บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จิรทีปม์ แสนรัก (2547) ได้คัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารไพรีน เพื่อพิสูจน์ว่าจุลินทรีย์บนใบไม้มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลาย PAHs พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จากใบจามจุรีมีประสิทธิภาพสูงสุดโดยสามารถย่อยสลายไพรีนได้หมดภายใน 14 วัน อย่างไรก็ตามการวิจัยเบื้องต้นได้ทดลองเติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ลงในดินที่ปนเปื้อนสารประกอบ PAHs โดยตรง พบว่าจะทำให้กลุ่มแบคทีเรียมีอัตราการตายสูง ซึ่งจะทำให้การบำบัดสารพิษไม่มีประสิทธิภาพ การทำให้กลุ่มแบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ในดินที่ปนเปื้อนและไม่สูญเสียความสามารถในการย่อยสลายสารพิษจะทำให้กลุ่มแบคทีเรียนั้นมีประโยชน์ในการบำบัดสารพิษ (Rhee และคณะ, 1996) มีรายงานการศึกษาชี้ว่า แบคทีเรียที่เตรียมในวัสดุทางการเกษตรบางชนิดจะมีอัตราการตายที่น้อยกว่าและคงความสามารถในการย่อยสลายสารพิษได้ Pattanasupong และคณะ (2004) รายงานว่าการใช้ใยบวบให้กลุ่มแบคทีเรียจับเกาะช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายสาร carbendazim และ 2,4-dichlorophenoxyacetic ได้ดีกว่าการเติมกลุ่มแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว Van Veen และคณะ (1997) รายงานว่าจุลินทรีย์สามารถใช้วัสดุทางการเกษตรบางชนิดเป็นแหล่งที่อยู่ โดยเกาะติดอยู่กับวัสดุนั้นและสามารถใช้สารอินทรีย์จากวัสดุทางการเกษตรเหล่านั้นเพื่อการเจริญได้ Scelza และคณะ (2006) รายงานว่าการเติมปุ๋ยหมักจากวัสดุทางการเกษตรสามารถช่วยเพิ่มการหมุนเวียนอากาศในดิน ทำเชื้อแบคทีเรียที่เติมลงไปในดินมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นมากกว่าการเติมเชื้อเพียงอย่างเดียว และดินที่เติมปุ๋ยหมักจะกระตุ้นการย่อยสลาย PAHs ได้มากกว่าดินที่ไม่เติมปุ๋ยหมัก เพราะในปุ๋ยหมักมีสารอินทรีย์และจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs อยู่ จึงทำให้เกิดการย่อยสลาย PAHs แบบโคเมตาบอลิซึมได้ (Kastner และ Mahro, 1996) จากงานวิจัยต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีและตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินที่ปนเปื้อนโดยใช้ใบจามจุรีที่มีกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จับเกาะอยู่

จากการทดลองได้เลี้ยงเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนใบจามจุรี เพื่อประเมินการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนใบจามจุรี (ข้อที่ 4.3) พบว่าตั้งแต่วันที่ 0-14 ของการทดลองกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี มีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก 7.9 log CFU ต่อกรัม จนถึงสูงสุด

ที่ 9.54 log CFU ต่อกรัมในวันที่ 3 ของการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวิธัญญา ชวเจริญพันธ์ (2549) ที่รายงานว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในเปลือกถั่วและเศษใบไม้ชนิดต่างๆ มีการเจริญสูงสุดมีค่าประมาณ 10 log CFU ต่อกรัมในวันที่ 14 ของการทดลอง ดังนั้นการทดลองต่อไปจะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนใบจามจุรีเป็นเวลา 3 วัน เพื่อสร้างเป็นหัวเชื้อแบคทีเรียก่อนนำไปบำบัดดินที่ปนเปื้อนไพรีนและฟีแนนทรีน

จากการศึกษาการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมโดยวิธีต่างๆ พบว่าในชุดควบคุมที่ใช้ดินปลอดเชื้อผสมไพรีนและฟีแนนทรีน เพื่อตรวจสอบการสลายของ PAHs เมื่อปราศจากปัจจัยทางชีวภาพจากดิน พบว่าตลอดระยะเวลาของการทดลอง ไพรีนและฟีแนนทรีนสามารถสลายไปจากดินได้เพียงเล็กน้อยคือเพียง 27.5% และ 24.3% ตามลำดับ การสลายตัวของ PAHs อาจเกิดขึ้นจากปัจจัยทางกายภาพต่างๆ เช่น การกลายเป็นไอ (volatilization) สารประกอบ PAHs จะสลายตัวได้อย่างรวดเร็วในช่วง 7 วันแรก แต่เมื่อระยะเวลานานขึ้นการจับกันของสารกับอนุภาคของดินจะยิ่งแน่นมากขึ้น การสลายไปโดยปัจจัยทางกายภาพจึงเกิดได้ยากขึ้นตามไปด้วย (Wiessenfels และคณะ, 1992) เป็นผลให้ช่วงหลังของการทดลอง ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนจึงไม่มีการลดลงมากนัก และไพรีนมีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนกว่าฟีแนนทรีนมีโอกาสที่จะจับเกาะกับโมเลกุลของดินได้แน่นกว่า โดยไพรีนจะจับกับอนุภาคดินและตะกอนดินด้วยแรงและปริมาณที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับสมบัติของชนิดและปริมาณอินทรีย์ของอนุภาคดิน (Chin และคณะ, 1997) ทำให้เกิดการสลายไปโดยปัจจัยทางกายภาพได้ยาก จึงควรจะพบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในดินมากกว่าฟีแนนทรีน อย่างไรก็ตามผลการทดลองไม่เป็นเช่นนั้น โดยพบว่าปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในดินมีเปอร์เซ็นต์สูงกว่าปริมาณไพรีนเล็กน้อย ซึ่งอธิบายได้ว่าเนื่องจากไพรีนมีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนกว่าฟีแนนทรีน จึงมีโอกาสที่จะจับเกาะกับโมเลกุลของดินได้แน่นกว่า เป็นผลทำให้การสกัด PAHs ออกจากดินยากขึ้นตามไปด้วย

ในชุดการทดลองใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมไพรีนและฟีแนนทรีน เพื่อตรวจสอบการสลายของสารประกอบ PAHs เมื่อมีปัจจัยทางชีวภาพจากดิน พบว่ามีปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองถึง 74.9 และ 75 เปอร์เซ็นต์หลังการบ่ม 35 วัน ซึ่งจะอยู่ในระดับเดียวกันกับในชุดการทดลองโดยใช้ดินปลอดเชื้อข้างต้น แสดงว่าจุลชีพในดินไม่ได้มีส่วนช่วยทำให้เกิดการสลายสารประกอบ PAHs ทั้งสองชนิด เมื่อพิจารณาการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในดิน พบว่าระดับการเจริญของแบคทีเรียในดินลดลงอย่างช้าๆ จนสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งการเจริญของแบคทีเรียในชุด

ทดลองน่าจะเกิดจากการใช้แหล่งคาร์บอนและพลังงานจากดินเอง เพราะผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดิน พบว่าในดินมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอยู่ และจากผลการทำ viable plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีผลึกไพรีนและฟีแนนทรีนวางบนฝาจานอาหารนั้น พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ อย่างไรก็ตามไม่อาจสรุปได้ว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs เพราะวุ้นที่ใช้ในการเตรียมอาหารแข็ง CFMM เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีนไม่มีความบริสุทธิ์เพียงพอ จึงอาจมีแหล่งคาร์บอนและพลังงานบางชนิดในวุ้นให้แก่แบคทีเรียเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตได้ แสดงว่าปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่ลดลงนั้นเกิดจากปัจจัยทางกายภาพเช่นเดียวกับในการทดลองใช้ดินปลอดเชื้อข้างต้น

ในชุดการทดลองใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีนและใบจามจุรีปลอดเชื้อ เพื่อศึกษาผลของใบจามจุรีต่อการเจริญของจุลชีพในดินที่สามารถสลายสารประกอบ PAHs ได้ พบว่าปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองนี้ลดลงมากกว่าชุดการทดลองทั้ง 2 ชุดข้างต้นกล่าวคือเหลือเพียง 56.2 และ 60.7 เปอร์เซ็นต์หลังจากบ่ม 35 วัน และจากการนับจำนวนแบคทีเรียในดินพบว่า การเจริญของแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แสดงว่าใบจามจุรีที่เติมลงไปในดินมีผลต่อจุลชีพในดิน ทำให้สามารถอยู่รอดและมีความสามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้ เนื่องจากในดินตามธรรมชาติย่อมมีแบคทีเรียหลายชนิดอยู่ร่วมกัน และผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของใบจามจุรีที่เติมลงไปนั้นชี้ว่า มีสารหลายชนิดที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อการเจริญเติบโตได้ ดังนั้นเมื่อเติมใบจามจุรีลงไปในดินของชุดการทดลอง จึงเป็นไปได้ว่ามีแบคทีเรียบางชนิดในดินสามารถนำใบจามจุรีไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อการเจริญเติบโตได้ และแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เจริญเพิ่มขึ้นนี้ อาจสร้างวิตะมิน กรดอะมิโน หรือสารที่ช่วยให้มีการย่อยสลายสารตั้งต้นดีขึ้น เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ของแบคทีเรียชนิดอื่นต่อไป (Mueller และคณะ , 1989) และในวันที่ 3 ของการทดลองตรวจพบปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองมีค่ามากกว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง ซึ่งอธิบายได้เช่นเดียวกันว่า อาจเนื่องมาจากใบจามจุรีที่เติมลงไปมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่อาจสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งทำให้เกิดการละลายสารลดแรงตึงผิวที่มีอยู่ในดินนั่นเอง รายงานที่ผ่านมาชี้ว่า สารลดแรงตึงผิวซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มี 2 ส่วนสำคัญ คือ ส่วนที่มีประจุ(ขั้ว) กับส่วนที่ไม่มีประจุ (ไม่มีขั้ว) มีสมบัติชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ตามลำดับ สามารถเพิ่มการละลายของไพรีน

และ PAHs อื่นได้มากขึ้นด้วย (Madsen และ Kristensen ,1997) จึงทำให้สามารถสกัด PAHs ออกมาจากดินได้มากกว่าในวันแรก ในขณะเดียวกัน PAHs ยังอยู่ในรูปที่ง่ายต่อการนำไปใช้ของจุลินทรีย์ในดินอีกด้วย นอกจากนั้น รายงานของนารีรัตน์ เจริญช่าง (2544) ชี้ว่าดินปนเปื้อนผสมใบจามจุรีจะสามารถสกัด PAHs ออกมาได้มากกว่าในดินปนเปื้อนเพียงอย่างเดียว เพราะดินมีโครงสร้างที่ซับซ้อน มีรูพรุนขนาดเล็ก เมื่อ PAHs ติดอยู่จึงทำให้สกัดออกมาได้ยาก ในขณะที่ใบจามจุรีมีรูพรุนน้อย PAHs ส่วนใหญ่จะติดอยู่ที่ผิวใบ จึงทำให้สกัดออกมาได้ง่ายกว่า รายงานชิ้นนี้จึงสนับสนุนผลการทดลองที่ว่าการลดลงของไพรีนและฟีแนนทรีนในชุดทดลองนั้น ไม่ได้เกิดจากใบไม้ดูซับ PAHs ไว้ แต่เป็นผลมาจากการย่อยสลายของแบคทีเรียในดินที่เจริญขึ้นมาจากการได้รับสารบางอย่างจากใบจามจุรีที่เติมลงไปนั่นเอง

ในการทดลองใช้ดินปลอดเชื้อผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน และผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อ เป็นชุดการทดลองเพื่อศึกษาความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนใบจามจุรีต่อการย่อยสลายของสารประกอบ PAHs ในดิน พบว่าปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในดินลดลงอย่างมาก โดยปริมาณฟีแนนทรีนลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ที่วันที่ 21 ของการทดลอง และปริมาณไพรีนเหลืออยู่เพียง 3.6 เปอร์เซ็นต์เมื่อสิ้นสุดการทดลอง 35 วัน การลดลงของสารประกอบ PAHs ทั้งสองชนิดนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองข้างต้นซึ่งใช้ใบจามจุรีปลอดเชื้อไปช่วยจุลชีพประจำถิ่นในดินเพื่อให้เกิดการสลายสารประกอบ PAHs จะเห็นว่า กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีสามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินปนเปื้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่มีอยู่ในดิน ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับที่ จิรทีปม์ แสนรัก (2547) ได้รายงานการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จากใบจามจุรีว่าสามารถย่อยสลายไพรีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้สาเหตุที่ไพรีนยังไม่หมดไปจากชุดการทดลอง อาจอธิบายได้เช่นเดียวกับที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นเกี่ยวกับการที่ไพรีนดูดซับติดกับอนุภาคของดินดีกว่าฟีแนนทรีน (Pignatello และ Xing, 1996 ; Luthy และคณะ, 1997) ในแง่การอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เติมลงไปในดินนั้น พบว่ากลุ่มแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนขึ้นในช่วง 3 วันแรก หลังจากนั้นอาจลดลงเล็กน้อยแต่ถือว่ายังอยู่ในปริมาณที่สูงอยู่ ส่วนหนึ่งอาจมาจากการที่กลุ่มแบคทีเรียใช้อาหารที่มีอยู่ในใบจามจุรีเพื่อการอยู่รอด และนอกจากนั้นที่สำคัญกลุ่มแบคทีเรียยังใช้ไพรีนและฟีแนนทรีนในดินเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญได้อีกด้วย ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการตรวจสอบปริมาณสารประกอบ PAHs ที่ยังเหลืออยู่ในชุดการทดลองกล่าวคือในวันที่ 3 ของการทดลอง เป็นวันที่มีจำนวนแบคทีเรียมากที่สุด ในขณะเดียวกันก็เป็นวันที่มี

เปอร์เซ็นต์ของสารประกอบ PAHs ทั้งสองชนิดลดลงมากที่สุดด้วย ในการทดลองจะเห็นว่ามีการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB มากกว่าใน CFMM นั่นเป็นเพราะแบคทีเรียแต่ละชนิดของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 อาจมีความสามารถในการนำไพรีนและฟีแนนทรีนไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อการเจริญได้ต่างกัน เมื่อเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM จึงทำให้มีแบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเจริญได้ จึงเป็นผลให้นับจำนวนแบคทีเรียได้น้อยกว่าใน LB

จากชุดการทดลองที่ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน และผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี เพื่อดูการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี และประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อที่ปนเปื้อน โดยใช้ใบจามจุรีที่มีกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จับเกาะอยู่ พบว่าปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในดินลดลงอย่างมากและรวดเร็วกว่าการทดลองที่ใช้ดินปลอดเชื้อ กล่าวคือไพรีนลดลงเหลือ 7.6 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 3 วัน และฟีแนนทรีนลดลงเหลือ 11.3 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 3 วัน แสดงว่านอกจากกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีแล้ว แบคทีเรียที่อยู่ในดินเองมีส่วนช่วยในการย่อยสลาย PAHs ในดินปนเปื้อนอีกทางหนึ่งด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเพื่อศึกษาผลของใบจามจุรีต่อจุลชีพในดินที่สามารถสลาย PAHs ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

นอกจากนี้ยังมีการเตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 อีก 2 วิธีด้วยกัน เพื่อเปรียบเทียบการรอดชีวิตและประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไพรีนและฟีแนนทรีนในดินที่ปนเปื้อน โดยใช้หัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมแบบต่างๆ ว่าแบบใดมีประสิทธิภาพมากน้อยกว่ากัน วิธีแรกจะเตรียมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในน้ำดิน เนื่องมาจากรายงานของ Deangrueng (2005) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำดิน แล้วนำไปเลี้ยงในดิน 2 แบบคือ ดินปลอดเชื้อ และดินไม่ปลอดเชื้อ พบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 มีการอยู่รอดและย่อยสลาย PAHs ได้ในดินทั้ง 2 ชุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยครั้งนี้คือ พบว่าไพรีนและฟีแนนทรีนลดลงเหลือเพียง 22.2 และ 12.1 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 และวันที่ 35 พบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 8.3 log CFU ต่อกรัมและจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน มีค่าเท่ากับ 7.6 log CFU ต่อกรัม

การเตรียมหัวเชื้อวิธีที่สองคือเตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เพื่อเปรียบเทียบการอยู่รอดและประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนเมื่อเติมลงไป

ในดินกับการเตรียมหัวเชื้ออีก 2 วิธีที่ได้กล่าวไปแล้ว ผลการทดลองพบว่า ไพรีนและฟีแนนทรีนลดลงเหลือ 57.3 และ 43.7 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3

จากผลการทดลองโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมในน้ำดิน และชุดทดลองโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM พบว่า ชุดทดลองโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมในน้ำดิน มีการอยู่รอดและมีประประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไพรีนและฟีแนนทรีนในดินที่ปนเปื้อนได้ดีกว่าชุดทดลองโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมใน CFMM สาเหตุอาจจะมาจากกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในน้ำดินน่าจะมีการปรับตัว (acclimatization) ให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนเพื่อให้สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้เร็วกว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงใน CFMM (Wilson และ Jones, 1993) มีรายงานการศึกษาเบื้องต้นโดยใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เติมลงไปในดิน พบว่าแบคทีเรียไม่สามารถอยู่รอดได้ในดิน (ข้อมูลจากดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากผลการวิจัยในครั้งนี้ ที่เป็นเช่นนี้อาจเพราะดินที่ใช้ในการทดลองเป็นดินที่มาจากแหล่งต่างกัน มีปัจจัยทางกายภาพและทางชีวภาพที่ต่างกัน จึงส่งผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียที่เติมลงไป (Sims และคณะ, 1990)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนของการเตรียมหัวเชื้อทั้ง 3 วิธี พบว่า กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีมีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินที่ปนเปื้อนได้ดีที่สุด คือเกิดการย่อยสลายได้เร็วที่สุด รองลงมาคือชุดทดลองโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมในน้ำดิน และชุดทดลองโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ตามลำดับ และผลประเมินการอยู่รอดของแบคทีเรียพบว่า กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีมีการเจริญสูงสุดตลอดการทดลอง ในขณะที่หัวเชื้อที่เตรียมในน้ำดินปลอดเชื้อและหัวเชื้อที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM มีระดับการเจริญใกล้เคียงกัน และหัวเชื้อทั้ง 3 วิธี มีระดับการเจริญของแบคทีเรียค่อนข้างสูง และมีการลดจำนวนลงเพียงเล็กน้อยตลอดการทดลอง

จากการทดลองโดยใช้หัวเชื้อทั้ง 3 ชนิด จะเห็นว่าหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี มีการอยู่รอดและมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไพรีนและฟีแนนทรีนในดินที่ปนเปื้อนได้ดีที่สุด เช่นเดียวกับ Kastner และ Mahro (1996) ที่รายงานว่าการเติมปุ๋ยหมักซึ่งเป็นวัสดุทางการเกษตรพวกใบไม้และกิ่งไม้ จะกระตุ้นการย่อยสลาย PAHs ได้มากกว่าดินที่ไม่เติม เพราะในปุ๋ยหมักมีสารอินทรีย์และจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs อยู่ จึงทำให้

เกิดการย่อยสลายสารประกอบ PAHs แบบโคเมตาบอลิซึมได้ ดังนั้นการเติมสารอินทรีย์เช่น ปุ๋ยหมักหรือวัสดุการเกษตรจึงเป็นการปรับปรุงดินในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนและช่วยกระตุ้นการทำงานของจุลินทรีย์ประจำถิ่นหรือจุลินทรีย์ที่เติมลงไปให้ดีขึ้น (Semple และคณะ, 2001) และวัสดุทางการเกษตรเป็นสารอินทรีย์ที่มีสมบัติในการช่วยเพิ่มการส่งผ่านออกซิเจนในดิน ช่วยให้ดินอุ้มน้ำได้ดีและควบคุมความเป็นกรดด่างในดินไม่ให้เปลี่ยนแปลง และยังเป็นแหล่งอาหารและแร่ธาตุที่สำคัญ ซึ่งปัจจัยที่กล่าวมานี้ล้วนช่วยส่งเสริมการทำงานของจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพ (Hupe และคณะ, 1996)

จากผลการติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในช่วงเวลาของการทดลอง โดยใช้เทคนิค DGGE พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก มีแถบดีเอ็นเอที่เห็นเด่นชัด 3 แถบด้วยกัน ซึ่งต่างกับที่ จิรทีปม์ แสนรัก (2547) ได้รายงานการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จากใบจามจุรี ว่าประกอบด้วยแบคทีเรียอย่างน้อย 7 ชนิด เมื่อนำแบคทีเรียกลุ่มนี้ไปเลี้ยงบนใบจามจุรีเพื่อประเมินการอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 พบว่า กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถเจริญได้ดีเมื่อเลี้ยงบนใบจามจุรีดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น เมื่อติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยอาศัย DGGE โปรไฟล์ของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวน 16S DNA พบว่า เมื่อนำกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มาเลี้ยงบนใบจามจุรีที่ปลอดเชื้อเป็นเวลานานขึ้น จะพบแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นมากกว่าชุดควบคุม คือกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM โดยพบว่าในวันเริ่มต้นการทดลอง มีแถบดีเอ็นเอเพียง 3 แถบ ซึ่งตรงกับแถบดีเอ็นเอของกลุ่มเชื้อที่ใช้เป็นชุดควบคุม แต่เริ่มมีแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น จนวันที่ 14 ของการทดลองซึ่งเป็นวันสุดท้าย พบแถบดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE ทั้งหมด 6 แถบ โดยความเข้มของแถบจะเพิ่มขึ้นในแต่ละวัน แสดงว่าโครงสร้างประชากรของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อเลี้ยงบนใบจามจุรีนานขึ้น (ดูจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอ) เหตุที่พบแถบดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE มากกว่าชุดควบคุม ทั้งที่เลี้ยงในสภาวะที่ใช้ใบจามจุรีปลอดเชื้อ เหตุผลในข้อนี้อาจอธิบายได้ว่า แบคทีเรีย 3 ชนิดนี้ คือกลุ่มประชากรหลัก ซึ่งน่าจะเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้ ส่วนแบคทีเรียบางชนิดที่พบในช่วงหลังนั้น อาจเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้จากการใช้สารอาหารที่มีในใบจามจุรีเพียงอย่างเดียว ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้อาจไม่มีความสามารถในการใช้สารไพรีน/ฟีแนนทรีนเพื่อการเจริญเลย ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM จึงไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดเหล่านี้ตลอดการทดลอง

การเตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนใบจามจุรี เพื่อนำไปใช้ในการบำบัดสารประกอบ PAHs ในการทดลองขั้นต่อไปนั้น ใช้เวลาบ่มเชื้อกับใบจามจุรีเป็นเวลา 3 วันก่อนจะนำไปผสมกับดินปนเปื้อน เนื่องจากวันที่ 3 มีจำนวนแบคทีเรียสูงที่สุด แต่จากผลของแถบดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE กลับชี้ว่า วันที่ 14 เป็นวันที่มีประชากรแบคทีเรียอยู่มากที่สุด (ดูจากจำนวนและความเข้มของแถบดีเอ็นเอ) ที่เป็นเช่นนี้อาจเพราะวัสดุทางการเกษตรอาจเปื่อย ทำให้แบคทีเรียสามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญได้ง่ายขึ้น หรือแบคทีเรียที่เจริญได้ในใบจามจุรีอาจยังไม่เจริญเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้นับจำนวนแบคทีเรียได้น้อย อย่างไรก็ตาม ความเข้มของแถบดีเอ็นเอในวันที่ 3 และ 14 ไม่ได้แตกต่างกันมาก และการทดลองนี้เพียงเพื่อต้องการให้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถใช้ใบจามจุรีเป็นแหล่งที่อยู่โดยเกาะติดอยู่กับใบ และสามารถใช้สารอาหารจากวัสดุทางการเกษตรชนิดนี้เพื่อการเจริญได้เท่านั้น จึงไม่น่าจะมีผลต่อการทดลองขั้นต่อไปมากนัก และวันที่ 3 เป็นช่วงเวลาที่สั้น ช่วยประหยัดเวลาในการทดลอง เหมาะที่จะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไปมากกว่าวันที่ 14

ผลการติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรียที่อยู่ในดินไม่ปลอดเชื้อที่ปนเปื้อนสารไพรีนและฟีแนนทรีนในชุดการทดลองที่ 2 โดยใช้เทคนิค DGGE พบว่าโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในดินมีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE น้อย (รูปที่ 4.15) จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าแบคทีเรียในดินอย่างเดียวแทบจะไม่มีส่วนช่วยในการสลายสารประกอบ PAHs ที่ปนเปื้อนในดิน แถบดีเอ็นที่โดดเด่นขึ้นในช่วงแรกของการทดลองนั้นน่าเป็นผลมาจากแบคทีเรียใช้อาหารที่มีในดินเพื่อการเจริญ แต่วันถัดมาแถบดีเอ็นเอจางลง อาจเป็นเพราะอาหารในดินเริ่มลดลง และในช่วงกลางของการทดลองพบแถบดีเอ็นเอชนิดใหม่โดดเด่นขึ้นมาอีกครั้ง แสดงว่าอาจมีแบคทีเรียบางชนิดปรับตัวเพื่อให้เคยชินกับสารพิษในดินได้ บวกกับการสลายตัวตามธรรมชาติของสารประกอบ PAHs จนแตกออกเป็นโมเลกุลที่เล็กลงจนแบคทีเรียในดินสามารถนำไปใช้ได้ หรืออาจเป็นเพราะว่าดินที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นดินที่ไม่มีประวัติการปนเปื้อนสารประกอบ PAHs มาก่อน จึงทำให้แบคทีเรียในดินปรับตัวต่อสารไพรีนและฟีแนนทรีนที่เติมลงไปได้ช้า หรือแบคทีเรียบางชนิดอาจทนสารพิษไม่ได้จนตายไป

จากผลการทดลองตรวจสอบการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น พิสูจน์ให้เห็นว่า หัวเชื้อ RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี สามารถย่อยสลายสารไพรีนและฟีแนนทรีนที่ปนเปื้อนในดินของชุดการทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด และเมื่อติดตามพลวัตรประชากร

ของแบคทีเรียในดินที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีลงไปในช่วงเวลาของการบำบัดด้วยเทคนิค DGGE พบว่าโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในชุดการทดลองมีความหลากหลายมากขึ้น โดยพบทั้งแถบดีเอ็นเอจากกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เติมลงไปและแถบดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่มีอยู่ในดิน จากผลของ DGGE จะเห็นว่าวันที่ 3 ของการทดลองมีแถบดีเอ็นเอโดดเด่นที่สุด ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลตรวจสอบการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยพบว่าวันที่ 3 ของการทดลองมีอัตราการสลายสารไพรีนและฟีแนนทรีนเกิดขึ้นมากที่สุดด้วย หลังจากวันที่ 3 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs เกิดขึ้นช้าลง ความเข้มของแถบดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE ก็จางลงตามไปด้วย (รูปที่ 4.16) ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในดินและกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนใบจามจุรีมีส่วนช่วยให้เกิดการสลายของสารไพรีนและฟีแนนทรีนในดินปนเปื้อนโดยใช้สารเหล่านั้นเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อการเจริญ และโครงสร้างประชากรแบคทีเรียทั้งหมดในชุดการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นหรือลดลงตามปริมาณสารประกอบ PAHs ที่มีอยู่ในดิน ณ ช่วงเวลานั้น

จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า สามารถนำใบจามจุรีมาใช้เป็นแหล่งที่อยู่และแหล่งอาหารของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เพื่อให้เกิดสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการอยู่รอดและเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายของจุลินทรีย์ก่อนที่จะเติมลงไปในดินปนเปื้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี สามารถอยู่รอดได้ในบริเวณดินที่ปนเปื้อนและไม่ทำให้สูญเสียความสามารถในการย่อยสลายสารพิษไป นอกจากนี้ใบจามจุรียังมีส่วนช่วยส่งเสริมแบคทีเรียประจำถิ่นในดินให้เกิดความสามารถในการย่อยสลายสารปนเปื้อนในดินบริเวณนั้นได้อีกด้วย และการนำเทคนิค PCR-DGGE เข้ามาช่วย ทำให้ทราบถึงแนวโน้มจำนวนและความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารไพรีนและฟีแนนทรีนได้