ดังนั้นจึงสามารถนำไปทดลองทำแห้งเยือกแข็งในการทดลองต่อไป

เมื่อนำกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มาทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้สารป้องกันความเย็นชนิดต่างๆ โดยผสมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 0.5 มล. กับสารป้องกันความเย็น 0.5 มล. และนำไปทำให้แข็งโดยแช่ในตู้แช่จุดเยือกต่ำ และนำไปเข้าเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง เพื่อระเหิดเอาน้ำออก เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังทำแห้งเยือกแข็งได้นำมาตรวจสอบการรอดชีวิตทันที พบว่าแบคทีเรียรอดชีวิตสูงที่สุดเมื่อใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น (การรอดชีวิต 99.54%) รองลงมาคือ 10% นมปลอดมันเนย (การรอดชีวิต 98.19%) ส่วนสารป้องกันความเย็นที่มีประสิทธิภาพต่ำที่สุดในการรักษาความมีชีวิตคือ 5% ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (การรอดชีวิต 39.99%) ซึ่งพบแบคทีเรียที่รอดชีวิตในจำนวนใกล้เคียงกับการทำแห้งเยือกแข็งโดยไม่ใช้สารป้องกันความเย็น (การรอดชีวิต

36.36%) Tzovenis และคณะ (2004) ว่า ไดเมธิลซัลฟอกไซด์จะมีพิษที่อุณหภูมิปกติโดยจะไปทำให้การทำงานของเอนไซม์ช้าลง ชักนำให้เกิดความเสียหายโดยแสงและเคมี และสลายโปรตีน

ผลการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยไม่มีการเติมไพรีนและฟีแนนทรีน พบว่าซูโครสและนมปลอดมันเนยสามารถเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญอีกแหล่งได้ เพราะพบการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เมื่อทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ซูโครสและนมปลอดมันเนยเป็นสารป้องกันความเย็น โดยที่จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดควบคุมที่ใช้ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น เพิ่มจำนวนจาก 6.40 เป็น 7.79 log CFU/มล. ในวันที่ 3 ของการทดลอง และเริ่มลดลงจนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 14 มีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 3.90 log CFU/มล. ส่วนชุดควบคุมที่ใช้นมปลอดมันเนยเป็นสารป้องกันความเย็นพบการเจริญเพิ่มจาก 6.72 เป็น 7.95 log CFU/มล. ในวันที่ 7 ของการทดลอง และเริ่มลดลงจนสิ้นสุดการทดลองพบจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 2.35 log CFU/มล. อาจเป็นเพราะว่าซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้ง่ายเพราะประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสองโมเลกุลมารวมกัน ในขณะที่นมปลอดมันเนยประกอบด้วยสารอาหารหลายอย่าง จึงใช้เวลาในการเจริญช้ากว่า ดังผลการทดลอง ส่วนในชุดการทดลองที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 5% ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ และไม่ใช้สารป้องกันความเย็น พบการลดลงของจำนวนแบคทีเรีย ทั้งนี้เนื่องจาก ไม่มีแหล่งคาร์บอนในการเจริญ จึงพบการตายของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 (รูปที่ 4.2)

จากการตรวจสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้สารป้องกันความเย็นชนิดต่างๆ พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็นสามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้ดีใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่เตรียมสด โดยอาจย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้เร็วกว่าเล็กน้อยกล่าวคือสามารถย่อยสลายสารทั้งสองได้หมดภายในระยะเวลา 7 วัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะผลของซูโครสที่ติดอยู่ที่ตัวแบคทีเรีย เนื่องจากซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็นโดยช่วยรักษาโครงสร้างของเซลล์เมมเบรน ช่วยคงรูปโดยการจับกับฟอสโฟไลปิดของเมมเบรน ทำหน้าที่เสมือนเป็นบัฟเฟอร์ของแรงดันออสโมติกโดยช่วยคงแรงดันออสโมติก (Liebermann และคณะ, 2003) ดังนั้นอาจจะมีบางส่วนที่ยึดติดกันแน่นกับเซลล์ นอกจากนี้ซูโครสยังเป็นแหล่งคาร์บอนที่เซลล์สามารถย่อยสลายได้ง่าย ดังนั้นกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จึงสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการเจริญเพราะพบการเจริญมากกว่าชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด โดยเมื่อเปรียบเทียบในช่วง 3 วันแรกของการทดลอง พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในชุดการทดลองที่ใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็นมีการเพิ่มขึ้นจาก 6.61 เป็น 9.95 log CFU/มล. ในขณะที่แบคทีเรียที่เตรียมสด มีการเจริญเพิ่มขึ้นจาก 6.72 เป็น 9.42 log

CFU/มล ซึ่งเมื่อมีจำนวนแบคทีเรียที่มากจึงเกิดการย่อยสลายสารไพรีนและฟีแนนทรีนได้เร็วกว่าดังการทดลองข้างต้น

ชุดการทดลองที่ใช้ 10% นมปลอดมันเนยเป็นสารป้องกันความเย็น พบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนลดลง โดยเมื่อเปรียบเทียบในวันที่ 3 ของการทดลองพบว่าสามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้เพียง 89.51 และ 56.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองที่ใช้ 12% ซูโครสย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้ 27.82 และ 70.53 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และใช้เวลาในการย่อยสลายสารไพรีนและฟีแนนทรีนจนไม่สามารถตรวจพบนานกว่า คือ ใช้เวลา 14 และ 10 วัน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังให้ผลการเจริญที่มากกว่าชุดการทดลองที่ใช้ 12% ซูโครส โดยมีการเพิ่มขึ้นจาก 6.81 เป็น 10.30 log CFU/มล. ในวันที่ 3 ของการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการเจริญนั้นอาจเกิดจากการใช้นมปลอดมันเนยเป็นแหล่งอาหารก่อนใช้สารประกอบ PAHs เพราะนมปลอดมันเนยประกอบด้วยสารหลายชนิดที่มีทั้งส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้วทำให้ยึดติดแน่นกับเยื่อหุ้มเซลล์มากกว่าซูโครส (Harold, 2004) ทำให้ล้างออกได้น้อยกว่า จึงอาจทำให้มีปริมาณนมปลอดมันเนยเหลือมากกว่าซูโครส และเมื่อนมปลอดมันเนยหมดกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จึงเริ่มย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน ทำให้เกิดการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนช้ากว่าดังข้างต้น

ในชุดการทดลองที่ใช้ 5% ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ พบประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้ไม่ดี โดยสารทั้งสองชนิดยังคงพบอยู่ในปริมาณที่สูงในวันที่ 3 ของการทดลองคือ 98.17 และ 78.47 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลา 14 ถึงจะสามารถลดลงจนหมด เช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งโดยไม่ใช้สารป้องกันความเย็น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความเป็นพิษของไดเมธิลซัลฟอกไซด์ที่อุณหภูมิปกติโดยจะไปทำให้การทำงานของเอนไซม์ช้าลง ชักนำให้เกิดความเสียหายโดยแสงและเคมี และสลายโปรตีน (Tzovenis และคณะ, 2004) ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารนี้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการย่อยสลายสารไพรีนและฟีแนนทรีน จึงก่อให้เกิดการย่อยสลายสารไพรีนและฟีแนนทรีนช้าลง

จากการทดลองในชุดที่ไม่เติมสารป้องกันความเย็น พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในรูปแบบเดียวกับชุดการทดลองที่ใช้ 5% ไดเมธิลซัลฟอก-ไซด์ กล่าวคือ กล่าวคือเกิดการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนเล็กน้อยในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยตรวจพบปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนเหลืออยู่ 82.87 และ 74.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และใช้เวลา 14 วันในการย่อยสลายสารทั้งสองชนิดจนหมด แสดงว่าเมื่อไม่มีสารป้องกันความเย็นอาจก่อให้เกิดการทำงานของเอนไซม์เสียหายไปเนื่องจากผลึกน้ำแข็งทิ่มแทงเซลล์ (Morgan และคณะ, 2006)

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นว่าสารป้องกันความเย็นมีความจำเป็นในการรักษาความมีชีวิตและประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะเลือก 12% ซูโครส เพราะสามารถรักษาความมีชีวิตและประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้ดีที่สุด

