บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA.
2. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA.
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench – top centrifuge) รุ่น D-7200 ของบริษัท GS, Germany.
4. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan.
5. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ "ISSCO" laminar flow รุ่น BVT –124 ของบริษัท International Sciencetific Supply, USA.
6. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 100 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Drummond Scientific, USA.
7. หัวกรอง ชนิด PTFE ขนาดความขว้างของรู 0.20 และ 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC – 13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
8. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มล. ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
9. ปิเปต (pipette) ขนาด 100, 1000 และ 5000 มล. ของบริษัท Gilson, France.
10. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Sciencetific Industris, USA.
11. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
12. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น Hereaus type B 5050 E ของบริษัท Hereaus, Germany.
13. ชุดเครื่องมือทำไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC) สำหรับตรวจสอบปริมาณของ PAHs
    - ลิควิดโครมาโตกราฟี (liqiud chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - คอลัมน์ (column) : Inertsil ODS – 3 ขนาด 4.6 x 150 มม. ของบริษัท GL Sciences, Japan.
    - เครื่องตรวจสอบ (UV – visible detector) รุ่น SPD – 2A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

- เครื่องบันทึก (recorder) Chromatopac รุ่น C-R1A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
- กระบอกฉีดยา (microsyringe) ขนาด 100 ไมโครลิตร รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, USA.

14. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
15. เครื่องคัดกรองขนาดดิน ขนาดความกว้างของรู 0.84 และ 1.18 มม รุ่น O.S.K. 119 Standard Sieve ของบริษัท Okawa Seiki, Japan.
16. เครื่องปั่น (blender) รุ่น MX – T31GH ของบริษัท Matsushita Electric, Taiwan.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เคมีภัณฑ์

1. ฟีแนนทรีน (phenanthrene) ของบริษัท Sigma, USA.
2. ฟลูออแรนธีน (fluoranthene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
3. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
4. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
5. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E.Merck, Germany.
7. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
8. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
9. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
10. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSo_4.7H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
11. เฟอรัสคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) ของบริษัท May & Baker, England.
12. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E.Merck, Germany.
14. เมทานอล (CH_3OH) ของบริษัท E.Merck, Germany.
15. เอธิลอะซีเตต ($CH_3COOC_2H_5$) ของบริษัท E.Merck, Germany.
16. ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) ของบริษัท Mallinckrodt, France.
17. ไดเอทธิลอีเทอร์ ((C_2H_5)O) ของบริษัท E.Merck, Germany.
18. อะซีโตน (CH_3COCH_3) ของบริษัท E.Merck, Germany.
19. แบคโตอการ์ (bacto agar) ของบริษัท Difco, USA.
20. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท E.Merck, Germany.
21. ไซโคลเฮกซามีด (cyclohexamide) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.
22. น้ำตาลกลูโคส (glucose) ของบริษัท E.Merck, Germany.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 เตรียมดินและวัสดุจากการเกษตรที่ใช้คัดเลือก

3.1.1 การเตรียมดิน

เก็บตัวอย่างดินในปริมาณมากพอจากบริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อนจากสารเคมีมาก่อนบริเวณเนินเขาในป่า อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี โดยขุดดินลึกจากผิวประมาณ 15 ซม. แยกเศษใบไม้ และหินออก ตรวจสอบการปนเปื้อนสาร PAHs โดยการสกัดและวิเคราะห์ด้วย HPLC แบ่งดินประมาณ 0.5 กิโลกรัมไปวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมี ส่วนดินที่เหลือนำมาคัดกรอง โดยใช้เครื่องคัดกรองขนาดดินเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.18 มม. แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จนกว่าจะทำการทดลอง และเมื่อเริ่มต้นทดลองจะนำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนที่จะนำมาใช้ในการทดลอง

3.1.2 การเตรียมวัสดุจากการเกษตร

วัสดุการเกษตรที่ใช้ในการคัดเลือกได้แก่ ฟางข้าว เปลือกถั่ว และใบจามจุรี

- ฟางข้าว เก็บมาจากกองฟางบริเวณทุ่งนา อำเภอบ้านไร่ จังหวัดราชบุรี ซึ่งฟางข้าวมีลักษณะแห้ง และเก่า

- เปลือกถั่ว ซื้อจากแผนกขายอุปกรณ์การเกษตร ในศูนย์การค้าคาร์ฟู บางแค กรุงเทพฯ เปลือกถั่วมีลักษณะแห้ง เก่า

- ใบจามจุรี เก็บมาจากบริเวณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเลือกเก็บใบจามจุรีที่ร่วงจากต้น และมีลักษณะแห้ง

ลักษณะของวัสดุการเกษตรที่นำมาใช้ในการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.1 โดยนำวัสดุการเกษตรทั้ง 3 ชนิดมาปั่น และคัดกรองโดยใช้เครื่องคัดกรองขนาดดิน ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.84 มม. และแบ่งวัสดุการเกษตรแต่ละชนิดประมาณ 0.5 กิโลกรัม สำหรับนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. จนกว่าจะทำการทดลอง และเมื่อเริ่มต้นทดลองจะนำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาทำการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.1 แสดงวัสดุการเกษตรที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ฟางข้าว เปลือกถั่ว และใบจามจุรี

3.2 ศึกษาลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินและวัสดุจากการเกษตร

3.2.1 นำตัวอย่างดิน 0.5 กิโลกรัม ส่งวิเคราะห์ที่ฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เพื่อวิเคราะห์

ลักษณะเนื้อดิน

ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุหรือไอออน (cation exchange capacity)

ความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (maximum water holding capacity)

และภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน เพื่อวิเคราะห์

ค่าความเป็นกรดด่าง

ปริมาณไนโตรเจน

ปริมาณฟอสฟอรัส

ปริมาณโพแทสเซียม

สารอินทรีย์

สารอินทรีย์คาร์บอน

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

โดยทำการวิเคราะห์เพื่อจำแนกลักษณะและส่วนประกอบของดินที่นำมาใช้ในการทดลอง

3.2.2 นำตัวอย่างวัสดุการเกษตรชนิดละ 0.5 กิโลกรัมส่งวิเคราะห์ที่ฝ่ายวิเคราะห์ปุ๋ย กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตรเพื่อวิเคราะห์

ค่าความเป็นกรดด่าง

เปอร์เซ็นต์ความชื้น

ปริมาณไนโตรเจน

สารอินทรีย์คาร์บอน

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

ปริมาณฟอสฟอรัส

ปริมาณโพแทสเซียม

โดยทำการวิเคราะห์เพื่อเป็นการจำแนกและทราบส่วนประกอบของวัสดุที่นำมาใช้ในการคัดเลือก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 คัดเลือกวัสดุการเกษตรที่สามารถเร่งการสลายสาร PAHs ในดิน

3.3.1 นำดินที่เตรียมไว้มาบรรจุลงในขวดแก้ว (vial) ปลอดเชื้อขนาด 23 x 85 มม. มีฝาเกลียวปิด แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 5 ชุดดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ใช้ดินปลอดเชื้อ เป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาการสลายของ PAHs เมื่อปราศจากปัจจัยทางชีวภาพจากดิน ใช้ดิน 2 กรัม บรรจุลงในขวดแก้วฝาเกลียว นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 45 นาที วันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกัน ทดสอบความปลอดเชื้อของดินก่อนนำมาใช้ในการทดลองโดยเพาะเชื้อจากดินบนอาหารแข็ง LB (Luria Bertani, LB agar)

ชุดการทดลองที่ 2 ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อ เป็นชุดควบคุมชุดที่ 2 เพื่อศึกษาความสามารถของสิ่งมีชีวิตในดินในการย่อยสลาย PAHs โดยใช้ดิน 2 กรัมบรรจุลงในขวดแก้วฝาเกลียวเหมือนข้อ 1

ชุดการทดลองที่ 3 ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมฟางข้าวในอัตราส่วน 9 : 1 ชั่งดินหนัก 1.8 กรัมผสมฟางข้าว 0.2 กรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมเปลือกถั่วในอัตราส่วน 9 : 1 ชั่งดินหนัก 1.8 กรัมผสมเปลือกถั่ว 0.2 กรัม

ชุดการทดลองที่ 5 ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมใบจามจุรีในอัตราส่วน 9 : 1 ชั่งดินหนัก 1.8 กรัมผสมใบจามจุรี 0.2 กรัม

ชุดทดลองที่ 3, 4 และ 5 มีจุดมุ่งหมายเพื่อหาอัตราการย่อยสลาย PAHs ในดินโดยมีวัสดุการเกษตรที่ต้องการคัดเลือกแต่ละชนิดเป็นตัวเร่งการย่อยสลาย

ชุดที่ 1, 2 และชุดที่ 3, 4 , 5 ก่อนที่จะผสมวัสดุการเกษตรดังกล่าว จะเติมฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธีน และไพรีน ในรูปสารละลายในอะซีโตน โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 มก. ต่อดิน 1 กรัม หลังจากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืนเพื่อให้อะซีโตนระเหยหมดไป จากนั้นเติมฟางข้าว หรือเปลือกถั่ว หรือใบจามจุรี ในชุดการทดลองที่ 3, 4 และ 5 ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องปั่นผสม หลังจากนั้นปรับความชื้นของดินผสมให้มีค่าเท่ากับ 60 % ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำโดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปในชุดการทดลองต่าง ๆ ให้มีน้ำหนักตรงกับค่าที่คำนวณจากความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำที่ได้จากการวิเคราะห์ ในทุกชุดการทดลอง จากนั้นผสมดินในขวดด้วยการปั่นบนเครื่องปั่นผสมอีกครั้ง นำขวดไปบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °ซ ในที่มืด เก็บตัวอย่างทุก 0, 14, 28 และ 42 วัน นำมาสกัดและ

วิเคราะห์ปริมาณสาร PAHs ทั้ง 3 ชนิดที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำทั้ง 5 ชุด เปรียบเทียบอัตราการย่อยสลาย PAHs ในการใช้วัสดุการเกษตรทั้ง 3 ชนิด

3.3.2 หาปริมาณสาร PAHs ในดินโดยการสกัดและวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC (Juhasz และคณะ, 1997)

เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส 2 กรัมลงในขวดแก้วบรรจุดินเพื่อกำจัดน้ำในดินแล้วเติมไดคลอโรมีเทนปริมาตร 3 มล. ปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นผสม ด้วยความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำขวดแก้วไปจุ่มในอ่างกำเนิดเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนไดคลอโรมีเทนมาเก็บไว้ และสกัดดินในขวดแก้วด้วยไดคลอโรมีเทนอีก 2 ครั้งที่สภาวะเดิม รวบรวมส่วนไดคลอโรมีเทนทั้งหมดไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน ละลายสาร PAHs ที่สกัดได้ในขวดด้วยเมธานอลปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปวัดปริมาณฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธีน และไพรีนด้วยวิธี HPLC ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟีที่ใช้คอลัมน์ Inertsil ODS-3 ขนาด 4.6 x 150 มม. ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 40° ซ. ตรวจสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย 80 เปอร์เซ็นต์เมธานอล (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) เป็นสารละลายตัวพา และใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1 มล. ต่อนาที

ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธีน และไพรีน ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้กระบอกฉีดขนาด 100 ไมโครลิตร รุ่น MS – 100 นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ ในแต่ละตัวอย่างไปเทียบหาเปอร์เซ็นต์ของฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธีน และไพรีนที่เหลืออยู่ จากวันที่เริ่มต้นการทดลอง

หมายเหตุ ในการฉีดวิเคราะห์โดยวิธี HPLC แต่ละครั้งต้องฉีดสารมาตรฐานจนกว่าจะได้ค่า retention time (Rt) ที่คงที่ ก่อนฉีดสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธีน และไพรีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 ศึกษาการเร่งการย่อยสลายสาร PAHs โดยวัสดุการเกษตรที่คัดเลือกได้

เมื่อคัดเลือกวัสดุที่สามารถเร่งการย่อยสลายสารฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธีน และไพรีน ได้จากการทดลองในข้อ 3.3 จะนำวัสดุการเกษตรที่ได้มาศึกษาปัจจัยที่ทำให้เกิดการย่อยสลายสารดังกล่าวในดิน โดยทำการทดลองเพื่อทดสอบปัจจัยทั้งทางกายภาพ และชีวภาพ(Kastner และ Mahro, 1996)

3.4.1 ใช้วัสดุการเกษตรที่คัดเลือกได้มาทำการทดลองดังต่อไปนี้

1.ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสาร PAHs ในดินเมื่อไม่มีปัจจัยทางชีวภาพโดยการทดลองใช้ดินปลอดเชื้อ หรือเมื่อมีปัจจัยทางชีวภาพ โดยใช้ดินไม่ปลอดเชื้อ

2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสาร PAHs ในดินผสมวัสดุการเกษตรที่คัดเลือก เมื่อไม่มีปัจจัยทางชีวภาพเปรียบเทียบกับเมื่อมีปัจจัยทางชีวภาพ โดยใช้ดินปลอดเชื้อผสมวัสดุที่คัดเลือกปลอดเชื้อ เปรียบเทียบกับดินไม่ปลอดเชื้อผสมวัสดุที่คัดเลือกไม่ปลอดเชื้อ

3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสาร PAHs ในดินผสมวัสดุการเกษตรที่คัดเลือก เมื่อมีปัจจัยทางชีวภาพจากดินหรือจากวัสดุที่คัดเลือก โดยใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมวัสดุที่คัดเลือกปลอดเชื้อเปรียบเทียบกับดินปลอดเชื้อผสมวัสดุที่คัดเลือกไม่ปลอดเชื้อ

โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 ชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ดินปลอดเชื้อ

ชุดการทดลองที่ 2 ดินไม่ปลอดเชื้อ

ชุดการทดลองที่ 3 ดินปลอดเชื้อผสมวัสดุที่คัดเลือกปลอดเชื้อ

ชุดการทดลองที่ 4 ดินปลอดเชื้อผสมวัสดุที่คัดเลือกไม่ปลอดเชื้อ

ชุดการทดลองที่ 5 ดินไม่ปลอดเชื้อผสมวัสดุที่คัดเลือกปลอดเชื้อ

ชุดการทดลองที่ 6 ดินไม่ปลอดเชื้อผสมวัสดุที่คัดเลือกไม่ปลอดเชื้อ

อัตราส่วนผสมระหว่างดินต่อวัสดุการเกษตรเท่ากับ 9 ต่อ 1 (ดิน 1.8 กรัม ต่อวัสดุการเกษตร 0.2 กรัม) วิธีการทดลอง และสภาวะที่ใช้ในการทดลองทำเช่นเดียวกับการทดลองคัดเลือกวัสดุการเกษตร (ข้อ 3.3) เก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0, 14, 28 และ 42 โดยทำชุดการทดลองละ 2 ซ้ำ นำมาสกัด และวิเคราะห์ปริมาณสาร PAHs ทั้ง 3 ชนิดที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC ดังข้อ 3.3.2 ส่วนชุดการทดลองที่มีปัจจัยทางชีวภาพนำมาวัดการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี viable plate count

3.4.2 การตรวจหาจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในดิน

เพื่อให้ทราบจำนวนและกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายในระหว่างเวลาที่ทดลอง จึงได้ตรวจหาปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียที่ย่อยสลายสาร PAHs โดยได้กำหนดให้แบคทีเรียที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ เป็นตัวแทนแบคทีเรียดังกล่าว และเชื้อรา ในชุดการทดลองที่ศึกษาปัจจัยทางชีวภาพ โดยทำการทดลองดังนี้

การตรวจหาแบคทีเรีย นำดินหรือดินผสมวัสดุการเกษตรมาละลายในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมากระจายเชื้อลงบนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) โดยวิธี spread plate บ่มเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 30°ซ

การตรวจหาแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน (phenanthrene-degrading bacteria) นำดินหรือดินผสมวัสดุการเกษตรมาละลายในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมากระจายเชื้อ โดยวิธี spread plate ลงบนอาหารแข็ง Carbon Free Mineral Medium (CFMM) ซึ่งเติมไซโคลเฮกซามีดเข้มข้น 200 มก.ต่อลิตร เพื่อฆ่าเชื้อรา และพ่นทับผิวหน้าอาหารแข็ง CFMM ด้วยสารละลายฟีแนนทรีนในไดเอธิลอีเทอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) บ่มเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 30°ซ. แบคทีเรียที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนได้จะเห็นเป็นโคโลนีมีบริเวณใสล้อมรอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ประมาณ 2 สัปดาห์ หลังจากเริ่มบ่มเชื้อ

การตรวจหาเชื้อรา โดยการนำดินหรือดินผสมวัสดุการเกษตรมาละลายในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ และเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมากระจายเชื้อ โดยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง Rose Bengal (RB) บ่มเชื้อที่ 30°ซ.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 ศึกษาความสามารถในการลดการดูดซับสาร PAHs ในดินของวัสดุการเกษตรที่คัดเลือก

สาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดินเป็นเวลานานจะถูกดูดซับให้จับอยู่ในอนุภาคดินเป็นผลให้มีความจำกัดในการย่อยสลายทางชีวภาพ และมีผลต่อปริมาณสาร PAHs ที่สกัดได้จากดินเมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (Kastner และ Mahro, 1996) ดังนั้นจึงได้ตรวจหาปริมาณสาร PAHs ที่สกัดได้จากในดินตามวิธีของ Hatzinger และ Alexander (1995) โดยใช้วัสดุการเกษตร และดินผสมวัสดุการเกษตรที่คัดเลือกที่มีระยะเวลาการปนเปื้อนที่ต่างกัน โดยออกแบบการทดลองดังนี้

3.5.1 ศึกษาการดูดซับของสาร PAHs ในดิน และในดินผสมวัสดุการเกษตร

โดยหาปริมาณฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธีน และไพรีน ที่สกัดได้จากดิน เปรียบเทียบกับดินผสมวัสดุการเกษตรที่คัดเลือกซึ่งทั้งสองชุดการทดลองไม่มีปัจจัยทางชีวภาพ

ชุดการทดลองที่ 1 ดินปลอดเชื้อ โดยนำดินปลอดเชื้อ 2 กรัม ใส่ขวดแก้วฝาเกลียว เติมสาร PAHs ทั้ง 3 ชนิด ความเข้มข้นชนิดละ 0.1 มก. ต่อดิน 1 กรัมผสมด้วยเครื่องปั่นผสม บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. ในที่มืด เป็นระยะเวลา 0, 21, 40 และ 60 วัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำนำมาสกัดและหาปริมาณสาร PAHs ด้วย HPLC ตามวิธีในข้อ 3.3.2

ชุดการทดลองที่ 2 ดินผสมวัสดุการเกษตร นำดินปลอดเชื้อ 1.8 กรัมใส่ขวดแก้วฝาเกลียว เติมสาร PAHs ทั้ง 3 ชนิด ความเข้มข้นชนิดละ 0.1 มก. ต่อดิน 1 กรัม ผสมด้วยเครื่องปั่นผสม นำมาเติมวัสดุการเกษตรปลอดเชื้อแล้วผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. ในที่มืด เป็นระยะเวลา 0, 7, 14, 21,40 และ 60 วัน นำมาสกัดและหาปริมาณสาร PAHs ด้วย HPLC ตามวิธีในข้อ 3.3.2 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.5.2 ศึกษาการช่วยลดการดูดซับสาร PAHs เมื่อเติมวัสดุการเกษตรลงในดินที่ปนเปื้อน PAHs มาเป็นระยะเวลานาน

โดยหาปริมาณฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธีน และไพรีน จากดินที่ปนเปื้อน PAHs มาเป็นระยะเวลานาน ผสมวัสดุการเกษตร

นำดินปลอดเชื้อ 1.8 กรัม ทำให้ปนเปื้อนสาร PAHs ทั้ง 3 ชนิด ความเข้มข้นชนิดละ 0.1 มก. ต่อดิน 1 กรัม มาเป็นระยะเวลานานต่างกัน คือ 0, 20, 40, 60 และ 80 วัน นำมาเติมวัสดุการเกษตรปลอดเชื้อผสมด้วยเครื่องปั่นผสม โดยทำชุดการทดลองละ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. ในที่มืด อีกเป็นระยะเวลา 60 วัน นำมาสกัดและหาปริมาณสาร PAHs ด้วย HPLC ตามวิธีในข้อ 3.3.2

3.5.3 ศึกษาการดูดซับสารฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธีน และไพรีน ของวัสดุการเกษตรโดยเปรียบเทียบปริมาณสาร PAHs ที่สกัดได้จากเปลือกถั่ว และใบจามจุรี

นำเปลือกถั่วปลอดเชื้อ และใบจามจุรีปลอดเชื้อ ชนิดละ 0.5 กรัม ใส่ขวดแก้วฝาเกลียว เติมสาร PAHs ทั้ง 3 ชนิด ความเข้มข้น 0.2 มก. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสม บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. ในที่มืด เป็นระยะเวลา 0, 20, 40, 60 และ 80 วันนำมาสกัดและหาปริมาณสาร PAHs ด้วย HPLC ตามวิธีในข้อ 3.2.2

3.6 ศึกษาลักษณะพื้นผิวของเปลือกถั่ว และใบจามจุรี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบ Scanning Electron Microscope (S. E. M.)

โดยนำเปลือกถั่ว และใบจามจุรีที่บดและร่อนแล้ว ไปศึกษาลักษณะพื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยวิธี S.E.M. โดยนำชิ้นส่วนของเปลือกถั่ว และใบจามจุรีฉาบติดกับแผ่นทอง และส่องดูลักษณะพื้นผิวภายใต้กล้อง S.E.M. ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเลือกถ่ายภาพที่กำลังขยาย 1,500 เท่า และ 3,500 เท่า ทั้งใบจามจุรีและเปลือกถั่ว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย