การย่อยสลายไพรีนที่ปนเปื้อนในดินด้วยกลุ่มแบคทีเรียไฮโดรโฟบิก STK ที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืช

นางสาวดาริกา ลาสุดตา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

PYRENE DEGRADATION IN CONTAMINATED SOIL BY HYDROPHOBIC BACTERIAL CONSORTIUM STK PREPARED IN PLANT WASTE MATERIALS

Miss Darika Lasudta

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 2011

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การย่อยสลายไพรีนที่ปนเปื้อนในดินด้วยกลุ่มแบคทีเรียไฮโดรโฟบิก STK ที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืช
โดย	นางสาวดาริกา ลาสุดตา
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

…… อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

…… กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

…… กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริโฉม ทุ่งเก้า)

ดาริกา ลาสุดตา: การย่อยสลายไพรีนที่ปนเปื้อนในดินด้วยกลุ่มแบคทีเรียไฮโดรโฟบิก STK ที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืช (PYRENE DEGRADATION IN CONTAMINATED SOIL BY HYDROPHOBIC BACTERIAL CONSORTIUM STK PREPARED IN PLANT WASTE MATERIALS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.ดร. กาญจณา จันทองจีน, 93 หน้า

STK เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำสามารถเข้าจับกับสารกลุ่ม PAHs ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำเช่นกันได้ พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าการย่อยสลายไพรีนในดินโดยแบคทีเรียนี้ยังเกิดได้ไม่ดีนัก งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งและในรูปแบบสเลอรีด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ในรูปเซลล์อิสระกับชนิดที่ตรึงบนเศษใบไม้ เมื่อเติมแบคทีเรียที่ตรึงบนเศษใบไม้ในดินภาวะของแข็งสามารถลดปริมาณไพรีนเป็น 4.08% ในเวลา 28 วัน ส่วนการย่อยไพรีนในดินภาวะสเลอรีนั้นหลังการย่อย 10 วัน พบปริมาณไพรีนเหลือในส่วนวัฏภาคดินและน้ำประมาณ 0.24% และ 6.83% ตามลำดับ สำหรับการเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ในรูปเซลล์อิสระนั้นไม่พบการย่อยไพรีนในระบบดินภาวะของแข็ง โดยหลังการย่อย 28 วัน เหลือไพรีน 66.89% เทียบกับชุดควบคุมที่เหลืออยู่ 76% แต่หากย่อยในระบบสเลอรีนั้นจะเหลือปริมาณไพรีนอยู่ที่ 18.21% และ15.04% ในเฟสดินและน้ำตามลำดับที่ 10 วันของการย่อย การเก็บกลุ่มจุลินทรีย์นี้ไว้ใช้ในระยะยาวทำโดยการเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK บนวัสดุเหลือใช้จากพืช 14 วัน ลดความชื้นเป็น 30% แล้วทำแห้งแบบเยือกแข็ง จากนั้นนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 9 เดือน ในระหว่างนั้นนำตัวอย่างมาตรวจสอบการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งและหาจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดที่ยังเหลือตามระยะเวลาที่เก็บที่เดือนที่ 0 3 6 และ 9 พบว่าหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็งมีปริมาณไพรีนในดินที่ทดสอบเหลืออยู่ 2.08%, 49.96%, 51.80% และ 58.49% ในขณะที่มีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ 9.34, 7.59, 7.57 และ 7.15 log CFU ต่อกรัม ภายหลังการเก็บนาน 3, 6 และ 9 เดือนตามลำดับ

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อ .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

##5172290023: MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEYWORD: PLANT WASTED MATERIAL/PYRENE/SOIL

DARIKA LASUDTA: PYRENE DEGRADATION IN CONTAMINATED SOIL BY HYDROPHOBIC BACTERIAL CONSORTIUM STK PREPARED IN PLANT WASTE MATERIALS. ADVISOR: ASSOC. PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D, CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. KANCHANA JUNTONGJIN, Ph.D, 93 pp.

STK is a bacterial consortium with hydrophobic in nature render them to bind to polycyclic aromatic hydrocarbons via their hydrophobicities. This consortium is able to utilize pyrene as carbon and energy sources, however pyrene degradation by the consortium in soil was limited. The aim of the present study is to focus on pyrene degradation in soil on solid state in comparison with that of slurry state in both free cell system and immobilized cell system. The latter, cells were immobilized onto mixed leaves. After 28 days of incubation, the immobilized system showed a 4.08 % of pyrene remained in solid soil while 0.24% and 6.83% remained in aqueous phases of the slurry system after 10 days. In the case of free cell, less degradation was observed in solid soil as the result showed that amount of pyrene remained after 28 days of incubation was 66.89% comparing to control of 76%. While in the slurry system, the amounts of pyrene remained were 18.21% and 15.04 % in solid and aqueous phases, respectively, after 10 days of incubation. In term of long term storage, the immobilized STK was grown on plant waste materials for 14 days, moisture content was adjusted to 30% followed by packed under vacuum and store at the room temperature for 9 months. Periodically samples were taken and determined for pyrene degradation activities and bacterial viabilities at 0, 3, 6 and 9 months. Under the above circumstances, number of viable cells and amount of pyrene remained were found to be 9.23 log CFU/g and 2.08%, 7.59 log CFU/g, 49.96%, 7.57 log CFU/g, 51.80% and 7.15 log CFU/g, 58.49% in 3, 6 and 9 months, respectively.

Department : Microbiology Student's Signature .....
Field of Study : Industrial Microbiology Advisor's Signature .....
Academic Year : 2011 Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ด้วยดี โดยความช่วยเหลือของ รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้และคำแนะนำต่างๆ ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เป็นไปในทางที่ถูกต้อง ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านอื่นๆ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ มากมายในการแก้ไขงานวิทยานิพนธ์ ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านอื่นๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และได้ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริโฉม ทุ่งเก้า เป็นอย่างสูง ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และคุณสุทธิรักษ์ นิยมฤทธิ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยในการดำเนินงานวิจัย จนงานวิจัยได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่างๆ มาโดยตลอด

ขอบคุณ คุณณฤดี อัศวเสรีเลิศ คุณนฤมล นันทกิจโกศล คุณนิโรบล เหลากลม และเพื่อนร่วมรุ่นทุกคน และพี่ๆ น้องๆ ทุกคน ที่มีส่วนช่วยเหลือในหลายๆ ด้าน ให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องที่คอยสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และให้กำลังใจอันเป็นสิ่งสำคัญแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญภาพ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 5

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 5

2. ปริทัศน์วรรณกรรม..... 6

2.1 ไพรีน..... 9

2.2 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของไพรีน..... 9

2.3 ความเป็นพิษของไพรีน..... 10

2.4 การปนเปื้อนของสารประกอบในกลุ่ม PAHs ในดิน..... 10

2.5 การบำบัดสารในกลุ่ม PAHs รวมถึงไพรีนในสิ่งแวดล้อม..... 12

2.6 การย่อยสลายไพรีนด้วยจุลินทรีย์..... 14

2.7 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ด้วยกลุ่มแบคทีเรีย..... 17

2.8 การเพิ่มการอยู่รอดของจุลินทรีย์ต่างถิ่น เมื่อนำมาบำบัดดินที่ปนเปื้อนสารในกลุ่ม PAHs..... 19

3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง..... 27

บทที่ หน้า

3.1 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อเปรียบเทียบสมบัติไม่ชอบน้ำของกลุ่มแบคทีเรีย STK กับกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และ *Escherichia coli*..... 31
3.1.1 การเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Free Mineral Medium (CFMM)..... 31
3.1.2 การเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM..... 31
3.1.3 การเลี้ยงแบคทีเรีย *E.coli* ในอาหาร Nutrient broth (LB)..... 31
3.2 สมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) ของกลุ่มแบคทีเรีย STK RRM-V3 และ *E.coli*..... 32
3.3 สมบัติไม่ชอบน้ำของแต่ละสายพันธุ์ที่ประกอบอยู่ในกลุ่มแบคทีเรีย STK 33
3.4 การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดลอง..... 34
3.4.1 เศษใบไม้..... 34
3.4.2 วัสดุเหลือใช้จากพืช..... 35
3.4.3 ดิน..... 35
3.5 การเตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK..... 36
3.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ใน CFMM..... 36
3.5.2 การเตรียมกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ และวัสดุเหลือใช้จากพืช 37
3.6 การย่อยสลายไพรีนในดิน..... 37
3.6.1 การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็ง..... 38
3.6.1.1 การย่อยสลายไพรีนในดินโดยใช้กล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM..... 38
3.6.1.2 การย่อยสลายไพรีนในดินโดยใช้กล้าเชื้อที่เตรียมในเศษใบไม้..... 38
3.6.2 การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะสเลอรี..... 39
3.6.2.1 การย่อยสลายไพรีนในดินโดยใช้กล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM..... 39

บทที่ หน้า

3.6.2.2 การย่อยสลายไพรีนในดินโดยใช้กล้าเชื้อที่เตรียมในเศษใบไม้..... 39
3.11 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งและจำนวนแบคทีเรียก่อนและหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง..... 44
3.12 การอยู่รอดและประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย STK หลังทำการเก็บโดยวิธีทำแห้งเยือกแข็งที่ระยะเวลาต่างๆ..... 44
4. ผลการทดลอง..... 45
4.1 การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินและวัสดุพาหะที่นำมาใช้ในการทดลอง..... 46
4.2 สมบัติไม่ชอบน้ำของกลุ่มแบคทีเรีย STK..... 48
4.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดิน..... 51
4.4 การเจริญและประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนในดินด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในด้วยวัสดุเหลือใช้จากพืช..... 61
4.5 การย่อยสลายไพรีนในดินด้วยกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืชก่อนและหลังกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง..... 64
4.6 การเก็บรักษากล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK บนวัสดุเหลือใช้จากพืช..... 66
4.7 การย่อยสลายไพรีนโดยกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บในวัสดุเหลือใช้จากพืช เป็นเวลา 9 เดือน..... 68
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 69
รายการอ้างอิง..... 76
ภาคผนวก..... 87
ภาคผนวก ก..... 88
ภาคผนวก ข..... 90
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 96

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2.1	ตัวอย่างของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายไพรีน……..	15
2.2	ลักษณะโคโลนีของกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	23
4.1	ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่นำมาใช้ในการทดลอง.....	46
4.2	ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของวัสดุพาหะที่ใช้ในการทดลอง...	47
4.3	ปริมาณไพรีนทั้งหมดในส่วนวัฏภาคดินและน้ำ ระยะเวลา 10 วัน เมื่อใช้กลุ่มแบคทีเรีย STK จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM และชุดควบคุม…….	55
4.4	ปริมาณไพรีนทั้งหมดในส่วนวัฏภาคดินและน้ำ ระยะเวลา 10 วัน เมื่อเติมและไม่เติมกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในเศษใบไม้……...	58
4.5	เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งเป็นเวลา 28 วัน และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดก่อนและหลังกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งกล้าเชื้อที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืชทันทีไม่เติมลงในดิน…….	64
4.6	การอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาในวัสดุเหลือใช้จากพืช ที่ภาวะ 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ที่เดือน 0 3 6 และ 9…….	66
4.7	ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็ง ระยะเวลา 28 วัน ด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาในวัสดุเหลือใช้จากพืช ที่ภาวะ 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ เป็นระยะเวลา 9 เดือน…….	67

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) 16 ชนิดที่บัญญัติโดยองค์กรพิทักษ์สิ่งแวดล้อม (USEPA) ประเทศสหรัฐอเมริกา…	8
2.2	โครงสร้างไพรีน.....	9
2.3	วิถีการย่อยสลายไพรีนโดย *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ KMS (Liang และคณะ, 2006)……	17
3.1	เศษใบไม้ที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านการคัดกรองแล้ว.....	34
3.2	วัสดุเหลือใช้จากพืชที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านการคัดกรองแล้ว.....	35
3.3	ดินที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านการบดและคัดกรองแล้ว……	36
3.4	ถุงอะลูมิเนียมหลังปิดผนึกในสุญญากาศ.....	43
3.5	ถุงอะลูมิเนียมหลังปิดผนึกในสุญญากาศและถุงซิลิกาเจลที่ใช้ในการทดลอง……..	43
3.6	เครื่อง freeze dryer…….....	43
4.1	สมบัติไม่ชอบน้ำของกลุ่มแบคทีเรีย STK กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และ *E.coli*……	48
4.2	สมบัติไม่ชอบน้ำของกลุ่มแบคทีเรีย STK แต่ละไอโซเลต.....	49
4.3	การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งที่มีความเข้มข้น 1,000 มก. ต่อ กก.ของดิน ด้วยกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM และชุดควบคุม…….	50
4.4	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดทดลอง (ดินภาวะของแข็งที่มีความเข้มข้นของไพรีน 1,000 มก.ต่อ กก.ของดิน และเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM) และชุดควบคุม.....	51
4.5	การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งที่มีความเข้มข้น 1,000 มก. ต่อ กก.ของดิน ด้วยกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในเศษใบไม้ และชุดควบคุม.....	52
4.6	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดทดลอง (ดินภาวะของแข็งที่มีความเข้มข้นของไพรีน 1,000 มก.ต่อ กก.ของดินและเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมในเศษใบไม้) และชุดควบคุม……....	53
4.7	การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะสเลอรีในส่วนวัฏภาคดินที่มีความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อ กก.ของดิน ด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM และชุดควบคุม……	54

ภาพที่ หน้า

4.8 การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะสเลอรีในส่วนวัฏภาคน้ำที่มีความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อ กก.ของดิน ด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM และชุดควบคุม..... 55

4.9 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดทดลอง (ดินภาวะสเลอรีที่มีความเข้มข้นของไพรีน 1,000 มก.ต่อ กก.ของดินและเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM) และชุดควบคุม..... 56

4.10 การย่อยสลายไพรีนที่มีความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อ กก.ของดิน ในดินภาวะสเลอรีในส่วนวัฏภาคดิน ด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในเศษใบไม้ และชุดควบคุม... 57

4.11 การย่อยสลายไพรีนที่มีความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อ กก.ของดิน ในดินภาวะสเลอรีในส่วนวัฏภาคน้ำ ด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในเศษใบไม้ และชุดควบคุม.... 58

4.12 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดทดลอง (ดินภาวะสเลอรีที่มีความเข้มข้นของไพรีน 1,000 มก.ต่อ กก.ของดินและเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมในเศษใบไม้) และชุดควบคุม..... 59

4.13 การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งที่มีความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อ กก.ของดินด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืช และชุดควบคุม..... 61

4.14 จำนวนกลุ่มแบคทีเรียทั้งหมด (ดินภาวะของแข็งที่มีความเข้มข้นของไพรีน 1,000 มก.ต่อ กก.ของดินและเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมในเศษใบไม้) และชุดควบคุม..... 62

4.15 การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งด้วยกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ก่อนและหลังทำแห้งเยือกแข็งในวัสดุเหลือใช้จากพืช..... 64

4.16 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่เก็บรักษาในวัสดุเหลือใช้จากพืชที่ระยะเวลา 0 3 6 และ 9 เดือน..... 66

4.17 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในดินภาวะของแข็งโดยเติมกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืชที่เก็บรักษาที่ระยะเวลา 0 3 6 และ 9 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อลดความชื้นเป็น 30% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ..... 68

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัญหาจากการปนเปื้อนของสารเคมีชนิดต่างๆ ได้เพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน ทั้งนี้สืบเนื่องมาจากการพัฒนาทางด้านอุตสาหกรรม คมนาคม การเกษตร และการดำรงชีวิตประจำวันของมนุษย์ ผลผลิตที่ได้จากการพัฒนาทางด้านต่างๆ นี้ ได้แก่ น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม น้ำมันจากเรือขนส่ง สารกำจัดวัชพืช และของเสียจากห้องทดลอง เป็นต้น เป็นที่ประจักษ์ว่าผลจากการพัฒนาของทางอุตสาหกรรม นอกจากจะให้ผลผลิตที่ต้องการแล้วยังก่อให้เกิดการปลดปล่อยสารอินทรีย์และอนินทรีย์สู่สิ่งแวดล้อมซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตรวมทั้งมนุษย์ด้วย (Klein, 2000) ปัญหานี้ต้องได้รับการแก้ไขเพื่อขจัดความเป็นพิษออกจากสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน น้ำ และอากาศ

น้ำมันและปิโตรเลียมได้ถูกจัดเป็นของเสียอันตรายประเภทหนึ่ง (กรมควบคุมมลพิษ, 2542) ซึ่งประกอบไปด้วยสารอินทรีย์หลายชนิด เช่น พวกสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) เป็นต้น โดยในงานวิจัยครั้งนี้ต้องการศึกษาไพรีนซึ่งเป็นสารประกอบ PAHs ชนิดหนึ่งที่มีความเป็นพิษและเกิดการย่อยสลายได้ยาก ดังนั้นไพรีนจึงจัดเป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจหาของเสียที่ปนเปื้อนด้วยสารพวกพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Anastasi และคณะ, 2009)

การกำจัดของเสียโดยวิธีทางชีวภาพหรือการบำบัดสารเป็นพิษโดยชีววิธี เป็นวิธีการที่อาศัยความสามารถของพืชและจุลินทรีย์ในการทำให้สารที่ก่อปัญหาเปลี่ยนรูปไป (biotransformation) หรือทำให้สามารถย่อยสลายสารที่มีพิษให้กลายเป็นสารที่เป็นพิษน้อยลงหรือไม่มีเลย (detoxification) หรือย่อยสลายของเสียให้หมดไป (mineralization) (อลิสา วังใน, 2550)

ในการย่อยสลายสาร PAHs โดยแบคทีเรียจะสามารถย่อยสลายสารเหล่านี้ได้ทั้งแบบที่ใช้และไม่ใช้ออกซิเจน และแบคทีเรียบริสุทธิ์บางชนิดสามารถย่อยสลายสาร PAHs ได้โดยสมบูรณ์ แต่แบคทีเรียบางชนิดนั้นจะต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียชนิดอื่นด้วย (Cerniglia, 1992) แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs ได้แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำจะมีส่วนทำให้แบคทีเรียสามารถใช้สารที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำได้ดี เช่น สารพวกไฮโดรคาร์บอนต่างๆ ได้ดีกว่าแบคทีเรียทั่วไป (Obuekwe และคณะ, 2009)

กลุ่มแบคทีเรีย STK เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำสูง แยกได้โดย ทิมากร แสงดำ (2548) ดังนั้นกลุ่มแบคทีเรียนี้จึงมีความน่าสนใจที่จะนำมาใช้ในการย่อยสลายสารที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ ดังเช่น สารในกลุ่ม PAHs

การใช้จุลินทรีย์บำบัดสารพิษในดินนั้นมีข้อจำกัดหลายอย่างคือ จุลินทรีย์อาจจะตายหรือเจริญไม่ดี เนื่องจากอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ทำให้จำนวนจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการบำบัดลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากในดินธรรมชาตินั้นมีปัจจัยหลายอย่างที่ต้องควบคุม เช่น สภาพของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และแร่ธาตุ ในดิน เป็นต้น ซึ่งการควบคุมให้คงที่นั้นสามารถทำได้ยาก และภายในดินนั้นมีจุลินทรีย์ท้องถิ่นซึ่งอาจจะเกิดการแย่งอาหารกันได้ (Van Veen และคณะ, 1997)

ในการย่อยสลายไพรีนที่ปนเปื้อนในดิน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ซึ่ง รุจา สารคุณ (2548) ได้ทดสอบการย่อยสลายไพรีนในดินโดยเติมน้ำในอัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1:8 พบว่า ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินเกิดขึ้นได้ดีขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากระบบสเลอรี (slurry) นี้มีการใช้น้ำและบ่มเขย่าตลอดเวลา เพื่อเพิ่มการสัมผัสระหว่างดินที่มีไพรีนปนเปื้อนกับกลุ่มแบคทีเรีย ซึ่งมีผลให้ปริมาณไพรีนลดลงอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อ ปิยะวรรณ เพชราภา (2549) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย STK จากอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ดินในภาวะของแข็ง (solid state) กลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถย่อยสลายไพรีนที่ปนเปื้อนได้ เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 1 เดือน โดยปริมาณไพรีนยังคงอยู่ จึงตั้งสมมติฐานว่า อาจเกิด

จากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีสมบัติไม่ชอบน้ำสูงจึงมีผลทำให้เชื้อไม่สามารถกระจายตัว เนื่องจากดินในภาวะของแข็งเป็นระบบนิ่งไม่มีการเขย่า

การใช้แบคทีเรียตรึงบนวัสดุพาหะเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อเพิ่มการเจริญและการอยู่รอดของจุลินทรีย์ระหว่างการบำบัด เพื่อให้แบคทีเรียเกิดความคุ้นเคย อีกทั้งแบคทีเรียที่อยู่บนวัสดุพาหะยังสามารถกระจายได้ทั่วทั้งบริเวณดินที่บำบัดได้ง่ายกว่าการใช้แบคทีเรียเติมลงไปโดยตรง วัสดุพาหะมีหลากหลายชนิด ทั้งวัสดุทางธรรมชาติ และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ดิน เศษใบไม้ชนิดต่างๆ เปลือกถั่ว และฟางข้าว เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสารอินทรีย์พอลิเมอร์ซึ่งมีลักษณะเป็นรูพรุน เช่น แคลเซียมอัลจิเนต และอะกาโรส สามารถนำมาใช้ได้เช่นกัน การใช้วัสดุพาหะนั้นจะต้องคำนึงถึงราคาของวัสดุพาหะและความสามารถในการเพิ่มความอยู่รอดของแบคทีเรียได้ เพื่อทำให้สามารถเก็บรักษากล้าเชื้อให้มีชีวิตได้นาน อีกทั้งยังรักษาเชื้อให้คงความสามารถในการย่อยสลายสารปนเปื้อนไม่เปลี่ยนแปลง และสะดวกต่อการนำไปใช้ในการบำบัดในพื้นที่จริง (Van Dyke และ Prosser, 2000)

วิธัญญา ชวเจริญพันธ์ (2549) ได้ศึกษาการสร้างกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK บนวัสดุพาหะชนิดต่างๆ เช่น เปลือกถั่ว เศษใบไม้ชนิดต่างๆ ใบมะขาม และสารเร่ง พด.1 ปลอดเชื้อ เพื่อคัดเลือกวัสดุพาหะที่แบคทีเรียสามารถเจริญและอยู่รอดได้ อีกทั้งยังส่งเสริมประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนได้ดียิ่งขึ้น โดยพบว่า STK ที่เลี้ยงในเปลือกถั่วและเศษใบไม้ชนิดต่างๆ สามารถเจริญอย่างรวดเร็วและย่อยสลายไพรีนได้ 50% ของปริมาณไพรีนเริ่มต้น เมื่อนำเปลือกถั่วและเศษใบไม้ทั่วไปมาบำบัดการปนเปื้อนไพรีนในดินสองภาวะคือ solid และ slurry ที่ความเข้มข้นของไพรีน 100 และ 1,000 มก.ต่อกก.ของดิน พบว่าดินภาวะ solid ที่มีความเข้มข้นของไพรีน 100 และ 1,000 มก.ต่อกก.ของดิน ตามลำดับ แบคทีเรียที่เลี้ยงในเปลือกถั่ว มีจำนวนมากขึ้นและภายในเวลา 60 วัน สามารถย่อยสลายไพรีนได้ 78 และ 54% ของปริมาณไพรีนเริ่มต้น ตามลำดับ ส่วนดินในภาวะ slurry นั้น ที่ 100 มก.ต่อกก.ของดิน แบคทีเรียที่เลี้ยงในเปลือกถั่วมีจำนวนมากขึ้นและตรวจไม่พบไพรีนภายในเวลา 10 วัน ส่วนที่ 1,000 มก.ต่อกก.ของดิน แบคทีเรียค่อยๆ

เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และสามารถย่อยสลายไพรีนได้ 72% ของปริมาณไพรีนเริ่มต้นภายในเวลา 10 วัน

การเก็บรักษากล้าเชื้อให้มีชีวิตได้นานและสามารถยังมีประสิทธิภาพที่ดีนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของวัสดุพาหะที่ถูกนำมาใช้ ความชื้นหรืออุณหภูมิที่ใช้ในระหว่างการเก็บรักษา (Trivedi และคณะ, 2005) สภาวะที่ใช้ในการเก็บ เช่น สุญญากาศ เป็นต้น (Bozoglu และคณะ, 1987) และจำนวนของจุลินทรีย์ (Asa และคณะ, 2006)

การเก็บรักษากล้าเชื้อในวัสดุพาหะนั้นจะเก็บรักษาได้ไม่นาน เนื่องจากเมื่อแบคทีเรียใช้ไพรีนซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน และสารอาหารในวัสดุพาหะหมด แบคทีเรียก็จะค่อยๆ ตายลง ดังนั้นการเก็บรักษาโดยวิธีไลโอฟิไลซ์เป็นอีกวิธีที่ใช้สำหรับเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญ เช่น แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (Asa และคณะ, 2006) แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก (Bassirou และคณะ, 2007) และแบคทีเรียที่ย่อยสลายสาร PAHs เป็นต้น ดังนั้นการไลโอฟิไลซ์จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจสำหรับเก็บรักษากล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ในวัสดุพาหะ เนื่องจากจะช่วยยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาได้นานและคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนได้ เมื่อต้องนำไปใช้ในการบำบัดในบริเวณที่ปนเปื้อน โดยการไลโอฟิไลซ์นั้นจะต้องคำนึงถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา เช่น อุณหภูมิ ความชื้นที่ใช้ในการเก็บ และความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้น เป็นต้น (Asa และคณะ, 2006)

กานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร (2551) ได้ศึกษาผลของภาวะการเก็บเชื้อต่อการรอดชีวิต และความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้ โดยพบว่าการเติมไพรีนระหว่างการเก็บทำให้จำนวนเชื้อที่รอดชีวิตมีสูงกว่าที่ไม่เติมไพรีน และการเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ทำให้การรอดชีวิตของเชื้อสูงกว่าที่อุณหภูมิห้อง และพบว่าในเดือนที่ 8 เมื่อเก็บกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยลดความชื้นเหลือ 30% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ ใส่และไม่ใส่ไพรีน แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ พบว่าการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะสเลอรีซึ่งมีไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อกก.ของดิน มีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ในวันที่ 10 เท่ากับ 2.11% และ 5.01%

ตามลำดับ และที่อุณหภูมิห้องใส่และไม่ใส่ไพรีนมีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 4.08% และ 7.61% ตามลำดับ

ผลการทำงานวิจัยนี้เพื่อใช้ประโยชน์จากการทำงานของกลุ่มแบคทีเรีย STK ซึ่งมีสมบัติไม่ชอบน้ำสูง ในการบำบัดไพรีนที่ปนเปื้อนในดินซึ่งมีสภาพเป็นของแข็ง โดยปกตินั้นจะทำให้การทำงานของแบคทีเรียเกิดขึ้นได้ไม่ดี งานวิจัยในครั้งนี้จะช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวโดยเตรียมกลุ่มแบคทีเรียในวัสดุพาหะ แล้วนำมาบำบัดไพรีนในดินโดยไม่ต้องทำให้อยู่ในภาวะสเลอรีที่ต้องเติมน้ำ หนึ่งในวัสดุพาหะที่เลือกใช้นั้นคือ วัสดุเหลือใช้จากพืช ซึ่งหาได้ง่าย ไม่ต้องคัดแยกเอาเฉพาะส่วนประกอบใดส่วนประกอบหนึ่ง และทดลองเก็บรักษากล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ในวัสดุเหลือใช้จากพืชโดยวิธีทำให้แห้งเยือกแข็ง โดยลดความชื้นให้เหลือ 30% ของความจุสูงของการอุ้มน้ำ เพื่อให้สามารถเก็บรักษาจุลินทรีย์ได้นาน และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการควบคุมอุณหภูมิและขั้นตอนในกระบวนการเก็บ และสามารถนำไปใช้สำหรับการย่อยสลายไพรีนในดินบริเวณที่พบการปนเปื้อนได้จริง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาการใช้กล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียไฮโดรโฟบิก STK ที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืชในการบำบัดไพรีนในดินภาวะของแข็ง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้กล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่เลี้ยงในวัสดุเหลือใช้จากพืชที่สามารถนำไปใช้ในการบำบัดไพรีนในดินภาวะของแข็ง และสะดวกต่อการขนส่งจุลินทรีย์สำหรับการบำบัดในภาคสนามหรือสภาวะจริง

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม

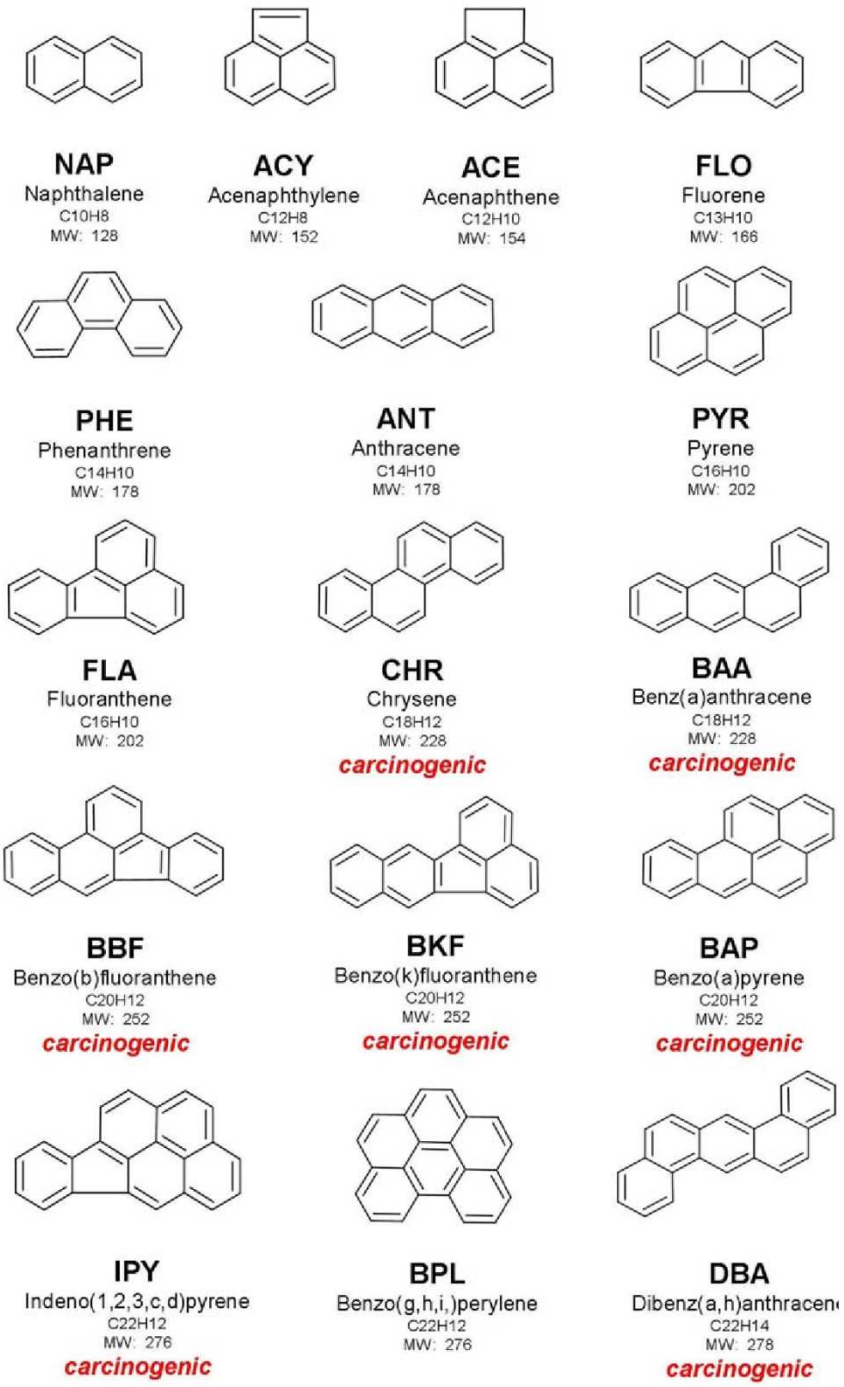
สารกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons หรือ PAHs) เป็นสารที่ประกอบไปด้วยวงอะโรมาติกตั้งแต่สองวงขึ้นไปมาต่อเรียงกันเป็นเส้นตรง (linear) มุมงอ (angular) หรือเป็นกลุ่ม (cluster) (Cerninglia และคณะ, 1992) โดยทั่วไปมักต่อกันด้วยวงอะโรมาติกประมาณ 5-6 วง สารในกลุ่มนี้มักคงอยู่นาน และย่อยสลายได้ยาก เมื่อปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (Su และคณะ, 2006) นอกจากนั้นสารในกลุ่ม PAHs บางชนิดยังมีความเป็นพิษ อาจเป็นสารชักนำที่ทำให้เกิดมะเร็ง (carcinogens) และก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ (mutagens) (Crawford และ Crawford, 1996) สามารถพบการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม PAHs โดยทั่วไปในสิ่งแวดล้อมไม่ว่าจะเป็นดิน น้ำ หรือพวกตะกอนทับถม (Andreoni และคณะ, 2004) ซึ่งการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม PAHs แต่ละชนิดมาจากการรั่วไหลของน้ำมันปิโตรเลียม การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของน้ำมันเชื้อเพลิงและสารอินทรีย์ รวมทั้งกระบวนการต่างๆ ทางอุตสาหกรรม (Bamforth และคณะ 2005)

สารในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน หรือ PAHs สามารถแบ่งออกได้เป็นสองประเภท ตามน้ำหนักของโมเลกุล ได้แก่

1. สารในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน หรือ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight PAHs) โดยกลุ่มนี้จะประกอบไปด้วยวงแหวนเบนซีนที่ต่อกันเพียง 2-3 วง เช่น แนพทาลีน (napthalene)และฟลูออรีน (fluorene) เป็นต้น
2. สารในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน หรือ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight PAHs) โดยกลุ่มนี้จะประกอบไปด้วยวงแหวนเบนซีนที่มาต่อกันมากกว่า 3 วงขึ้นไป เช่น ไพรีน (pyrene) และเบนโซ-เอ ไพรีน (benzo[a] pyrene) เป็นต้น

สารในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่ถูกบัญญัติให้เป็นสารปนเปื้อนที่สำคัญโดยองค์กรพิทักษ์สิ่งแวดล้อม (Environmental Protection Agency: EPA) ของประเทศสหรัฐอเมริกา มีด้วยกันทั้งหมด 32 ชนิด แต่มี 16 ชนิดที่เป็นต้นแบบ ได้แก่ แนพทาลีน อะซีแนพทีลีน อะซีแนพทรีน ฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีน เป็นต้น ส่วนใหญ่ทั้ง 16 ชนิดนี้ มักใช้เป็นกลุ่มเป้าหมายในการตรวจวัดคุณภาพของสิ่งแวดล้อม ดังแสดงในภาพที่ 2.1

คุณสมบัติที่สำคัญอีกข้อของสารในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน หรือ PAHs คือ มีสมบัติไฮโดรโฟบิกหรือสมบัติความไม่ชอบน้ำ ทำให้เอนไซม์ ตลอดจนจุลินทรีย์ซึ่งมีความชอบน้ำ จะเข้าสัมผัสและสลายสารในกลุ่ม PAHs ได้ต่ำ จึงเป็นสาเหตุให้สารในกลุ่มนี้มีความคงทนเมื่อปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม โดยทั่วไปสารในกลุ่ม PAHs ที่มีจำนวนวงแหวนเบนซีนต่อกันเพิ่มขึ้นจะทำให้เกิดการลดความสามารถในการละลายน้ำลง และเพิ่มสมบัติไม่ชอบน้ำหรือไฮโดรโฟบิกให้สูงขึ้น นอกจากนั้นยังทำให้สมบัติของการระเหยเป็นไอลดลงอีกด้วย (Wilson และ Jones, 1993)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) 16 ชนิดที่บัญญัติโดยองค์กรพิทักษ์สิ่งแวดล้อม (USEPA) ประเทศสหรัฐอเมริกา (www.grin.com/object/external_document.256680/6537d3862972662a60e3959eaf2a3a1e_LARGE.png)

2.1 ไพรีน (Pyrene)

ไพรีนเป็นสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) ชนิดหนึ่ง ที่มีความเป็นพิษและย่อยสลายได้ยาก โครงสร้างของไพรีนประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 4 วง ที่เรียงต่อกัน (ภาพที่ 2.2) มีควิโนนเป็นสารเมตาบอไลต์พื้นฐานที่สามารถก่อการกลายพันธุ์และมีความเป็นพิษมากกว่าสารตั้งต้น ดังนั้นไพรีนจึงจัดเป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจหาของเสียที่ปนเปื้อนด้วยสารพวกพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Anastasi และคณะ, 2009)

Pyrene

ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของไพรีน (Schirmer และคณะ, 1998)

2.2 สมบัติทางเคมีกายภาพและเคมี

สูตรโมเลกุล	$C_{16}H_{10}$
น้ำหนักโมเลกุล	202.3 กรัมต่อโมล
ลักษณะปรากฏ	ผลึกสีขาวหรือเหลือง
อุณหภูมิหลอมเหลว	56 °ซ
อุณหภูมิการกลายเป็นไอ	393-404 °ซ
ความหนาแน่นที่ 14 °ซ	1.271 กรัมต่อตารางเซนติเมตร
ความถ่วงจำเพาะที่ 23 °ซ	1.271 กรัมต่อมล.

การละลาย	
ในน้ำ	0.77 กรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 25 °ซ
ในตัวทำละลาย	เบนซีน อีเทอร์ เดเอทธิลอีเทอร์ ปิโตรเลียมอีเทอร์ โทลูอีน เอทานอล คาร์บอนไดซัลไฟด์
สัมประสิทธิ์แบ่งการละลาย	
Log K_{oc}	4.55 (Abdul และคณะ, 1987)
Log K_{ow}	5.18 (Edwards และคณะ, 1991)
ความดันไอที่ 25 °ซ	$2.5X10^{-6}$ มิลลิเมตรปรอท

2.3 ความเป็นพิษของไพรีน

ไพรีนเป็นสารที่หน่วยงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกาไม่ระบุว่าเป็นสารที่สามารถก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือสารก่อมะเร็งในมนุษย์ได้ แต่สามารถก่อให้เกิดการระคายเคืองบริเวณที่สัมผัสกับสารดังกล่าวได้ (skin irritant) นอกจากนี้ยังเป็นอันตรายต่อทารก ซึ่งเกิดได้จากแม่ที่ตั้งครรภ์ที่สูบบุหรี่หรือได้รับควันบุหรี่เป็นประจำ (Zanieri และคณะ, 2007) ส่วนในสัตว์นั้น พบว่าไพรีนสามารถทำให้เกิดอาการแพ้แสงที่ผิวหนัง (Kochevar และคณะ, 1982)

2.4 การปนเปื้อนของสารในกลุ่ม PAHs ในดิน

การปนเปื้อนของสารในกลุ่ม PAHs สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม โดยส่วนใหญ่มักเกิดจากธรรมชาติทั่วไป เช่น การระเบิดของภูเขาไฟ หรือการเกิดไฟไหม้ เป็นต้น และกิจกรรมหลายๆ อย่างในการดำเนินชีวิตของมนุษย์ เช่น การเผาป่า อุตสาหกรรมการกลั่นน้ำมันปิโตรเลียม และการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิง (Bispo และคณะ,1999) โดยการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม PAHs สามารถพบได้ทั่วไปในดิน น้ำ และอากาศ โดยการปนเปื้อนแต่ละแหล่งก็สามารถพบได้หลายสาเหตุ หน่วยงานทางด้านสิ่งแวดล้อมของประเทศอังกฤษได้ระบุว่า ดินยังเป็นแหล่งสะสมหลักของสารในกลุ่ม PAHs (Wild และ Jones, 1995) เช่น การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลงหรือปิโตรเลียม ทำให้สารในกลุ่ม PAHs กระจายตัวในสิ่งแวดล้อมในรูปของอากาศ จากนั้นอาจจะ

ไปเกาะกลุ่มกับฝุ่นละอองหรือเขม่าที่มีอยู่ในอากาศและตกลงในดิน ซึ่งทำให้เกิดการปนเปื้อนขึ้นได้ และจับตัวกับดินแล้วเกิดการสะสมมากขึ้น ซึ่งสามารถพบลักษณะเช่นนี้ได้ในพื้นที่ที่มีการจราจรคับคั่ง และพื้นที่ๆ อยู่ในเขตอุตสาหกรรม

การปนเปื้อนของสารในกลุ่ม PAHs หรือสารประกอบอินทรีย์ในดิน มักอยู่ในรูปแบบของการอยู่ร่วมกันภายในอนุภาคดินหรือฮิวมัส การปนเปื้อนนั้นเกิดจากสมบัติทางกายภาพ เช่น ส่วนที่เป็นของแข็งปะปนในอนุภาคดินหรืออนุภาคดินถูกเคลือบด้วยของเหลว หรือดูดซับอยู่ในอนุภาคของดิน ซึ่งสารที่ปนเปื้อนที่เป็นสารในกลุ่ม PAHs นั้น สามารถถูกชะออกมาได้โดยอาศัยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ แต่หากสารในกลุ่ม PAHs ถูกสะสมในดินเป็นระยะเวลานาน ทำให้สารปนเปื้อนนั้นถูกชะออกมาได้น้อย เนื่องจากดินมีความสามารถในดูดซับเอาสารดังกล่าวไว้และแทรกตัวอยู่ระหว่างชั้นน้ำตามช่องว่างภายในอนุภาคดิน และหากสารปนเปื้อนจับกับอนุภาคของดินโดยอาศัยพันธะทางเคมี จะทำให้การชะสารปนเปื้อนดังกล่าวหลุดออกมาได้ยากขึ้น (Verstraete และ Devliegher, 1996)

สารในกลุ่ม PAHs ส่วนใหญ่นั้นจะถูกดูดซับโดยอินทรีย์วัตถุที่อยู่ในดิน กระบวนการทางชีวภาพไม่สามารถย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs ได้ การดูดซับระหว่างสารในกลุ่ม PAHs และอินทรีย์วัตถุจะเพิ่มขึ้น เมื่อวงอะโรมาติกของสารในกลุ่ม PAHs มีจำนวนมากขึ้น และเมื่อสารในกลุ่ม PAHs สัมผัสกับอนุภาคดินเป็นระยะเวลานาน จะค่อยๆเข้าสู่อินทรีย์วัตถุในอนุภาคดิน และถูกดูดซับและจับกับอนุภาคของดินได้แน่น สารในกลุ่ม PAHs นั้นจะยึดติดในรูพรุนของอนุภาคดินหรืออินทรียวัตถุได้ดี จึงส่งผลให้สารในกลุ่ม PAHs ถูกสะสมและย่อยสลายได้ยากเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นระยะเวลานาน (Wiessenfels และคณะ, 1992; Lundstedt, 2003)

นอกจากการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม PAHs ในดินแล้ว หากพบการปนเปื้อนของสารอื่นร่วมด้วย (co-contaminant) เช่น พบการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม PAHs ร่วมกับสารพวกโลหะหนัก จะทำให้การย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs เกิดได้ยากขึ้น เพราะโลหะหนักอาจจะไปขัดขวางการย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs ของแบคทีเรีย (Sokhn และคณะ, 2001; Riis และคณะ, 2002; Atagana และคณะ, 2006)

2.5 การบำบัดสารในกลุ่ม PAHs รวมถึงไพรีนในสิ่งแวดล้อม

เมื่อสารในกลุ่ม PAHs และไพรีนปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม จึงอาจก่อให้เกิดอันตรายแก่สิ่งมีชีวิตบริเวณนั้นได้ ซึ่งสารในกลุ่ม PAHs แต่ละชนิดมีความเป็นพิษแตกต่างกันไป บางชนิดก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ บางชนิดก่อให้เกิดมะเร็ง เป็นต้น แม้ว่าสารในกลุ่ม PAHs จะไม่ได้ทำให้เกิดความเป็นพิษโดยเฉียบพลันแต่สารเหล่านี้เมื่อสะสมเป็นระยะเวลานาน อาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ระบบนิเวศ รวมทั้งสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ได้ โดยสารในกลุ่ม PAHs หรือไพรีน มักสะสมอยู่ในรูปเขม่า และจับตัวกับดินได้ดี โดยมักจะสะสมอยู่ในดิน ตะกอนดิน น้ำ หรือฝุ่นละออง พืช และอากาศ เป็นต้น สารเหล่านี้จะสามารถทำให้หมดไปโดยกระบวนการต่างๆ เช่น การระเหย การเกิดออกซิไดซ์ด้วยแสง หรือการใช้ตัวดูดซับ เป็นต้น (Harayama, 1997) ซึ่งกระบวนการเหล่านี้เป็นกระบวนการทางกายภาพและเคมี อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวยังมีปัจจัยจำกัดอยู่หลายประการเช่นกัน เช่น ราคา เป็นต้น (Samanta และคณะ, 2002)

การบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพนั้นมีหลายวิธีด้วยกัน ตามรายงานของ Trejo และ Quintero (2000) ดังนี้

Bioaugmentation เป็นการเติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารปนเปื้อนได้ลงไปในบริเวณที่ต้องการบำบัดสารพิษ

Biostimulation เป็นวิธีที่มีการเติมสารอาหาร หรือปัจจัยเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ลงไปในบริเวณที่ปนเปื้อน ทั้งนี้เพื่อช่วยให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นเพิ่มจำนวนและประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารปนเปื้อนได้ดีขึ้น

Bioventing เป็นวิธีที่บำบัดบริเวณบนเปื้อนโดยการให้อากาศและเติมสารอาหารลงไปในบริเวณปนเปื้อนเพื่อกระตุ้นการเจริญและกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ประจำถิ่น

Biofilters เป็นวิธีที่จะบำบัดสารปนเปื้อนที่กระจายออกสู่บรรยากาศได้ โดยอาศัยการใช้คอลัมน์ยาวที่มีจุลินทรีย์ที่ใช้บำบัดเกาะอยู่ในตัวคอลัมน์ แล้วบำบัดอากาศปนเปื้อนที่ไหลผ่าน

Bioreactor เป็นวิธีการย่อยสลายสารปนเปื้อนในถังหมักที่มีการเติมจุลินทรีย์เข้าไปย่อยสลายและใช้สารปนเปื้อนเป็นแหล่งอาหาร และพลังงาน

Composting เป็นวิธีการบำบัดสารปนเปื้อนโดยอาศัยการใช้ออกซิเจนและอุณหภูมิสูง ร่วมกับการเติมปุ๋ยหมักหรือวัสดุทางการเกษตรเพื่อเป็นวัสดุค้ำจุนการเจริญของจุลินทรีย์

Landfarming เป็นวิธีการบำบัดบริเวณที่มีการปนเปื้อนโดยการขุดดินหรือปั๊มน้ำขึ้นมาแล้วปล่อยให้มีการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์แบบใช้อากาศ (aerobic)

สุพินดา ศิริวราศิลป์ (2545) ใช้ใบไม้ของพืชในตระกูลถั่วที่ร่วงหล่น เติมลงในดินที่ปนเปื้อนไพรีน ใบไม้ที่ใช้ได้แก่ ใบจามจุรี ใบมะขาม และใบนนทรี จากผลการทดลองพบว่าใบมะขามทำให้เกิดการย่อยสลายไพรีนได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ใบนนทรี และ ใบจามจุรี ตามลำดับ และพบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายเพิ่มขึ้นจากเดิม 75% เป็น 93% เมื่อมีการปรับสภาวะให้มีความเหมาะสมต่อการย่อยสลาย ทั้งนี้อาจเกิดจากกิจกรรมการทำงานของจุลินทรีย์ที่อาศัยบนใบไม้ที่เติมลงในดิน

Charoenchang และคณะ (2003) ศึกษาความสามารถของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในการบำบัดดินที่ปนเปื้อนสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน โดยพบว่าเมื่อเติมเปลือกถั่วและใบจามจุรีลงในดิน ปริมาณไพรีนในดินลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ ภายในเวลา 42 วัน อาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในวัสดุเหลือใช้จากพืชนั้น สามารถย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs ในดินได้ดี

การเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่น (exogenous microorganisms) ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษที่ปนเปื้อนหรือเปลี่ยนโครงสร้างของสารพิษในสิ่งแวดล้อม (bioaugmentation) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมและเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย ซึ่งวิธีการนี้มีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงได้แก่ การเกิดภาวะแข่งขันของจุลินทรีย์ต่างถิ่นกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น โดยจุลินทรีย์ต่างถิ่นที่เติมนั้นจะต้องมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนและอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ (Vidali, 2001) วิธีการบำบัดทางชีวภาพเป็นวิธีที่ไม่เป็นอันตรายและมีความสำคัญต่อการกำจัดสารในกลุ่ม PAHs ในสิ่งแวดล้อม (Hughes และคณะ, 1997) อีกทั้งยังสามารถบำบัดได้ในบริเวณที่กว้างขวาง

(Cerniglia และคณะ, 1993; Rehmann และคณะ, 1998) และสามารถบำบัดพิษได้อย่างถาวร ซึ่งมีค่าใช้จ่ายในการบำบัดที่ต่ำกว่าวิธีอื่นๆ (Korda และคณะ, 1997)

2.6 การย่อยสลายไพรีนด้วยจุลินทรีย์

การบำบัดโดยอาศัยจุลินทรีย์นั้นเป็นการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพวิธีหนึ่ง จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไพรีน ได้แก รา ยีสต์ และแบคทีเรีย โดยราที่ย่อยสลายไพรีนจะเป็นราในกลุ่มของลิกนิโนไลติก จัดอยู่ในกลุ่มของเบสิดิโอไมซีส (Singh, 2006) นอกจากนี้ยีสต์บางชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนได้ (Romero และคณะ, 2002) และแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์อีกชนิดที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้ดีโดยใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

แบคทีเรียบริสุทธิ์บางชนิดสามารถสามารถคัดแยกได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และยังมีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนได้ดี ตัวอย่างของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ (mineralization) แสดงในตาราง 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายไพรีน

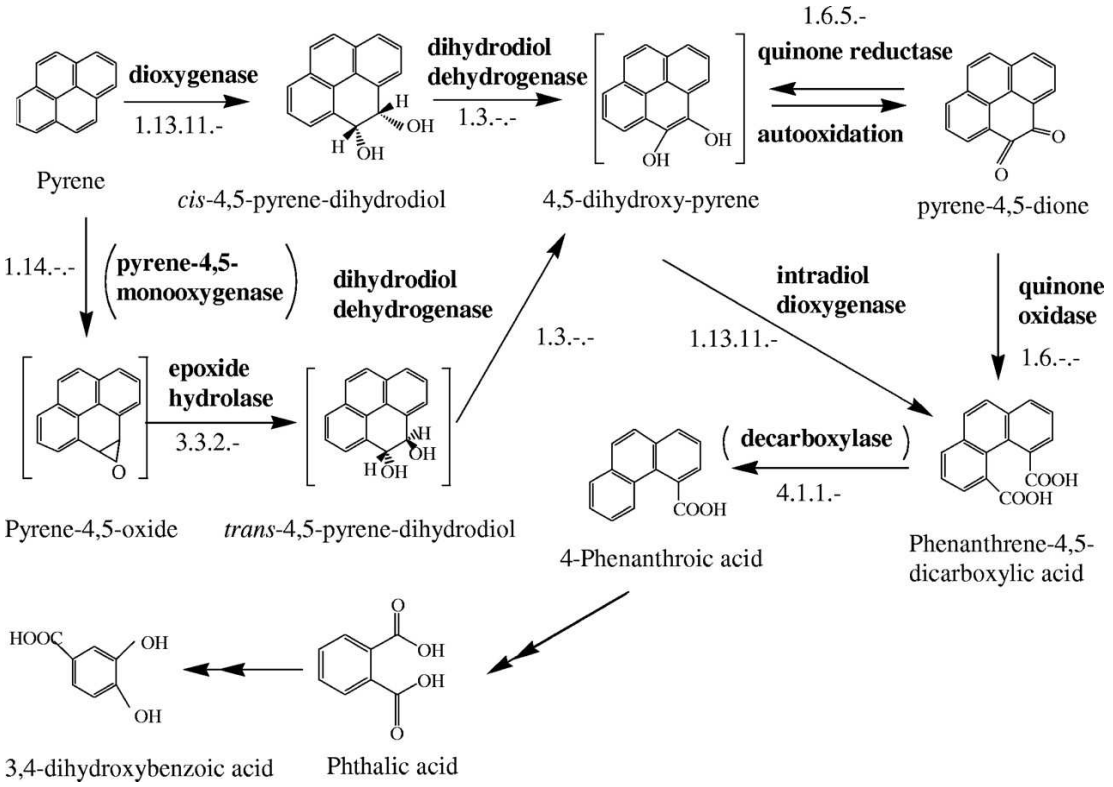
แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
Rhodococcus sp. สายพันธุ์ UW1	Walter และคณะ, 1991
Mycobacterium sp. สายพันธุ์ BB1	Boldrin และคณะ, 1993
Mycobacterium sp. สายพันธุ์ VF1	Kastner และคณะ, 1994
Rhodococcus sp. สายพันธุ์ S Pyr Na 1	Bouchez และคณะ, 1995
Rhodococcus sp. สายพันธุ์ S Flt Na 1	Bouchez และคณะ, 1995
Mycobacterium flavescens	Dean-Ross และ Cerniglia, 1996
Burkhoderia cepacia สายพันธุ์ VUN10,001	Juhasz และคณะ, 1997
Mycobacterium sp. สายพันธุ์ KR2	Rehmann และคณะ, 1998
Mycobacterium sp. สายพันธุ์ MR-1	Molina และคณะ, 1999
Stenotrophomonas maltophilia สายพันธุ์ VUN10,001	Boonchan และคณะ, 2000
Mycobacterium sp. สายพันธุ์ AP1	Vila และคณะ, 2001
Mycobacterium gilvum สายพันธุ์ B1	Gauthier และคณะ, 2003
Mycobacterium esteraromaticum สายพันธุ์ B21	Gauthier และคณะ, 2003
Genus Porphyrobacter สายพันธุ์ B51	Gauthier และคณะ, 2003
Mycobacterium sp. สายพันธุ์ KM3	Liang และคณะ, 2006
Enterobacter sp. สายพันธุ์ 12J1	Sheng และคณะ, 2008
Mycobacterium frederiksbergense	Mahanty และคณะ, 2008
Bacillus vallismortis สายพันธุ์ JY3A	Ling และคณะ, 2011

กระบวนการย่อยสลายไพรีนด้วยแบคทีเรียบริสุทธิ์โดยสมบูรณ์นั้นจะได้ มวลชีวภาพต่างๆ น้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ (Cerniglia, 1992; Wilson และ Jones, 1993) เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่สามารถย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs ได้นั้นแยกมาจากบริเวณที่พบการ

ปนเปื้อน และแบคทีเรียโดยทั่วไปสามารถย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs ได้ยาก เนื่องจากสารพวกนี้มีสมบัติในการละลายน้ำได้น้อยมาก และแบคทีเรียบางกลุ่มนั้นสามารถสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs ได้ เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยส่วนใหญ่พบว่าแบคทีเรียบริสุทธิ์สามารถย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำได้ดี ซึ่งอาศัยการเข้าไปทำปฏิกิริยาโดยตรง แบคทีเรียจะใช้เอนไซม์ออกซิจิเนสในการย่อยสลายซับสเตรทได้หลายชนิด (broad specificity enzyme) (Baver และ Capone, 1998) เช่น แบคทีเรีย *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ KM3 สามารถย่อยสลายไพรีนได้โดยตรง(Liang และคณะ, 2006) ซึ่งมีวิธีการย่อยสลายดังแสดงในภาพที่ 2.3

Cerniglia (1992) พบว่า แบคทีเรียบริสุทธิ์ไม่สามารถย่อยสลายไพรีนหรือสารในกลุ่ม PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงได้ในบางครั้ง ดังนั้นจึงต้องอาศัยสับเสตรทร่วม (co-substrate) เพื่อเป็นสารตั้งต้นให้เกิดการย่อยสลาย หรือใช้ในการเจริญและเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย หรือเพื่อช่วยในการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ปฏิกิริยาไปก่อน เพื่อให้เกิดการย่อยสลายต่อไป หรือโคเมแทบอลิซึม (co-metabolism) ซึ่งจะทำให้โครงสร้างของสารในกลุ่ม PAHs เปลี่ยนแปลงไป โดยแบคทีเรียนั้นไม่สามารถนำสารดังกล่าวไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ เมื่อในระบบมีสับสเตรทร่วมจึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารในกลุ่ม PAHs ต่อไปเรื่อยๆ จนเกิดการย่อยสลายแบบสมบูรณ์ในที่สุด

Wilson และ Jones (1993) รายงานว่า แบคทีเรียบริสุทธิ์หรือแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยวไม่สามารถย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงได้ เนื่องจากสารในกลุ่ม PAHs นั้น มีความเสถียรสูงและเกิดการย่อยสลายแบบสมบูรณ์ได้ยาก ต้องอาศัยเอนไซม์และปัจจัยหลายๆ อย่าง ที่มักจะทำไม่ได้โดยจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว ดังนั้นการย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs ที่มีความซับซ้อนหรือมีวงอะโรมาติกที่สูงนั้นจะต้องอาศัยกระบวนการย่อยสลายแบบโคเมแทบอลิซึม หรือการย่อยสลายโดยอาศัยการทำงานร่วมกันของกลุ่มจุลินทรีย์



ภาพที่ 2.3 วิถีการย่อยสลายไพรีนโดย *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ KMS (Liang และคณะ, 2006)

2.7 **การย่อยสลายไพรีนด้วยกลุ่มแบคทีเรีย** (consortium)

การย่อยสลายสารปนเปื้อนในกลุ่ม PAHs นั้น ในบางครั้งการย่อยสลายจำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียหลายชนิดที่แตกต่างกัน ซึ่งแบคทีเรียจะต้องอยู่ร่วมกันอาศัยซึ่งกันและกันได้ โดยการย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs ด้วยกลุ่มแบคทีเรียจะช่วยให้ประสิทธิภาพและอัตราในการย่อยสลายเกิดได้ดีขึ้น และทำให้เกิดการย่อยสลายได้โดยสมบูรณ์

การทำงานร่วมกันของแบคทีเรียแต่ละชนิดต่อการย่อยสลายสารปนเปื้อนในกลุ่ม PAHs นั้น ต้องอาศัยการทำงานของระบบเอนไซม์ของแบคทีเรียชนิดที่ 1 ที่สามารถสร้างเอนไซม์ออกมาเพื่อย่อยสลายสารตั้งต้นได้ แต่แบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ จึงทำให้เกิดมีการสะสมของสารมัธยันตร์ต่างๆ ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรียชนิดที่ 1 แต่

แบคทีเรียชนิดที่ 2 นั้นสามารถสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารมัธยันตร์ดังกล่าวได้ โดยจะไปทำให้สารมัธยันตร์มีความเป็นพิษลดลงหรือนำสารดังกล่าวไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ และแบคทีเรียชนิดที่ 2 อาจจะมีส่วนสร้างสารต่างๆ เช่น วิตามิน หรือสารที่ช่วยให้มีการย่อยสลายสารตั้งต้นได้เร็วขึ้น เช่น สารลดแรงตึงผิว ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญต่อการเจริญและการย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs ของแบคทีเรียอื่นต่อไป (Mueller และคณะ, 1989)

Juhasz และคณะ (1997) แยกแบคทีเรียจากดินที่ปนเปื้อนสารในกลุ่ม PAHs ได้แบคทีเรียทั้งหมด 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Burlholderia cepacia* สายพันธุ์ VUN10,001 VUN10,002 และ VUN10,003 กลุ่มแบคทีเรียนี้สามารถใช้สารในกลุ่ม PAHs เช่น ฟลูออรีน ไพรีน และฟีแนนทรีน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ นอกจากนี้ยังย่อยสลายสารพวก ฟลูออแรนธีน เบนโซ[เอ]ไพรีน และไดเบนซ์[เอ,เอช]แอนทราซีน ซึโครงสร้างของสารดังกล่าวประกอบไปด้วยวงอะโรมาติกที่ต่อกันถึง 5 วง โดยใช้ฟีแนนทรีนเป็นสับสเตรทเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของแบคทีเรีย

Guo และคณะ (2005) ศึกษากลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณดินตะกอนชายเลน ซึ่งใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน พบว่า กลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวประกอบไปด้วย *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ HCCS *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ MWFG และ *Paracoccus* sp. สายพันธุ์ SPNT ซึ่งสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ 90% ภายใน 7 วัน

Janbandhu และ Fulekar (2011) คัดแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบๆ โรงงานอุตสาหกรรมปิโตรเคมีและน้ำมัน ได้กลุ่มแบคทีเรียทั้งหมด 3 สายพันธุ์ คือ *Sphingomonas* sp. *Bacillus cereus* และ *Achromobacter insolitus* MHF ENV IV ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ โดยกลุ่มแบคทีเรียนี้จะสร้างสารเมแทบอไลต์ ได้แก่ ซาลิไซลัลดีไฮด์ กรดซาลิไซลิก และ catechol ซึ่งฟีแนนทรีนจะถูกเปลี่ยนให้เป็นสารประกอบที่ไม่ซับซ้อนผ่านทางวิถีทางซาลิไซเลท และกลุ่มแบคทีเรียนี้ยังสามารถสร้างสารพวกอิมัลชันที่ช่วยส่งเสริมการย่อยสลายสารประกอบพวกไฮโดรคาร์บอนต่างๆ

การบำบัดสารในกลุ่ม PAHs ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่นที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs ในดินนั้น จะต้องคำนึงถึงปัจจัยที่มีความสำคัญต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญและรอดชีวิตของจุลินทรีย์ต่างถิ่น ซึ่งโดยปกติแล้วพบว่า เมื่อเติมลงไปในดินธรรมชาติ จำนวนของแบคทีเรียต่างถิ่นจะลดลงอย่างรวดเร็ว เพราะแบคทีเรียจะยังปรับตัวกับสภาวะต่างๆ ในดินได้ไม่ดี

เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ และวิตามินต่างๆ เป็นต้น และนอกจากนี้แล้วปัจจัยทางชีวภาพและกายภาพของดินถือว่าเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการลดลงของจำนวนแบคทีเรีย โดยปัจจัยทางชีวภาพในดิน เช่น ประชากรของแบคทีเรียลดลงเนื่องจากถูกจับกินโดยศัตรูธรรมชาติ เช่น โปรโตซัว เป็นต้น และปัจจัยทางกายภาพของดินที่ส่งผลต่อการลดลงของแบคทีเรีย เช่น ลักษณะของเนื้อดิน ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เป็นต้น (Van Veen และคณะ, 1997)

2.8 การเพิ่มการอยู่รอดของจุลินทรีย์ต่างถิ่น เมื่อนำมาบำบัดดินที่ปนเปื้อนสารในกลุ่ม PAHs

งานวิจัยที่ศึกษาถึงการเพิ่มความสามารถในการอยู่รอดของจุลินทรีย์ต่างถิ่น ดังนี้

Labare และ Alexander (1995) ศึกษาการบำบัดดินที่ปนเปื้อนด้วยสารในกลุ่ม PAHs ในสภาวะสเลอรีโดยใช้อัตราส่วนดินต่อน้ำ 1 กรัมต่อ 1 มล. พบว่าการย่อยสลายฟีแนนทรีนเกิดได้ดีขึ้นจาก 4.4% เป็น 36.9% และการเจริญของแบคทีเรียดีขึ้นเช่นกัน เนื่องจากน้ำมีส่วนช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างจุลินทรีย์และฟีแนนทรีน การเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสนั้นทำให้เกิดการแตกตัวของดิน ซึ่ง PAHs จะสามารถเคลื่อนเข้าไปในวัฏภาคน้ำ รวมทั้งเพิ่มความสามารถในการเข้าจับระหว่างจุลินทรีย์กับ PAHs ที่ปนเปื้อนในดิน (Doick และ Semple, 2003)

วัสดุพาหะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกเพื่อเพิ่มความสามารถในการอยู่รอดของจุลินทรีย์ต่างถิ่นเมื่อนำมาใช้ในการบำบัดดินที่ปนเปื้อน PAHs วัสดุพาหะที่สามารถนำมาใช้ได้มีทั้งวัสดุทางธรรมชาติและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

Hupe และคณะ (1996) ศึกษาคุณสมบัติของวัสดุพาหะที่สำคัญที่ช่วยเพิ่มการเจริญและอยู่รอดของแบคทีเรียต่างถิ่นในดิน ได้แก่ ช่วยเพิ่มการส่งผ่านออกซิเจนในดินให้เกิดได้ดียิ่งขึ้น และเป็นแหล่งสะสมอาหารที่มีความสำคัญโดยเฉพาะไนโตรเจนและฟอสฟอรัส และช่วยป้องกันการ

แก่งแย่งอาหารระหว่างแบคทีเรียในท้องถิ่นกับแบคทีเรียต่างถิ่นและจากการจับกินโดยโปรโตซัวซึ่งเป็นศัตรูธรรมชาติ และยังสามารถช่วยดูดซับเอาสารในกลุ่ม PAHs ที่อยู่ในดิน

มีรายงานวิจัยที่ศึกษาการอาศัยวัสดุพาหะ (carrier materials) เพื่อเพิ่มการเจริญและอยู่รอดของแบคทีเรียหลังจากถูกเติมลงในดินบริเวณที่ต้องการบำบัด ดังนี้

Van Dyke และ Prosser (2000) ศึกษาการสร้างกล้าเชื้อแบคทีเรียก่อนนำไปบำบัดดินที่ปนเปื้อนสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เพื่อเพิ่มการอยู่รอดของ *Pseudomonas fluorescens* ในดิน โดยพบว่าการเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวในวัสดุพาหะก่อนนำไปบำบัดในดิน การรอดชีวิตของแบคทีเรียจะมีอัตราสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากวัสดุพาหะนี้สามารถป้องกันแบคทีเรียจากโปรโตซัวต่างๆ ในดิน การแย่งอาหารระหว่างแบคทีเรียท้องถิ่นที่อยู่ในดินและตัววัสดุพาหะยังสามารถเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญของแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการเลี้ยงแบคทีเรียในวัสดุพาหะที่ใช้ระยะยาวนาน ส่งผลให้แบคทีเรียสามารถปรับสภาพและทนต่อภาวะแวดล้อมได้ดีขึ้น โดยแบคทีเรียที่เลี้ยงในวัสดุพาหะเป็นเวลา 14 วัน จะให้การอยู่รอดของแบคทีเรียสูงสุด

การใช้ประโยชน์จากวัสดุพาหะเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพด้านการเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรียหลังการบำบัดลงดิน พบว่ามีกระบวนการคล้ายกับการหมักในอาหารแข็ง (solid state fermentation) ตามที่ Krishna (2005) รายงานไว้ เพราะกระบวนการหมักในอาหารแข็งนั้นเป็นวิธีเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง โดยเลี้ยงบนสารตั้งต้น (substrate) หรือวัสดุที่มีความแข็ง (solid material) โดยจุลินทรีย์จะเจริญอยู่ภายในโครงสร้างหรือรูพรุนหรืออาจจะเจริญที่ผิวของวัสดุพาหะ ซึ่งวัสดุพาหะที่เป็นของแข็งหรือสารตั้งต้น (substrate) ที่ถูกนำมาใช้โดยส่วนใหญ่นั้น ได้แก่ วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ เปลือกข้าว รำข้าว แกลบ และเปลือกถั่ว เป็นต้น วัสดุทางธรรมชาติ เช่น ดิน หรือเศษใบไม้ กิ่งไม้ และสารอินทรีย์พอลิเมอร์ ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน ได้แก่ แคลเซียมอัลจิเนต อะกาโรส คาราจีแนน เป็นต้น โดยการหมักดังกล่าวสามารถนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ได้ เช่น การผลิตเอนไซม์บางชนิด ผลิตภัณฑ์ทางอาหาร หรือปุ๋ย เป็นต้น

แบคทีเรียมีบทบาทที่สำคัญสำหรับการหมักในอาหารแข็ง โดยเฉพาะการหมักแบบธรรมชาติ (Krishna, 2005) เช่น กระบวนการผลิตปุ๋ยหมัก การผลิตอาหาร หรือการผลิตเอนไซม์บางชนิด เป็นต้น

แบคทีเรียที่มีบทบาทสำหรับการหมักแบบของแข็ง ได้แก่ *Bacillus* sp. *Pseudomonas* sp. *Serratia* sp. *Streptococcus* sp. และ *Lactobacillus* sp. เป็นต้น

นอกจากปัจจัยทางชีวภาพที่เกิดจากคุณสมบัติของจุลินทรีย์แล้ว ปัจจัยทางกายภาพก็มีผลต่อกระบวนการหมักแบบของแข็งเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูง โดยเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์และชีวมวลที่เพิ่มขึ้น (Krishna, 2005) ปัจจัยเหล่านั้นที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์ ได้แก่ อากาศ ความเป็นกรด-เบส ความชื้น และสารอาหาร เป็นต้น

Charoenchang และคณะ (2003) ศึกษาความสามารถของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในการเร่งการบำบัดดินที่ปนเปื้อนสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน พบว่า การเติมเปลือกถั่วและใบจามจุรีช่วยทำให้ปริมาณฟีแนนทรีนลดลงจนตรวจไม่พบภายใน 24 วัน ส่วนฟลูออแรนธีนและไพรีนลดลงจนตรวจไม่พบ ภายในเวลา 42 วัน ในขณะที่ฟางข้าวไม่มีผลต่อการช่วยย่อยสลาย ซึ่งปริมาณ PAHs ไม่ลดลงในดินที่ไม่เติมวัสดุทางการเกษตร และในชุดควบคุมที่ใช้ดินปลอดเชื้อ ผลแสดงให้เห็นว่ามีปัจจัยทางชีวภาพบางชนิดในเปลือกถั่วและใบจามจุรีอาจมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และพบว่าปัจจัยทางชีวภาพบางชนิดในเปลือกถั่วและใบจามจุรีอาจมีบทบาทในการส่งเสริมการย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

Krishna (2005) ได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. บนวัสดุพาหะทางการเกษตร ซึ่งเป็นการหมักในอาหารที่เป็นของแข็ง โดยพบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถเจริญและอาศัยอยู่รอดได้เมื่อนำมาใช้เป็นปุ๋ยหมักให้กับดินจะช่วยในการปรับปรุงสภาพดิน โดยเพิ่มปริมาณแร่ธาตุอาหารและรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดิน

งานวิจัยที่ได้กล่าวข้างต้นเป็นงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการอยู่รอดของจุลินทรีย์โดยใช้ประโยชน์จากวัสดุพาหะและการหมักแบบของแข็งได้นั้น เพื่อรักษาจุลินทรีย์ให้รอดชีวิตได้นานขึ้น และยังคงความบริสุทธิ์ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม โดยควบคุมปัจจัยที่

จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น อุณหภูมิ สารอาหาร การจำกัดอากาศ และน้ำ เป็นต้น การเก็บรักษาจุลินทรีย์แต่ละวิธีนั้น จำเป็นให้เชื้อยังมีชีวิตรอดและคงเดิมไม่เปลี่ยนแปลงมากที่สุด จึงได้มีงานวิจัยที่ศึกษาการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญและอยู่รอดในภาวะของแข็งได้

Pesenti-Barili และคณะ (1991) ศึกษาถึงการอยู่รอดของ *Agrobacter radiobacter* K84 บนวัสดุหลากหลายชนิด เพื่อนำมาใช้ในการการควบคุมโรคพืช ซึ่งได้คัดเลือกมาทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ agriperlite, expanded clay, kaolin, celite, diatom, porosil MP, micro-cel และ vermiculite และบรรจุลงในถุงแล้วกำจัดอากาศออก เปรียบเทียบการเก็บรักษาเชื้อบนวัสดุพาหะทั้ง 8 ชนิด ที่อุณหภูมิ 4 °ซ และ 21 °ซ พบว่า celite, porosil MP และ vermiculite สามารถทำให้ *Agrobacter radiobacter* K84 เจริญและอยู่รอดได้มากที่สุด และแบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ถึง 1-2 ปี และที่อุณหภูมิ 21 °ซ พบว่า *Agrobacter radiobacter* K84 สามารถเจริญและอยู่รอดบน expanded clay, kaolin และ porosil MP ได้ดีกว่าชนิดอื่น ซึ่งแบคทีเรียนี้สามารถอยู่รอดถึง 3-5 เดือน งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าวัสดุพาหะที่ใช้แต่ละชนิดนั้นจะส่งเสริมการเจริญและรอดชีวิตของแบคทีเรียได้แตกต่างกันขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บ

April และคณะ (2009) ศึกษาการเก็บรักษาแบคทีเรียในพอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น acacia gum และ pullulan โดยได้ทดสอบการเก็บรักษาในแบคทีเรียต้นแบบสองชนิด คือ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และ *Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่อุณหภูมิ 40 °ซ โดยผลของความชื้นที่สูงจะส่งผลต่อการอัตรารอดชีวิตของ *E. coli* มากกว่าผลของอุณหภูมิสูง ส่วน *B. subtilis* ที่เก็บรักษาโดย acacia gum ไม่พบการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิและความชื้นต่างๆ และจากผลการทดลองยังพบว่า acacia gum ทำให้แบคทีเรียทั้งสองชนิดมีอัตราการรอดชีวิตที่ดีกว่าในพอลิเมอร์ชนิด pullulan

จากงานวิจัยที่กล่าวมา การบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพโดยการเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่นนั้นต้องคำนึงถึงความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ในดิน และการอยู่รอดของจุลินทรีย์

ทิมากร แสงดำ (2548) ได้คัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย STK จากปุ๋ยหมักใบมะขาม โดยการใช้แผ่นพอลิเตตระฟลูออโรเอทธิลีน (PTFE) ที่เคลือบด้วยไพรีน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ประกอบไปด้วยแบคทีเรีย STK1 STK2 และ STK3 (ตารางที่ 2.2) ที่มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียที่อยู่ในสายพันธุ์ *Zoogloea* sp. *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. โดยแบคทีเรียกลุ่ม

นี้มีสมบัติไม่ชอบน้ำสูง และสามารถย่อยสลายไพรีนที่ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถย่อยสลายไพรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้หมดภายในระยะเวลา 8 วัน และสามารถย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs อื่นๆ ได้แก่ ฟีแนนทรีน ไดเบนโซฟูแรน อะซีแนพธีน และอะซีแนพธิลีน นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายแอนทราซีนกับฟลูออรีนได้เล็กน้อย รวมทั้งเบนโซ[เอ]ไพรีนในขณะที่มีน้ำมันดีเซลรวมอยู่ด้วย

ตารางที่ 2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของกลุ่มแบคทีเรีย STK (ทิมากร, 2548)

แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์	ลักษณะที่ศึกษา	
	โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB	ลักษณะภายใต้กล้อง และการติดสีแกรม
STK1	โคโลนีกลมแบน สีขาว ขอบเรียบ โปร่งแสง ตรงกลางทึบแสง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-5 มม.	แท่ง แกรมลบ
STK2	โคโลนีกลมแบน สีเหลือง ขอบเรียบ โปร่งแสง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-5 มม.	แท่ง แกรมลบ
STK3	โคโลนีกลมแบน สีขาว ขอบเรียบ โปร่งแสง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มม.	แท่งสั้น แกรมลบ

ปิยะวรรณ เพชราภา (2549) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย STK พบว่ากลุ่มแบคทีเรียนี้ไม่สามารถย่อยสลายไพรีนในดินระบบนิเวศ เมื่อจำลองภาวะเป็น solid state ภายในระยะเวลา 1 เดือน โดยปริมาณไพรีนยังคงไม่ลดลง ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีสมบัติไม่ชอบน้ำสูงจึงมีผลทำให้เชื้อไม่สามารถกระจายตัว เนื่องจากดินเป็นระบบนิ่งที่ไม่มีการเขย่าดังการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการ

เขย่าตลอดเวลา อีกปัจจัยคือ เมื่อไพรีนอยู่ในดินโดยใช้ระยะเวลานานขึ้นจะมีผลให้เกิดการจับติดกับอนุภาคของดินซึ่งทำให้เกิดการย่อยสลายได้ยาก (low availability) (Johnsen และคณะ, 2005)

วิธัญญา ชวเจริญพันธ์ (2549) ทำการศึกษาการสร้างกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในวัสดุพาหะชนิดต่างๆ เช่น เปลือกถั่ว เศษใบไม้ชนิดต่างๆ ใบมะขาม และสารเร่ง พด.1 เพื่อคัดเลือกวัสดุที่ให้การเจริญและสามารถย่อยสลายไพรีนได้ดี โดยพบว่า STK ที่เลี้ยงในเปลือกถั่วและเศษใบไม้ชนิดต่างๆ สามารถเจริญอย่างรวดเร็วและย่อยสลายไพรีนได้ 50% ของปริมาณไพรีนเริ่มต้น เมื่อนำเปลือกถั่ว และเศษใบไม้ทั่วไปมาบำบัดการปนเปื้อนไพรีนในดินสองภาวะคือ ของแข็งและสเลอรี (slurry) ที่ความเข้มข้นของไพรีน 100 และ 1,000 มก.ต่อกก.ของดิน พบว่าดินภาวะของแข็งที่มีไพรีน 100 และ 1,000 มก.ต่อกก.ของดิน แบคทีเรียที่เลี้ยงในเปลือกถั่ว มีจำนวนมากขึ้นและย่อยสลายไพรีนได้ 78% และ 54% ของปริมาณไพรีนเริ่มต้น ตามลำดับ ภายในเวลา 60 วัน ส่วนดินในภาวะสเลอรีที่ไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อ กก.ของดิน แบคทีเรียที่เลี้ยงในเปลือกถั่วมีจำนวนมากขึ้นและตรวจไม่พบไพรีนภายในระยะเวลา 10 วัน ส่วนที่ 1,000 มก.ต่อ กก.ของดิน แบคทีเรียค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และสามารถย่อยสลายไพรีนได้ 72% ของปริมาณไพรีนเริ่มต้น และยังพบว่าสามารถเก็บรักษากล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK บนเศษใบไม้ได้นาน 6 เดือน โดยที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนได้ดี

สมบัติไม่ชอบน้ำเป็นคุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของจุลินทรีย์ โดยแบคทีเรียบางชนิดที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำจะสามารถใช้สารที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำได้ เช่น สารพวกไฮโดรคาร์บอนต่างๆ ได้ดีกว่าแบคทีเรียทั่วไป (Obuekwe และคณะ, 2009) ยกตัวอย่างแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำสูง เช่น *Mycobacterium* sp. ซึ่งแยกโดยอาศัยแผ่นเมมเบรนที่ถูกดูดซับด้วยสารในกลุ่ม PAHs และแบคทีเรียนี้สามารถเจริญเติบโตโดยใช้ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (Bastiaens และคณะ, 2000) แบคทีเรียที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำนี้จะมีข้อดีมากกว่าแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติชอบน้ำในด้านของการทนทานต่อสารพิษ และการเข้าจับกับเซลล์ (Rosenberg, 2006) และแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำสูงจะมีอัตราการย่อยสลายสารปนเปื้อนได้เร็วกว่าแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำที่ต่ำกว่า (Farrell และ Quilty, 2002)

Wang และ Han (2007) ได้ศึกษาความสามารถของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ YB-030518 และ YB-034325 ซึ่งมีสมบัติไม่ชอบน้ำและเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกมาบำบัดในบ่อประมงโดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม เช่น การเจริญ อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-เบส ที่มีผลต่อสมบัติไม่ชอบน้ำของแบคทีเรีย พบว่าในการศึกษาผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบสต่างๆ ทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อสมบัติไม่ชอบน้ำของเซลล์ ส่วนการศึกษาการเจริญพบว่าสายพันธุ์ YB-034325 มีอัตราการเจริญและมีสมบัติไม่ชอบน้ำสูงกว่าสายพันธุ์ YB-030518 อย่างมีนัยสำคัญ และความสามารถในการบำบัดในบ่อประมงพบว่าทั้งสองสายพันธุ์สามารถบำบัดได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

นอกจากสมบัติไม่ชอบน้ำที่มีผลต่อการย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs แล้ว ยังมีการเติมสารลดแรงตึงผิวเพื่อเพิ่มการละลาย และการย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs (Boonchan และคณะ, 1998; Kim และ Weber, 2005) การเติมสารลดแรงตึงผิวอาจจะมีผลทำให้ความไม่ชอบน้ำที่ผิวเซลล์จุลินทรีย์ลดลงหรือเพิ่มขึ้น ซึ่งจะมีส่วนสำคัญในการดูดซับและย่อยสลายสารปนเปื้อนที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ ส่วนใหญ่แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs ได้จะมีสมบัติไม่ชอบน้ำที่ผิวเซลล์สูง (Haritash และ Kaushik, 2009) โดยสามารถเข้าจับกับสารในกลุ่ม PAHs ที่ปนเปื้อนในดิน หรือผลึกของ PAHs ได้ (Hwang และคณะ, 2008) และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย เช่น แรมโนลิปิด ซึ่งผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 เมื่อนำมาทดสอบสมบัติไม่ชอบน้ำกับแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* P-CG3 พบว่าแรมโนลิปิดนี้จะเพิ่มสมบัติความไม่ชอบน้ำที่ผิวเซลล์แบคทีเรีย และมีส่วนช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ (Zhenyong และคณะ, 2011)

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs ได้ มีความสำคัญต่อการบำบัด PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นกระบวนการเก็บรักษาเพื่อให้คงสภาพไม่เปลี่ยนแปลง อยู่รอดและยังคงประสิทธิภาพได้นั้น จึงมีความสำคัญต่องานวิจัยต่างๆ รวมทั้งงานบำบัดสิ่งปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

การเก็บรักษาจุลินทรีย์มีหลากหลายแบบ แต่ละแบบมีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกันไป แต่มีวัตถุประสงค์ที่เหมือนกันคือ เพื่อรักษาความมีชีวิตของจุลินทรีย์ให้มีความบริสุทธิ์ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และยังคงความสามารถให้เหมือนเดิมทุกประการ การเลือกใช้วิธีการเก็บรักษา

จุลินทรีย์นั้นควรคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ในการใช้จุลินทรีย์ วิธีการต่างๆ นั้นสามารถส่งกระทบผลต่อการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ จึงควรเลือกวิธีที่ทำให้จุลินทรีย์มีชีวิตรอดใกล้เคียงกับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในตอนเริ่มต้น เพื่อกำจัดปัญหาการเปลี่ยนแปลงลักษณะบางอย่างของจุลินทรีย์ ซึ่งวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ต่างๆ สามารถทำได้ปริมาณมากในแต่ละครั้ง และสามารถคงความมีชีวิตของจุลินทรีย์ได้เป็นเวลานานถึง 50 ปี อีกทั้งยังสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ หากจุลินทรีย์นั้นจัดว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณค่ามาก หรือจำเป็นต้องแจกจ่ายจุลินทรีย์นั้นให้หน่วยงานต่างๆ ที่อยู่ที่ไกลออกไป ถือเป็นวิธีที่ให้ผลที่คุ้มค่า แต่วิธีนี้เป็นวิธีที่ค่อนข้างทำยากและต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง (สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, 2539)

กานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร (2551) ได้ศึกษาผลของภาวะการเก็บเชื้อต่อการรอดชีวิตและความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้ พบว่าการเติมไพรีนระหว่างการเก็บทำให้จำนวนเชื้อที่รอดชีวิตมีสูงกว่าที่ไม่เติมไพรีน และการเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ทำให้การรอดชีวิตของเชื้อสูงกว่าที่อุณหภูมิห้อง และพบว่าในเดือนที่ 8 เมื่อเก็บกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่มีความชื้น 30% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ ใส่และไม่ใส่ไพรีนเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ทำให้ปริมาณไพรีนในดินที่ทดลองในภาวะสเลอรีเหลืออยู่เท่ากับ 2.11% และ 5.01% ตามลำดับ ในงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียไฮโดรโฟบิก STK ที่เตรียมจากวัสดุเหลือใช้จากพืชในการบำบัดไพรีนในดินในภาวะของแข็ง ซึ่งวัสดุเหลือใช้จากพืชสามารถหาได้ง่ายกว่า และเพื่อทำให้สามารถนำไปใช้ในพื้นที่ปนเปื้อนได้จริงและทำให้กล้าเชื้อเกิดการกระจายตัวได้ดียิ่งขึ้น

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (Digital pH meter) รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์

2. เครื่องชั่ง รุ่น PG 2002-S รุ่น PB 3002 และรุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์

3. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 บริษัท Tomy Seiko, ญี่ปุ่น, รุ่น MLS 3020 บริษัท Sanyo, ญี่ปุ่น และรุ่น HV-25, บริษัท Hirayama, ญี่ปุ่น

4. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow cabinet) ISSCO รุ่น BV-124 บริษัท International Scientific Supply, ไทย, รุ่น Clean, รุ่น V3-4 บริษัท Triwork 2000, ไทย และ Bosstech รุ่น HVB 120s บริษัท Boss Scientific Associated, ไทย

5. เครื่องเขย่า (Orbital shaker) รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunswick Scientific, สหรัฐอเมริกา

6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys20 บริษัท Thermo Spectonic, สหรัฐอเมริกา และรุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Unicam, สหรัฐอเมริกา

7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigenerated centrifuge) รุ่น 6500 บริษัท Kubota, ญี่ปุ่น และรุ่น Avanti J-30I บริษัท Beckman Coulter, เยอรมนี

8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Bench-top centrifuge) รุ่น KM-15200 บริษัท Kubota, ญี่ปุ่น

9. ตู้อบความร้อน รุ่น UE 600 และรุ่น UL 80 บริษัท Memmert, เยอรมนี

10. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Sonicator) ชนิดอ่าง รุ่น Soronex RK 100 บริษัท Bandelin Electronic, เยอรมนี

11. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท Memmert, เยอรมนี

12. ชุดเครื่องมือทำไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

สำหรับตรวจสอบปริมาณของ PAHs

- ลิควิดโครมาโทกราฟี (Liquid Chromatography) รุ่น LC-3A บริษัท Shimadzu, ญี่ปุ่น
- คอลัมน์ (column) : Inertsill ODS-3 ขนาด 4.6 X 150 มิลลิเมตร บริษัท GL Science, ญี่ปุ่น
- เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-2A บริษัท Shimadzu, ญี่ปุ่น
- เครื่องบันทึก (recorder) Chromatography รุ่น C-RIA บริษัท Shimadzu, ญี่ปุ่น
- กระบอกฉีดยา (micro syringe) ขนาด 100 ไมโครลิตร รุ่น MS-R50 บริษัท Exmire, สหรัฐอเมริกา

13. เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบปั่นเหวี่ยง (rotary vacuum evaporator) รุ่น CVE-2000 บริษัท Tokyo Rikakikai, ญี่ปุ่น

14. เครื่องคัดกรองขนาดดิน ขนาดความกว้างของรู 0.84 มิลลิเมตร รุ่น O.S.K.119 Standard Sieve บริษัท Okawa Seiki, ญี่ปุ่น

15. เครื่องบด (Blender) รุ่น MX-T31GH บริษัท Matsushita Electric, ไต้หวัน

16. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer-Genie2) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, สหรัฐอเมริกา

17. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, ญี่ปุ่น

18. ไมโครปิเปต ขนาด 200 1,000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, ฝรั่งเศส

19. ปิเปต (Pipette) ขนาด 1 5 และ 10 มล. บริษัท Gilson, ฝรั่งเศส

20. หัวกรองชนิด PTFE ขนาดความกว้างของรู 0.20 และ 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roishi Kaisha, ญี่ปุ่น

21. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มล. ของบริษัท Nissho Nipro, ญี่ปุ่น

22. ขวดแก้วฝาเกลียว (vial) ขนาด 22 มล. (Screw Cap with Teflon Liner) ของบริษัท Lab system, ไทย

23. เครื่องปิดถุงด้วยสุญญากาศ (Vacuum seal)

24. เครื่องดูดอากาศ รุ่น A-3S บริษัท Eyela, ญี่ปุ่น

25 เครื่องทำความเย็น รุ่น CCA-110 บริษัท Eyela, ญี่ปุ่น

26. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilizer) รุ่น Modulyod-230 ของบริษัท Thermo Electron Corporation, USA และ ปั๊มสุญญากาศ Vacuum pump รุ่น VLP200 ของบริษัท Thermo Savant Instruments inc., สหรัฐอเมริกา

27. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -20 °ซ ของบริษัท Sanyo Electric, ญี่ปุ่น

28. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath) รุ่น W 200 และรุ่น WB22 บริษัท Memmert, เยอรมนี

29. เครื่องกวนสารละลาย (Stirrer) Clifton รุ่น CP-1E บริษัท Nickle-Electro, อังกฤษ

เคมีภัณฑ์

1. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical , ญี่ปุ่น
2. ฟีแนนทรีน (phenanthrene) ของบริษัท Sigma, สหรัฐอเมริกา
3. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา
4. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Merck, เยอรมนี
5. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, เยอรมนี
6. แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ของบริษัท J.T.Baker, สหรัฐอเมริกา
7. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) ของบริษัท Merck, เยอรมนี
8. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, ออสเตรเลีย
9. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไตรไฮเดรต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) ของบริษัท Merck, เยอรมนี
10. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, ฝรั่งเศส
11. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) ของบริษัท May & Baker, อังกฤษ
12. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, ออสเตรเลีย
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, เยอรมนี
14. เมทานอล (CH_3OH) ของบริษัท Merck, เยอรมนี

15. เอทิลอะซีเตท ($CH_3COOC_2H_5$) ของบริษัท Merck, เยอรมนี

16. ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) ของบริษัท Merck, เยอรมนี

17. อะซีโตน (CH_3COOCH_3) ของบริษัท Merck, เยอรมนี

18. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (CH_3SOCH_3) ของบริษัท Carlo ERBA, อิตาลี

19. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท Merck, เยอรมนี

20. สารปฏิชีวนะนิสเตติน (Nystatin) ของบริษัท Sigma Chemical, สหรัฐอเมริกา

21. โซเดียมอะซีเตต (CH_3COONa) ของบริษัท Merck, เยอรมนี

22. แบคโตอะการ์ ของบริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา

23. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Merck, เยอรมนี

24. ไซลีน (C_8H_{10}) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti, อิตาลี

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อเปรียบเทียบสมบัติไม่ชอบน้ำของกลุ่มแบคทีเรีย STK กับกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และ *Escherichia coli*

3.1.1 การเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Free Mineral Medium (CFMM)

นำกลุ่มแบคทีเรีย STK เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ปริมาตร 100 มล. ที่มีไพรีนเข้มข้นเท่ากับ 100 มก.ต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. มาบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 8 วัน

3.1.2 การเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM

นำกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 (จิรทีปฆ์ แสนรัก, 2547) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ปริมาตร 100 มล. ที่มีไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นเท่ากับ 100 มก.ต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. มาบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 วัน โดยแบคทีเรีย RRM-V3 เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้ดี จึงนำมาใช้ในการทดสอบ

3.1.3 การเลี้ยงแบคทีเรีย *E.coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani broth (LB)

นำ *E.coli* เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB เป็นเวลา 1 วัน โดยแบคทีเรียนี้เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถย่อยสลายไพรีนและไม่พบรายงานที่ระบุว่าแบคทีเรียนี้มีสมบัติไม่ชอบน้ำ

3.2 สมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) ของกลุ่มแบคทีเรีย STK RRM-V3 และ *E.coli* (ดัดแปลงตามวิธีของ Zhang และคณะ, 2009)

3.2.1 นำกลุ่มแบคทีเรีย STK จากข้อ 3.1.1 กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จากข้อ 3.1.2 และแบคทีเรีย *E.coli* จากข้อ 3.1.3 มาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ และล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl 3 ครั้ง และนำไปปรับจำนวนเซลล์ให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ 8 log CFU ต่อมล. โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.2.2 นำแบคทีเรียแต่ละชนิดมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM แต่ละขวดมีไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 มาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อนำเอาเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไปทดสอบสมบัติไม่ชอบน้ำ

3.2.3 ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ละลายเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน จากนั้นวัดค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.2.4 แบ่งเซลล์แขวนลอยแต่ละชนิดใส่หลอดทดลอง ปริมาตร 2 มล. เติม para-xylene ลงไป 1 มล.เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที

3.2.5 ดูดเอาส่วนล่างอย่างระมัดระวังใส่ในหลอดทดลองอีกหลอด และนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.2.6 บันทึกค่าที่ได้และนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบ โดยสมการที่ใช้ในการคำนวณหาค่าร้อยละของจุลินทรีย์ที่จับกับไฮโดรคาร์บอน (Microbial adhesion to hydrocarbons : MATHs) :

$$\text{ร้อยละของ MATHs} = \frac{\text{ความขุ่นของเซลล์เริ่มต้น} - \text{ความขุ่นของเซลล์หลังเติม p-xylene}}{\text{ความขุ่นของเซลล์เริ่มต้น}} \times 100$$

3.3 สมบัติไม่ชอบน้ำของแต่ละสายพันธุ์ที่ประกอบอยู่ในกลุ่มแบคทีเรีย STK

กลุ่มแบคทีเรีย STK แยกมาจากปุ๋ยหมักใบมะขาม โดย ทิมากร แสงดำ (2547) โดยประกอบด้วยแบคทีเรียทั้งหมด 3 สายพันธุ์ได้แก่ แบคทีเรีย STK1 STK2 และ STK3 ที่มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียที่อยู่ในจีนัส *Zoogloea* sp., *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. ตามลำดับ และพบอีกสายพันธุ์เพิ่มเข้ามาในภายหลัง จากการเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK เป็นระยะเวลานาน คือ STK4 เนื่องจากกลุ่มแบคทีเรียนี้มีสมบัติไม่ชอบน้ำสูงเมื่อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องการทดสอบว่าเมื่อแบคทีเรียสายพันธุ์ใดที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำสูง

3.3.1 นำกลุ่มแบคทีเรีย STK แต่ละสายพันธุ์ แยกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ วัดความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นก่อนเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยใช้ไพรีนที่มีความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำมาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทดสอบสมบัติไม่ชอบน้ำตามข้อ 3.2.3 ถึง 3.2.6 โดยแบ่งเซลล์แขวนลอยแต่ละสายพันธุ์ใส่หลอดทดลอง ปริมาตร 5 มล. ทำสามซ้ำ และเติม para-xylene ปริมาตร 2.5 มล.

3.4 การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดลอง

3.4.1 เศษใบไม้

3.4.1.1 ตัวอย่างวัสดุพาหะประกอบด้วยเศษใบไม้แห้งตามรายงานของ กานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร (2551) ซึ่งประกอบด้วย ใบหูกวาง ใบจามจุรี ใบประดู่ และ ใบโพธิ์ ผสมกัน โดยมาจากบริเวณภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.1.2 ใบหูกวาง ใบจามจุรี ใบประดู่ และใบโพธิ์ มาผสมกัน และตากแห้งโดยผึ่งลมเป็นเวลา 3 วัน ตามวิธีการทดลองของ กานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร (2551) แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น และคัดกรองโดยใช้เครื่องคัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.84 มิลลิเมตร ตามภาพที่ 3.1 แบ่งเศษใบไม้ส่วนหนึ่งเพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพและเคมี ส่วนที่เหลือนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ภาพที่ 3.1 เศษใบไม้ที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านการคัดกรองแล้ว

3.4.1.3 นำตัวอย่างเศษใบไม้ที่ปั่นและคัดกรองแล้ว 0.5 กิโลกรัม ส่งวิเคราะห์ที่ฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เพื่อวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-เบส และความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ อีกส่วนที่เหลือนำไปวิเคราะห์ที่ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณโพแทสเซียม ปริมาณฟอสฟอรัส สารอินทรีย์คาร์บอน และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

3.4.2 วัสดุเหลือใช้จากพืช

3.4.2.1 เศษพืชที่ไม่เจาะจงส่วนประกอบ โดยกวาดรวมกัน จากบริเวณภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

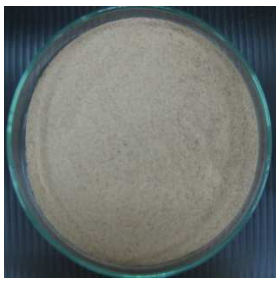
3.4.2.2 เตรียมวัสดุเหลือใช้จากพืชโดยทำตามวิธีในข้อ 3.4.1.2 จะได้วัสดุเหลือใช้จากพืชตามภาพที่ 3.2 และวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 3.4.1.3

ภาพที่ 3.2 วัสดุเหลือใช้จากพืชที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านการคัดกรองแล้ว

3.4.3 ดิน

3.4.3.1 ดินที่ใช้ในการทดลอง นำมาจากบริเวณป่าสวนต้นไม้ จังหวัดอุบลราชธานี คาดว่าดินนี้อยู่ในบริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อนจากสาร PAHs มาก่อน โดยขุดลึกจากผิวประมาณ 2 เซนติเมตร และแยกเศษใบไม้และหินออก

3.4.3.2 นำดินมาบดและคัดกรองโดยใช้เครื่องคัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.84 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3.3) แบ่งดินส่วนหนึ่งเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร PAHs ด้วยวิธี HPLC ซึ่งจะสกัด PAHs ในดินด้วยไดคลอโรมีเธน และวิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพและเคมี ส่วนที่เหลือนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 3.3 ดินที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านการบดและคัดกรองแล้ว

3.4.3.3 นำตัวอย่างดิน 0.5 กิโลกรัม ส่งวิเคราะห์ที่ฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เพื่อวิเคราะห์ ลักษณะเนื้อดิน ความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุหรือไอออน (cation exchange capacity) ค่าความเป็นกรด-เบส ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณโพแทสเซียม สารอินทรีย์คาร์บอน และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

3.5 การเตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK

3.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ใน CFMM

นำกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM จากข้อ 3.1.1 มาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนเซลล์ที่ได้มาล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% และปั่นเหวี่ยงในสภาวะดังที่กล่าวข้างต้น โดยทำซ้ำขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง แล้วนำส่วนเซลล์ที่แขวนลอยในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% มาปรับความเข้มข้นให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ 8 log CFU ต่อมล. โดยวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.5.2 การเตรียมกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ และวัสดุเหลือใช้จากพืช

นำตัวอย่างเศษใบไม้หรือวัสดุเหลือใช้จากพืชที่ไม่ปลอดเชื้อซึ่งเตรียมได้จากข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 มา 1.5 กรัม ใส่ในขวดฝาเกลียว ปรับความชื้นให้เท่ากับ 70% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และปรับความเป็นกรด-เบส ประมาณ 7 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไพรีนที่ละลายในอะซิโตนเติมลงในตัวอย่างใบไม้ที่เตรียมไว้ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 มก.ต่อกก.ของตัวอย่าง และตั้งทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้อะซิโตนระเหยออกให้หมด จากนั้นเติมเซลล์แขวนลอยจากข้อ 3.5.1 ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณเป็น 8 log CFU ต่อกรัมของตัวอย่าง โดยการปรับกรด-เบส เติมไพรีน และเซลล์แขวนลอยยังคงผลให้ความชื้นเท่ากับ 70% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ จากนั้นผสมให้เข้ากัน และนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 14 วัน (วิธัญญา ชวเจริญพันธ์, 2549) โดยขยับฝาเกลียวเพื่อให้อากาศ และวัดความชื้นทุกๆ 7 วัน โดยการชั่งน้ำหนัก แล้ววิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี Viable plate count ตามวิธีในข้อ 3.7

3.6 การย่อยสลายไพรีนในดิน

เนื่องจาก กานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร (2551) ได้ศึกษาถึงความสามารถของกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ซึ่งถูกเตรียมในเศษใบไม้ต่อการย่อยสลายไพรีนในดินแบบสเลอรี ซึ่งพบว่าได้ผลที่ดี ดังนั้นในการทดลองขั้นนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาความสามารถของกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ดังกล่าวในการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็ง และเปรียบเทียบกับการใช้กล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM นอกจากนี้ยังทดสอบการย่อยสลายไพรีนในดินแบบสเลอรี โดยใช้กล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM และจากกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียในเศษใบไม้เช่นกัน

3.6.1 การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็ง

3.6.1.1 การย่อยสลายไพรีนในดินโดยใช้กล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM

ชั่งดินแห้งไม่ปลอดเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.4.3 มา 7.5 กรัม ใส่ในขวดฝาเกลียว ปรับความชื้นให้มีค่าเท่ากับ 70% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปรับความเป็นกรด-เบส ประมาณ 7 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม นำไพรีนที่ละลายในอะซิโตนผสมลงในดินที่เตรียมไว้โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1,000 มก.ต่อกก.ของดิน ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน แล้วเติมเซลล์แขวนลอยจากข้อ 3.5.1 ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณเป็น 8 log CFU ต่อกรัม โดยการปรับกรด-เบส เติมไพรีน และเซลล์แขวนลอยยังคงผลให้ความชื้นเท่ากับ 70 % ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 °ซ ขยับฝาเกลียวเพื่อให้อากาศ และวัดความชื้นทุกๆ 7 วัน โดยการชั่งน้ำหนัก เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 7 14 21 และ 28 มาตรวจหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์หาปริมาณไพรีนที่เหลือโดยวิธี HPLC ตามวิธีในข้อ 3.8 โดยสกัดไพรีนในส่วนของวัฏภาคดิน ทั้งนี้ชุดควบคุมได้รับการทดลองเช่นเดียวกันเพียงแต่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM

3.6.1.2 การย่อยสลายไพรีนในดินโดยใช้กล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมในเศษใบไม้

ทำตามวิธีในข้อ 3.6.1.1 แต่ใช้กล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมในเศษใบไม้ในข้อ 3.5.2

3.6.2 การย่อยสลายไพรีนในสเลอรีดิน

3.6.2.1 การย่อยสลายไพรีนในสเลอรีดินโดยใช้กล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM

นำดินแห้งไม่ปลอดเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.4.3 มา 7.5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ปรับความเป็นกรด-เบส ประมาณ 7 แล้วผสมให้เข้ากันกับดินโดยเครื่องปั่นผสม และเติมไพรีนความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อกก. ที่ละลายในอะซิโตนลงในตัวอย่างดินด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้มีอัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1:8 ตามวิธีของ รุจา สารคุณ (2548) ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM จากข้อ 3.5.1 ให้มีปริมาณให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณเป็น 8 log CFU ต่อกรัมของดิน เตรียมชุดการทดลองทั้งหมด 12 ขวดรูปชมพู่ และนำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 °ซ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน และเก็บตัวอย่างครั้งละ 4 ขวด ในวันที่ 0 5 และ 10 โดยนำ 3 ขวด มาวิเคราะห์หาปริมาณไพรีนที่เหลือโดยวิธี HPLC จากส่วนสกัดไพรีนรวมจากทั้งวัฏภาคน้ำด้วยเอธิลอะซีเตท ตามวิธีในข้อ 3.8.1.2 และวัฏภาคดินด้วยไดคลอโรมีเธนตามวิธีในข้อ 3.8.1.1 และนำขวดที่ 4 มาตรวจหากลุ่มแบคทีเรีย STK ตามวิธีในข้อ 3.7 โดยชุดควบคุมจะมีลักษณะเดียวกันเพียงแต่ไม่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรียลงไป

3.6.2.2 การย่อยสลายไพรีนในดินโดยใช้กล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมในเศษใบไม้

ทำตามวิธีในข้อ 3.6.2.1 แต่ใช้กล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมในเศษใบไม้ในข้อ 3.5.2

3.7 การวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธี Viable Plate Count

นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และนำไปเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นดินหรือใบไม้ต้องเติมนิสเตติน ความเข้มข้น 200 มก.ต่อลิตร เพื่อป้องกันการเจริญของรา และนำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นและคำนวณจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียทั้งหมด

3.8 การวิเคราะห์ปริมาณไพรีน

3.8.1 การสกัดไพรีนในดินแบบสเลอรี แยกเป็น 2 ส่วนคือ

3.8.1.1 การสกัดไพรีนในส่วนวัฏภาคดินด้วยไดคลอโรมีเธน (ดัดแปลงจาก Juhasz และคณะ, 1997)

เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส 1 เท่าของตัวอย่าง ลงในขวดแก้วบรรจุดิน จากนั้นสกัดด้วยไดคลอโรมีเธนปริมาตร 1 เท่าของตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 2 นาที นำตัวอย่างดินในขวดแก้วไปจุ่มในอ่างกำเนิดเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ไพรีนหลุดออกมาจากดิน จากนั้นแยกส่วนไดคลอโรมีเธนเก็บไว้ และสกัดตัวอย่างซ้ำอีก 2 ครั้ง รวบรวมส่วนไดคลอโรมีเธนทั้งหมดไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน ละลายตะกอนไพรีนในขวดก้นกลมด้วยเมธานอลปริมาตร 1 มล. กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่ในหลอดแก้วขนาดเล็ก และนำตัวอย่างในแต่ละชุดการทดลองไปวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่โดยวิธี HPLC

3.8.1.2 การสกัดไพรีนในส่วนวัฏภาคน้ำด้วยเอธิลอะซีเตท (ดัดแปลงจาก Rehmann และคณะ, 1998)

นำส่วนวัฏภาคน้ำที่ทราบปริมาตรที่แน่นอนมาปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เท่ากับ 2.0-3.0 โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นเติมเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของส่วนวัฏภาคน้ำผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นแยกส่วนเอธิลอะซีเตทเก็บไว้ ทำการสกัดส่วนวัฏภาคน้ำซ้ำอีก 2 ครั้งด้วยเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่า รวบรวมส่วนเอธิลอะซีเตททั้งหมดเข้าด้วยกัน กำจัดน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส นำส่วนเอธิลอะซีเตทไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน ละลายไพรีนในขวดก้นกลมด้วยเมธานอลปริมาตร 1 มล. กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่ในหลอดแก้วขนาดเล็ก และนำตัวอย่างในแต่ละชุดการทดลองไปวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่โดยวิธี HPLC ต่อไป

3.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่โดยวิธี HPLC

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.8.1.1 และ 3.8.1.2 มาวิเคราห์โดยวิธี HPLC ซึ่งมีส่วนประกอบและสภาวะต่างๆในระบบ ดังนี้

คอลัมน์ (Column)	: Inertsill ® ODS (4.6X150มม.)
ตัวชะสาร (Mobile phase)	: เมธานอล 80%
อัตราการไหล (Flow rate)	: 1 มล.ต่อนาที
อุณหภูมิคอลัมน์	: 40 °ซ
ความยาวคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตใช้ตรวจวิเคราะห์	: 275 นาโนเมตร
ปริมาณสารที่ฉีด	: 10 ไมโครลิตร

เมื่อพบว่ากล้าเชื้อที่เตรียมในเศษใบไม้ สามารถย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งได้ดีใกล้เคียงกับการใช้กล้าเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM และกล้าเชื้อที่เตรียมในเศษใบไม้ในดินภาวะสเลอรี แสดงว่าการใช้กล้าเชื้อที่เตรียมในเศษใบไม้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งไม่ด้อยกว่าเชื้อที่ย่อยไพรีนในดินภาวะสเลอรี จึงได้ทดลองใช้วัสดุพาหะชนิดอื่น คือ วัสดุเหลือใช้จากพืชซึ่งหาได้ง่าย โดยไม่ต้องคัดแยกเฉพาะเศษใบไม้เพียงอย่างเดียว มาทดสอบการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็ง

3.9 การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งด้วยกล้าเชื้อที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืช

ทำตามวิธีในข้อ 3.6.1.1 โดยใช้กล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.2

เมื่อพบว่ากล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืชสามารถย่อยสลายไพรีนในดินได้ดี จึงนำไปเก็บรักษากล้าเชื้อที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืช

3.10 การเก็บรักษากล้าเชื้อ STK โดยการทำแห้งเยือกแข็ง

นำกลุ่มแบคทีเรียที่เจริญในวัสดุเหลือใช้จากพืชเป็นเวลา 14 วัน ที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.2 มาเก็บใส่ถุงอะลูมิเนียม ลดความชื้นให้เหลือ 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำด้วยปั๊มจากเครื่องไลโอฟิไลซ์ดังแสดงในภาพ 3.6 (กานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร, 2551)

จับเวลา 5 ชั่วโมง เพื่อลดความชื้นให้เหลือประมาณ 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ จากนั้นนำมาใส่ถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ แล้วนำไปปิดถุงให้ภายในมีสภาพเป็นสุญญากาศโดยใช้เครื่องผนึกสุญญากาศ (vacuum seal) ดังแสดงในภาพที่ 3.4 และเก็บตัวอย่างไว้ในถุงพลาสติกที่มีซิปล็อกโดยใส่ถุงซิลิกาเจลเพื่อดูดความชื้น (ภาพที่ 3.5) จากนั้นนำไปเก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทั้งหมด 4 ครั้งคือ เดือนที่ 0 3 6 และ 9 ตามลำดับ โดยนำตัวอย่างในแต่ละครั้งมาทดสอบหาการอยู่รอดและประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนในดินของกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืช

ภาพที่ 3.4 ภาพถุงอะลูมิเนียมหลังปิดผนึกในสุญญากาศ

ภาพที่ 3.5 ถุงอะลูมิเนียมหลังปิดผนึกในสุญญากาศและถุงซิลิกาเจล
ที่ใช้ในการทดลอง

ภาพที่ 3.6 เครื่อง freeze dryer

3.11 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งและจำนวนแบคทีเรียก่อนและหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

3.11.1 นับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียในวัสดุเหลือใช้จากพืชทั้งก่อนและหลังกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง โดยวิธี Viable Plate Count ตามข้อ 3.7

3.11.2 ทำตามวิธีในข้อ 3.6.1.1 โดยใช้กล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ก่อนและหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็งทันที

3.12 การอยู่รอดและประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย STK หลังทำการเก็บโดยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็งที่ระยะเวลาต่าง ๆ

3.12.1 นับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในกล้าเชื้อที่เก็บในระยะเวลาต่างๆ โดยวิธี Viable Plate Count ตามข้อ 3.7

3.12.2 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดิน ทำตามวิธีในข้อ 3.6.1.1 แต่ใช้กล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่ทำการเก็บในระยะเวลาต่างๆ และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไพรีนที่เหลือในดินโดยวิธี HPLC ตามข้อ 3.8

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินและวัสดุพาหะที่นำมาใช้ในการทดลอง

ดินที่นำมาใช้ในการทดลองเก็บมาจากบริเวณสวนป่าไม้ ในเขตพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี เป็นดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ เนื้อดินมีลักษณะร่วน และยังมีความเป็นกรด โดยแหล่งดินนี้ไม่พบประวัติการปนเปื้อนสารพวก PAHs มาก่อน และจากการตรวจสอบ PAHs ในดิน โดยสกัดและวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของสารดังกล่าว ซึ่งอัตราส่วนของค่า C:N ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน คือ 10:1 (Liebig และ Curtright, 1999) ดังนั้นค่าที่วิเคราะห์ได้มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่เหมาะสมโดยมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12:1 จึงไม่จำเป็นต้องเติมคาร์บอนและไนโตรเจนลงไปในดิน

ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่นำมาใช้ในการทดลองนี้มาจากฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่นำมาใช้ในการทดลอง

พารามิเตอร์	ผลการวิเคราะห์
ลักษณะดิน	ดินร่วนปนทราย
ค่าความเป็นกรด ด่าง	5.7
ค่าความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (%)	20.96
ค่าความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุหรือไอออน ($cmol_c kg^{-1}$)	3.1
ปริมาณสารอินทรีย์ (%)	1.02
ปริมาณคาร์บอน (%)	0.592
ปริมาณไนโตรเจน (%)	0.051
ปริมาณฟอสฟอรัส (ppm)	32
ปริมาณโพแทสเซียม (ppm)	28
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N)	12

หมายเหตุ วิเคราะห์โดยฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

วัสดุพาหะที่นำมาใช้ในการทดลองนี้มีสองชนิดด้วยกันคือ เศษใบไม้ชนิดต่างๆ (กานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร, 2551) เป็นต้น ใบไม้ประกอบไปด้วย ใบหูกวาง ใบจามจุรี ใบประดู่ ใบโพธิ์ ผสมกัน

ส่วนวัสดุพาหะอีกชนิด เป็นวัสดุเหลือใช้จากพืชที่ปะปนกันอยู่ เช่น กิ่งไม้ขนาดเล็ก หญ้า และเศษใบไม้ทั่วไป ได้แก่ ใบหูกวาง ใบจามจุรี ใบประดู่ ใบโพธิ์ ใบไทร ใบจำปี และใบทองกวาว เป็นต้น

ผลวิเคราะห์ทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของวัสดุพาหะที่นำมาใช้ แสดงในตารางที่ 4.2 จากผลการทดลองพบว่า เศษใบไม้และวัสดุเหลือใช้จากพืชมีลักษณะเป็นกรด และเศษใบไม้ที่นำมาใช้พบว่ามีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) ใกล้เคียงกับค่าที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนคือ 10:1 (Liebig และ Curtright, 1999)

แต่ในวัสดุเหลือใช้จากพืชจะมีปริมาณอินทรีย์คาร์บอนที่มากกว่าในเศษใบไม้ เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของพวกกิ่งไม้ส่วนใหญ่เป็นคาร์บอน ส่วนองค์ประกอบในใบไม้ส่วนใหญ่จะเป็นไนโตรเจน ซึ่งจะเห็นได้ว่าในเศษใบไม้นั้นมีปริมาณไนโตรเจนที่มากกว่าในวัสดุเหลือใช้จากพืช

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของวัสดุพาหะที่ใช้ในการทดลอง

พารามิเตอร์	ผลการวิเคราะห์	
	เศษใบไม้	วัสดุเหลือใช้จากพืช
ค่าความเป็นกรดด่าง	4.74*	4.50*
ค่าความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ (%)	268.29*	314.47*
ปริมาณอินทรีย์คาร์บอน (%)	36.69**	47.05**
ปริมาณไนโตรเจน (%)	2.31**	0.87**
ปริมาณฟอสฟอรัส (%)	0.82**	0.21**
ปริมาณโพแทสเซียม (%)	0.23**	0.74**
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (%)	11.29**	54.08**

หมายเหตุ * วิเคราะห์โดย ฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

** วิเคราะห์โดย ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2 **สมบัติไม่ชอบน้ำของกลุ่มแบคทีเรีย** STK

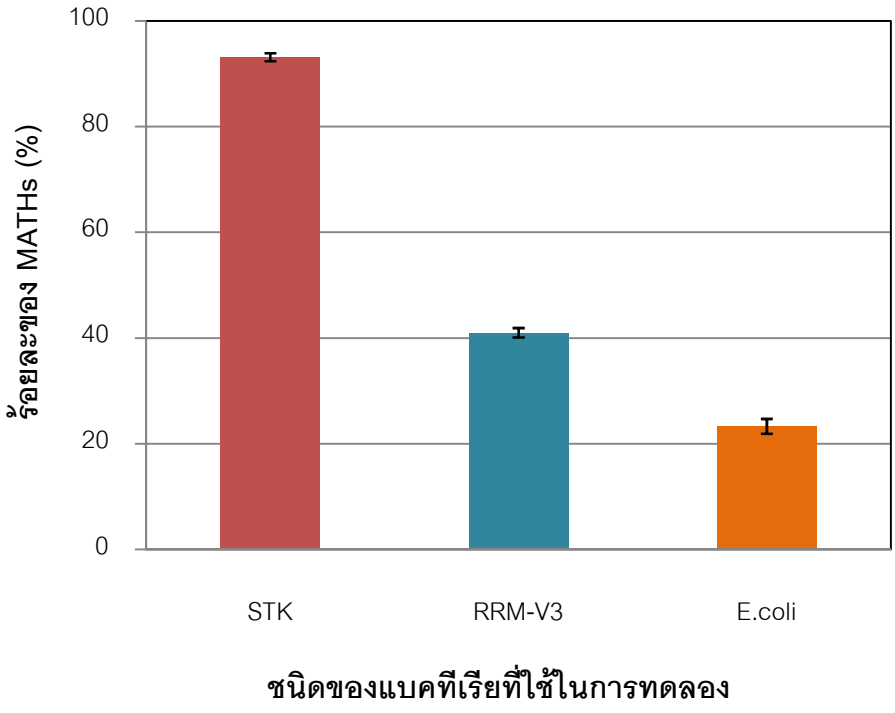
4.2.1 **สมบัติไม่ชอบน้ำของกลุ่มแบคทีเรีย** STK RRM-V3 **และ** *E.coli*

ผลของการวิเคราะห์สมบัติการไม่ชอบน้ำของกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ซึ่งมีความสามารถย่อยสลายสารประกอบพวกพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้ดีเช่นเดียวกัน และ *E.coli* โดยตามหลักการนั้น แบคทีเรียที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำจะเข้าจับกับสารที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำได้ดี โดยไซลีนที่เติมลงไปมีสมบัติไม่ชอบน้ำ

โดยจะไปจับกับแบคทีเรีย ซึ่งจะทำให้ค่าความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียที่วัดได้ลดลงจากค่าเริ่มต้น หากแบคทีเรียมีสมบัติไม่ชอบน้ำสูงจะทำให้ค่าความขุ่นของเซลล์ลดลงมาก โดยนำแบคทีเรียแต่ละชนิดมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ซึ่งมีความเข้มข้นของไพรีน 100 มก.ต่อลิตร และนำค่าที่วัดได้จากเครื่องวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร มาวิเคราะห์หาค่า Microbial adhesion to hydrocarbons (MATHs) ตามสูตร

$$\text{ร้อยละของ MATHs} = \frac{\text{ความขุ่นของเซลล์เริ่มต้น} - \text{ความขุ่นของเซลล์หลังเติม p-xylene}}{\text{ความขุ่นของเซลล์เริ่มต้น}} \times 100$$

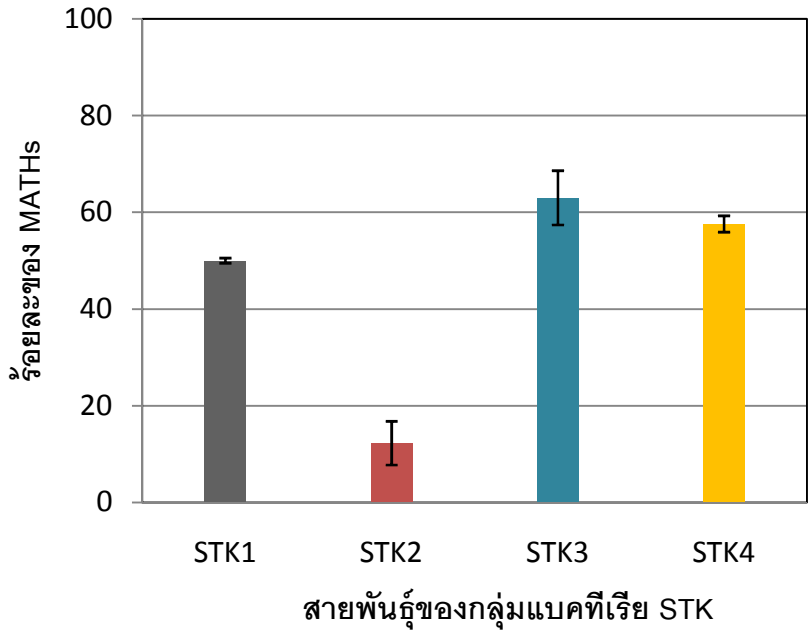
จากผลการวิเคราะห์พบว่า กลุ่มแบคทีเรีย STK มี MATHs เท่ากับ 93.14% ส่วนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และ *E.coli* มีค่าร้อยละของ MATHs เท่ากับ 41.00% และ 23 ตามลำดับ ดังแสดงตามภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 สมบัติไม่ชอบน้ำของกลุ่มแบคทีเรีย STK กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และ *E.coli*)

4.2.2 สมบัติไม่ชอบน้ำของกลุ่มแบคทีเรีย STK แต่ละสายพันธุ์

กลุ่มแบคทีเรีย STK ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ STK1 STK2 และ STK3 ตามรายงานของ ทิมากร แสงดำ (2548) ส่วน STK4 เป็นสายพันธุ์ที่ปรากฏขึ้นมาในภายหลัง ซึ่งเกิดจากการเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK เป็นเวลานาน โดยแบคทีเรียนี้ไม่ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนลดลง จากนั้นนำแบคทีเรียแต่ละชนิดมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ซึ่งมีความเข้มข้นของไพรีน 100 มก.ต่อลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อนำไปวัดค่าความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเติมไซลีน หลังจากนั้นนำมาวัดหาความเข้มข้นของเซลล์หลังจากเติมไซลีนแล้ว ซึ่งผลการทดลองได้แสดงดังในภาพที่ 4.2



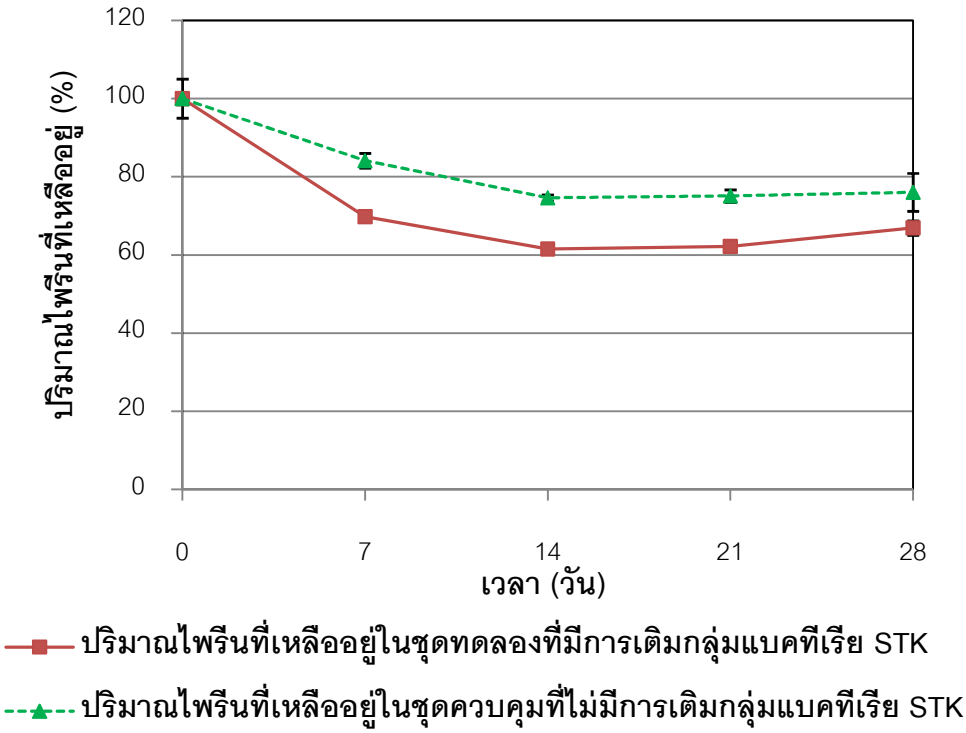
ภาพที่ 4.2 สมบัติไม่ชอบน้ำของกลุ่มแบคทีเรีย STK แต่ละสายพันธุ์

จากผลการวิเคราะห์พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ STK1 มีร้อยละของ MATHs ค่าเท่ากับ 50.00 สายพันธุ์ STK3 และ STK4 มีค่าเท่ากับ 63.00 และ 57.59 ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ STK2 นั้น มีค่าเท่ากับ 12.24 ซึ่งน้อยที่สุด

4.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดิน

4.3.1 การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM

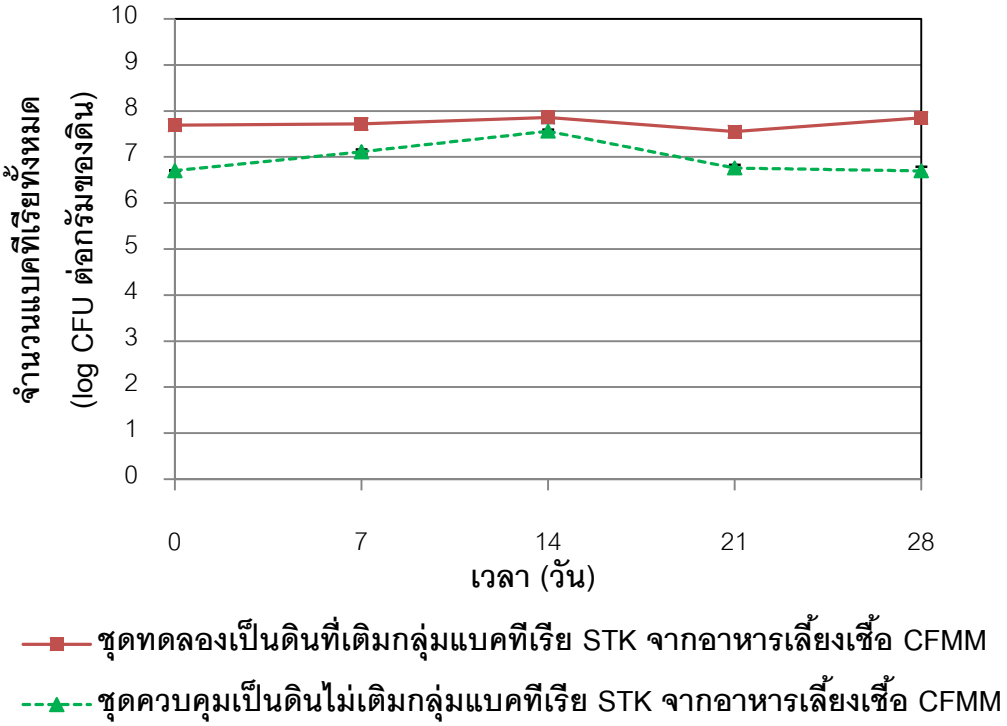
ผลการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่หลังการย่อยสลายด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK จากอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับวันที่ 0 ซึ่งคิดเป็นปริมาณไพรีนเริ่มต้นเท่ากับ 100% (ไพรีนมีความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อ กก.ของดิน) หลังการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน นำไประเหยจนแห้ง ละลายไพรีนกลับด้วยเมธานอล จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า วันที่ 28 ของการทดลอง ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรียไฮโดรโฟบิก STK จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM มีค่าเท่ากับ 66.89% ในขณะที่ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรียลดลงเหลือ 76.01% จากวันเริ่มต้น แสดงว่าปริมาณไพรีนที่ลดลงในชุดทดลองนั้นอาจไม่ได้มาจากการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจจะเกิดการระเหยหรือไพรีนถูกดูดซับไว้ในอนุภาคของดิน ดังแสดงในภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งที่มีความเข้มข้น 1,000 มก. ต่อกก.ของดินด้วยกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM และชุดควบคุม

4.3.2 จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่เติมลงดินในภาวะของแข็ง

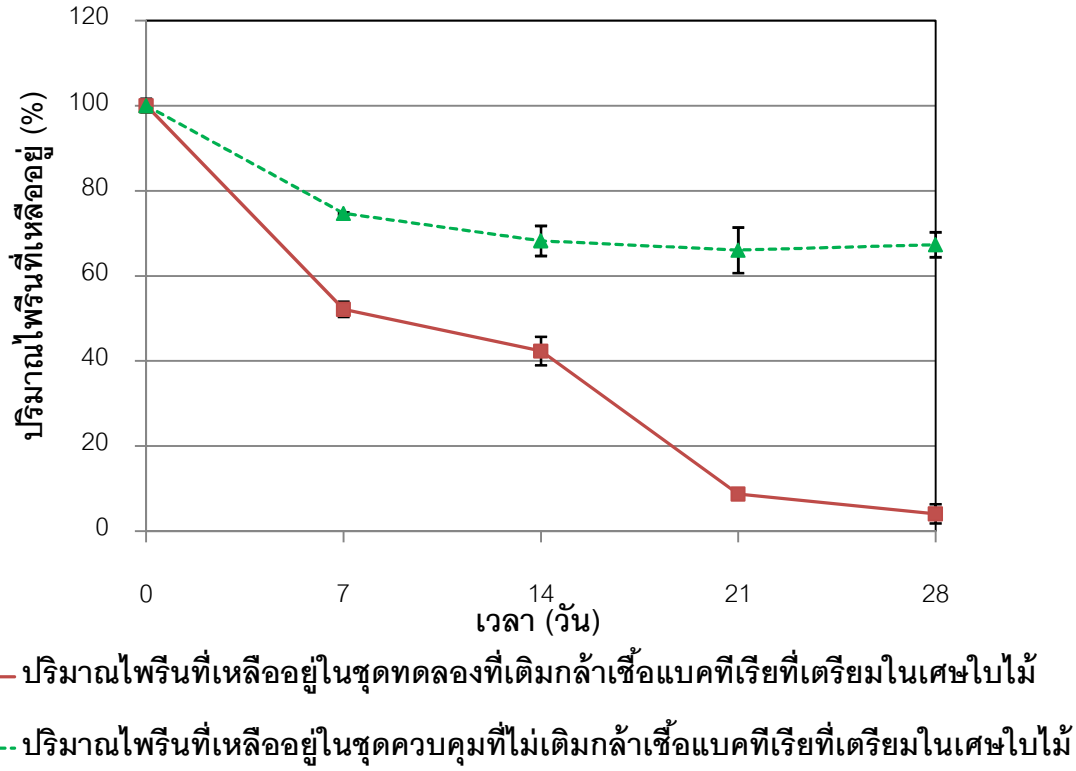
ผลการวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดทดลองในดินภาวะของแข็ง พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง แบคทีเรียเริ่มต้นมีจำนวนเท่ากับ 7.69 log CFU ต่อกรัม และเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ซึ่งในวันที่ 14 พบว่าจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเท่ากับ 7.86 log CFU ต่อกรัม และคงที่ในวันที่ 28 ของการทดลอง ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 7.85 log CFU ต่อกรัม ในขณะที่จำนวนกลุ่มแบคทีเรียในชุดควบคุมนั้น มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 6.70 log CFU ต่อกรัม ค่อยๆ เพิ่มขึ้น โดยในวันที่ 14 จำนวนแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 7.56 log CFU ต่อกรัม และลดลงจนถึงวันที่ 28 มีจำนวนแบคทีเรียเหลืออยู่เท่ากับ 6.70 log CFU ต่อกรัม ดังแสดงในภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดทดลอง (ดินภาวะของแข็งที่มีความเข้มข้นของไพรีน 1,000 มก. ต่อกก.ของดิน และเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM) และชุดควบคุม

4.3.3 การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในเศษใบไม้

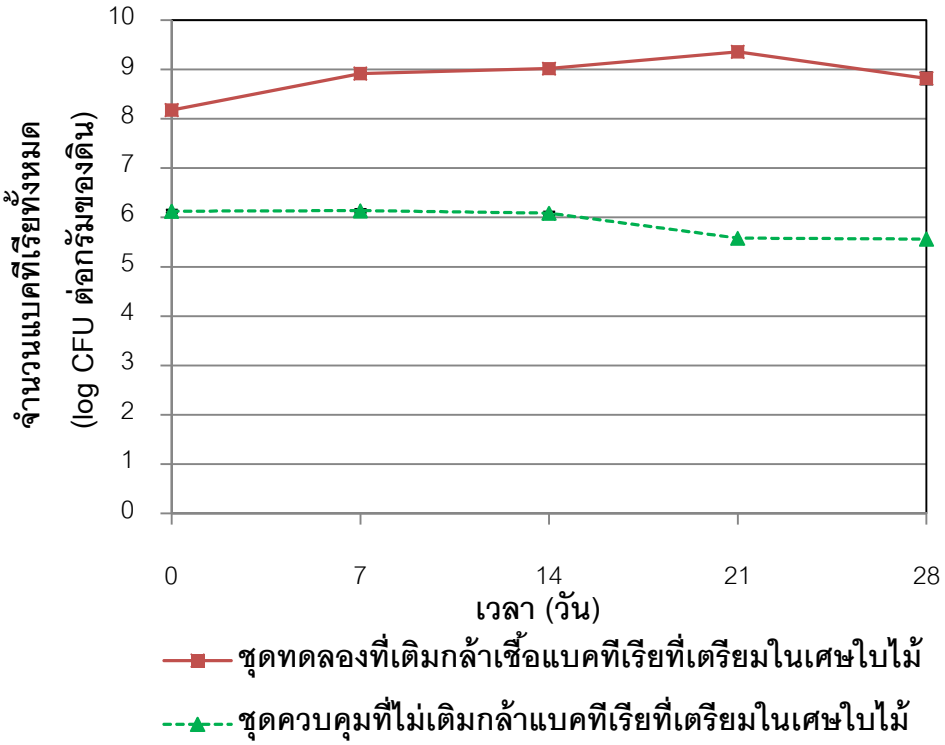
เมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ ในภาวะที่เหมาะสม โดยเติมไพรีนที่มีความเข้มข้น 100 มก.ต่อกก.ของเศษใบไม้ เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 8.57 log CFU ต่อกรัมของเศษใบไม้ แล้วเติมลงในดินที่อยู่ในภาวะของแข็ง ผลการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในชุดทดลองที่เติมกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียซึ่งเตรียมในเศษใบไม้ โดยวันเริ่มต้นของการทดลองคิดเป็น 100% ทดลองเป็นเวลา 28 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 7 วัน พบว่าปริมาณไพรีนในตัวอย่างค่อยๆ ลดลง โดยในวันที่ 7 เหลืออยู่เท่ากับ 52.14% และในวันสุดท้ายเหลืออยู่เท่ากับ 4.08% ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมในเศษใบไม้ พบว่าปริมาณไพรีนจากวันเริ่มต้นจนถึงวันสุดท้ายของการทดลองลดลงเพียงเล็กน้อย แสดงว่าการเติมกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมในเศษใบไม้มีการย่อยสลายไพรีนเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงในภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งที่มีความเข้มข้น 1,000 มก. ต่อกก.ของดินด้วยกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในเศษใบไม้ และชุดควบคุม

4.3.4 จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในเศษใบไม้เติมลงดินในภาวะของแข็ง

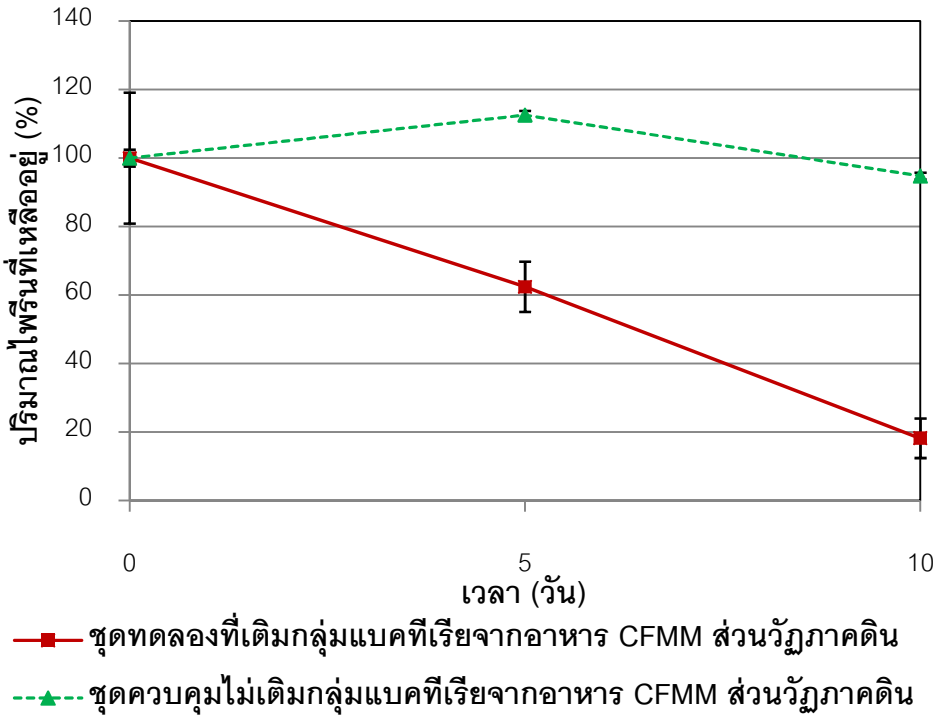
ผลการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียโดยวิธี Viable Plate Count พบว่า จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นในชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมในเศษใบไม้ มีค่าเท่ากับ 8.17 log CFU ต่อกรัม และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 21 ของการทดลอง มีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 9.36 log CFU ต่อกรัม และลดลงในวันสุดท้ายของการทดลองซึ่งมีจำนวนเท่ากับ 8.82 log CFU ต่อกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับวันเริ่มต้นของการทดลองพบว่ามีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้น ส่วนในชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมในเศษใบไม้ พบว่าจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 6.12 log CFU ต่อกรัม และเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในวันที่ 7 ของการทดลอง หลังจากนั้นจึงลดลงเรื่อยๆ จนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 5.56 log CFU ต่อกรัม ดังแสดงในภาพที่ 4.6



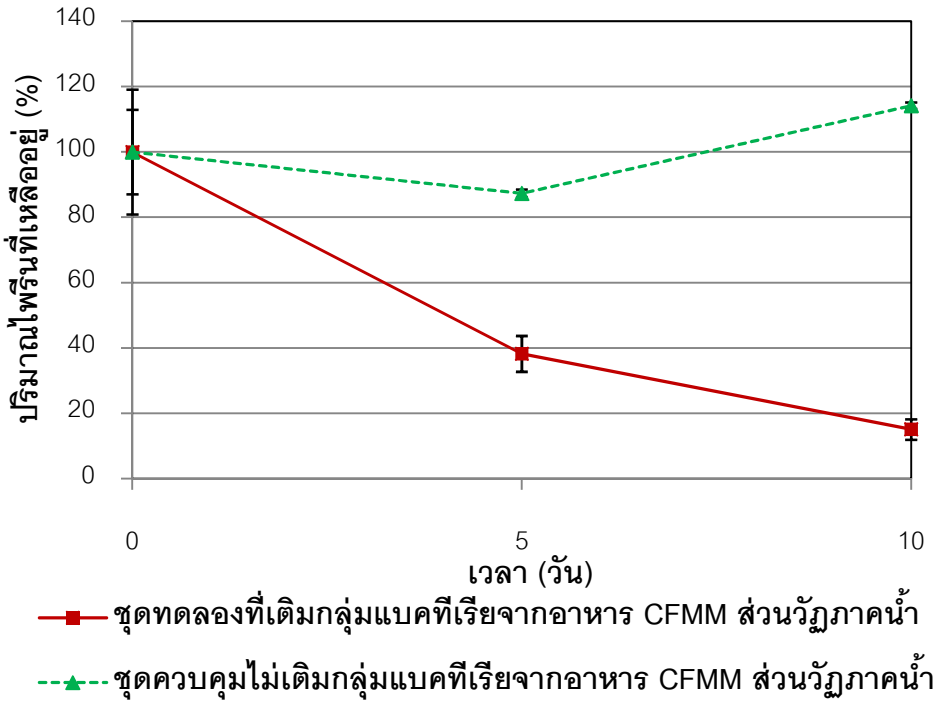
ภาพที่ 4.6 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดทดลอง (ดินภาวะของแข็งที่มีความเข้มข้นของไพรีน 1,000 มก.ต่อ กก.ของดินและเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมในเศษใบไม้) และชุดควบคุม

4.3.5 การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะสเลอรีด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM

เก็บตัวอย่างดินในส่วนวัฏภาคน้ำและวัฏภาคดินและเตรียมตามวิธีในข้อ 3.10 ปริมาณไพรีนในดินวันที่ 0 ของการทดลองคิดเป็น 100% หลังจากบ่มเป็นเวลา 5 วัน พบว่ามีปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ 62.43% และ 38.19% ในส่วนวัฏภาคดินและวัฏภาคน้ำตามลำดับ ส่วนในชุดควบคุม พบว่า ปริมาณไพรีนในส่วนวัฏภาคดินและส่วนวัฏภาคน้ำเหลืออยู่ 112.60% และ 87.34% ตามลำดับ ส่วนวันที่ 10 ของการทดลอง พบว่าปริมาณไพรีนทั้งในส่วนวัฏภาคดินและน้ำเหลืออยู่ 18.21% และ 15.04% ตามลำดับ ในชุดควบคุมนั้นพบปริมาณไพรีนทั้งในส่วนของวัฏภาคดินและน้ำเหลืออยู่ 94.76% และ 114.21% ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.7 และ 4.8



ภาพที่ 4.7 การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะสเลอรีในส่วนวัฏภาคดินที่มีความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อกก.ของดิน ด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM และชุดควบคุม



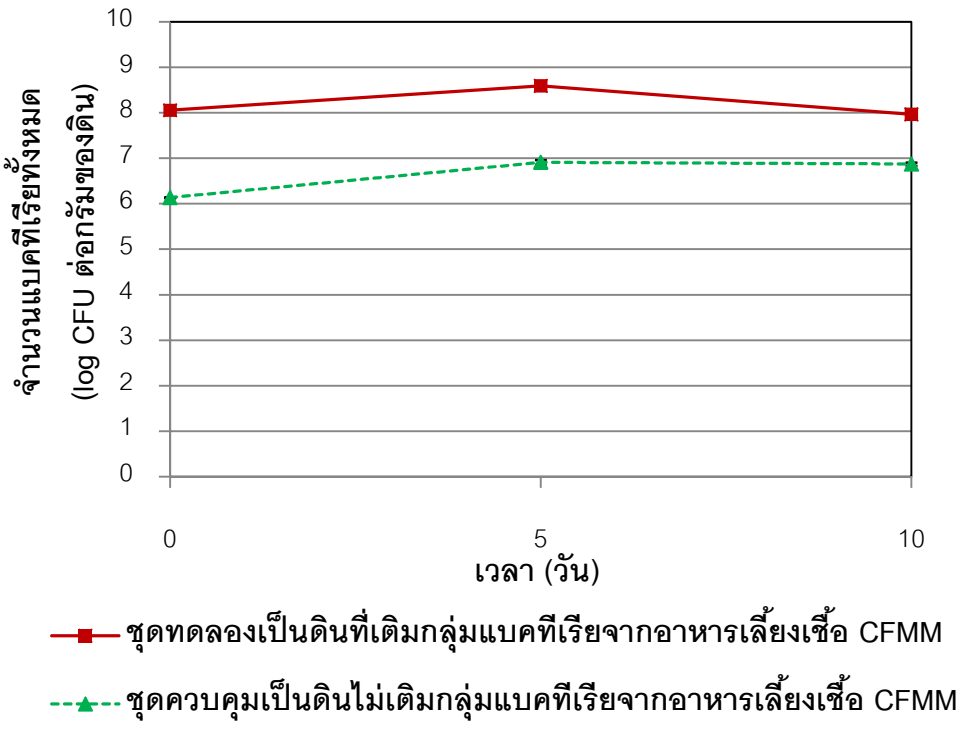
ภาพที่ 4.8 การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะสเลอรีในส่วนวัฏภาคน้ำที่มีความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อ กก.ของดิน ด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM และชุดควบคุม

ตารางที่ 4.3 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในส่วนวัฏภาคดินและน้ำ ระยะเวลา 10 วัน เมื่อใช้กลุ่มแบคทีเรีย STK จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM และชุดควบคุม

สภาวะ	ระยะเวลา (วัน)					
	0		5		10	
	ดิน	น้ำ	ดิน	น้ำ	ดิน	น้ำ
เติม STK (ทดลอง)	100	100	62.43	38.19	18.21	15.04
ไม่เติม STK (ควบคุม)	100	100	112.60	87.34	94.76	114.21

4.3.6 จำนวนกลุ่มแบคทีเรียไฮโดรโฟบิก STK จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่เติมลงดินในภาวะสเลอรี

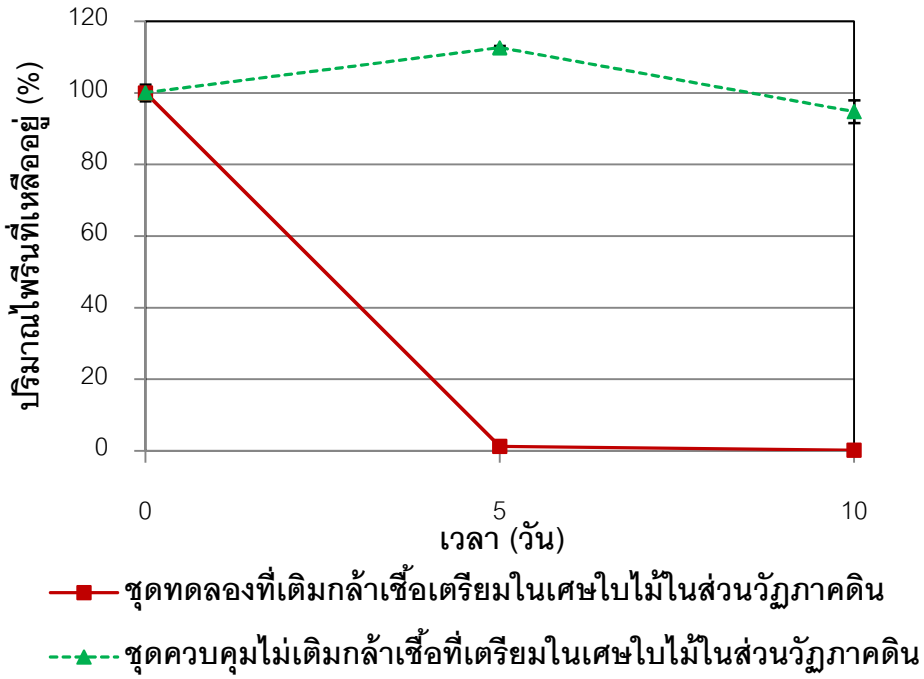
ผลการวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลอง พบว่า วันที่ 0 ของการทดลอง แบคทีเรียมีปริมาณเท่ากับ 8.06 log CFU ต่อกรัม และเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยในวันที่ 5 ของการทดลอง พบว่าจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเท่ากับ 8.60 log CFU ต่อกรัม และลดลงในวันที่ 10 ของการทดลอง ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 8.00 log CFU ต่อกรัม ในขณะที่จำนวนกลุ่มแบคทีเรียในชุดควบคุม มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 6.14 log CFU ต่อกรัม หลังจากนั้นจึงเพิ่มขึ้นในวันที่ 5 โดยจำนวนแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 6.91 log CFU ต่อกรัม และลดลงไม่มากในวันที่ 10 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลอง โดยมีจำนวนแบคทีเรียเหลืออยู่เท่ากับ 6.88 log CFU ต่อกรัม ดังภาพที่ 4.9



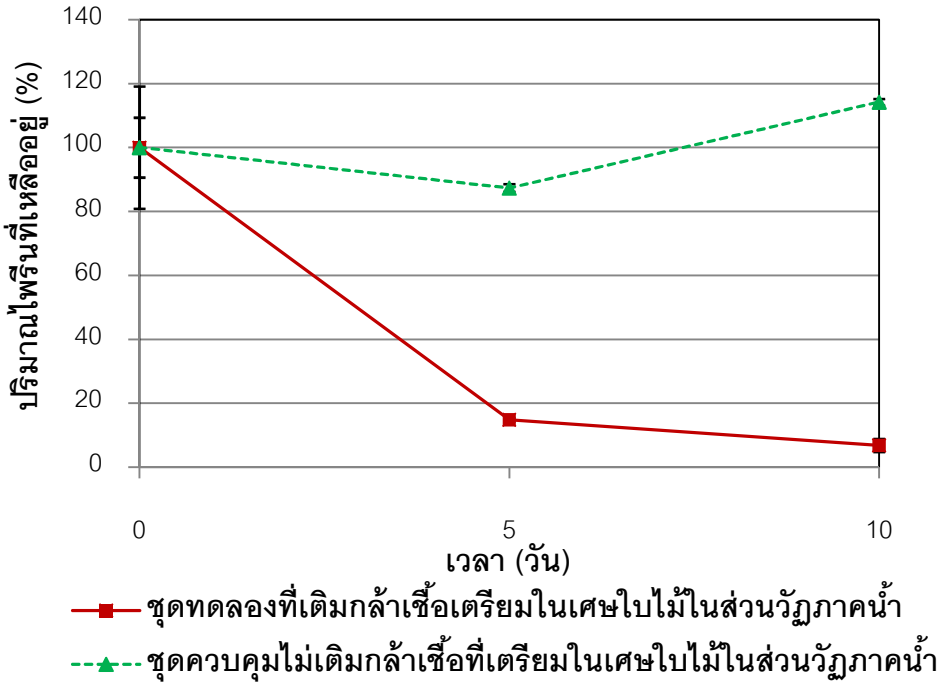
ภาพที่ 4.9 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดทดลอง (ดินภาวะสเลอรีที่มีความเข้มข้นของไพรีน 1,000 มก.ต่อกก.ของดินและเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM) และชุดควบคุม

4.3.7 การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะสเลอรีด้วยกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมในเศษใบไม้

ปริมาณไพรีนในวันที่ 0 คิดเป็น 100% ทดลองเป็นเวลา 10 วัน สกัดทั้งในส่วนวัฏภาคดินและน้ำ ในวันที่ 5 พบว่าปริมาณไพรีนในส่วนของวัฏภาคดินมีค่าเท่ากับ 1.03% ซึ่งลดลงอย่างรวดเร็ว ส่วนวัฏภาคน้ำเหลืออยู่ 14.83% ในชุดควบคุมนั้นพบว่าปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในส่วนวัฏภาคดินเท่ากับ 112.60% และส่วนวัฏภาคน้ำเหลืออยู่ 87.34% ในวันสุดท้ายของการทดลองพบว่ามีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ในส่วนวัฏภาคดินและน้ำเท่ากับ 0.24% และ 6.83% ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียพบว่า ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในส่วนของวัฏภาคดินและน้ำเหลืออยู่ 94.76% และ 114.21% ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.10 และ 4.11



ภาพที่ 4.10 การย่อยสลายไพรีนที่มีความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อกก.ของดิน ในดินภาวะสเลอรีในส่วนวัฏภาคดิน ด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในเศษใบไม้ และชุดควบคุม



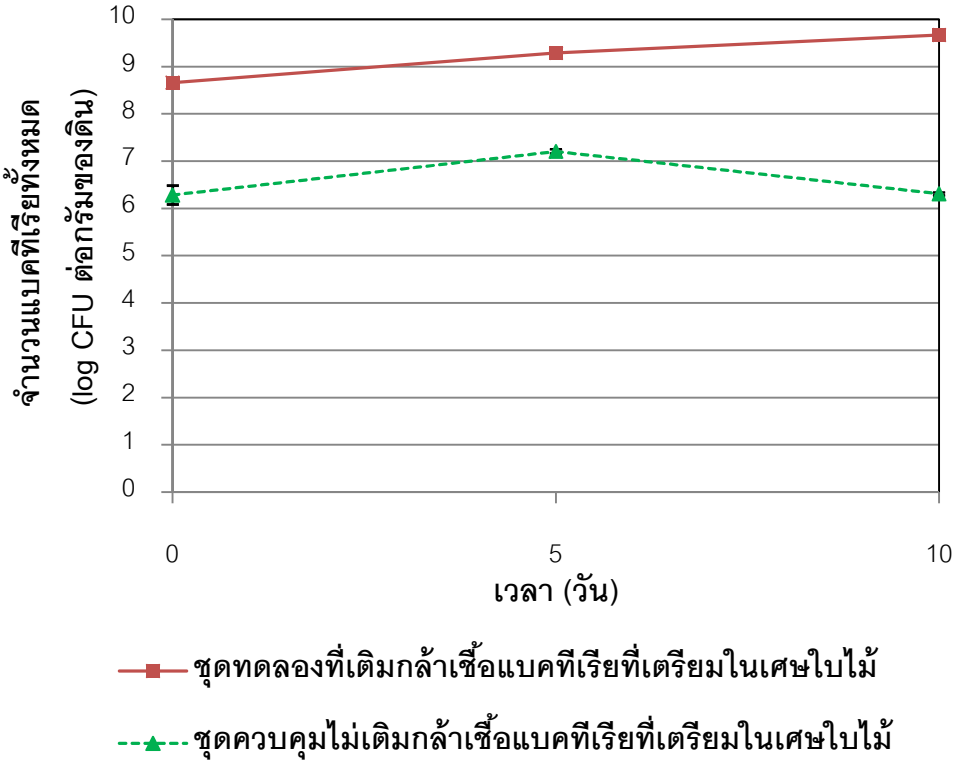
ภาพที่ 4.11 การย่อยสลายไพรีนที่มีความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อกก.ของดิน ในดินภาวะสเลอรีในส่วนวัฏภาคน้ำ ด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในเศษใบไม้ และชุดควบคุม

ตารางที่ 4.4 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในส่วนวัฏภาคดินและน้ำ ระยะเวลา 10 วัน เมื่อเติมและไม่เติมกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในเศษใบไม้

สภาวะ	ระยะเวลา (วัน)					
	0		5		10	
	ดิน	น้ำ	ดิน	น้ำ	ดิน	น้ำ
เติม STK (ทดลอง)	100	100	1.03	14.83	0.24	6.83
ไม่เติม STK (ควบคุม)	100	100	112.60	87.34	94.76	114.21

4.3.8 จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในเศษใบไม้ที่เติมลงในดินภาวะสเลอรี

ผลการวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลอง โดยจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรึงบนเศษใบไม้เป็นเวลา 14 วัน มีค่า 8.65 log CFU ต่อกรัม และพบว่าวันที่ 0 ของการทดลอง เมื่อเติมน้ำลงไปจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดมีปริมาณเท่ากับ 8.18 log CFU ต่อกรัม และเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยในวันที่ 5 ของการทดลอง พบว่าจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเท่ากับ 9.29 log CFU ต่อกรัม จนกระทั่งถึงวันที่ 10 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียยังคงเพิ่มขึ้น ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 9.67 log CFU ต่อกรัม ในขณะที่จำนวนกลุ่มแบคทีเรียในชุดควบคุม มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 6.28 log CFU ต่อกรัม และเพิ่มขึ้น โดยในวันที่ 5 จำนวนแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 7.24 log CFU ต่อกรัม และลดลงในวันที่ 10 ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียเหลืออยู่เท่ากับ 6.30 log CFU ต่อกรัม ดังภาพที่ 4.12



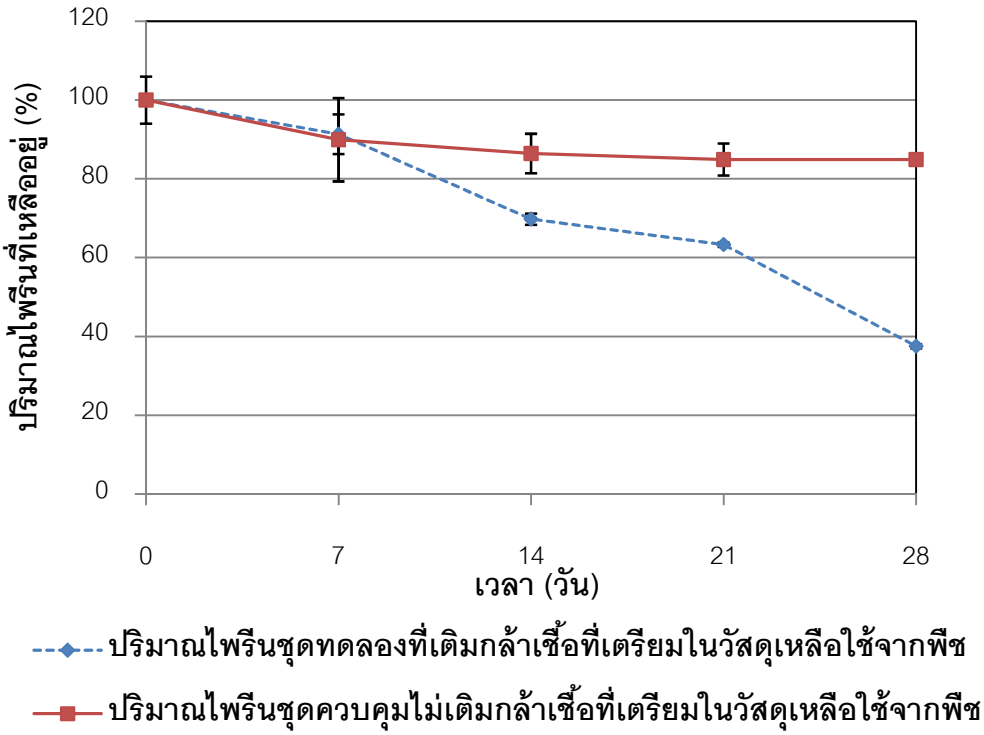
ภาพที่ 4.12 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดทดลอง (ดินภาวะสเลอรีที่มีความเข้มข้นของไพรีน 1,000 มก.ต่อกก.ของดินและเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมในเศษใบไม้) และชุดควบคุม

การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะสเลอรีเกิดขึ้นเมื่อใช้กลุ่มแบคทีเรีย STK ทั้งที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM และที่เตรียมในเศษใบไม้ แต่จะเห็นได้ว่าในภาวะของแข็งนั้น กลุ่มแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ไม่สามารถย่อยสลายไพรีนในดินได้ ดังนั้นในการบำบัดในสถานที่จริงจะต้องต้องอาศัยน้ำเป็นตัวช่วย ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถทำได้ยาก แต่การเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมในเศษใบไม้จะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งนั้นเกิดได้ดีขึ้น และมีปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ใกล้เคียงกับภาวะสเลอรี ถึงแม้ว่าในภาวะของแข็งนั้นจะใช้เวลานานกว่าก็ตาม

4.4 การเจริญและประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนในดินด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในด้วยวัสดุเหลือใช้จากพืช

4.4.1 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนในดินด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืช

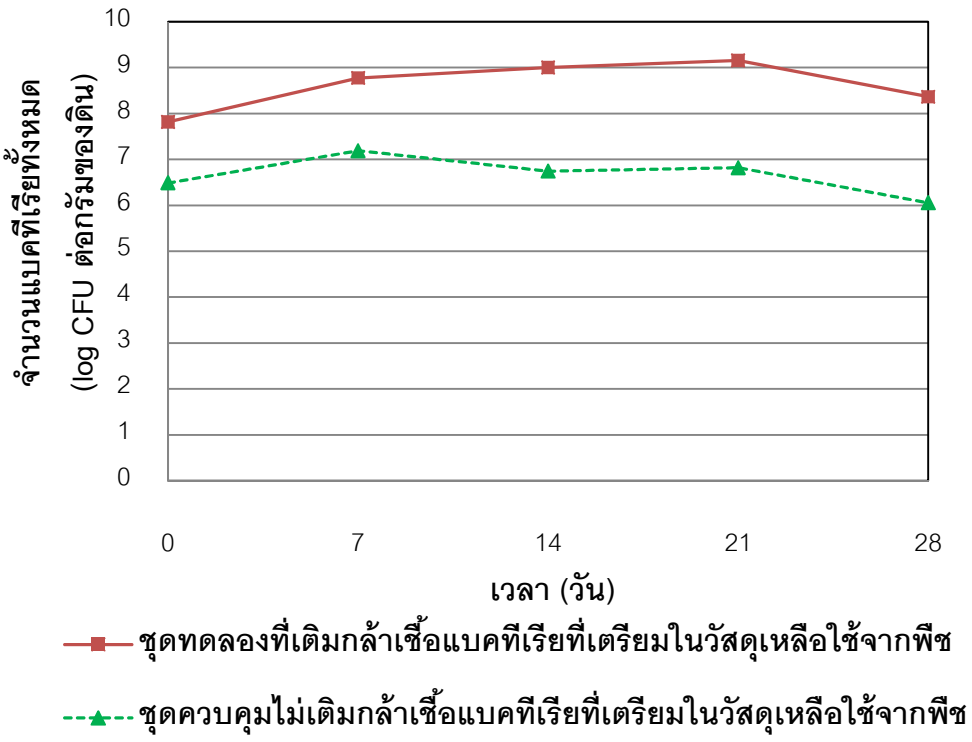
การย่อยสลายไพรีนในภาวะของแข็งซึ่งมีความเข้มข้นของไพรีนในดิน 1,000 มก.ต่อกก.ของดิน โดยคิดปริมาณไพรีนที่เหลือในชุดควบคุมเป็น 100% ทดลองเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่ากล้าเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืชสามารถย่อยสลายไพรีนได้ โดยปริมาณของไพรีนค่อยๆ ลดลงไปเรื่อยๆ จนกระทั่งถึงวันสุดท้ายของการทดลอง พบว่ามีปริมาณไพรีนเหลืออยู่เท่ากับ 37.48% ส่วนชุดควบคุม พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 28 วัน ไม่พบว่ามีการสลายตัวของไพรีนอย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงในภาพที่ 4.13



ภาพที่ 4.13 การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งที่มีความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อกก.ของดิน ด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืช และชุดควบคุม

4.4.2 จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืชที่เติมลงดินในภาวะของแข็ง

เมื่อตรึงแบคทีเรียบนวัสดุเหลือใช้เป็นเวลา 14 วัน พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 8.01 log CFU ต่อกรัม จำนวนกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมในวัสดุพาหะในวันเริ่มต้นการทดลอง พบว่ามีปริมาณเท่ากับ 7.81 log CFU ต่อกรัม และค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงวันที่ 21 ของการทดลองพบว่าจำนวนแบคทีเรียมีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 9.1 log CFU ต่อกรัม และในวันสุดท้ายของการทดลองพบว่าจำนวนแบคทีเรียมีปริมาณลดลงเหลืออยู่ 8.37 log CFU ต่อกรัม ในส่วนของชุดควบคุมนั้น จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นที่ 6.49 log CFU ต่อกรัม และพบว่าปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นในวันที่ 7 ของการทดลอง และหลังจากนั้นไปจนถึงวันสุดท้ายของการทดลองพบว่าจำนวนแบคทีเรียลดลงเหลืออยู่เท่ากับ 6.06 log CFU ต่อกรัม ซึ่งลดลงเหลือน้อยกว่าวันเริ่มต้น ดังแสดงในภาพที่ 4.14



ภาพที่ 4.14 จำนวนกลุ่มแบคทีเรียทั้งหมด (ดินภาวะของแข็งที่มีความเข้มข้นของไพรีน 1,000 มก.ต่อกก.ของดินและเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมในเศษใบไม้) และชุดควบคุม

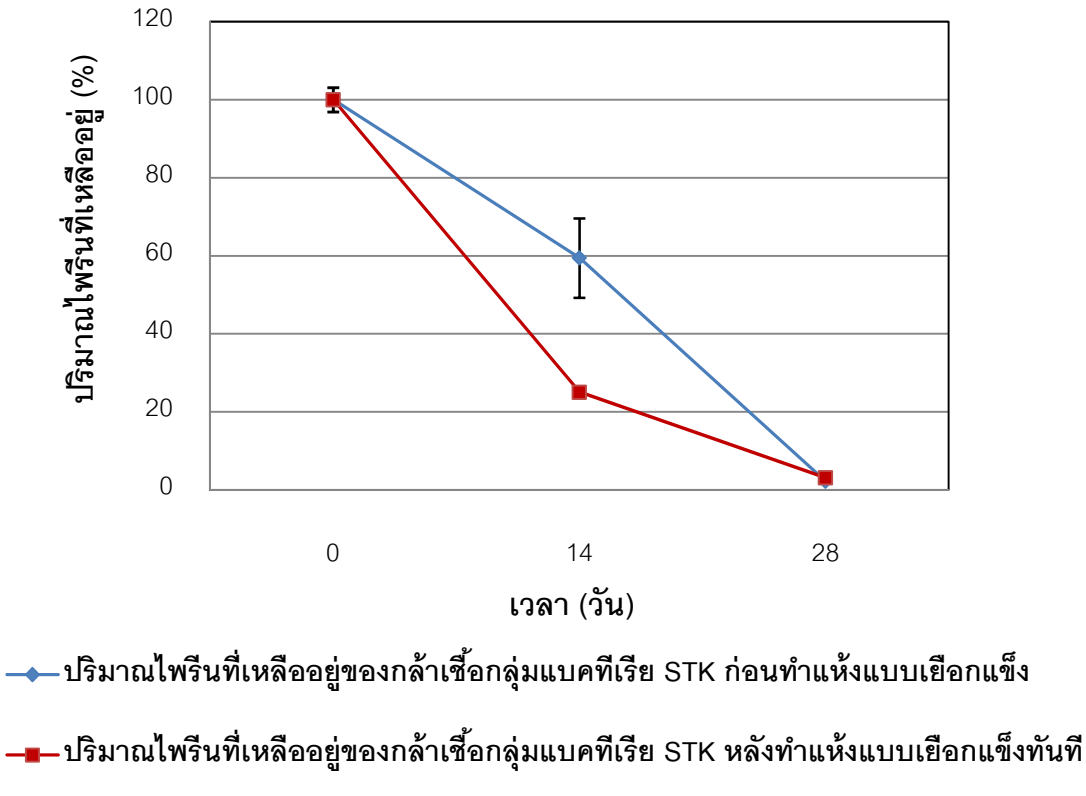
การใช้กลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืชให้ผลการย่อยสลายไพรีนในดินไม่ดีเมื่อเทียบกับการย่อยสลายเมื่อใช้เศษใบไม้เป็นวัสดุพาหะ ทั้งนี้อาจเกิดจากค่า C:N ที่ต่างกัน โดยในเศษใบไม้จะมีมากกว่า แต่ถ้ามีการปรับค่าไนโตรเจนที่เหมาะสมและเพิ่มจำนวนแบคทีเรียน่าจะได้ผลเช่นเดียวกัน จึงได้ทดลองเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ในวัสดุเหลือใช้จากพืช

4.5 การย่อยสลายไพรีนในดินด้วยกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืชก่อนและหลังกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง

กระบวนการทำแห้งเยือกแข็งเป็นวิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง การทดลองนี้เพื่อจะทดสอบว่า กระบวนการดังกล่าวไม่มีผลต่อจำนวนแบคทีเรียและประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดิน โดยนับจำนวนแบคทีเรียก่อนทำแห้งเยือกแข็งคือ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ถูกตรึงบนวัสดุเหลือใช้จากพืชเป็นเวลา 14 วัน พบว่ามีจำนวนอยู่เท่ากับ 9.35 log CFU ต่อกรัมของวัสดุเหลือใช้จากพืช จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนด้วยการเติมกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ในวัสดุเหลือใช้จากพืชก่อนทำแห้งเยือกแข็งลงในดินที่มีไพรีนเข้มข้น 1,000 มก.ต่อกก.ของดิน เป็นระยะเวลา 28 วัน โดยเมื่อเติมลงดิน มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นในวันที่ 0 เท่ากับ 8.92 log CFU ต่อกรัมของดินและหลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งทันที และนำมานับจำนวนแบคทีเรีย พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ 9.23 log CFU ต่อกรัมของวัสดุเหลือใช้จากพืช และการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินนั้นทำเช่นเดียวกันกับก่อนทำแห้งเยือกแข็ง ซึ่งเมื่อเติมลงดิน มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นในวันที่ 0 เท่ากับ 8.77 log CFU ต่อกรัมของดิน ซึ่งแสดงดังในตาราง 4.5

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งเป็นเวลา 28 วัน และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดก่อนและหลังกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งกล้าเชื้อที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืชทันทีไม่เติมลงในดิน

การเก็บรักษา	จำนวนแบคทีเรีย (log CFU ต่อกรัม)	ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ (%)
ก่อนทำแห้งเยือกแข็ง	9.32	2.23
หลังทำแห้งเยือกแข็งทันที	9.23	3.13



ภาพที่ 4.15 การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งด้วยกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ก่อนและหลังทำแห้งเยือกแข็งในวัสดุเหลือใช้จากพืช

4.6 การเก็บรักษากล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK บนวัสดุเหลือใช้จากพืช

4.6.1 จำนวนแบคทีเรียที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืชก่อนเก็บด้วยวิธีทำแห้งเยือกแข็ง

จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในวัสดุเหลือใช้จากพืชในวันที่ 0 มีค่าเท่ากับ 8.09 log CFU ต่อกรัมของวัสดุเหลือใช้จากพืช หลังทำการบ่มเป็นระยะเวลา 14 วัน ก่อนที่จะนำไปผ่านกระบวนการเก็บรักษา จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเท่ากับ 10 log CFU ต่อกรัมของวัสดุเหลือใช้จากพืช ซึ่งใช้คนละชุดกับการทดลองในข้อที่ 4.5 โดยนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี Viable Plate Count พบว่า มีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นในวันที่ 14 ของการทดลอง แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถใช้สารอาหารจากวัสดุเหลือใช้จากพืชในการเจริญเติบโตได้ และมีการปรับสภาวะที่เหมาะสม

4.6.2 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในวัสดุเหลือใช้จากพืชก่อนและหลังการเก็บด้วยวิธีทำแห้งเยือกแข็ง

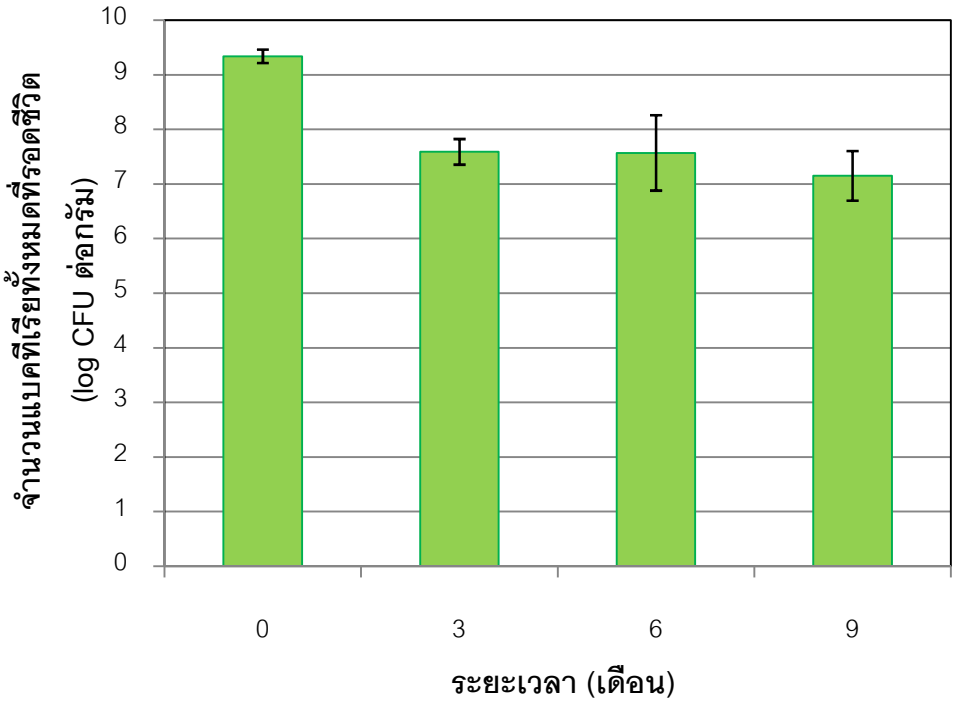
จากการทดลองพบว่าก่อนกระบวนการเก็บนั้นกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืช มีจำนวนของแบคทีเรียเท่ากับ 10 log CFU ต่อกรัมของวัสดุเหลือใช้จากพืช และเมื่อผ่านกระบวนการเก็บโดยวิธีทำแห้งเยือกแข็ง พบว่าจำนวนแบคทีเรียมีจำนวนลดลง โดยจำนวนกลุ่มแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 9.34 log CFU ต่อกรัมของวัสดุเหลือใช้จากพืช

4.6.3 การอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บในวัสดุเหลือใช้จากพืช ที่เดือน 0 3 6 และ 9

จากตารางที่ 4.8 หลังจากทำแห้งเยือกแข็งและเก็บที่อุณหภูมิห้อง พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่เก็บโดยลดความชื้นเหลือ 30% ในเดือนที่ 0 นั้น มีค่าเท่ากับ 9.34 log CFU ต่อกรัม และเมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าจำนวนของกลุ่มแบคทีเรียลดลง ซึ่งจำนวนแบคทีเรียเหลืออยู่เท่ากับ 7.59 log CFU ต่อกรัม และเมื่อเก็บจนถึงเดือนที่ 6 ของการทดลอง พบว่า จำนวนแบคทีเรียลดลงจากเดือนที่ 3 เพียงเล็กน้อย โดยเหลืออยู่ 7.57 log CFU ต่อกรัม และในเดือนที่ 9 ของการทดลองพบว่าจำนวนแบคทีเรียลดลงเพียงเล็กน้อยโดยเหลืออยู่ 7.15 ดังแสดงในภาพที่ 4.16

ตารางที่ 4.6 การอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาในวัสดุเหลือใช้จากพืช ที่ภาวะ 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ที่เดือน 0 3 6 และ 9

ระยะเวลาที่เก็บรักษา (เดือน)	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่เก็บรักษาในวัสดุเหลือใช้จากพืชก่อนทำแห้งเยือกแข็ง (log CFU ต่อกรัม)	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่เก็บรักษาในวัสดุเหลือใช้จากพืชหลังทำแห้งเยือกแข็ง (log CFU ต่อกรัม)
0	9.97	9.34
3	ไม่ได้ทดลอง	7.59
6	ไม่ได้ทดลอง	7.57
9	ไม่ได้ทดลอง	7.15



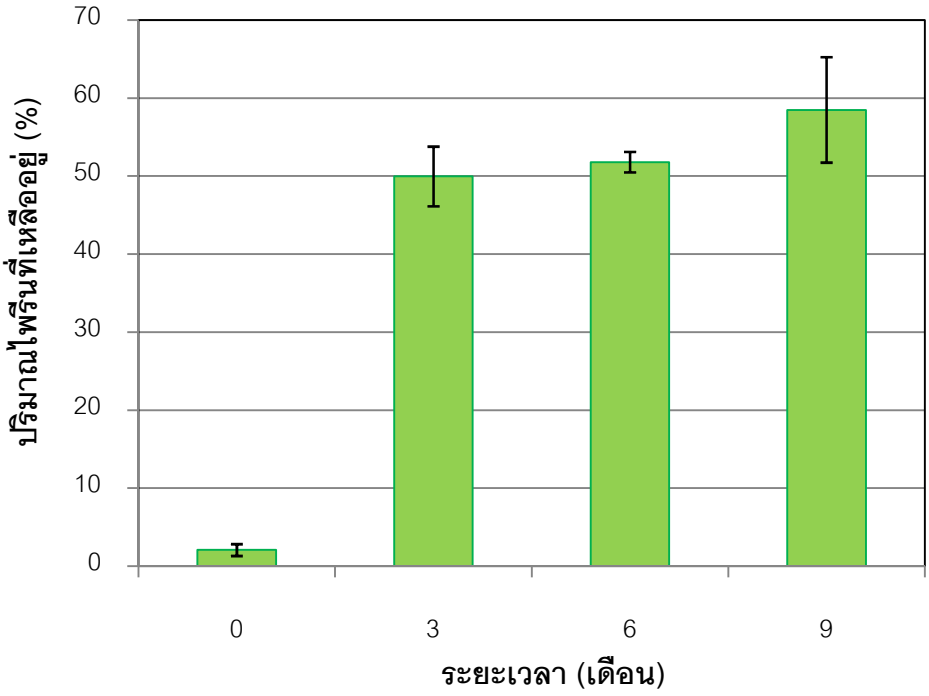
ภาพที่ 4.16 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่เก็บรักษาในวัสดุเหลือใช้จากพืชที่ระยะเวลา 0 3 6 และ 9 เดือน

4.7 การย่อยสลายไพรีนโดยกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บในวัสดุเหลือใช้จากพืช ที่เดือน 0 3 6 และ 9

จากผลการวิเคราะห์การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งด้วยกลุ่มแบคทีเรียที่เก็บรักษาในวัสดุเหลือใช้จากพืชที่เวลาต่างๆ ซึ่งมีความเข้มข้นของไพรีนในดินเริ่มต้น 1,000 มก.ต่อ กก.ของดิน ในเดือนที่ 0 ของการทดลอง พบว่ากลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายไพรีนได้ดี โดยมีปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่เท่ากับ 2.08% และเมื่อเก็บรักษาไว้นาน 3 เดือน พบว่าทำให้ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในดินลดลงได้น้อยกว่า โดยเหลืออยู่ 49.96% และที่ 6 เดือนของการเก็บรักษากล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK นั้นพบว่า ทำให้มีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 51.80% ส่วนในเดือนที่ 9 นั้น พบว่ากลุ่มแบคทีเรียในวัสดุเหลือใช้จากพืชสามารถย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งได้ลดลงจากเดือนที่ 6 โดยมีปริมาณไพรีนในดินเหลืออยู่ 58.49% ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็ง ระยะเวลา 28 วัน ด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาในวัสดุเหลือใช้จากพืช ที่ภาวะ 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ เป็นระยะเวลา 9 เดือน

ระยะเวลาที่เก็บรักษา (เดือน)	ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่หลังการย่อยสลายไพรีนในดิน 1,000 มก. ต่อ กก. โดยกล้าเชื้อ STK ที่เก็บรักษาในวัสดุเหลือใช้จากพืช (%)
0	2.08
3	49.96
6	51.80
9	58.49



ภาพที่ 4.17 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในดินภาวะของแข็งโดยเติมกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมในวัสดุเหลือใช้จากพืชที่เก็บรักษาที่ระยะเวลา 0 3 6 และ 9 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อลดความชื้นเป็น 30% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

วิธัญญา ชวเจริญพันธ์ (2549) ได้ศึกษาผลของการสร้างกล้าเชื้อเพื่อเพิ่มการอยู่รอดของแบคทีเรียโดยอาศัยวัสดุพาหะ โดยประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งที่ปนเปื้อนไพรีนความเข้มข้น 100 และ 1,000 มก.ต่อกก.ของดิน โดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียในเปลือกถั่ว พบว่าจำนวนกล้าเชื้อแบคทีเรียในเปลือกถั่วเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และสามารถย่อยสลายไพรีนได้จนหมดภายในระยะเวลา 10 วัน ส่วนที่ความเข้มข้นของไพรีน 1,000 มก.ต่อกก.ของดิน พบว่าจำนวนแบคทีเรียในกล้าเชื้อบนเปลือกถั่วค่อยๆ เพิ่มขึ้น และสามารถย่อยสลายไพรีนในดินที่ปนเปื้อนได้ 72% เมื่อเทียบกับปริมาณไพรีนเริ่มต้น เนื่องจากกลุ่มแบคทีเรีย STK มีความสำคัญต่อการบำบัดไพรีนในสิ่งแวดล้อม ดังนั้น กานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร (2551) จึงศึกษาภาวะการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ที่ภาวะต่างๆ และเปรียบเทียบกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ การเลี้ยงแบคทีเรียในเศษใบไม้นั้นมีทั้งการเติมและไม่เติมไพรีน เมื่อครบ 14 วัน นำไปลดความชื้นให้เหลือ 40% และ 30% อีกชุดไม่ต้องลดความชื้น นำมาเก็บใส่ถุงอะลูมิเนียม และปิดถุงให้ภายในมีสภาพเป็นสุญญากาศ และนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 °ซ เปรียบเทียบกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาโดยวิธีไลโอฟิไลซ์ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ เก็บตัวอย่างมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะสเลอรีและนับจำนวนแบคทีเรีย เมื่อครบเดือนที่ 0 4 8 และ 12 พบว่า ทุกภาวะของการเก็บที่มีการเติมไพรีนระหว่างการเก็บให้จำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตที่สูงกว่าชุดที่ไม่เติมไพรีน และมากกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ส่วนที่อุณหภูมิ 4 °ซ นั้นยังให้ผลการย่อยสลายไพรีนที่ดีกว่าที่อุณหภูมิห้องและดีกว่าที่เก็บรักษาโดยวิธีไลโอฟิไลซ์ โดยที่ความชื้น 30% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ และเก็บที่อุณหภูมิห้องให้ผลรองลงจากการเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะสเลอรีนั้น มีประสิทธิภาพและสามารถย่อยสลายไพรีนได้อย่างรวดเร็ว แต่การนำไปใช้ในการบำบัดในพื้นที่จริงที่ปนเปื้อนสามารถทำได้ยาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาการย่อยสลายไพรีนในดินทั้งภาวะของแข็งและภาวะสเลอรี โดยอาศัยแบคทีเรีย

จากอาหารเลี้ยงเชื้อและกล้าเชื้อแบคทีเรียในเศษใบไม้เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินทั้งสองภาวะด้วยแบคทีเรียที่เตรียมต่างกัน โดยเศษใบไม้ที่ใช้นั้นจะใช้ตามรายงานวิจัยของ กานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร (2551) ซึ่งเก็บจากบริเวณในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อนำมาวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมี พบว่า มีลักษณะเป็นกรด และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) มีค่าที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไพรีน (10:1) (Liebig และ Curtright, 1999) ซึ่งตรงกับค่าการวิเคราะห์เศษใบไม้ที่ กานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร (2551) รายงานไว้

กลุ่มแบคทีเรีย STK มีสมบัติอย่างหนึ่งที่แตกต่างจากแบคทีเรียทั่วไปคือ มีสมบัติไม่ชอบน้ำ ซึ่งสามารถเกาะติดกับวัสดุหรือสารที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำได้ดี โดยสมบัติไม่ชอบน้ำของแบคทีเรียจะเกิดที่บริเวณผิวเซลล์ เนื่องจากที่ผิวเซลล์ของแบคทีเรียมักมีชั้นของไขมันซึ่งจะมีสมบัติไม่ชอบน้ำสูงกว่าแบคทีเรียที่ไม่มีชั้นไขมัน Chang และคณะ (2009) พบว่า เมื่อมีการสะสมของชั้นไขมันอาจจะมีส่วนช่วยส่งเสริมการเข้าจับกับเซลล์ที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำและทำให้เกิดการจับกันระหว่างเซลล์กับน้ำมันง่ายขึ้น Raetz และคณะ (2007) พบว่าชั้นไขมันนั้นส่วนใหญ่จะพบได้ในแบคทีเรียแกรมลบในส่วนที่เรียกว่า ลิปิด A (Lipid A) ในงานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบสมบัติไม่ชอบน้ำของกลุ่มแบคทีเรีย STK เพื่อตรวจดูให้แน่ชัด ซึ่งใช้วิธีที่แตกต่างจากงานวิจัยของ ทิมากร แสงดำ (2547) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้ดี แต่คัดแยกโดยวิธีที่ไม่ใช่สำหรับคัดแยกแบคทีเรียที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ และ *E.coli* นั้นเป็นแบคทีเรียทั่วไปที่ไม่สามารถย่อยสลายไพรีนได้ เมื่อนำมาทดสอบโดยดัดแปลงตามวิธีของ Rosenberg และคณะ (1980) พบว่า กลุ่มแบคทีเรีย STK มีค่าของ Microbial adhesion to hydrocarbons (MATHs) เท่ากับ 93.14% ส่วนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และ *E.coli* มีค่าของ MATHs เท่ากับ 41.00% และ 23.29% ตามลำดับ ส่วนใหญ่แบคทีเรียแกรมลบจะมีสมบัติไม่ชอบน้ำ แต่พบว่า *E.coli* นั้นมีสมบัติไม่ชอบน้ำต่ำ ทั้งนี้อาจเกิดขึ้นจากการที่แบคทีเรียนี้ไม่สามารถย่อยสลายไพรีนได้จึงทำให้ความสามารถในการเข้าจับกับไพรีนเกิดได้ต่ำกว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK ซึ่งเป็นไปตามรายงานของ Obueke และคณะ (2009) โดยพบว่า แบคทีเรียบางชนิดที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำจะสามารถใช้สารที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำได้ดี เช่น สารพวกไฮโดรคาร์บอนต่างๆ เป็นต้น ได้ดีกว่าแบคทีเรียทั่วไป และไพรีนเป็นสาร PAHs ที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำเมื่อมาอยู่รวมกันกับกลุ่ม

แบคทีเรีย STK จึงจับกันได้ดีขึ้น ส่วน RRM-V3 เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำต่ำ แต่กลุ่มแบคทีเรียนี้สามารถย่อยสลายไพรีนได้ดี ซึ่งอาจเกิดจากแบคทีเรียมีการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงทำให้เกิดการย่อยสลายสารที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำได้ดี โดยจากรายงานของ Zhao และคณะ (2011) พบว่า *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs ในดินภาวะสเลอรี

รายงานเกี่ยวกับกลุ่มแบคทีเรียที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำที่สามารถย่อยสลายสารพวก PAHs ได้ดีนั้นมีไม่มากนัก โดย Bastiaents และคณะ (2000) พบว่า แบคทีเรียที่มีสมบัติดังกล่าวและสามารถย่อยสลาย PAHs ได้แก่ *Mycobacterium* sp. ซึ่งจะใช้สาร PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคทีเรียที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำจะมีความทนทานต่อสารพิษและสามารถเข้าจับกับเซลล์แบคทีเรียอื่นได้ดี (Rosenberg, 2006) และแบคทีเรียที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำมีอัตราการย่อยสลายสารปนเปื้อนที่เร็ว (Farrell และ Quilty, 2002)

เมื่อศึกษาสมบัติไม่ชอบน้ำของกลุ่มแบคทีเรีย STK แต่ละสายพันธุ์มีค่าแตกต่างกัน โดยแบคทีเรีย STK1 STK2 และ STK3 นั้น คล้ายคลึงกับแบคทีเรียที่อยู่ในจีนัส *Zoogloea* sp., *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. ตามลำดับ และพบอีกสายพันธุ์ซึ่ง STK4 นั้นเป็นสายพันธุ์ที่ปรากฏขึ้นในภายหลังและไม่พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนลดลง จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ STK1 มีร้อยละของ MATHs เท่ากับ 50.00 สายพันธุ์ STK3 และ STK4 มีค่าเท่ากับ 63.00 และ 57.59 ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ STK2 นั้น มีร้อยละของ MATHs น้อยสุดคือ 12.24 โดยจะเห็นได้ว่า STK สายพันธุ์เดี่ยวมีค่า MATHs ต่ำกว่าเมื่อรวมกันเป็นกลุ่มแบคทีเรีย STK ซึ่งมีค่าร้อยละสูงถึง 93.14 ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียมีการสะสมของไขมันบริเวณผิวเซลล์น้อยเมื่อแยกแบคทีเรียเป็นแต่ละสายพันธุ์ ในขณะเมื่ออยู่เป็นกลุ่มอาจเกิดการสะสมของไขมันปริมาณมากบริเวณที่ผิวเซลล์ของแบคทีเรียทำให้มีค่าร้อยละของ MATHs สูงมาก

การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งโดยใช้กลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ตรึงในเศษใบไม้และจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM พบว่าการใช้วัสดุพาหะ เช่น เศษใบไม้ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งได้ดีกว่าการเติมกลุ่มแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อลงดินโดยตรง ซึ่งให้ผลการทดลองสอดคล้องกับของ วิธัญญา ชวเจริญพันธ์ (2549) ที่ใช้กล้าเชื้อ

แบคทีเรียในเปลือกถั่วในการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งที่มีไพรีนความเข้มข้น 1,000 มก. ต่อกก.ของดิน

การย่อยสลายไพรีนในดินภาวะสเลอรีด้วยแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ และกล้าเชื้อแบคทีเรียในเศษใบไม้ โดยในดินมีไพรีนความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อกก.ของดิน พบว่า การเติมกล้าเชื้อในเศษใบไม้นั้นมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนดีกว่าการเติมกล้าเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM เพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดจากวัสดุพาหะที่ใช้สามารถกระจายและเพิ่มพื้นที่ผิวในการเข้าจับกับดินที่ปนเปื้อนไพรีนได้ทั่วถึงมากกว่า ซึ่งเป็นไปตามรายงานของ Potin และคณะ (2004) ที่พบว่าราเส้นใยจะมีพื้นผิวสัมผัสที่สูงซึ่งสามารถปล่อยเอนไซม์เข้าไปจับสับเสตรทที่ไม่ละลายน้ำและจับกับดินที่มีปริมาณมากได้ดี โดยคล้ายคลึงกับกรณีของแบคทีเรียที่ถูกตรึงในเศษใบไม้

จากการทดสอบการย่อยสลายไพรีนในดินทั้งสองภาวะนั้น พบว่าการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งและภาวะสเลอรีด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมในเศษใบไม้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายใกล้เคียงกัน ซึ่งการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะสเลอรีนั้นเป็นวิธีที่ค่อนข้างมีประสิทธิภาพ แต่ทำได้ยากและมีข้อจำกัด จึงสนใจการบำบัดไพรีนในดินภาวะของแข็งซึ่งสามารถทำในบริเวณจริงได้ง่ายและสะดวกมากกว่า

การใช้เศษใบไม้สามารถช่วยเพิ่มการย่อยสลายไพรีนได้ดี แต่การจะนำมาใช้แต่ละครั้งค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากจะต้องคัดแยกเศษใบไม้กับพวกกิ่งไม้ หรือเศษหญ้า หรือวัชพืชต่างๆ ออกก่อน และในงานวิจัยนี้จึงต้องการเพิ่มปริมาณของวัสดุพาหะและสามารถหาได้ง่ายยิ่งขึ้น โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากพืช เช่น เศษใบไม้ หญ้า หรือกิ่งไม้ขนาดเล็ก เป็นต้น ซึ่งไม่จำเป็นต้องคัดแยกและสามารถนำมาใช้ได้ทั้งหมด โดยมีงานวิจัยที่คล้ายคลึงกัน เช่น งานวิจัยของ April และคณะ (2009) ได้ใช้พอลิเมอร์ธรรมชาติเป็นวัสดุพาหะในการเก็บรักษาแบคทีเรีย พบว่ามีประสิทธิภาพที่ดี แต่วัสดุดังกล่าวค่อนข้างหาได้ยากและมีปริมาณน้อย ซึ่งในทางปฏิบัติ การเลือกวัสดุพาหะควรเลือกวัสดุที่สามารถหาได้ง่าย ลดขั้นตอนการคัดแยก ราคาถูก และมีปริมาณมาก อีกทั้งยังคงความมีประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ด้วย และเมื่อนำวัสดุเหลือใช้จากพืชมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมี พบว่า มีลักษณะเป็นกรด เช่นเดียวกันกับเศษใบไม้ และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) ไม่ค่อยเหมาะสมตามรายงานของ Liebig และ Curtright (1998) แต่จะมีปริมาณของไนโตรเจนที่น้อยกว่าในเศษใบไม้ เนื่องจากส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็น

พวกใบไม้และกิ่งไม้ที่มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นคาร์บอน เมื่อนำมาใช้เป็นวัสดุพาหะเช่นเดียวกับเศษใบไม้ พบว่า กลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถเจริญและย่อยสลายไพรีนที่เติมลงไปในวัสดุเหลือใช้จากพืชได้ไม่ดีเมื่อเทียบกับเศษใบไม้ โดยมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 7.81 log CFU ต่อกรัม และในวันที่ 28 ของการทดลอง พบว่ามีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 37.48% ทั้งนี้อาจเกิดจากจำนวนแบคทีเรียที่น้อยเกินไป ซึ่งในกล้าเชื้อที่เตรียมในเศษใบไม้มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นถึง 8.17 log CFU ต่อกรัม

การเก็บรักษากล้าเชื้อที่สามารถย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็งนั้นมีน้อย ซึ่งการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรียนั้นอาศัยภาวะการเก็บรักษากล้าเชื้อตามวิธีของ กานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร (2551) โดยลดความชื้นเหลือ 30% และเมื่อผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่า กระบวนการดังกล่าวไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็ง และยังพบว่ามีอัตราการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรียสูง 93.7-99.0% หลังการทำแห้งแบบเยือกแข็งทันที ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกและไบฟิโดแบคทีเรียที่มีการรอดชีวิตเพียง 46.2-75.1% และ 43.2-51.9% ตามลำดับ โดยมีการใช้สารดูดอากาศและสารดูดความชื้นในตัวอย่างก่อนทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Wang และคณะ, 2004) ซึ่งในงานวิจัยนี้ไม่มีการเติมสารดังกล่าวในตัวอย่าง มีเพียงวัสดุเหลือใช้จากพืชกับแบคทีเรีย อาจเป็นไปได้ว่าวัสดุเหลือใช้จากพืชมีส่วนเพิ่มการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย STK และยังมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่า *E.coli*, *Pseudomonas putida*, และ *Enterobacter cloacae* โดยมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ 42.6%, 33.5% และ 50.8% ตามลำดับ (Miyamoto-Shinohara และคณะ, 2006) โดยการเก็บรักษาครั้งนี้เก็บที่อุณหภูมิห้องและใส่ซิลิกาเจลนอกซองที่ใช้เก็บ เพื่อดูดความชื้นที่จะไปรบกวนกระบวนการเก็บรักษา และนำกล้าเชื้อที่เก็บรักษาที่เดือน 0 3 6 และ 9 มาทดสอบการย่อยสลายไพรีนในดินภาวะของแข็ง โดยไพรีนมีความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อกก.ของดิน ซึ่งแตกต่างจาก กานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร (2551) ที่ทดสอบในดินภาวะสเลอรี และใช้ไพรีนที่ความเข้มข้น 100 มก.ต่อกก.ของดิน แล้ววัดการอยู่รอดของแบคทีเรียในแต่ละเดือน จากผลการทดลองพบว่า ในเดือนที่ 0 กล้าเชื้อแบคทีเรียสามารถย่อยสลายไพรีนได้ดี แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปในเดือนที่ 3 ของการทดลอง พบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนลดลง หลังจากนั้นจึงค่อนข้างคงที่ในเดือนที่ 6 และ 9 ในส่วนของอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียนั้น พบว่ากลุ่มแบคทีเรียมีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน

และค่อยๆ คงที่ ในเดือนที่ 6 และ 9 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในแต่ละเดือน สาเหตุที่ทำให้จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียลดลงจากเดือนที่ 0 ค่อนข้างมาก อาจมาจากขั้นตอนในการเก็บรักษาที่ลดความชื้นเหลือ 30% และเก็บที่อุณหภูมิห้อง และอาจจะเกิดจากแบคทีเรียสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งในกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เคยส่งเสริมการย่อยสลายไพรีนในดินตายไป ทำให้มีจำนวนที่รอดชีวิตลดลง และคงที่ในเดือนต่อมา เป็นผลให้ความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย STK ลดลงด้วยเช่นกัน ซึ่งจำเป็นจะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อในงานวิจัยครั้งต่อไป

ข้อเสนอแนะในงานวิจัย

จากผลการทดลองประสิทธิภาพการย่อยสลายของไพรีนในดินภาวะของแข็งนั้น จะเห็นว่าประสิทธิภาพของการย่อยสลายค่อยๆ ลดลงจากช่วงเดือนแรกของการเก็บ เนื่องจากจำนวนแบคทีเรียที่ลดลงเรื่อยๆ เช่นกัน และอาจเกิดความเข้มข้นของไพรีนที่ 1,000 มก.ต่อกก.ของดิน ที่นำมาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายในดินภาวะของแข็งนั้นถือว่าสูงเกินไป ดังนั้นควรทดสอบในความเข้มข้นของไพรีนที่น้อยกว่า 1,000 มก.ต่อกก.ของดิน มาเปรียบเทียบ เพื่อให้ปราศจากผลที่เกิดจากความเข้มข้นของไพรีนที่สูงเกินไป และหากค่า C:N ของวัสดุพาหะที่นำมาใช้ไม่เหมาะสม ควรปรับด้วยการเติมสารอินทรีย์หรืออนินทรีย์คาร์บอนหรือไนโตรเจนก่อน เพื่อให้กล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียสามารถเจริญและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนได้ดีขึ้น และหาสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถทำให้จำนวนแบคทีเรียไม่ลดลงจากเดิมตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษา

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมควบคุมมลพิษ. 2542. รายงานสถานการณ์สิ่งแวดล้อม พ.ศ. 2542. กรุงเทพมหานคร: ที พริ้นติ้ง กรุ๊ป.

กานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร. 2551. ผลของภาวะการเก็บเชื้อต่อการรอดชีวิตและความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จิรทีปฆ์ แสนรัก. 2547. การย่อยสลายไพรีนและสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น โดยกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากใบพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทิมากร แสงดำ. 2548. การแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีสมบัติในการเกาะติดและย่อยสลายไพรีนจากปุ๋ยหมักใบพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปิยะวรรณ เพชราภา. 2549. สารมัธยันต์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่แยกได้จากใบมะขาม Tamarindus india Linn. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิธัญญา ชวเจริญพันธ์. 2549. การสร้างกล้าเชื้อในวัสดุพาหะเพื่อเสริมการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดินที่ปนเปื้อนไพรีน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รุจา สารคุณ. 2548. ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2539. เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

สุพินดา ศิริวราศิลป์. 2545. การใช้ใบพืชตระกูลถั่วและพารามิเตอร์บางประการในการส่งเสริมการย่อยสลายไพรีนในดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อลิสา วังใน. 2550. หลักการเบื้องตนของการบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ Basic concepts in bioremediation. น. 85 การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ. โรงพิมพแหงจุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 358 หนา

ภาษาอังกฤษ

Abdul, A.S., Gibson, T.L. and Rai, D.N. 1987. Statistical correlations for predicting the partition coefficient for non polar organic contaminants between aquifer organic carbon and water. Haz. Waste. Haz. Mat. 4: 211-222.

Anastasi, A., Coppola, T., Prigione, V. and Varese, G.C. 2009. Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: Role of laccases and peroxidases. Haz. Mat. 165: 1229-1233.

Androni, V., Cavalca, L., Rao, M.A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Dell'Amic, E., Colombo, M. and Gianfredo, L. 2004. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. Chemosphere. 57: 401-412.

April, A.K., Iryna, B.S., Eric, O., Ludmira, G., Jame, M.B. and Vitaly, J.V. 2009. Preservation of bacteria in natural polymers. J. Microbiol. Methods. 78: 189-194.

Atagana, H.I. 2006. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil by biostimulation and bioaugmentation in the presence of copper(II) ions. Microbiol. Biotechnol. 22: 1145-1153.

Asa, S., Johan, O., Johan, C., Johan, S. and Sebastian, H. 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.

Bamforth, S.M. and Singleton, I. 2005 Bioremediation of Polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. Chem. Technol. Biot. 80: 723-730.

Bassirou, N., Frédéric, W., Bréhima, D., Amadou, T.G. and Philippe, T. 2007. Survival and preservation after freeze-drying process of thermoresistant acetic acid bacteria isolated from tropical products of Subsaharan Africa. J. Food. Eng. 79: 1374-1382.

Bastiaens, L., Springeal, D., Wattiau, P., Harms, H., Wachter, R., Verachtert, H. and Diels, L. 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1834-1843.

Baver, J.E. and Capone, D.G. 1988. Effect of co-occuring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons marine sediment slurries. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1649-1655.

Bispo, A., Jourdain, M.J. and Jauzein, M. 1999. Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Org. Geochem. 30: 947-952.

Boldrin, B., Tiehm, A. and Fritzsche, C. 1993 Degradation of phenanthrene, fluorine, fluoranthene and pyrene by a *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1927-1930.

Boonchan, S., Britz, M.L. and Stanley, G.A. 1998. Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. Biotechnol. Bioeng. 59: 482-494.

Boonchan, S., Britz, M.L. and Stanley, G.A. 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1007-1019.

Bouchez, M., Blanchet, D. and Vandecasteele, J.P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain association: inhibition phenomena and cometabolism. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 156-164.

Bozoglu, T.F., Ozilgen, M. and Bakir, U. 1987. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. Enzym. Microb. Tech. 9: 531-537.

Cerniglia, C.E. 1992. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegrad. 3: 351-368.

Chang, W.N., Liu, C.W. and Liu, H.S. 2009. Hydrophobic cell surface and bioflocculation behavior of Rhodococcus erythropolis. Process. Biochem. 44: 955-962.

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

Crawford, R.L. and Crawford, D.L. 1996. Bioremediation : Principles and Applications. Cambridge University Press.

Dean-Ross, D. and Cerniglia, C.E. 1996. Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 307-312.

Doick, K. J. and Semple, K.T. 2003. The effect of soil: water ratios on the mineralization of phenanthrene: LNAPL mixtures in soil. FEMS. Microbiol. Lett. 220: 29-33.

Edwards, D.A., Luthy, R.G. and Liu, Z. 1991. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. Environ. Sci. Technol. 25: 127-142.

Farrell, A. and Quilty, B. 2002. Substrate-dependent autoaggregation of *Pseudomonas putida* CP1 during the degradation of mono-chlorophenols and phenol. Ind. Microbiol. Biotechnol. 28: 316-324.

Gauthier, E., Déziel, E., Villemur, R., Juteau, P., Lépine, F. and Breaudet, R. 2003. Initial characterization of new bacteria degrading high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from 1 2-year enrichment in a two-liquid-phase culture system. Appl. Microbiol. 94: 301-311.

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. Marine. Poll. Bull. 51: 1054-1061.

Harayama, S. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. Curr. Opin. Biotechnol. 8: 268-273.

Haritash, A.K. and Kaushik, C.P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. Haz. Mat. 169: 1-15.

Hughes, J. B., Newell, C. J. and Fisher, R. T. 1997. "Process for *in situ* Biodegradation of Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons by Subsurface Hydrogen Injection," U.S. Patent No. 5,602,296. February 11.

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.

Hwang, G., Ban, Y.M., Lee, C.H. and Ahn, I.S. 2008. Adhesion of *Pseudomonas putida* NCIB 9816–4 to a naphthalene-contaminated soil. Coll. Surf. 62: 91–96.

Janbandhu, A. and Fulekar, M.H. 2011. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. Haz. Mat. 187: 333-340.

Johnsen, A.P., Wick, L.Y. and Harms, H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environ. Pollut. 133: 71-84.

Juhasz, A.L., Stanley, G.A., Davey, B. and Briyz, M.L. 1997. Evaluation of high molecular weight PAHs degradation by pyrene-enriched microbial community in incubated soil. In D.L.Wise(ed), Global Environment Biotechnology. pp.457-458. Great Britian : Kluwer Academic.

Kästner, M., Breuer-Jammali, M. and Mahro, B. 1994. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Appl. Microbiol. Biotechnol. 41: 267-273.

Kim, H.S. and Weber, W.J. 2005. Optimizing contaminant desorption and bioavailability in dense slurry systems. 2. PAH bioavailability and rates of degradation. Environ. Sci. Technol. 39: 2274–2279.

Klein, J. 2000. Possibilities, limits, and future developments of soil bioremediation. In: Rehm, H.J., Reed, G. (eds.), Environmental processes II. Soil Decontamination, Biotechnology, Vol. 11b, 2nd Edition. Wiley-VCH, Weinheim, FRG. pp. 465–476.

Krishna, C. 2005. Solid-state fermentation system – An overview. Crit. Rev. Biotechnol. 25: 1-30.

Kochevar, I.E., Armstrong, R.B., Einbinder, J., Walther, R.R. and Haber, L.C. 1982. Coal tar phototoxicity: Active compounds and action spectra. Photochem. Photobiol. 35: 351-358.

Korda, A., Santas, P., Tenente, A. and Santas, R. 1997. Petroleum hydrocarbon bioremediation: Sampling and analytical techniques, *in situ* treatments and commercial microorganisms currently used. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 677-686.

Labare, M.P. and Alexander, M. 1995. Enhanced mineralization of organic compounds in non-aqueous phase liquids. Eniviron. Toxicol. Chem. 14: 257-265.

Liang, Y., Gardner, D.R., Miller, C.D., Chen, D., Anderson, A.J., Weimer, B.C. and Sims, R.C. 2006. Study of biochemical pathways and enzymes involved in pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. strain KMS. Appl. Environ. Microbiol. 72: 7821-7828.

Liebig, E.W. and Curtright, T.J. 1999. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. Int. Biodeterior. Biodegrad. 44: 55-64.

Ling, J., Zhang, G., Sun, H., Fan, Y., Ju, J. and Zhang, C. 2011. Isolation and characterization of novel pyrene-degrading *Bacillus valismortis* strain JY3A. Sci. Total. Environ. 409: 1994-2000.

Lundstedt, S. 2003. Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remediation process. (eds.). Academic press, Sweden.

Mahanty, B., Pakshirajan, K. and Dasu, V.V. 2008. Biodegradation of pyrene by *Mycobacterium frederiksbergense* in a two-phase partitioning bioreactor system. Bioresource. Technol. 99: 2694-2698.

Molina, M., Araujo, R. and Hodsen, R.E. 1999. Cross-induction of pyrene and phenanthrene in a *Mycobacterium* sp. isolated from polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated river sediments. Can. Microbiol. 45: 520-529.

Mueller, J.G., Chapman, P.J. and Pritchard, P.H. 1989. Action of fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. Appl. Environ. Microbiol. 55: 3085-3090.

Obuekwe, C.O., Al-Jadi, Z.K. and Al-Saleh, E.S. 2009. Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. Int. Biodeterior. Biodegrad. 63: 273-279.

Pesenti-Barili, B., Ferdani, E., Mosti, M. and Degli-innocenti, F. 1991. Survival of *Agrobacterium radiobacter* K84 on various carriers for crown gall. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2047-2051.

Potin, O., Veignie, E. and Rafin, C. 2004. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. FEMS. Microbiol. Ecol. 51: 71-78.

Raetz, C.R., Reynolds, C.M., Trent, M.S. and Bishop, R.E. 2007. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. Annu. Rev. Biochem. 76: 295-329.

Rehmann, K., Noll, H.P., Steinberg, C.E.W. and Kettrup, A.A. 1998. Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. strain KR2. Chemosphere. 36: 2977-2992.

Ressler, B.P., Kneifel, H. and Winter, J. 1999. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons and formation of humic acid-like residues during bacterial PAH degradation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 85-91.

Riis, V., Babel, W. and Pucci, O.H. 2002. Influence of heavy metals on the microbial degradation of diesel fuel. Chemosphere. 49: 559-568.

Romero, C.M., Salvioli, M.L., Cazau, C.M. and Arambarri, A.M. 2002. Pyrene degradation by yeasts and filamentous fungi. Environ. Pollut. 117: 159-163.

Rosenberg, M. 2006. Microbial adhesion to hydrocarbons: Twenty-five years of doing MATH. Microbiol. Lett. 262: 129-134.

Rosenberg, M., Utnick, D.G. and Rosenberg, E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity, FEMS. Microbiol. Lett. 9: 29-33.

Samanta, S.K., Singh, O.V. amd Jain, R.K. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation. Trends. Biothechnol. 20: 243-248.

Schirmer, K., Dixon, D.G., Greenberg, B.M. and Bols, N.C. 1998. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. Toxicol. 127: 129-141.

Sheng, X., Chen, X. and He, L. 2008. Characteristics of an endophytic pyrene-degrading bacterium of *Enterobacter* sp. 12J1 from *Allium macrostemon* Bunge. Int. Biodeterior. Biodegrad. 62: 88-95.

Singh, B.K. and Walker, A. 2006. Microbial degradation of organophosphorus compounds. FEMS. Microbiol. Rev. 30: 428-471.

Sokhn, J., Leij, F.A.A.M., Hart, J.T.D. and Linch, M. 2001. Effect of copper on the degradation of phenanthrene by soil microorganisms. Lett. Appl. Microbiol. 3: 164-168.

Su, D., Li, P.J., Frank, S. and Xiong, X.Z. 2006. Biodegradation of benzo[a]pyrene in soil by *Mucor* sp. SF06 and *Bacillus* sp. SB02 co-immobilized on vermiculite. Environ. Sci. 18: 1204-1209.

Trejo, M. and Quintero, R. 2000. Bioremediation of contaminated soil. In J.O. Eugenia, Sanchez Gloria and H. Elizabeth (eds), pp. 179-189. Environmental biotechnology and cleaner bioprocess. London: Tayler and Francis Limited.

Trivedi, P., Pandey, A. and Palni, L.M.S. 2005. Carrier-based preparations of plant growing-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. World. J. Microb. Biot. 21: 941-945.

Van Dyke, M.I. and Prosser, J.I. 2000. Enhanced survival of *Pseudomonas fluorescens* in soil following establishment of inoculums in a sterile soil carrier. Soil. Biol. Biochem. 32: 1377-1382.

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

Verstraete, W. and Devliegher, W. 1996. Formation of non-bioavailable organic residues in soil: Perspectives for site remediation. Biodegrad. 7: 471-485.

Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview, Pure. Appl. Chem. 73: 1163-1172.

Vila, J., Lopez, Z., Sabate, J., Minguillon, C., Solanas, A.M. and Grifoll, M. 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1 action of the isolate on two-and 3- ring polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5497-5505.

Walter, U., Beyer, M., Klein, J. and Rehm, H.J. 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 671-676.

Wang, Y.B. and Han, J.Z. 2007. The role of probiotic cell wall hydrophobicity in bioremediation of aquaculture. Aquaculture. 269: 349-354.

Wang, Y.C., Yu, R.C. and Chou, C.C. 2004. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. Int. J. Food. Microbiol. 93: 209-217.

Weissenfels, W.D., Klewer, H. and Landhoff, J. 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 689-696.

Wild, S.R. and Jones, K.C. 1995. Polynucler aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. Environ. Pollut. 88: 91-108.

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

Miyamoto-Shinohara, Y., Sukenobe, J., Imaizumi, T. and Nakahara, T. 2006. Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. Cryobiology. 52: 27-32.

Zanieri, L., Galvan, P., Checchini, L., Cincinelli, A. and Lepri, L. 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human milk from Italian woman: Influence of cigarette smoking and residential area. Chemosphere. 67: 1265-1274.

Zhang, J., Sun, Z., Li, Y., Peng, X., Li, W. and Yan, Y. 2009. Biodegradation of *p*-nitrophenol by *Rhodococcus* sp. CN6 with high cell surface hydrophobicity. Haz. Mat. 163: 723-728.

Zhenyong, Z., Ammaiyappan, S. and Jonathan, W.C.W. 2011. Effects of rhamnolipids on cell surface hydrophobicity of PAH degrading bacteria and the biodegradation of phenanthrene. Bioresource. Technol. 102: 3999-4007.

Zhenyong, Z., Ammaiyappan, S. and Jonathan, W.C.W. 2011. Synergistic effect of thermophilic temperature and biosurfactant produced by *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 on the biodegradation of phenanthrene in bioslurry system. Haz. Mat. 190: 345-350.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตน (tryptone)	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ละลายวุ้น (Bacto Agar) 15 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM)

ก.

แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	5.5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม

ข.

แมกนีเซียมซัลเฟต (Mg_2SO_4)	0.01	กรัม
เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	0.005	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.005	กรัม

ละลายน้ำส่วน ก. ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ในส่วนของสารละลาย ข. ทำการเตรียมแยกแต่ละชนิดของสาร แล้วทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร แล้วค่อยเติมลงในอาหารส่วน ก. ที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

ภาคผนวก ข
สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. สารปฏิชีวนะ

ละลายนิสเตติน (Nystatin) 40 มก.ในไดเมธิลซัลฟอกไซด์ 1 มล. ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่อุณหภูมิ -20 °ซ

2. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	22	กรัม
KH_2PO_4	7.26	กรัม
น้ำกลั่นปลอดประจุ	1	ลิตร

3. 70% เอธานอล

99% เอธานอล	700	มล.
น้ำกลั่นปลอดประจุ	300	มล.

4. สารละลายไพรีนในไดเมธิลซัลฟอกไซด์

ชั่งไพรีน 1 กรัม ละลายในไดเมธิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 10 มล. ผสมด้วยเครื่องผสมจนผลึก PAHsละลายหมด ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อด้วยฟอล์ยให้มิดชิด เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ เติมลงในอาหารเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

5. สารละลายไพรีนในอะซิโตน

ชั่งไพรีน 1 กรัม ละลายในอะซิโตนปริมาตร 10 มล. ผสมด้วยเครื่องผสมจนผลึก PAHs ละลายหมด ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร

<u>หมายเหตุ</u> ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ เนื่องจากอะซิโตนระเหยเร็วมาก และขณะเติมสาร PAHs ที่ละลายในอะซิโตนลงในดินหรือวัสดุเหลือใช้จากพืชควรทำอย่างรวดเร็วเพื่อไม่ให้อะซิโตนระเหยซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นของสารเปลี่ยนแปลงได้

6. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

7. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล. และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น

8. การหาค่าความจุสูงสุดของของการอุ้มน้ำที่ 30%

1) นำกระดาษอะลูมิเนียมฟอล์ยมาตัดและพับเป็นถุงสี่ทรงสี่เหลี่ยม และนำไปอบให้แห้งเพื่อไล่ความชื้นที่ตู้อบอุณหภูมิ 80 °ซ เป็นเวลา 2 วัน

2) นำไปใส่ในเดกซิเคเตอร์ และนำมาชั่งน้ำหนักจนคงที่

3) ชั่งเศษใบไม้ใส่หลอดฝาเกลียว 1.5 กรัม และเติมน้ำเพื่อปรับความชื้นให้เป็น 30% แล้วผสมให้เข้ากัน ทำซ้ำประมาณ 5 ชุด

4) เขี่ยเศษใบไม้ใส่ในถุงอะลูมิเนียมฟอล์ยที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว และนำไปชั่งน้ำหนักและบันทึกค่าเอาไว้

5) นำค่าน้ำหนักของถุงที่มีเศษใบไม้หักน้ำหนักของถุงออก จะทำให้ทราบน้ำหนักของเศษใบไม้ที่มีค่าความจุสูงสุดของของการอุ้มน้ำที่ 30%

9. การหาค่าความเป็นกรด-เบส

ชั่งดิน เศษใบไม้ และวัสดุเหลือใช้จากพืช 1.5 กรัม เติมน้ำลงไปพออิ่มตัว จากนั้นใช้กระดาษลิตมัสวัดค่าความเป็นกรด-เบส

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวดาริกา ลาสุดตา เกิดเมื่อวันที่ 31 พฤษภาคม พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดอุบลราชธานี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2550 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

1. Darika Lasudta, Kanchana Jantongjin and Suthep Thaniyavarn. Degradation of pyrene in contaminated soil by hydrophobic bacterial consortium STK. Proceedings in The 2nd National Soil and Fertilizer Conference (NSFC). May 11-13, 2011, Maejo University, Chiangmai, Thailand. p. 823-832. (poster presentation) (Full text in CD-ROM)