การทดลองต่อไปเป็นการหาภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง โดยใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น และเก็บรักษาที่ต่างๆ ในภาวะที่มีและไม่มีซิลิกาเจล เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นนำมาตรวจสอบการรอดชีวิต พบว่าหลังจากกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็นและเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน จะพบจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตสูงที่สุด (98.63% ของจำนวนเริ่มต้น) รองลงมาคือ 4 องศาเซลเซียส และที่ไม่พบการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งตรงกับรายงานของ Gherna (1994) ซึ่งรายงานว่าควรเก็บที่ -20 และ 4 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังควรหลีกเลี่ยงอุณหภูมิห้อง เพราะว่าจะทำให้แบคทีเรียกลับมามีเมแทบอลิซึมได้อีกและเมื่อไม่มีอาหารจะทำให้เกิดการตายของจุลินทรีย์ ดังจะได้เห็นได้จากผลการทดลองไม่พบการรอดชีวิตที่อุณหภูมิห้องนั่นเอง ส่วนผลของสารดูดความชื้นนั้น พบว่าการมีและไม่มีสารดูดความชื้น ให้ผลการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งอาจขัดแย้งกับงานวิจัยของ De valdez และคณะ (1984) ซึ่งมีรายงานว่าความชื้นมีผลต่ออัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียที่ทำแห้งเยือกแข็ง โดยถ้าคงมีความชื้นปริมาณมากอาจทำให้จุลินทรีย์มีกิจกรรมและเมื่อไม่มีอาหารทำให้เกิดการตาย ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า ปริมาณสารดูดความชื้นอาจยังไม่เพียงพอ จึงก่อให้เกิดการตายของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ไม่แตกต่างกันในภาวะที่มีและไม่มีซิลิกา

ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เก็บไว้ 1 เดือนที่ -20 องศาเซลเซียส ไม่ว่าจะมีหรือไม่มีซิลิกาเจล สามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้ใกล้เคียงกับกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทดสอบทันทีหลังการทำแห้งเยือกแข็ง ในขณะที่กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้ช้ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมินี้สามารถเก็บรักษาได้ดีกว่า สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kurosawa และคณะ (1997) ที่รายงานว่าประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์สารซัลไฟด์ของแบคทีเรียที่ทำแห้งเยือกแข็งจะลดลงเมื่อเก็บที่อุณหภูมิสูงกว่า -20 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองข้างต้นจึงเลือกอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และไม่ใช้ซิลิกาเจล มาทดลองในการทดลองเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งไว้เป็นระยะเวลา 3 และ 6 เดือน ต่อไป

การรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 และ 6 เดือน พบว่าแบคทีเรียเริ่มมีจำนวนลดลงเหลือ 92.90 และ 83.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Shinohara และคณะ (2000) ที่รายงานว่า แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli, Pseudomonas putida, Serratia marcescens,* และ *Alcaligenes faecalis* มีอัตราการรอดชีวิตประมาณ 50% และลดลงเมื่อเก็บรักษาได้ช่วง 0-5 ปี

ความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 และ 6 เดือน พบว่าเมื่อผ่านไป 3 เดือน ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนลดลงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เก็บไว้ 1 เดือน กล่าวคือในวันที่ 3 ของการทดลอง กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เก็บ -20 องศาเซลเซียส 1 เดือน จะย่อยสลายไพรีนได้ 72.29% และ ฟีแนนทรีนได้ 27.84% ในขณะที่กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เก็บ -20 องศาเซลเซียส 3 เดือน จะย่อยสลายไพรีนเหลือปริมาณ 78.34 และ 89.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และฟีแนนทรีนเหลือปริมาณ 36.99 และ 53.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อาจเป็นได้ว่าการเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำๆ เป็นเวลานานอาจทำให้ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลดลง เพราะมีรายงานว่าแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไนโตรเจนบางชนิด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลานานจะทำให้ความสามารถในการย่อยสลายไนโตรเจนลดลง (Verchot, 1999)

ซึ่งจากข้างต้นเป็นการยืนยันได้ดีว่าอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ให้มีอัตราการรอดชีวิตสูงและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนเทียบเท่ากับแบคทีเรียที่เตรียมสด จึงได้นำกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน มาทดสอบบำบัดไพรีนและฟีแนนทรีนในดิน

ในชุดควบคุมที่ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน พบการเจริญของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยเพิ่มจาก 4.69 เป็น 5.02 log CFU/กรัม ในวันที่ 21 ของการทดลอง และพบการลดลงของไพรีนและฟีแนนทรีนเล็กน้อย โดยในวันสิ้นสุดการทดลองเหลือไพรีนและฟีแนนทรีน 83.11 และ 77.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเปอร์เซ็นต์ไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่นี้ มีปริมาณใกล้เคียงกับชุดควบคุมในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการลดลงของไพรีนและฟีแนนทรีนนี้น่าจะเกิดจากการสลายตัวตามธรรมชาติมากกว่า ไม่ได้เกิดจากปัจจัยทางชีวภาพในดิน

การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในชุดการทดลองที่ประกอบด้วยดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีนและกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมสด พบว่าเกิดการย่อยสลายสารไพรีนและ

ฟีแนนทรีนได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายได้หมดภายในระยะเวลา 21 วันของการทดลอง โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนเหลือ 25.90 และ 18.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการเจริญเพราะพบจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 8.77 เป็น 10.15 log CFU/มล. ในวันที่ 7 ของการทดลอง และเริ่มลดลงจนสิ้นสุดการทดลองพบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 8.52 log CFU/มล แต่ในชุดการทดลองที่ไม่เติมไพรีนและฟีแนนทรีน พบว่าแบคทีเรียลดลง แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นน่าจะเกิดจากการใช้ไพรีนและฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ และในดินน่าจะไม่มีแหล่งอาหารใดๆ เพราะจากผลการวิเคราะห์ดินจากภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พบปริมาณธาตุอาหารในปริมาณต่ำซึ่งน่าจะไม่เพียงพอในการเป็นแหล่งอาหารทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญและเพิ่มปริมาณได้ สำหรับประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนเกิดได้ไม่ดีเท่ากับงานวิจัยของเสาวลักษณ์ อ้นเมฆ (2550) ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากตัวอย่างดินที่ใช้ในการทดลอง ได้ทำการเก็บตัวอย่างมาจากแหล่งที่ต่างกัน ทำให้ปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพต่างกัน จึงส่งผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียที่เติมลงไปและทำให้เกิดการย่อยสลายสารไพรีนและฟีแนนทรีนได้ต่างกัน (Sims และคณะ, 1990; Van Veen และคณะ, 1997)

ในชุดการทดลองที่ประกอบด้วยดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีนและกลุ่มแบคทีเรียที่ทำแห้งเยือกแข็ง พบว่าเกิดการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้ดีกว่าแบคทีเรียที่เตรียมสด อีกทั้งยังพบการเจริญที่มากกว่า และในชุดการทดลองที่ไม่เติมไพรีนและฟีแนนทรีนที่พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ไม่ค่อยลดลง ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากซูโครสที่ติดอยู่ที่เซลล์ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีส่วนช่วยในการเจริญ โดยกลุ่มแบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารและทำให้แบคทีเรีย RRM-V3 เพิ่มจำนวนได้ในระยะแรก จึงทำให้ได้การเจริญมากกว่าชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียที่เตรียมสด และเมื่อมีจำนวนแบคทีเรียที่มากกว่าทำให้เกิดการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้ดีกว่า ดังจะเห็นได้จากวันที่ 21 ของการทดลองเหลือปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนน้อยกว่าคือ 12.68 และ 7.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่าวิธีการทำแห้งเยือกแข็งหรือไลโอฟิไลเซชันเป็นวิธีที่สามารถนำมาเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เป็นเวลานานเพื่อให้มีชีวิตรอดได้ และคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน โดยภาวะที่เหมาะสมคือใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือนขึ้นไป กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เก็บรักษาโดยวิธีนี้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้ดีกว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด วิธีการนี้จึงอาจจะนำไปประยุกต์ใช้กับกลุ่มแบคทีเรียอื่นได้

บทที่ 6

ข้อเสนอแนะในงานวิจัย

6.1 ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้สารป้องกันความเย็นเพียง 3 ชนิด คือ ซูโครส นมปลอดมันเนย และไดมธิลซัฟอกไซด์ ซึ่งเป็นสารที่มีราคาถูกและหาได้ง่าย มีรายงานการใช้สารป้องกันความเย็นอื่นในการทำแห้งเยือกแข็งเช่น กลีเซอรอล ทรีฮาโลส ฯลฯ ดังนั้นจึงควรทดลองทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้สารป้องกันความเย็นชนิดอื่นๆ เพิ่มเติม

6.2 ในการทดลองนี้ใช้จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นไม่ถึง 10^8 CFU/มล. ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดในการเตรียมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ดังนั้นในการทดลองต่อไป อาจจะทดลองทำกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งด้วยจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นที่สูง ว่าสามารถคงความมีชีวิตได้ดีหรือไม่

6.3 ในการทดลองนี้ใช้ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. ซึ่งถูกย่อยสลายได้รวดเร็วโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็ง ดังนั้นในการทดลองต่อไปอาจจะเพิ่มความเข้มข้นของสารประกอบ PAHs ให้มากขึ้น

6.4 ในการทดลองนี้เลือกใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งใส่ลงไปในดินอย่างเดียว ดังนั้นในการทดลองต่อไปอาจจะมีการใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ทำแห้งเยือกแข็งร่วมกับการเติมวัสดุการเกษตร โดยการปลูกเชื้อที่ทำแห้งเยือกแข็งลงวัสดุการเกษตรก่อน แล้วเมื่อเจริญได้ปริมาณเซลล์ที่มากแล้วค่อยเติมลงไปในดิน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน

6.5 การทำแห้งเยือกแข็งเป็นวิธีการเก็บรักษาแบคทีเรียที่รักษาความมีชีวิตได้นาน ดังนั้นในการทดลองต่อไปควรทดลองเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในระยะเวลาที่มากกว่า 6 เดือน และนำมาตรวจสอบความมีชีวิตและประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ควบคุมมลพิษ,กรม. 2545. สถานการณ์มลพิษด้านของเสียอันตราย. สรุปสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย พ.ศ.2545. กรุงเทพมหานคร : ที.พริ้นติ้ง.กรุ๊ป.

ควบคุมมลพิษ,กรม. 2548. รายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อม: บทสรุปสำหรับผู้บริหาร. สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม.

เกื้อ วงศ์บุญสิน. 2545. ประชากรกับการพัฒนา. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จิรทีปฆ์ แสนรัก. 2547. การย่อยสลายไพรีนและสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นโดยกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากใบพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม, สำนักงาน. 2549. รายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อม พ.ศ. 2549. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์วิฑูรย์การปก.

เสาวลักษณ์ อ้นเมฆ. 2550. การสลายไพรีนและฟีแนนทรีนที่ปนเปื้อนในดินโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Ashok, B. T., and Saxena, S. 1995. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, a review. J. Sci. Ind. Res. 54:443-451.

Bengtsson, G., and Zerhouni, P. 2003. Effects of carbon substrate enrichment and DOC concentration on biodegradation of PAHs in soil. J. Appl. Microbiol. 94:608–617.

Boving, T.B., and Zhang, W. 2004. Removal of aqueous-phase polynuclear aromatic hydrocarbons using aspen wood fibers. Chemosphere. 54:831-839.

Brand, J.J., and Diller, K.R. 2004. Application and theory of algal cryopreservation. Nova Hedwigia. 79 (1-2):175-189.

Charoenchang, N., Pinphanichakarn, P., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarn, S., and Juntongjin, K. 2003. Utilization of agricultural materials to enhance microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. J. Sci. Res. Chula. Univ. 28(1):1-13.

Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3:351–368.

Chavarri, F.J., De Paz, M., and Nuñez, M. 1998. Cryoprotective agents for frozen concentrated starters from non-bitter *Streptococcus Lactis* strain. Biotechnol. Lett. 10:11-16.

Chen, F.M. 1983. Binding of pyrene to DNA, base sequence specificity and its implication. Nucleic. Acids. Res. 11:7231-7250.

Costa, E., Usall, J., Teixido, N., Garcia, N., and Vinas, I. 2000. Effect of protective agents rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. J. Appl. Microbiol. 89(5):793-800.

Croan, S.C. 2000. Lyophilization of hypha forming tropical wood-inhabiting Basidomycotina. Mycologia. 92:810-817.

De Valdez, G.F., De Giori, G.S., De Ruiz Holgado, A.P., and Oliver, G. 1984. Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried Lactic Acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 49:413-415.

Daengrueng, P. 2005. Survival and PAHs degradative ability of *Sphingomonas* sp. strain P2 in PAHs contaminated soil after soil acclimatization. Thesis. Environmental Management. Chulalongkorn University.

Dyk, A., and Kangas, T. 2002. Lyophilized bioluminescent bacterial reagent for the detection of toxicants. [online]. http://www.freepatentsonline.com/5731163.html. Accessed 21 September 2002.

Edwards, A.V. 2001. Industrial & Municipal Wastewater Treatment Bioremediation, Composting. [online]. http://www.alken-murray.com. Accessed 25 November 2005.

Faust, R. A. 1998. Toxicity summary for pyrene [online]. http://rais.ornl.gov/tox/profiles/pyrene_c_V1.html. Accessed 13 Feburary 1998.

Gherna, R.L. 1994. Culture preparation, p. 278-292. *In* Gerhardt, p., Murray, R.G.E., Wood, W.A., and Krieg, N.R. Method for General and Molecular Biology. American Society for microbiology, Washington DC.

Guo, C.L., Zhou, H.W., Wong, Y.S., and Tam, N.F.Y. 2005. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. Mar. Pollut. Bull. 51:1054-1061.

Haderlein, A., Legros, R., and Ramsay, B. 2001. Enhancing pyrene mineralization in contaminated soil by the addition of humic acids or composted contaminated soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:555-559.

Haigh, S. D. 1996. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. Sci. Total Environ. 185:161-170.

Harold, M. 2004. On Food and Cooking: The Science and Lore of the Kitchen, Completely Revised and Updated. Scribner, New York.

Hupe, K., Luth, J.C., Heerenklage, J., and Stegmann, R. 1996. Enhancement of the biological degradation of soils contaminated with oil by the addition of compost. Acta. Biotechnol. 16:19-30.

IARC (International Agency for Research on Cancer). 1983. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 32:431-445.

Jacques, J.S.R., Okeke, C.B., Bento, M.F., Teixeira, S.A., Peralba, C.R.M., and Camargo, A.O.F. 2007. Microbial consortium bioaugmentation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. Biores. Technol. 99(7):2637-43.

Jacques, G., and Ratti Cristina, R. 2004. Effect of protectant stability properties on the viability of *Geotrichum candidum* RO294 after freeze-drying. [online]. http://asae.frymulti.com/abstract.asp?aid=16942&t=1. Accessed 31 September 2008.

Jain, R.K., Kapur, M., Labana, S., Lal, B., Sarma, P.M., Bhattacharya, D., and Thakur, I.S. 2005. Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. Curr. Sci. 89(1):101-112.

Kotula, A.W., Pierson, M.D., Emswiler, B. S., and Guilfoyle, J. R. 1979. Effect of sample transport systems on survival of bacteria in ground beef. Appl. Environ. Microbiol. 38(5):789-794.

Komukai-Nakamura, S., Sugiura, K., and Yamauchi-Inomata, Y., 1996. Construction of bacterial consortia that degrade arabian light crude oil. J. Ferment. Bioeng. 82(6):570-574.

Kurosawa, H., Endo, S., Hirano, T., Nakamura, K., and Amano, Y. 1997. Stabilization of freeze-dried *Thiobacillus thiooxidans* cells as a bacterial deodorant for removal of hydrogen sulfide. J. Ferment. Bioeng. 83 (2):213-15.

Lee, S., and Cutright, T. 1996. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. Biotechnol. 14(3):399-399

Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H., and Crowe, L.M. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. Appl. Environ. Microbiol. 61(10):3592–3597.

Liebermann, J., Dietl, J., Vanderzwalmen, P., and Tucker, M.J. 2003. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: Where are we now?. Reprod. Biomed. Online. 7(6):23-33.

Li, X., and Ricke, S.C. 2004. Comparison of cryoprotectants for *Escherichia coli* lysine bioavailability assy culture. J. Food. Process. 28(1): 39–50.

Luthy, R.G. 1997. Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. Environ. Sci. Technol. 31:3341-3347.

McGann, L.E. 1978. Differing actions of penetrating and non-penetrating cryoprotective agents. Cryobiology. 15:382–390.

Means, J.C., Wood, S.G., Hassett, J.J., and Banwort, W.L. 1980. Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. Environ. Sci. Technol. 14:1524-1528.

Melcher, R. J., Apitz, S. E., and Hemmingsen, B. B. 2002. Impact of irradiation and polycyclic aromatic hydrocarbon spiking in microbial populations in marine sediment for future aging and biodegradability studies. Appl. Environ. Microbiol. 68(6):2858-2868.

Moorthy, B., and Randerath, K. 1997. Pentachlorophenol enhances 9-hydroxybenzo[a]pyrene-induced hepatic DNA adduct formation *in vivo* and inhibits microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase activities *in vitro*: likely inhibition of epoxide detoxication by pentachlorophenol. Arch. Toxicol. 70:696-703.

Morgan, C. A., N. Herman, P. A. White, and G. Vesey. 2006. Preservation of microorganisms by drying: a review. J. Microbiol. Methods. 66:183-193.

Nadarajah, N., Hamme, J. B., Pannu, J., Sungh, A., and Ward, O. 2002. Enhanced transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons using a combined Fenton's reagent, microbial treatment and surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 540-544.

Nam, K., and Kukor, J. J. 2000. Combined ozonation and biodegradation for remediation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Biodegradation. 11:1-9.

Ozaki, S., Kishimoto, N., and Fujita, T. 2007. Change in the predominant bacteria in a microbial consortium cultured on media containing aromatic and saturated hydrocarbons as the sole carbon source. Microbes. and Environ. 22(2):128-135.

Patnaik, P. 1992. Hydrocarbon, Aromatic. p 429-445. *In* A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substrances. Van Nortrand Reinhold, New York.

Pignatello, J.J., and Xing, B. 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. Environ. Sci. Technol. 30:1-11.

Pattanasupong, A., Nagase, H., Sugimoto, E., Hori, Y., Hirata, K., Tani, K., Nasu, M., and Miyamoto, K. 2004. Degradation of carbendazim and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by immobilized consortium on loofa sponge. J. Biosci. Bioeng. 98(1):28-33.

Reyes, C., Sigman, M. E., Arce, R., Barbas, J. T., and Dabestani, R. 1998. Photochemistry of acenaphthene at a silica gel/air interface. J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. 122:277-283.

Sax, N. I., and Lewis, R. L. 1987. Hawley's Condensed Chemical Dictionary. Van Nostrand Reinhold Company, New York.

Sembries, S., and Crawford, R., 1997. Production of *Clostridium bifermentans* spores as inoculum for bioremediation of nitroaromatic contaminants. Appl. Environ. Microbiol. 63:2100-2104.

Shin, H.P., Lee, H.S., and Lee, H.K. 2001. Preservation of marine heterotrophic bacteria by Using a Deep-freezing Method. J. Microbiol. 39:240-243.

Sims, R.C., and Overcash, M.R., 1983. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant system. Res. Rev. 88:1-68.

Sims, J.LO., Sims, R.C., and Matthews, J.E. 1990. Approach to bioremediation of contaminated soil. Hazard. Wast. Hazard. Mat. 7:117-149.

Shinohara, Y.M., Imaizumi, T., Sukenobe, J., Murakami, Y., Kawamura, S., and Komatsu, Y. 2000. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. Cryobiology. 41:251–255.

Schoug, A.,Olsson, J.O., Carlfors, J., Schnürer, J., and Håkansson, S. 2006. Freeze-drying of *Lactobacillus coryniformis* Si3 effects of sucrose concentration, cell density, and freezing rate on cell survival and thermophysical properties. Cryobiology. 53:119-127.

Steponkus, P. L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. Annu. Rev. Plant Physiol. 35:543-584.

Steponkus, P. L., and Webb, M.S. 1992. Freeze-induced dehydration and membrane destabilization in plants. p. 338-362. *In* Somero, G. N. ,Osmond, C. B., and Boils, C.L. *In* Water and Life: Comparative analysis of water relationships at the organismic, Cellular and Molecular Level. Springer-Verlag, Berlin.

Tauriainen, S.M., Virta, M.P.J., and Karp, M.T. 2000. Detecting bioavailable toxic metals and metalloids from natural water samples using luminescent sensor bacteria. Wat. Res. 34:2661-2666.

Trsic-Milanovic, N., Kodzic, A., Baras, J., and Dimitrijevic-Brankovic, S. 2001. The influence of a cryoprotective medium containing glycerol on the lyophilization of lactic acid bacteria. J.Serb.Chem.Soc. 66(7):435–441.

Trejo, M.R. and Quintero, R. 2000. Bioremediation of contaminated soil. p. 179-189. Eugeni, J.O., Gloria, S. and Elizabeth, S. (eds), Environmental Biotechnology and Cleaner Bioprocess. Tayler and Francis Limited, London.

Trzesicka-Mlynarz, D. T., and Ward, O. P. 1996. Degradation of fluoranthrene in a soil matrix by indigenous and introduced bacteria. Biotechol. Lett. 18:181-186.

Tserovska, L., and Dimkov, R. 1998. Degradation of dimethylterephthalate by naturally formed microbial associations 169AC and 189 AC. J, culture collections. 2:10-14.

Tzovenis, I., Triantaphyllidis, G., Naihong, X., Chatzinikolaou, E., Papadopoulou, K., Xouri, G., and Tafas, T. 2004. Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquaculture food chain. Aquacult. 230:457-473.

Uemura, M., Joseph, R. A., and Steponkus, P.L. 1995. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 109:15-30.

U.S. EPA. 1987. Health and environmental effects profile for phenanthrene: The environmental criteria and assessment office, office of health and environmental assessment, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, for the office of solid waste and emergency response ECAO-CIN-P226.

Van Hamme, J.D., and Ward, O.P. 2001. Physical and metabolic interactions of Pseudomonas sp. strain JA5-B45 and Rhodococcus sp. strain F9-D79 during growth on crude oil and effect of a chemical surfactant on them. Appl. Environ. Microbiol. 69:4874-4879.

Vidali, M. 2001. Bioremediationn and overview. Pure. Appl. Chem. 73(7): 1163-1172.

Van Veen, J. A., Van Overbeek, L. S., and Van Elsas, J. D. 1997. Fate and activity of microorganisms into soil. Microbiol. Mol. Biol. Reviews. 61:121-135.

Verchot, L.V., 1999. Cold storage of a tropical soil decrease nitrification potential. Soil. Sci.Soc. Am. J. 63:19421-944.

Verschueren, K. 1997. Handbook of environmental data on organic chemicals. p. 596-599. Thomson publishing, New York.

