# บทที่ 5

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

PAHs เป็นสารเคมีที่พบได้ทั่วไปในอุตสาหกรรมหลายประเภท และในปัจจุบันประเทศไทยมีโรงงานอุตสาหกรรมเพิ่มขึ้นหลายแห่ง จึงมีแนวโน้มที่จะเกิดการปนเปื้อนของ PAHs ในน้ำทิ้งที่เป็นกรดจากโรงงานอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังพบว่าปิโตรเลียมซึ่งมีส่วนประกอบหนึ่งเป็นสารในกลุ่ม PAHs นั้น มีการรั่วไหลเมื่อเกิดอุบัติเหตุจากการขนส่งและการจัดเก็บอยู่บ่อยครั้ง ทำให้เกิดผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมในแหล่งน้ำและแหล่งดิน ประกอบกับหลายพื้นที่ของประเทศไทยมีลักษณะดินเป็นดินเปรี้ยว จึงมีแนวโน้มที่จะเกิดการปนเปื้อนของ PAHs ในบริเวณแหล่งดินเปรี้ยวได้ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการย่อยสลาย PAHs ในแหล่งดินที่มีภาวะเป็นกรด ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกฟีแนนทรีนเป็นสารต้นแบบในการศึกษา และเลือกดิน 2 ชนิด ซึ่งได้แก่ดินเปรี้ยวในธรรมชาติจากจังหวัดนครนายก ซึ่งเป็นจังหวัดหนึ่งที่มีพื้นที่เป็นดินเปรี้ยวอยู่เป็นจำนวนมาก เพื่อเป็นตัวแทนของแหล่งดินเปรี้ยวที่ปนเปื้อนด้วยฟีแนนทรีนในภายหลัง และเลือกดินที่มีความเป็นกรดน้อยกว่าเป็นตัวแทนของแหล่งดินที่ปนเปื้อนด้วยน้ำทิ้งที่เป็นกรดที่ปนเปื้อนด้วยฟีแนนทรีน

มุ่งเน้นศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการย่อยสลายฟีแนนทรีนทางชีวภาพ โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 หัวข้อ คือ

1. ศึกษาถึงการย่อยสลายฟีแนนทรีนในดินที่มีภาวะกรดโดยธรรมชาติ เปรียบเทียบกับการย่อยสลายในดินที่เป็นกรดน้อยกว่า โดยปรับ pH ของดินทั้ง 2 ชุดให้มีความเป็นกรดใกล้เคียงกับดินเปรี้ยวในธรรมชาติที่เป็นกรดมากที่สุดที่ใช้ในการศึกษานี้คือประมาณ pH 4.0 โดยก่อนการสร้างระบบนิเวศจำลองได้วิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน การปนเปื้อนของฟีแนนทรีน รวมถึงตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นในแหล่งดินนั้นๆ เพื่อพิจารณาถึงปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีน

2. ศึกษาถึงผลกระทบของสารอาหารที่เติมลงไปต่อการย่อยสลายฟีแนนทรีนในดินที่มีภาวะเป็นกรด โดยได้ทดลองในดินทั้ง 2 ชุด คือ ในดินที่มีภาวะเป็นกรดโดยธรรมชาติและในดินที่เป็นกรดน้อยกว่า โดยในดินที่มีภาวะเป็นกรดโดยธรรมชาตินั้น ทดลองเติมสารอาหาร 3 แบบ คือ เติมสารสกัดจากยีสต์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในดินเป็น 200 ppm เติมเปลือกถั่วที่ผ่านการบดละเอียดแล้ว 6% ของน้ำหนักดิน และเติมสารสกัดจากยีสต์ร่วมกับเปลือกถั่วในปริมาณดังที่กล่าวมา และในดินที่เป็นกรดน้อยกว่า เติมสารสกัดจากยีสต์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในดินเป็น 200 ppm เพียงอย่างเดียว

**ปัจจัยทางฟิสิกส์และเคมี และจำนวนจุลินทรีย์ในดิน**

ในการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างดินเปรี้ยวโดยธรรมชาติ 4 ตัวอย่าง ได้แก่ NY1 NY2 NY3 และ NY4 จากจังหวัดนครนายก และตัวอย่างดินที่มีความเป็นกรดน้อยกว่าอีก 3 ตัวอย่าง ได้แก่ PJ จากจังหวัดปราจีนบุรี RB1 และ RB2 จากจังหวัดราชบุรี โดยแบ่งเป็นดินชุดที่ 1 และชุดที่ 2 ตามลำดับ เพื่อนำมาสร้างระบบนิเวศจำลองดินที่มีภาวะเป็นกรดที่ปนเปื้อนด้วยฟีแนนทรีน ก่อนนำมาสร้างระบบนิเวศจำลอง ได้วิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมี วิเคราะห์การปนเปื้อนของฟีแนนทรีน และตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น โดยได้ผลที่แตกต่างกันระหว่างดินที่ใช้ในการทดลองดังนี้

ผลการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีพบว่า ตัวอย่างดินชุดที่ 1 ซึ่งได้แก่ NY1 NY2 NY3 และ NY4 มี pH 4.3 5.0 4.3 และ 4.5 ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างดินชุดที่ 2 ซึ่งได้แก่ PJ RB1 และ RB2 มี pH สูงกว่าตัวอย่างดินชุดแรก คือ 5.3 6.4 และ 5.5 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนและไนโตรเจนในตัวอย่างดิน พบว่าในตัวอย่างดิน NY1 และ NY2 มีปริมาณต่ำกว่าในตัวอย่างดินชนิดอื่นที่ใช้ในการทดลอง และลักษณะเนื้อดินของตัวอย่างดิน NY3 และ NY4 มีลักษณะแตกต่างจากตัวอย่างดินอื่นอย่างเห็นได้ชัด คือมีลักษณะเนื้อดินเป็น silty clay loam และ clay ตามลำดับ ซึ่งเนื้อดินมีลักษณะอัดตัวกันแน่นเมื่อนำมาสร้างระบบนิเวศจำลอง ในขณะที่ตัวอย่างดินอื่นมีส่วนประกอบของ clay อยู่น้อย

ทั้งนี้ pH ปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอน และไนโตรเจน รวมถึงลักษณะเนื้อดินซึ่งส่งผลต่อการถ่ายเทออกซิเจนในดิน เป็นปัจจัยสำคัญในการย่อยสลาย PAHs ในดิน โดยมีรายงานว่าความเป็นกรดจัดมีผลต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน และความเป็นกรดด่างสามารถคัดเลือกกลุ่มของแบคทีเรียได้ และอาจมีผลต่อการปลดปล่อยสารอาหารและสารพิษบางชนิดในดิน นอกจากนี้ปริมาณสารอาหารในดินก็มีส่วนส่งเสริมการย่อยสลาย PAHs ในดิน โดยพบว่าการขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทำให้การเจริญของแบคทีเรียหยุดชะงัก (Van Veen และคณะ, 1997) นอกจากนี้การถ่ายเทออกซิเจนภายในดินที่เพียงพอ ก็เป็นปัจจัยสำคัญในการส่งเสริมการย่อยสลาย PAHs (กรมพัฒนาที่ดิน, 2550; Hupe และคณะ, 2001)

จากปัจจัยดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าดินชุดที่ 2 ที่มีการปรับ pH ให้มีภาวะเป็นกรดน่าจะมีการย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ดีกว่าดินชุดที่ 1 เนื่องจากมีปริมาณสารอาหารมาก และลักษณะเนื้อดินที่ง่ายในการสร้างระบบนิเวศจำลอง

ผลการวิเคราะห์การปนเปื้อนฟีแนนทรีนในตัวอย่างดินพบว่าในดินทั้ง 7 ชนิด ไม่มีการปนเปื้อนฟีแนนทรีนมาก่อน แต่เป็นที่น่าสนใจว่าตัวอย่างดิน PJ ซึ่งเป็นดินจากสวนผลไม้ มีประวัติ

การฉีดพ่นยาฆ่าแมลงซึ่งมีส่วนประกอบเป็นสารที่เป็นวงอะโรมาติกเช่นเดียวกับฟีแนนทรีน จึงมีแนวโน้มที่จุลินทรีย์ในตัวอย่างดินนี้จะย่อยสลายฟีแนนทรีนได้

เมื่อตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นในดินทั้ง 2 ชุดซึ่งมี pH เริ่มต้นที่แตกต่างกัน พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 7.0 มีจำนวนใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วงตั้งแต่ $4.60 \times 10^5 - 5.40 \times 10^6$ เซลล์/กรัมดิน ในขณะที่จำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 4.0 จำนวนจุลินทรีย์อยู่ในช่วงตั้งแต่ $3.30 \times 10^2 - 3.50 \times 10^3$ เซลล์/กรัมดิน ยกเว้นตัวอย่างดิน NY1 ที่มีจำนวนจุลินทรีย์เพียง $7.8 \times 10^1$ เซลล์/กรัมดิน เท่านั้น แสดงให้เห็นว่าจำนวน heterotrophic bacteria ในตัวอย่างดินที่ใช้ในการทดลองไม่น่าจะส่งผลกระทบต่อการย่อยสลายฟีแนนทรีน ยกเว้นในตัวอย่างดิน NY1 ซึ่งจำนวน heterotrophic bacteria ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 4.0 มีจำนวนน้อยที่สุดซึ่งต่างจากดินตัวอย่างอื่น ทั้งที่ pH ของตัวอย่างดินคือ 4.3 ซึ่งใกล้เคียงกับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ สาเหตุที่จำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างดินนี้ต่ำกว่าชนิดอื่น น่าจะมาจากปริมาณสารอาหารหลักที่จำเป็นในการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในดินมีปริมาณน้อยที่สุด ทำให้ไม่เพียงพอที่จะส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ในดิน (Van Veen และคณะ, 1997)

นอกจากนี้พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 4.0 มีจำนวนน้อยกว่าที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 7.0 ถึง 1,000 เท่า โดยในงานวิจัยของ Stapleton และคณะ (1998) ได้เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณที่ปนเปื้อน PAHs และมีค่า pH เป็นกรดแตกต่างกันแต่อยู่ในบริเวณเดียวกันจำนวน 3 แหล่ง นำมาตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เป็น neutrophilic และ acidophilic heterotrophic bacteria โดยนำมาเกลี่ยในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YEPG ที่มี pH 7.0 และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง acidophile ที่มี pH 3.0 ตามลำดับ พบว่าจำนวน neutrophilic heterotroph จาก 3 ตัวอย่างดิน โดย 2 ตัวอย่างแรกมี pH 2.0 และตัวอย่างที่ 3 มี pH 5.4 มีจำนวนจุลินทรีย์ $1.0 \times 10^3$ ($\pm 4.7 \times 10^2$) $1.1 \times 10^4$ ($\pm 4.1 \times 10^3$) และ $2.2 \times 10^6$ ($\pm 8.2 \times 10^5$) CFU/กรัมดิน ตามลำดับ ในขณะที่จำนวน acidophilic heterotroph ของทั้ง 3 ตัวอย่างดินมีค่าอยู่ในช่วงประมาณ $10^2 - 10^3$ CFU/กรัมดิน ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้

**การสร้างระบบนิเวศจำลองดิน**

หลังจากวิเคราะห์ปัจจัยต่างๆ ในดินแล้ว ได้สร้างระบบนิเวศจำลองดินโดยเติมสารอาหารที่ปราศจากแหล่งคาร์บอนลงไปในระบบนิเวศจำลองซึ่งได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM และ basal salt เพื่อปรับอัตราส่วน คาร์บอน : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส (C:N:P) ให้ใกล้เคียง 100 : 8 : 2 และปรับความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้เป็น 60% ตามรายงานของ Hupe และคณะ (2001) ซึ่งได้สรุปภาวะที่เหมาะสมในการบำบัด PAHs ที่ปนเปื้อนในดินให้มีประสิทธิภาพสูงไว้ ดังนั้นอัตราส่วนของ C:N:P ในแต่ละระบบนิเวศจำลองดินจึงมีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่ Evans และคณะ (2004) ใช้การเติมสารอาหาร $(NH_4)_2SO_4$ และ $KH_2PO_4$ เพื่อปรับอัตราส่วนของ คาร์บอน: ไนโตรเจน: ฟอสฟอรัส เป็น 100: 10: 1 เพื่อศึกษาถึงผลกระทบของการปนเปื้อนน้ำมันและการเติมสารอาหารต่อความหลากหลายของประชาคมแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบนิเวศจำลองดิน

ส่วนประกอบหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM และ basal salt ที่เติมลงในระบบนิเวศจำลองนั้นมีความแตกต่างกันคือ CFMM มีธาตุอาหารหลักคือ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียมและโซเดียม ในขณะที่ basal salt มี ไนโตรเจน โพแทสเซียม แคลเซียมและแมกนีเซียม เป็นส่วนประกอบหลัก โดยในดินเปรี้ยวนั้นพบว่ามีปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียมต่ำ การเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ basal salt ในการทดลองนี้จึงน่าจะเหมาะสมกว่า ซึ่ง Gemmell และ Knowles (2000) ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ basal salt ในการแยก acidophilic heterotroph โดยปรับ pH ของอาหารเป็น 3.0

ในการทดลองแรกซึ่งทดลองในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ขนาด 250 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น ผู้วิจัยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เติมลงในระบบนิเวศจำลอง แล้วพบว่าไม่มีการย่อยสลายฟีแนนทรีนเกิดขึ้น จึงได้เปลี่ยนชนิดอาหารเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว basal salt โดยเติมในระบบนิเวศจำลองดินขนาด 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารอาหารอื่น พบว่าไม่มีการย่อยสลายฟีแนนทรีนเกิดขึ้นเช่นกัน จึงอาจกล่าวได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในปริมาณที่เติมลงไปทั้ง 2 ชนิด รวมทั้งขนาดของดินที่ใช้ในการทดลองไม่สามารถช่วยให้เกิดการย่อยสลายฟีแนนทรีนในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1

ส่วนในการสร้างระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ผู้วิจัยได้เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว basal salt ทั้งในการทดลองที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และในการทดลองที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารอาหารอื่น โดยสร้างระบบนิเวศจำลองขนาด 6 กรัม เนื่องจากง่ายในการผสมให้เข้ากันและง่ายในการเก็บตัวอย่าง ซึ่งพบว่ามีการย่อยสลายเกิดขึ้นในทั้ง 2 การทดลอง จึงอาจสรุปได้ว่า

สามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว basal salt ในการเติมลงในระบบนิเวศจำลองดินได้เช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM

ในการสร้างระบบนิเวศจำลองนั้น ได้ทำชุดควบคุมซึ่งเป็นชุดที่มีการนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในดินเป็นจำนวน 3 ครั้ง เพื่อใช้เปรียบเทียบและยืนยันว่าการลดลงของฟีแนนทรีนที่เกิดขึ้นนั้น เกิดจากแอคติวิตีของจุลินทรีย์ในดิน ไม่ใช่เกิดจากการสูญเสียไปโดยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

ผู้วิจัยสร้างระบบนิเวศจำลองโดยแบ่งตามชุดดินคือ ระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 และชุดที่ 2 ซึ่งในแต่ละระบบนิเวศจำลอง ได้ศึกษาถึงผลกระทบของสารอาหารอื่นต่อการย่อยสลายฟีแนนทรีนในระบบด้วย โดยใช้สารสกัดจากยีสต์ เปลือกถั่วที่ผ่านการบดและนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และสารสกัดจากยีสต์ร่วมกับเปลือกถั่ว เติมลงในระบบนิเวศจำลองเพื่อใช้เป็นสารอาหาร

**ระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1**

การทดลองที่ 1 ได้สร้างระบบนิเวศจำลองที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อติดตามปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือในระบบนิเวศจำลองดินทั้ง 4 ชนิดแล้ว พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทำนองเดียวกัน คือจุลินทรีย์ในดินไม่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ และในสัปดาห์ที่ 6 พบว่าปริมาณฟีแนนทรีนในชุดควบคุมและชุดทดลองของระบบนิเวศจำลองดินทั้ง 4 ชนิด มีปริมาณเกินกว่า 100% มาก สาเหตุน่าจะมาจากการระเหยของน้ำในดินเป็นไปอย่างรวดเร็วทำให้ปริมาณฟีแนนทรีนที่สกัดได้มีความเข้มข้นมากกว่าปกติ

และเมื่อนำตัวอย่างดินจากช่วงเวลาต่างๆ ในระบบนิเวศจำลองมาสกัดดีเอ็นเอ พบว่าไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างดินดังกล่าว ซึ่งต่างจากก่อนการสร้างระบบนิเวศจำลองที่สามารถสกัดดีเอ็นเอและนำไปเพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสได้ และยังพบว่ามีความหลากหลายของแบคทีเรียในดินทั้ง 4 ชนิด เมื่อนำมาวิเคราะห์โดยเทคนิค PCR-DGGE บริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA อีกด้วย

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากผลของการตรวจหาส่วนของยีนไดออกซิจีเนสซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs แล้ว ไม่พบยีนดังกล่าวในตัวอย่างดินเริ่มต้นของ NY1 NY2 และ NY3 จึงเป็นไปได้ว่าสาเหตุที่ไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอจากระบบนิเวศจำลองที่ปนเปื้อนด้วยฟีแนนทรีนได้นั้น เพราะว่าจุลินทรีย์ในดินไม่สามารถทนต่อความเป็นพิษของฟีแนนทรีน และไม่สามารถใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งอาหารได้จึงตายไปในที่สุด ส่วนในตัวอย่างดิน NY4 ที่พบส่วนของยีนไดออกซิจีเนสเป็นแถบจางนั้น อาจกล่าวได้ว่าจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนมีปริมาณน้อยเกินไป จึงไม่เพียงพอที่จะย่อยสลายฟีแนนทรีน และตรวจพบดีเอ็นเอได้

เมื่อแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่พ่นทับด้วยสารละลายฟีแนนทรีนในไดเอทธิลอีเทอร์ พบว่าไม่มีแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมา

ต่อมาผู้วิจัยได้เลือกตัวอย่างดิน NY1 เป็นตัวแทนในการสร้างระบบนิเวศจำลองดิน เพื่อศึกษาถึงผลกระทบของสารอาหารอื่นต่อการย่อยสลายฟีแนนทรีน เนื่องจากตัวอย่างดินชนิดนี้มีปริมาณสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์น้อยที่สุด และยังพบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี pH 4.0 น้อยที่สุดอีกด้วย นอกจากนี้ลักษณะเนื้อดินเป็นชนิด loam และมีองค์ประกอบของ clay ต่ำ ซึ่งไม่ยากต่อการนำมาสร้างระบบนิเวศจำลองมากนัก ในขณะที่อย่างดิน NY4 ถึงแม้จะพบว่ามีส่วนของยีนไดออกซิจีเนสในตัวอย่างดินเริ่มต้น แต่ก็พบในปริมาณน้อย และลักษณะเนื้อดินยังยากต่อการนำมาสร้างระบบนิเวศจำลองอีกด้วย เนื่องจากดินมีลักษณะอัดกันแน่นเมื่อนำมาสร้างระบบนิเวศจำลอง

การทดลองที่ 2 ได้สร้างระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารอาหารอื่น โดยเลือกเติมสารสกัดจากยีสต์ เปลือกถั่วที่ผ่านการบดละเอียดและนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว และสารสกัดจากยีสต์ร่วมกับเปลือกถั่ว โดย Hupe และคณะ (1996) ได้รายงานไว้ว่า การเติมวัสดุทางการเกษตรช่วยปรับปรุงเนื้อดิน ทำให้การถ่ายเทออกซิเจนดีขึ้น และยังเป็นการเพิ่มแหล่งพลังงานให้กับประชาคมจุลินทรีย์ในดินอีกด้วย เมื่อติดตามปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือในระบบนิเวศจำลองดินทั้ง 4 ชนิดแล้ว พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการทดลองแรก คือจุลินทรีย์ในดินไม่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้

แต่เมื่อตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 4.0 พบว่าจุลินทรีย์มีจำนวนเพิ่มขึ้นจากเมื่อเริ่มต้นการทดลอง โดยในการทดลองที่เติมสารสกัดจากยีสต์ จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนในสัปดาห์ที่ 4 ในขณะที่ในการทดลองที่เติมเปลือกถั่ว และเปลือกถั่วร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนขึ้นทันทีที่เริ่มการทดลอง แสดงว่าจุลินทรีย์ในดินมีการตอบสนองต่อเปลือกถั่วได้ดีกว่าสารสกัดจากยีสต์ ทั้งๆ ที่สารสกัดจากยีสต์ถูกนำไปใช้โดยจุลินทรีย์ได้ง่ายกว่า เปลือกถั่วจึงอาจช่วยให้ออกซิเจนผ่านเข้าไปในดินได้ดีขึ้น ทำให้ช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ และจากผลการทดลองซึ่งไม่พบว่ามีการย่อยสลายฟีแนนทรีนเกิดขึ้นนั้น อาจเกิดจากปริมาณสารอาหารที่เติมยังไม่เหมาะสมต่อการส่งเสริมจุลินทรีย์ให้มีการย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ หรือจุลินทรีย์เลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่เติมลงไปในการเจริญมากกว่า หรือจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นมีน้อยเกินไป จึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนจนเพียงพอที่จะย่อยสลายฟีแนนทรีน

ในเวลาที่ใช้ในการทดลองได้ และอาจยังมีปัจจัยอื่นอีกที่ยับยั้งการย่อยสลายนอกจากปริมาณสารอาหารในดิน

จากการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนในภาวะกรดได้นั้น ไม่พบจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญและย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมา

**ระบบนิเวศจำลองดินชุดที่** 2

การทดลองที่ 1 ได้สร้างระบบนิเวศจำลองที่เติมฟีแนนทรีน และเลือกเติมสารสกัดจากยีสต์เป็นสารอาหารอื่น เนื่องจากเป็นสารอาหารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้โดยง่าย เมื่อติดตามปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือในระบบนิเวศจำลองดินทั้ง 3 ชนิดแล้ว พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทำนองเดียวกัน คือจุลินทรีย์ในดินสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้

เมื่อนำตัวอย่างดินจากช่วงเวลาต่างๆ ในระบบนิเวศจำลองดินแต่ละชนิดมาสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค PCR-DGGE พบว่าแถบดีเอ็นเอเด่นในแต่ละระบบนิเวศจำลองมีรูปแบบแตกต่างกัน โดยในระบบนิเวศจำลองดินทั้ง 3 ชนิด มีความหลากหลายของแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียน้อยเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าแบคทีเรียบางกลุ่มเท่านั้นที่สามารถใช้สารสกัดจากยีสต์ในการเจริญได้อย่างรวดเร็ว

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอเด่นไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่ไม่สามารถเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ ซึ่งเมื่อแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ก็ไม่พบแบคทีเรียที่สามารถเจริญและสร้างบริเวณใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง basal salt ที่พ่นทับด้วยสารละลายฟีแนนทรีนในไดเอทธิลอีเทอร์

นอกจากนี้สาเหตุที่ไม่สามารถแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ อาจเป็นเพราะการย่อยสลาย PAHs ในสิ่งแวดล้อมนั้นต้องใช้กลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลาย ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานถึงกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารที่มีความคงทนในธรรมชาติหลายงานวิจัยด้วยกัน (Alvey และ Crowley, 1996; Assaf และ Turco, 1994)

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอเด่นในแต่ละระบบนิเวศจำลองมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบสายพันธุ์แบคทีเรียเด่นหลายชนิด และมีจำนวนหนึ่งที่พบว่ามีรายงานการย่อยสลายสารพิษ โดยสกุลของแบคทีเรียที่มีรายงานการย่อยสลายสารพิษแสดงไว้ในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 สกุลของแบคทีเรียที่มีรายงานการย่อยสลายสารพิษ

| ระบบนิเวศจำลอง | สกุลแบคทีเรีย | แอคติวิตีในการย่อยสลาย | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|
| PJ | *Sphingomonas* sp.<br><br><br><br>*Bacillus* sp. | ฟลูออรีน<br>ฟีแนนทรีน<br>ฟลูออแรนทรีน<br>สีย้อม<br>ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน<br>PAHs | Bastiaens และคณะ, 2000<br>Mueller และคณะ, 1990<br>Khehra และคณะ, 2006<br>Verma และคณะ, 2006<br>Toledo และคณะ, 2006 |
| RB1 | *Sphingomonas* sp. | ฟลูออรีน<br>ฟีแนนทรีน<br>ฟลูออแรนทรีน | Bastiaens และคณะ, 2000<br>Mueller, 1989 |
| RB2 | *Halomonas* sp.<br>*Staphylococcus* sp.<br>*Mycobacterium* sp. | ฟีแนนทรีน ไครซีน<br>แนพธาลีน<br>ไพรีน ไวนิลคลอไรด์ | Melcher และคณะ, 2002<br>Zhuang และคณะ, 2003<br>Heitkamp และคณะ, 1988<br>Hartmans และ De Bont, 1992 |

เมื่อติดตามประชาคมราตลอดระยะเวลาในการทดลอง โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer ของยูคาริโอต พบแถบดีเอ็นเอเด่นในแต่ละระบบนิเวศจำลอง โดยในระบบนิเวศจำลองดินทั้ง 3 ชนิดให้รูปแบบ DGGE ที่คล้ายกัน และเมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีสายพันธุ์โปรโตซัวรวมอยู่ด้วยซึ่งได้แก่ *Halteria grandinella* และ *Epistylis plicatilis* และพบว่ามีราอยู่ 1 สกุล คือ *Penicillium* และราอีกกลุ่มที่ไม่สามารถเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ในระบบนิเวศจำลองดินทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 5.2 ซึ่งการที่ในระบบนิเวศจำลองดินทั้ง 3 ชนิด มีประชาคมรากลุ่มเดียวกันอยู่ในระบบนิเวศจำลอง และยังพบความหลากหลายน้อย ประชาคมราจึงอาจไม่มีผลต่อการย่อยสลายฟีแนนทรีน แต่เป็นเพียงจุลินทรีย์ที่ดำรงชีพอยู่ในดินเริ่มต้นเท่านั้น

ตารางที่ 5.2 สกุลของราที่พบในระบบนิเวศจำลองดินทั้ง 3 ชนิด

| ระบบนิเวศจำลอง | สกุลรา | แอคติวิตีในการย่อยสลาย | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|
| PJ | uncultured soil fungus | - | - |
| RB1 | *Penicillium* sp. | ฟีแนนทรีน | Sack และ Gunther, 1993 |

เมื่อตรวจหาส่วนของยีนไดออกซิจีเนสโดยการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ Rieske ในระบบนิเวศจำลองดินทั้ง 3 ชนิด ตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีส่วนของยีนไดออกซิจีเนสเกิดขึ้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองน่าจะมีแอคติวิตีในการย่อยสลายฟีแนนทรีนได้

การทดลองที่ 2 ได้สร้างระบบนิเวศจำลองดินที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนแต่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ เพื่อเปรียบเทียบถึงผลกระทบของสารสกัดจากยีสต์ต่อการย่อยสลายฟีแนนทรีน เมื่อติดตามปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือในระบบนิเวศจำลองดินทั้ง 3 ชนิดแล้ว พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการทดลองแรก คือจุลินทรีย์ในดินสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้

แต่ในระบบนิเวศจำลองดิน PJ และ RB2 การย่อยสลายเป็นไปได้ช้ากว่าในการทดลองที่เติมสารสกัดจากยีสต์อย่างชัดเจน ในขณะที่ระบบนิเวศจำลองดิน RB1 เป็นไปในทางตรงกันข้ามคือ การย่อยสลายเป็นไปได้อย่างรวดเร็วกว่าในระบบนิเวศจำลองที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์

เมื่อติดตามประชาคมแบคทีเรียตลอดระยะเวลาในการทดลอง พบแถบดีเอ็นเอเด่นในแต่ละระบบนิเวศจำลองมีความคล้ายคลึงกัน ซึ่งต่างจากในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมสารสกัดจากยีสต์ที่ลักษณะรูปแบบแถบดีเอ็นเอเด่นระหว่างระบบนิเวศจำลองแตกต่างกัน และแถบดีเอ็นเอเด่นมีความเข้มน้อยกว่าในระบบนิเวศจำลองที่เติมสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งสาเหตุน่าจะมาจากสารสกัดจากยีสต์เพิ่มการเจริญของจุลินทรีย์เฉพาะกลุ่มเท่านั้น ซึ่งในระบบนิเวศจำลองดิน PJ และ RB2 นั้นแบคทีเรียที่เจริญด้วยสารสกัดจากยีสต์นั้นสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ดีโดยพิจารณาจากการย่อยสลายที่เป็นไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งตรงกันข้ามกับในระบบนิเวศจำลอง RB1 ซึ่ง

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนเป็นกลุ่มที่ไม่ต้องการสารอาหารจากสารสกัดจากยีสต์

ในระบบนิเวศจำลองดิน RB2 การย่อยสลายฟีแนนทรีนต่ำมาก ซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบประชาคมแบคทีเรียที่พบเป็นแถบดีเอ็นเอจางมาก และพบว่าแถบดีเอ็นเอเริ่มเข้มขึ้นในสัปดาห์ที่ 12 ซึ่งถ้าทำการทดลองต่อไปอาจพบว่ามีอัตราการย่อยสลายเร็วขึ้นกว่านี้ภายหลังสัปดาห์ที่ 12

ในขณะที่จำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างดินของระบบนิเวศจำลองดิน RB2 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 4.0 เพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 10 และคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง และการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 4.0 ในตัวอย่างดินของระบบนิเวศจำลอง PJ และ RB1 พบว่าจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 8 แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ไม่แตกต่างจากเมื่อเริ่มต้นการทดลอง ซึ่งจากการที่จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนขึ้นเพียงเล็กน้อยในช่วงท้ายของการทดลองในระบบนิเวศจำลองดินทั้ง 3 ชนิดนั้น อาจเกิดจากในระบบนิเวศจำลองไม่มีการเติมสารอาหารอื่นนอกจากฟีแนนทรีน จุลินทรีย์จึงต้องใช้สารอาหารในดินเพื่อการเจริญ จึงทำให้การเจริญเป็นไปอย่างช้าๆ รวมถึงการที่จุลินทรีย์ในดินต้องใช้เวลาในการปรับตัวเมื่อสัมผัสกับฟีแนนทรีนซึ่งเป็นสารพิษในดิน จึงจะใช้ฟีแนนทรีนในการเจริญได้

เมื่อตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว basal salt ที่มี pH 4.0 และฟีแนนทรีน 200 ppm ไม่พบจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ ซึ่งสาเหตุน่าจะเกิดจากเหตุผลที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

## สรุปผลการศึกษา

เมื่อติดตามการย่อยสลายฟีแนนทรีนในระบบนิเวศจำลองดินทั้ง 7 ชนิด พบว่าในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ไม่มีการย่อยสลายฟีแนนทรีนเกิดขึ้นทั้งในการทดลองที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารอาหารอื่น ในทางตรงกันข้ามในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 พบว่าฟีแนนทรีนมีปริมาณลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองเมื่อสิ้นสุดการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 5.3

นอกจากนี้ผลการติดตามประชาคมแบคทีเรียโดยเทคนิค DGGE พบว่าประชาคมแบคทีเรียในตัวอย่างดินชนิดเดียวกันของชุดทดลองที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารอาหารอื่นมีความแตกต่างกัน โดยการเติมสารสกัดจากยีสต์ทำให้มีจำนวน

ชนิดของประชากรเด่น (แถบดีเอ็นเอเด่น) ในระบบน้อยลง แต่ประชากรแต่ละชนิดมีปริมาณมากขึ้น (แถบดีเอ็นเอมีความเข้มสูงขึ้น)

ตารางที่ 5.3 ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองสัปดาห์ที่ 12

| ระบบนิเวศจำลอง | ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือ (%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ | | เติมสารสกัดจากยีสต์ | |
| | ชุดควบคุม | ชุดทดลอง | ชุดควบคุม | ชุดทดลอง |
| PJ | 89.45 ± 2.05 | 26.01 ± 0.78 | 87.80 ± 1.84 | 8.39 ± 2.89 |
| RB1 | 93.03 ± 0.75 | 7.74 ± 7.94 | 98.44 ± 3.72 | 34.09 ± 1.09 |
| RB2 | 84.19 ± 1.29 | 53.31 ± 23.77 | 88.37 ± 0.63 | 17.55 ± 17.62 |

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่ไม่มีการย่อยสลายฟีแนนทรีนเกิดขึ้นแม้มีการเติมสารอาหารอื่น กับระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่มีการย่อยสลายฟีแนนทรีนทั้งในการทดลองที่เติมและไม่เติมสารอาหารอื่น จะเห็นได้ว่าสาเหตุที่ระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ไม่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ น่าจะเกิดจากสมบัติของดินเริ่มต้นที่นำมาสร้างระบบนิเวศจำลอง ซึ่งในดิน NY1 และ NY2 มีสารอาหารในดินต่ำ ขณะเดียวกันในดิน NY3 และ NY4 ก็มีลักษณะเนื้อดินเป็นดินเหนียวที่อากาศถ่ายเทได้ยาก ทำให้ระบบนิเวศจำลองดินที่สร้างขึ้นไม่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟีแนนทรีน นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างดินเริ่มต้น NY1 NY2 และ NY3 ไม่พบส่วนของยีนไดออกซิจีเนสซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs จึงอาจกล่าวได้ว่าจุลินทรีย์เริ่มต้นในดิน NY1 NY2 และ NY3 ไม่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีน ส่วนในตัวอย่างดินเริ่มต้น NY4 พบส่วนของยีนไดออกซิจีเนสแต่พบในปริมาณน้อย ซึ่งอาจไม่เพียงพอที่จะย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ ในขณะที่ดินชุดที่ 2 มีสารอาหารและการถ่ายเทอากาศดีเมื่อนำมาสร้างระบบนิเวศจำลอง นอกจากนี้ยังพบส่วนของยีนไดออกซิจีเนสตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 ของการทดลอง

สารอาหารอื่นที่เติมลงไปในระบบนิเวศจำลองดินก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีบทบาทในการส่งเสริมการย่อยสลายฟีแนนทรีนในระบบนิเวศจำลอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่สารอาหารที่เติมลงไปช่วยเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีน โดยก่อนเติมสารอาหาร ควรตรวจสอบว่ามีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารหรือไม่ อาจทำโดยตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารก่อนทำการทดลอง

จากงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าการนำดินเปรี้ยวในธรรมชาติมาสร้างระบบนิเวศจำลองเพื่อย่อยสลาย PAHs นั้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของดินก่อนเพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงดินเริ่มต้นที่จะนำมาใช้ โดยอาจจะต้องศึกษาถึงปริมาณสารอาหารหรือวัสดุทางการเกษตรที่เหมาะสมในการช่วยส่งเสริมให้เกิดการย่อยสลาย ซึ่งการเติมวัสดุบางชนิดสามารถช่วยปรับ pH ให้เป็นกลางมากขึ้น เช่นการเติมขี้เถ้าซึ่งมีสารอาหารโพแทสเซียมฟอสเฟตและโบรอนเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย

นอกจากนี้อาจใช้แหล่งดินที่พบว่ามีการย่อยสลายฟีแนนทรีนในภาวะกรดผสมลงในดินเปรี้ยวที่ปนเปื้อนเพื่อเป็นการปรับสภาพของเนื้อดิน รวมทั้งเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนให้มากขึ้น หรือแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนในภาวะกรดได้แล้วจึงนำไปเติมลงในแหล่งดินเปรี้ยว

การวิเคราะห์ประชาคมจุลินทรีย์ในดินโดยวิธีการเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการมีข้อจำกัดคือ มีจุลินทรีย์เพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่เจริญโดยการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ (Atlas และคณะ, 1992; Head และคณะ, 1998) เช่นเดียวกับในงานวิจัยนี้ซึ่งไม่สามารถเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คาดว่าย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ แต่เมื่อนำเทคนิค PCR-DGGE เข้ามาช่วย ทำให้ทราบถึงแนวโน้มของชนิดจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนได้

การติดตามประชาคมจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลองดินโดยใช้การติดตามบริเวณชิ้นส่วนของ 16S rDNA ของแบคทีเรียและ internal transcribed spacer ของยูคาริโอตนั้นบอกได้เพียงแนวโน้มของชนิดจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ อย่างไรก็ตามหากต้องการทราบถึงแอคติวิตีของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้จริง ควรติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีนควบคู่ไปด้วย เช่นในการทดลองนี้ได้ใช้ส่วนของยีนไดออกซิจีเนสบริเวณ Rieske ในการติดตามแอคติวิตีของการย่อยสลาย