บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 สารเคมี

- ฟีแนนทรีน (phenanthrene) ของบริษัท Sigma, USA.
- แนพธาลีน (naphthalene) ของบริษัท Sigma, USA
- สารมาตรฐานพีเอเอช 13 ชนิด ได้แก่ อะซีแนพธิลีน (acenaphthylene) ฟลูออรีน (fluorene) ฟีแนนทรีน (phenanthrene) แอนทราซีน (anthracene) ไพรีน (pyrene) ไครซีน (crysene) เบนโซ[เอ]แอนทราซีน (benzo[a]anthracene) เบนโซ[บี]ฟลูออแรนธีน (benzo[b]fluoranthene) เบนโซ[เค]ฟลูออแรนธีน (benzo[k]fluoranthene) เบนโซ[เอ]ไพรีน (benzo[a]pyrene) เบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอรีลีน (benzo[g,h,i]perylene) อินดิโน[1,2,3-ซีดี]ไพรีน (indeno[1,2,3-cd]pyrene) และไดเบนซ์[เอ,เอช]แอนทราซีน (dibenz[a,h]amthracene)
- 0.1 M โพแทสเซียมฟอสเฟตบัพเฟอร์ (potassium phosphate buffer pH 7)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ MS (minimal salt liquid medium) (Focht, 1994)
- ซิลิกาเจล 60 (silica gel 60) ขนาดอนุภาค 0.063-0.02 มิลลิเมตร ของบริษัท Merck
- โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (sodium sulfate anhydrous) ของบริษัท Merck
- เฮกเซน (hexane Analytical grade) ของบริษัท Fisher Scientific Chemicals
- ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane Analytical grade) ของบริษัท Fisher Scientific Chemicals
- เอทธานอล (ethanol Analytical grade) ของบริษัท Mallinkrodt
- ไดเมทธิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide Analytical grade) ของบริษัท Fisher Scientific Chemicals
- ใยแก้ว (gas wool)

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์

- หลอดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร
- หลอดแก้วแบบฝาเกลียวขนาด 22 มิลลิลิตร
- ขวดชมพู่ (Evaporation flask) 125 ml
- คอลัมน์ (column) ขนาด 2 × 40 เซนติเมตร
- บีกเกอร์ (beaker)
- กรวยแก้ว
- ขวดใส่ตัวอย่างทำก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography vials)
- ขวดวัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร
- ช้อนตักสาร
- กระดาษกรอง 70 มิลลิเมตร (Whatman (GF/C))
- อลูมิเนียมฟอยด์
- พาราฟิล์ม

3.1.3 เครื่องมือ

- กล้องสเตอริโอ (sterio microscopy) รุ่น SZ30 ของบริษัท Olympus Japan
- เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น 3017 ของบริษัท GFL
- เครื่องสกัด (Microwave extractor) รุ่น ETHOS SEL ของบริษัท Milestone
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น NE-1 ของบริษัท Eyela Tokyo Aikakikai
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Sorvall Biofuge Stratos ของบริษัท Kendo Laboratory Products
- เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan
- เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) G-500 E ของบริษัท Scientific Industries
- เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas liquid chromatography Flame Ionizing Detector: GC-FID) รุ่น 6890N ของบริษัท Agilent Technologies
- เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี แมสสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Gas chromatography with mass spectrometry: GC-MS) รุ่น Pegasus III ของบริษัท Leco
- เครื่องเผาสาร (furnace) รุ่น Carbolite ของบริษัท Scientific Promotion

- เครื่องดูดความชื้น (desicator)
- เครื่องชั่งน้ำหนัก
- ไมโครปิเปต ขนาด 20, 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Drummond Scientific

3.1.4 ไม้ประดับ

- เข็ม (*Ixora* spp.)
- แก้ว (*Murraya paniculata*)
- โมก (*Wrigtia religiosa*)
- เฟื่องฟ้า (*Bougainvillea* spp.)
- มะลิ (*Jasminum sambac* (L.) Ait.)
- โกสน (*Codiaeum varicgatum*)
- ไทรแคระ (*Ficus* sp.)
- ข่อย (*streblus asper* Lour.)
- เข็มม่วง (*Pseuderanthemum graciliflorum* (Nees) Ridl.)
- ชบา (*Hibiscus rosa sinensis* L.)

เข็ม (*Ixora* spp.)

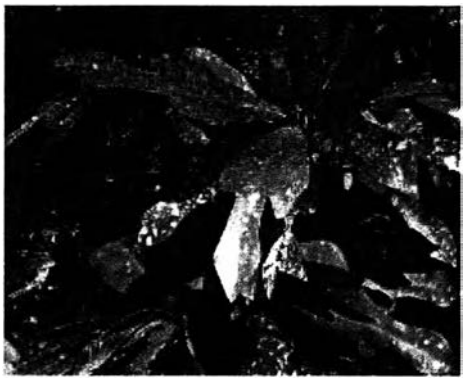
แก้ว (*Murraya paniculata*)

ภาพที่ 3.1 ไม้ประดับที่ศึกษา

โมก (*Wrigtia religiosa*)

เฟื่องฟ้า (*Bougainvillea* spp.)

มะลิ (*Jasminum sambac* (L.) Ait.)



โกสน (*Codiaeum varicgatum*)

ไทรแคระ (*Ficus* sp.)

ข่อย (*streblus asper* Lour.)

ภาพที่ 3.1 ไม้ประดับที่ศึกษา (ต่อ)

เข็มม่วง (*Pseuderanthemum graciliflorum* (Nees) Ridl.)

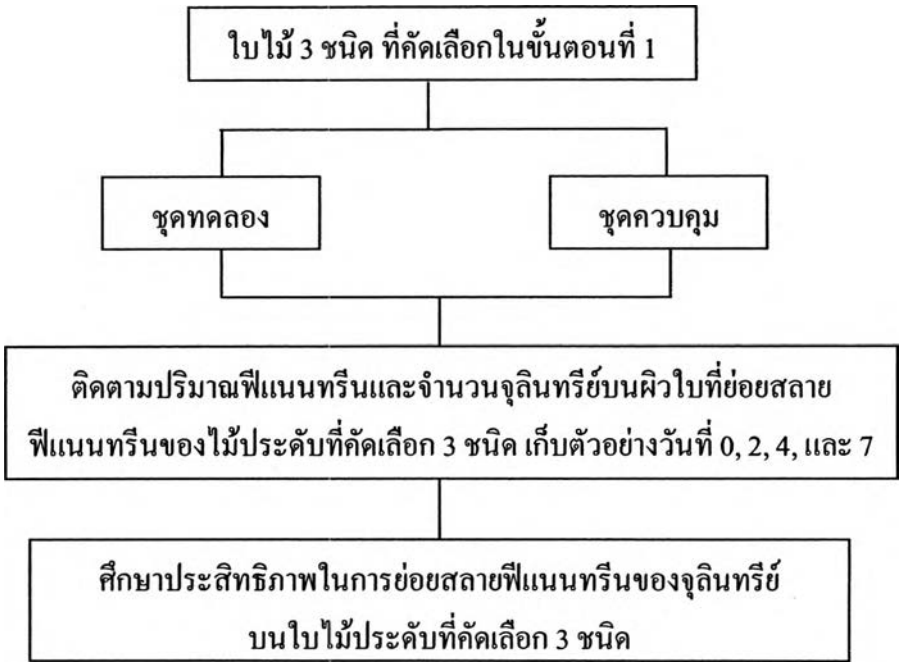
ชบา (*Hibiscus rosa sinensis* L.)

ภาพที่ 3.1 ไม้ประดับที่ศึกษา (ต่อ)

3.2 แผนผังแสดงวิธีการดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาลักษณะทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของใบไม้ประดับ 10 ชนิด

ขั้นตอนที่ 2 เปรียบเทียบการลดลงของฟีแนนทรีนที่สะสมบนผิวใบของไม้ประดับที่มีจำนวนของแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนแตกต่างกัน



3.3 การเก็บตัวอย่างใบไม้

เก็บตัวอย่างใบไม้แบบสุ่ม โดยเลือกเก็บใบไม้สดที่โตเต็มที่ ในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ - มิถุนายน 2550 ในบริเวณพื้นที่ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำการศึกษาไม้ประดับ 10 ชนิด ที่นิยมปลูกทั่วไปและดูแลรักษาง่าย ได้แก่ เข็ม โมก แก้ว มะลิ โกสน ไทรแคระ เข็มม่วง ข่อย เฟื่องฟ้า และชบา เก็บตัวอย่างในเวลาเช้า ใส่ในถุงพลาสติกแล้วนำไปทำการทดลองภายในวันเดียวกัน

3.4 วิธีศึกษาลักษณะทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของใบไม้ประดับ 10 ชนิด

3.4.1 ศึกษาลักษณะทางกายภาพของใบไม้ประดับ 10 ชนิดได้แก่ จำนวนขนบนผิวใบ (trichome) และพื้นที่ของใบ ตามวิธีในข้อ 3.5.1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.2 ศึกษาลักษณะทางเคมีของใบไม้ประดับ10 ชนิดได้แก่ ปริมาณความชื้น ปริมาณแวกซ์ ปริมาณฟอสฟอรัส ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณฟีแนนทรีนและ PAHs ชนิดอื่นด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี แมสสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ตามวิธีในข้อ 3.5.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

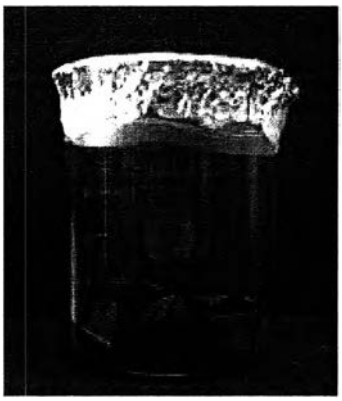
3.4.3 ศึกษาลักษณะทางชีวภาพของใบไม้ประดับ 10 ชนิด ด้วยการหาความหลากหลายของแบคทีเรียบนผิวใบและจำนวนแบคทีเรียบนผิวใบที่ย่อยสลายฟีแนนทรีน ตามวิธีในข้อ 3.6 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.4 จำแนกไม้ประดับทั้ง 10 ชนิดตามจำนวนของแบคทีเรียบนผิวใบที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่มีจำนวนของแบคทีเรียบนผิวใบที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนสูง กลาง และต่ำ จากนั้นคัดเลือกไม้ประดับ 1 ชนิด เพื่อเป็นตัวแทนกลุ่ม (ทั้งหมด 3 ชนิด) นำไปศึกษาต่อในข้อ 3.4

3.5 เปรียบเทียบการลดลงของฟีแนนทรีนที่สะสมบนผิวใบของไม้ประดับที่มีจำนวนของแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนแตกต่างกัน

3.5.1 เก็บตัวอย่างใบไม้ประดับ 3 ชนิด ที่ผ่านการคัดเลือกในข้อที่ 3.4.4 มาแล้ว เพื่อนำมาทดสอบกิจกรรมการย่อยสลายฟีแนนทรีนของแบคทีเรียบนผิวใบ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยทำการทดลอง 2 ชุด ดังนี้ ชุดการทดลองที่ 1 เป็นชุดทดลองที่มีจุลินทรีย์บนใบไม้ตามธรรมชาติและชุดการทดลองที่ 2 เป็นชุดควบคุมที่กำจัดจุลินทรีย์บนใบไม้ออกก่อนทำการทดลอง โดยนำใบไม้ที่เก็บมาแล้วตัดให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร ชั่งน้ำหนักใบไม้ 8 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายฟีแนนทรีนที่ความเข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเตรียมใน 20% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงไปบนใบไม้ให้ทั่วจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยด์และพาราฟิล์ม ดังแสดงในภาพที่ 3.2 ส่วนชุดการทดลองที่ 2 มีการเตรียมใบไม้เช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 แต่แช่ใบไม้ 5 นาที ในสารละลาย 70% เอทธานอลก่อนทำการทดลอง จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างใบไม้ในวันแรกและวันที่ 2, 4 และ 7 นำมาหาปริมาณฟีแนนทรีนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ตามวิธีในข้อ 3.6.2 และจำนวนแบคทีเรียบนผิวใบที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนที่เหลือบนใบ ตามวิธีในข้อ 3.6.1

3.5.2 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีแนนทรีนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันของแบคทีเรียบนผิวใบของไม้ประดับทั้ง 3 ชนิด โดยทำการทดลองตามชุดทดลองในข้อ 3.4.1 แต่ใช้สารละลายฟีแนนทรีนที่มีความเข้มข้น 400, 800 และ 4000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เตรียมใน 20% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงไปบนใบไม้ให้ทั่วจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50, 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จากนั้นเก็บตัวอย่างในวันแรกและวันที่ 4 แล้วนำใบไม้มาวิเคราะห์หาปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือบนใบด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ตามวิธีในข้อ 3.6.2



ภาพที่ 3.2 การทดลองเพื่อติดตามปริมาณฟีแนนทรีนบนผิวใบไม้ที่ผ่านการคัดเลือก (3 ชนิด)

3.6 วิธีวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและเคมีของใบไม้

3.6.1 ลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ จำนวนขนบนผิวใบ และพื้นที่ใบ

จำนวนขนบนผิวใบด้านบน (adaxial epidermis) และด้านล่าง (abaxial epidermis) ทำได้โดยการนำใบไม้มาตัดให้มีขนาด 1 ตารางเซนติเมตร วางใต้กล้องสเตอริโอและนับจำนวนขนบนผิวใบต่อหน่วยพื้นที่ที่เห็นจากใต้กล้อง ตามวิธีของ Yadav และคณะ (2005)

พื้นที่ใบ หาได้จากการนำใบไม้วางทาบบนกระดาษกราฟและลากเส้นตามแนวขอบใบด้วยดินสอ แล้วนำไปหาพื้นที่ใต้กราฟ

3.6.2 ลักษณะทางเคมี ได้แก่ ปริมาณแวกซ์ ปริมาณความชื้น ปริมาณฟอสฟอรัส ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณ PAHs บนผิวใบ

วิธีหาปริมาณแวกซ์ ชั่งน้ำหนักตัวอย่างใบไม้ 4 กรัม นำมาตัดให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตรแล้วใส่ในเวสเซล (vessel) ของเครื่อง microwave extractor (Milestone ETHOS SEL) จากนั้นใส่เฮกเซนลงไป 40 มิลลิลิตร สกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที นำของเหลวที่สกัดได้กรองด้วยกระดาษกรอง GF/C ใส่ในขวดวัดชมพู่ที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้ว นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ Karnchanasest และ Satayavibul (2005) จากนั้นนำไปวางในเครื่องดูดความชื้นและชั่งน้ำหนักขวดอีกครั้ง นำไปคำนวณหาปริมาณร้อยละของแวกซ์ ได้ดังนี้

ปริมาณแวกซ์ (%) = (ขวดชมพู่ที่ชั่งน้ำหนักหลังทำการทดลอง - ขวดชมพู่ที่ชั่งน้ำหนักก่อนทำการทดลอง) / น้ำหนักตัวอย่างใบไม้ × 100

วิธีหาปริมาณความชื้น นำใบไม้ 4 กรัมมาตัดแล้วใส่ในถ้วยกระเบื้องที่ชั่งน้ำหนักก่อนอบตัวอย่างใบไม้ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำไปวางในเครื่องดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักหลังอบ แล้วนำไปคำนวณหาร้อยละความชื้นของใบไม้

I 24306068

ปริมาณความชื้น (%) = (น้ำหนักสดของตัวอย่างใบไม้ – น้ำหนักแห้งของตัวอย่างใบไม้) / น้ำหนักสดของตัวอย่างใบไม้ × 100

ปริมาณฟอสฟอรัสในใบ ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ แผนกวิเคราะห์พืช กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร

ปริมาณไนโตรเจนในใบ ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ แผนกวิเคราะห์พืช กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร

วิธีหาปริมาณ PAHs 14 ชนิดได้แก่ แนพธาลีน อะซีแนพธิลีน ฟลูออรีน ฟีแนนทรีน แอนทราซีน ไพรีน ไครซีน เบนโซ[เอ]แอนทราซีน เบนโซ[บี]ฟลูออแรนธีน เบนโซ[เค]ฟลูออแรนธีน เบนโซ[เอ]ไพรีน เบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอริรีน อินดิโน[1,2,3-ซีดี]ไพรีน และไดเบนซ์-[เอ,เอช]แอนทราซีน นำใบไม้ 8 กรัม มาตัดให้มีขนาด 1 ตารางเซนติเมตร ใส่ในเวสเซลของเครื่อง microwave extractor (Milestone ETHOS SEL) เติมเฮกเซนลงไป 60 มิลลิลิตร สกัดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที นำของเหลวที่สกัดได้กรองด้วยกระดาษกรอง GF/C ใส่ในขวดชมพู่ นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศให้เหลือปริมาตร 5 มิลลิลิตรจากนั้นทำให้ปราศจากสารปนเปื้อนโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี และนำของเหลวหลังผ่านคอลัมน์แล้ว ไประเหยแห้งอีกครั้งให้เหลือปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตามวิธีของ Karnchanasest และ Satayavibul (2005) วิเคราะห์หาปริมาณ PAHs 14 ชนิด ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี แมสสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลาย PAHs แต่ละชนิด

การแยกสารที่ต้องการศึกษาออกจากของเหลวที่ผ่านการสกัดมาแล้ว โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี ก่อนทำการทดลองต้องนำซิลิกาเจลไปเผาด้วยเครื่องเผาสารที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง วางไว้ในเครื่องดูดความชื้นเพื่อให้เย็นก่อนนำไปทำการทดลอง เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลองต้องล้างด้วยเฮกเซนก่อนนำไปทำการทดลองทุกครั้ง การเตรียมคอลัมน์ เริ่มจากนำใยแก้วใส่ลงไปตรงตำแหน่งล่างสุดของคอลัมน์แล้วล้างด้วยเฮกเซน ในการบรรจุซิลิกาเจลลงในคอลัมน์แต่ละอันใช้ซิลิกา 15 กรัม ที่อิ่มตัวด้วยเฮกเซน 50 มิลลิลิตร จากนั้นเทซิลิกาที่อิ่มตัวแล้วลงในคอลัมน์ และเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสลงไปให้คลุมผิวหน้าซิลิกา แล้วจึงเติม 20 % ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซนลงไป 50 มิลลิลิตร ตามด้วยของเหลวที่ผ่านการสกัดมาแล้ว และเติม 20 % ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซนลงไปอีก 100 มิลลิลิตร ของเหลวที่ไหลผ่านคอลัมน์ถูกเก็บในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้เหลือปริมาตร 5 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีแนนทรีนที่สะสมบนผิวใบไม้ประดับที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้ว 3 ชนิด โดยการหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างด้วยการเทียบกับสารละลายมาตราฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ด้วยดีเทคเตอร์ FID และคอลัมน์ HP-5 fused-

silica capillary (ขนาด 30 × 0.32 มิลลิเมตร และหนา 0.25 ไมโครเมตร) สภาวะของการวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีน ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สภาวะของการวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีน

Injector	Type: splitless Temperature: 280 °C
Detector	Type: FID Temperature: 250 °C
Split vent	Turn of time: 1 min
Tempeature program	Initial 80 °C, 1 min Rate 1: 25 °C/min, until 160 °C for 3 min Rate 2: 3 °C/min, until 300 °C for 2 min
Injection Volume	2 µl

3. 7 วิธีวิเคราะห์ลักษณะทางชีวภาพของใบไม้

3.7.1 วิธีหาจำนวนจุลินทรีย์บนผิวใบที่ย่อยสลายฟีแนนทรีน โดยการนำใบไม้ 4 กรัม มาตัดให้มีขนาด 1 ตารางเซนติเมตร ใส่ลงในขวดชมพู่ที่มีสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ (พีเอช 7) 40 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 30 นาที เพื่อให้จุลินทรีย์หลุดออกจากผิวใบไม้ นำสารละลายที่ได้ไปเจือจางเพื่อนำไปทำการทดลองต่อด้วยวิธี MPN (Most Probable Number) แบบ 3 หลอด ในขวดแก้วขนาด 22 มิลลิลิตรแบบฝาเกลียว ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MS (minimal salt liquid medium) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และสารละลายฟีแนนทรีนที่เตรียมในไดเมทธิลฟอร์มาไมด์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิกรัมต่อลิตรอยู่ด้วย จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 20 วัน แล้วสังเกตดูความขุ่นของทั้ง 3 หลอดในชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นเดียวกัน โดยถ้าขุ่นให้ถือว่าเป็น positive และไม่ขุ่นถือว่าเป็น negative นำค่าของทั้ง 3 หลอดใน 3 ชุดของระดับความเข้มข้น ไปเทียบกับตาราง MPN จะได้ค่าจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมของใบไม้ ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก

3.7.2 สำรวจความหลากหลายของแบคทีเรียบนใบไม้ทั้งหมดด้วยวิธี PCR-DGGE (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis) ของ 16S rRNA gene ดังรายละเอียดในภาคผนวก ค ทั้งนี้เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่ถูกชะจากผิวของใบไม้ ด้วยวิธี mechanical disruption แล้วเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ16S rRNA gene ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส หลังจากนั้น

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย DGGE และคำนวณหาความหลากหลายของแบคทีเรียบนใบไม้แต่ละชนิดด้วยวิธี Shannon – Weaver index ตาม Eichner และคณะ (1999) โดยมีสูตรคำนวณดังนี้

$$H = - \Sigma Pi \log Pi$$

H คำนวณจากความหนาแน่นของแถบดีเอ็นเอบนเจล (gel track) โดยพิจารณาจากความสูงของยอดกราฟใน densitometric curve ซึ่ง Pi คำนวณได้จาก

$$Pi = ni / N$$

โดย ni เป็นความสูงของยอดกราฟและ N เป็นผลรวมความสูงของยอดกราฟทั้งหมดใน densitometric curve

3.8 วิธีวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.8.1 หาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของใบไม้กับจำนวนของแบคทีเรียบนผิวใบที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนด้วยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson correlation) ด้วยโปรแกรม SPSS 15.0

3.8.2 เปรียบเทียบความแตกต่างของประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีแนนทรีนของแบคทีเรียบนผิวใบไม้ประดับที่ผ่านการคัดเลือกในข้อ 3.4.4 (3 ชนิด) โดยการหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี one – way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05ถ้าหากมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ก็ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's new multiple range test ด้วยโปรแกรม SPSS 15.0