Warner, S. D., Farant, J. P., and Butler, I. S. 2004. Photochemical degradation of selected nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in solution and adsorbed to solid particles. Chemosphere. 54:1207-1215.

Wilson, S. C., and Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). A review. Environ. Pollut. 81: 229-249.

Yamana, K., Iwai, T., and Nakano, H. 2000. Synthesis of oligonucleotide derivatives containing bis-pyrene residue in the main chain. Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 44:27-28.

Ying, C. Q., Hui, M. C., Tang, W. Q., Yun, Z. Q., Katsoyiannis, A., and Férard, J. F. 2007. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated sewage sludge by different composting processes. J. Hazard. Mater. 142: 535-542.

Yu, S.H., Ke, L., Wong, Y.S., and Tam, N.F.Y. 2005. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. Environ. Inter. 31:149-154.

Yudkin, J., Edelman, J., and Hough, L. 1973. Sugar-chemical, biological and nutritional aspects of sucrose. The Butterworth Group, Arizona.

Zhang, S. A., Schisler, D. A., Boehm, M. J., and Slininger, P. J. 2005. Carbon-to-nitrogen ratio and carbon loading of production media influence freeze-drying survival and biocontrol efficacy of *Cryptococcus nodaensis* OH 182.9. Phytopathology. 95(6):626-631.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโทน (tryptone)	10.0 กรัม
สารสกัดจากผงยีสต์ (yeast extract)	5.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. **อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง** Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหาร LB เหลว และใส่วุ้น (Bacto agar) 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

3. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM)

ก.

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0 กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	5.5 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8 กรัม

ข.

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.01 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	0.005 กรัม
เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3.6H_2O$)	0.005 กรัม

ละลายส่วนผสมก. ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในส่วนของสารละลาย ข. ทำการเตรียมแยกสารแต่ละชนิดทำให้ปลอดเชื้อโดยผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตทขนาด 0.46 ไมโครเมตร แล้วจึงค่อยเติมลงในสารละลาย ก. ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

4. **อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง** Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM agar)

เตรียมอาหารเช่นเดียวกับการเตรียม CFMM แต่ใส่แบคโตอะการ์ 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร ลงไปในสารละลายส่วน ก. และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้จนอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลายส่วน ข

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มล. ใส่สารละลายในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล. ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3. สารละลาย Triton X-100 15%

ปิเปต Triton X-100 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 85 มล. ผสมให้เข้ากันบนเครื่องคนแม่เหล็กที่มีการให้ความร้อน

4. 70% เอธานอล

ละลายเอธานอลสัมบูรณ์ ปริมาตร 700 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร

5. กลีเซอรอล

นำกลีเซอรอลมานึ่งฆ่าเชื้อด้วย อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกรอบหนึ่ง

6. สารปฏิชีวนะ

ชั่งนิสเตติน (Nystatin) 40 มิลลิกรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 1 มิลลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป PTFE ขนาดรูกว้าง 0.2 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7. สารละลายฟีแนนทรีนและไพรีนในไดเมทิลซัลฟอกไซด์

ชั่งฟีแนนทรีนและไพรีนอย่างละ 0.05 กรัม เติมสารไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 10 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม จากนั้นกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ เก็บสารละลาย PAHs ในขวดสีชาหรือห่อด้วยฟอยล์ให้มิดชิด ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ เติมลงในอาหารเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

8. สารละลายฟีแนนทรีนและไพรีนในอะซีโตน

ชั่งฟีแนนทรีนและไพรีนอย่างละ 0.05 กรัม ละลายในอะซีโตนปริมาตร 10 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม กรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร

หมายเหตุ ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ เนื่องจากอะซีโตนระเหยเร็วมาก การเติม PAHs ในดินควรเติมอย่างรวดเร็ว เพราะอะซีโตนระเหยอย่างรวดเร็วมาก อาจทำให้ความเข้มข้น PAHs เปลี่ยนแปลงได้

9. สารป้องกันความเย็น 24% ซูโครส

ชั่งซูโครส 24 กรัม ละลายในน้ำ 100 มล. และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

10. สารป้องกันความเย็น 20% นมปลอดมันเนย

ชั่งนมปลอดมันเนย 20 กรัม ละลายในน้ำ 100 มล. และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

11. สารป้องกันความเย็น 10% ไดเมธิลซัลฟอกไซด์

ปิเปตไดเมธิลซัลฟอกไซด์ 10 มล. ละลายในน้ำ 100 มล. และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวประภัสสร ปานมีทรัพย์ เกิดเมื่อวันที่ 23 มิถุนายน พ.ศ.2526 ที่จังหวัดนครปฐม สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2547 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย