บทที่ 4

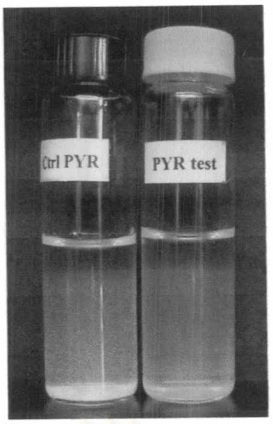
ผลการทดลอง

4.1. การแยกแบคทีเรียที่มีสมบัติในการเกาะติดและย่อยสลายไพรีนจากปุ๋ยหมักใบพืชตระกูลถั่ว โดยอาศัยวัสดุดูดซับ PTFE

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการดูดซับไพรีนบนแผ่น PTFE โดยเคลือบไพรีนความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม ลงบนแผ่น PTFE หลังจากเขย่าทิ้งไว้ในน้ำเป็นเวลา 7 วัน เมื่อนำแผ่น PTFE และส่วนที่เป็นน้ำมาสกัด พบว่า สามารถสกัดไพรีนที่อยู่บนแผ่น PTFE ดีได้ถึง 1.93 มิลลิกรัมและส่วนไพรีนที่ละลายน้ำได้มีปริมาณน้อยมาก (0.021 มิลลิกรัม) ซึ่งปริมาณไพรีนส่วนที่หายไปนั้นอาจจะไม่ถูกสกัดออกมาจากแผ่น PTFE จากการศึกษานี้ทำให้สามารถยืนยันได้ว่า ไพรีนสามารถดูดซับอยู่บนแผ่น PTFE ที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิก และจะไม่ละลายออกมาแผ่น PTFE ซึ่งทำให้แน่ใจได้ว่าแบคทีเรียที่จะแยกจากปุ๋ยหมักใบพืชตระกูลถั่วจะใช้ไพรีนที่เคลือบอยู่บนแผ่น PTFE

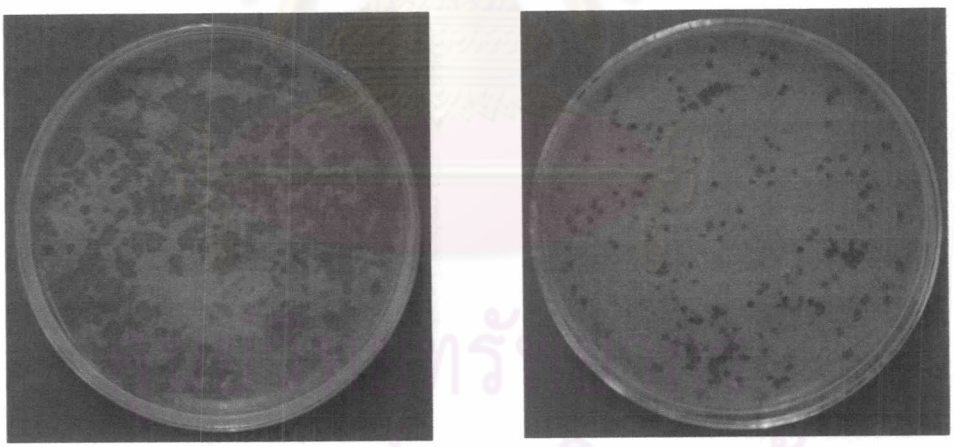
จากการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้แผ่น PTFE ที่เคลือบด้วยไพรีน ซึ่งใช้เป็นวัสดุที่ช่วยในการแยกกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการในการศึกษานี้ หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 1 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำแผ่น PTFE ที่สังเกตว่ามีการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เติมไซโคลเฮกซาไมด์ โดยมีผลึกไพรีนวางบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเป็นเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ. จะสังเกตเห็นโคโลนีที่เจริญบนแผ่น PTFE หรือบริเวณรอบๆ เขี่ยโคโลนีทั้งหมดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีไพรีน หลังจากถ่ายเชื้อหลายๆ ครั้ง จะสังเกตเห็นว่าเมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียจะทำให้ผลึกสีขาวที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนและไม่มีผลึกของไพรีน ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อใสขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลอง รูปที่ 4.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เมื่อมีการย่อยสลายไพรีน
โดยกลุ่มแบคทีเรีย (PYR test) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Ctrl PYR)

จากการแยกกลุ่มแบคทีเรียที่ได้จากปุ๋ยหมักใบไม้ทั้ง 3 ชนิด โดยการสังเกตวงใสรอบโคโลนีบนอาหารแข็ง CFMM พบว่ามีการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้จากปุ๋ยหมักใบมะขาม (STK) และปุ๋ยหมักใบจามจุรี (SSK) (รูปที่ 4.2) แต่ไม่พบกลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานจากปุ๋ยหมักใบนนทรี (ไม่แสดงรูป)



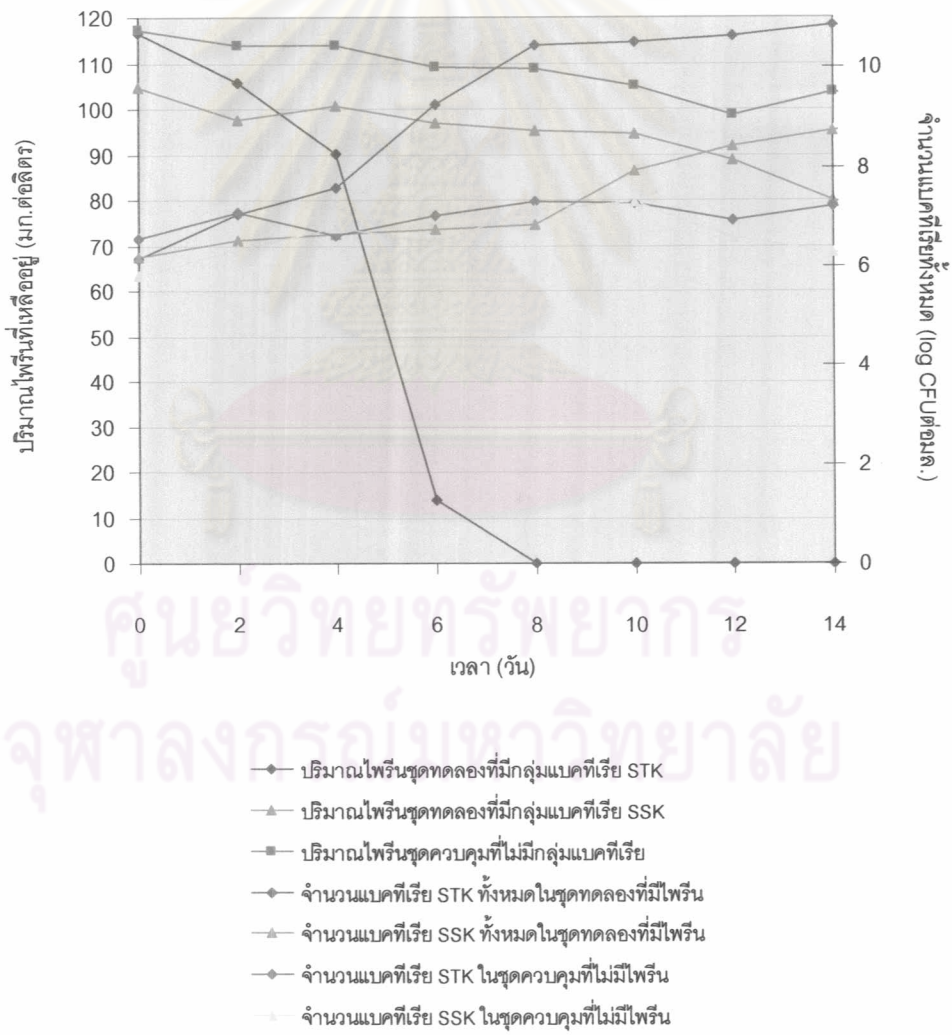
ก. ข.

รูปที่ 4.2 ลักษณะวงใสรอบโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง CFMM ที่พ่นทับด้วยไพรีน
ที่ได้จากปุ๋ยหมักใบมะขาม (ก.) และใบจามจุรี (ข.)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การเจริญและย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากปุ๋ยหมักใบมะขาม (STK) และปุ๋ยหมักใบจามจุรี (SSK)

เมื่อนำกลุ่มแบคทีเรีย STK และ SSK ทั้ง 2 กลุ่มที่แยกได้ มาศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีไพรีนความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มก.ต่อลิตร โดยตรวจติดตามปริมาณไพรีนที่ลดลงด้วยวิธี HPLC พบว่า กลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากปุ๋ยหมักใบมะขาม (STK) สามารถย่อยสลายไพรีนได้ดีกว่ากลุ่มแบคทีเรียที่ได้จากปุ๋ยหมักใบจามจุรี (SSK) โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ย่อยสลายไพรีนจนถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ ภายในระยะเวลา 8 วัน ซึ่งมีอัตราเร็วในการย่อยสลายไพรีนคิดเป็น 26.26 มก.ต่อลิตรต่อวันและทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีน้ำตาลอ่อนและไม่พบผลึกไพรีน ในขณะที่กลุ่มแบคทีเรีย SSK ย่อยสลายไพรีนใน 14 วันได้เพียง 20.08 มก.ต่อลิตร เท่านั้น (รูปที่ 4.3) ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำกลุ่มแบคทีเรีย STK ดังกล่าวมาทำการศึกษาในลำดับต่อไป



รูปที่ 4.3 การเจริญและปริมาณไพรีนที่เหลือจากการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่แยกได้จากปุ๋ยหมักใบมะขามเปรียบเทียบกับกลุ่มแบคทีเรีย SSK ที่แยกได้จากปุ๋ยหมักใบจามจุรี

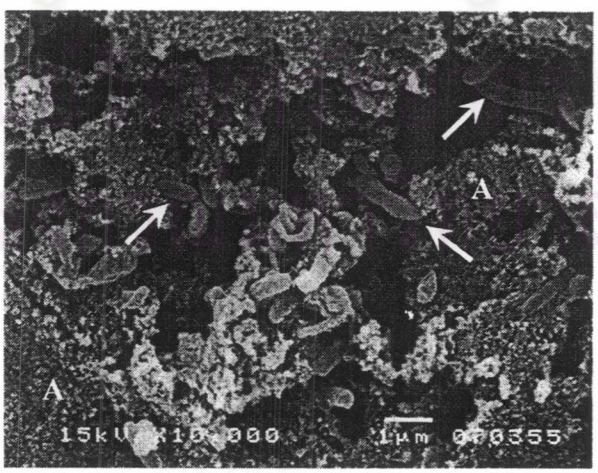
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่า การย่อยสลายไพรีนจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 8 วัน โดยในช่วง 4 วันแรกของการทดลองปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยและแบคทีเรียอยู่ในระยะปรับตัว (lag phase) ซึ่งจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 6.16 log CFU ต่อมล. เป็น 7.05 log CFU ต่อมล. ในขณะที่ชุดควบคุมจำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนและพลังงาน พบว่าจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นในช่วงต้นของการทดลอง จากนั้นจึงเข้าสู่ระยะคงที่และลดลงในช่วงปลายของการทดลอง สำหรับชุดควบคุมปริมาณไพรีนนั้น พบว่าเมื่อไม่มีกลุ่มแบคทีเรียปริมาณไพรีนลดลงเพียง 7.56 มก.ต่อลิตร

หลังจากวันที่ 4 การย่อยสลายไพรีนจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อเทียบกับที่เวลาเริ่มต้นปริมาณไพรีนลดลงเหลือเพียง 13.68 มก.ต่อลิตรและไพรีนที่เหลือจะถูกย่อยสลายต่อไป จนไม่สามารถตรวจพบไพรีนในวันที่ 8 เมื่อพิจารณาการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK เห็นได้ว่าการเจริญสอดคล้องกับปริมาณไพรีนที่ลดลง กล่าวคือ การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 4 ของการทดลอง โดยจำนวนแบคทีเรียเพิ่มจาก 7.58 log CFU ต่อมล.ในวันที่ 4 เป็น 10.45 log CFU ต่อมล.ในวันที่ 8 หลังจากนั้นจำนวนแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นและค่อยๆ ลดลงจนสิ้นสุดการทดลอง

ในขณะที่กลุ่มแบคทีเรีย SSK มีระยะเวลาในการปรับตัวนานถึง 10 วันและไม่เกิดการย่อยสลายไพรีน แต่ช่วงวันที่ 12 ของการทดลองสังเกตเห็นว่ามีการเพิ่มจำนวนของกลุ่มจุลินทรีย์ จาก 7.81 log CFUต่อมล. เป็น 9.56 log CFUต่อมล. ในวันที่ 14 และไพรีนถูกย่อยสลายไป 27.21 มก. ต่อลิตรเท่านั้น

จากรูปที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานและสามารถกระจายตัวอยู่ระหว่างรูพรุนของผลึกไพรีนได้



รูปที่ 4.4 กลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เจริญอยู่บนผลึกไพรีนจากกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบสองผ่าน (S.E.M.) กำลังขยาย 10,000 เท่า (A; ผลึกไพรีน, ลูกศรชี้; เซลล์แบคทีเรีย)

4.3 จำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียทางอนุกรมวิธานของกลุ่มแบคทีเรีย STK สายพันธุ์บริสุทธิ์

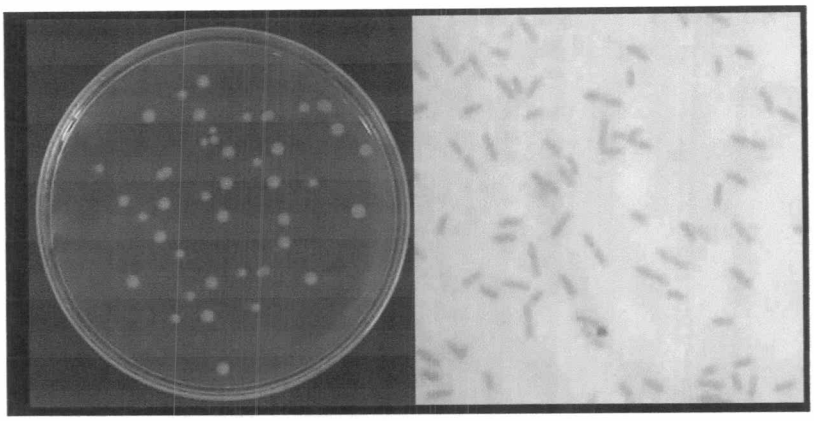
4.3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics)

จากการศึกษาเปรียบเทียบการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ซึ่งแยกได้จากปุ๋ยหมักจากใบมะขามกับกลุ่มแบคทีเรีย SSK ที่แยกได้จากปุ๋ยหมักจากใบจามจุรี พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนได้ดีกว่ากลุ่มแบคทีเรีย SSK ผู้วิจัยจึงนำกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ผ่านการถ่ายเชื้อในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีนมาแล้ว 5 ครั้ง มาแยกให้ได้แบคทีเรียบริสุทธิ์ โดยนำมาเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% แล้วเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB หลังจากการบ่ม 3 วัน พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK ประกอบด้วยโคโลนีที่แตกต่างกันของแบคทีเรียบริสุทธิ์อย่างน้อย 3 สายพันธุ์ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.5

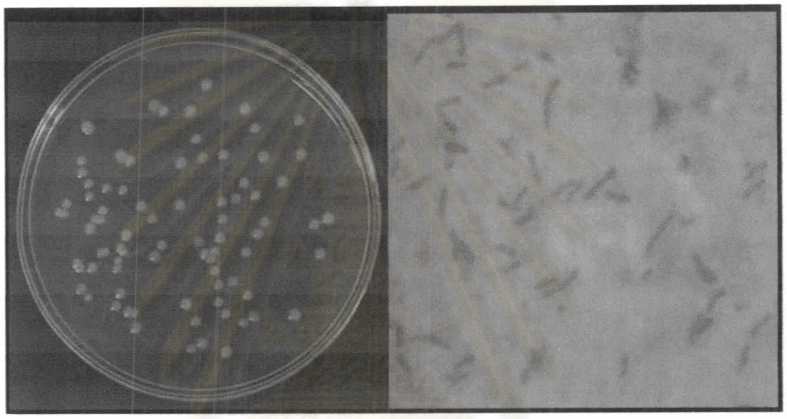
ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์

แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์	ลักษณะที่ศึกษา	
	โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB	รูปร่างเซลล์และการติดสีแกรม
STK-1	โคโลนีกลมแบน สีขาว ขอบเรียบ โปร่งแสง ตรงกลางทึบแสง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-5 มม.	แท่ง แกรมลบ
STK-2	โคโลนีกลมแบน สีเหลือง ขอบเรียบ โปร่งแสง ขนาด 3-5 มม.	แท่ง แกรมลบ
STK-3	โคโลนีกลมแบน สีขาว ขอบเรียบ โปร่งแสง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มม.	แท่งสั้น แกรมลบ

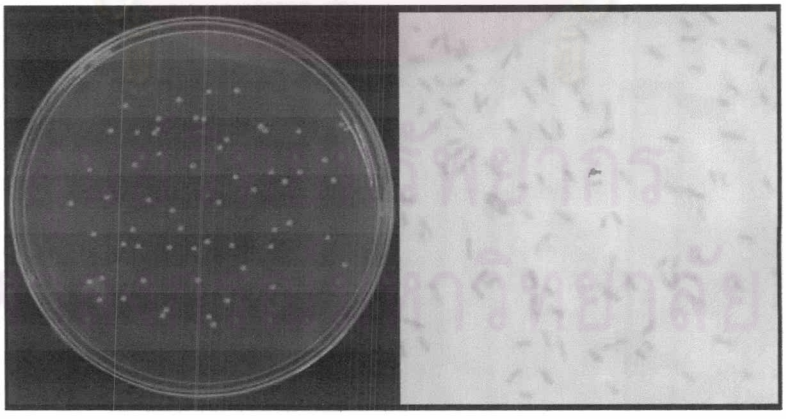
เมื่อได้แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ จึงนำแบคทีเรียดังกล่าวมาศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี ซึ่งผลการจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานแสดงไว้ดังตารางที่ 4.2



ก.แบคทีเรียสายพันธุ์ STK1



ข. แบคทีเรียสายพันธุ์ STK2



ค. แบคทีเรียสายพันธุ์ STK3

รูปที่ 4.5 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง LB และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ STK1 STK2 และ STK3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 วัน

ตารางที่ 4.2 สมบัติทางสรีรวิทยาและปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้

แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ใช้ทดสอบ	การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี											การทดสอบการใช้น้ำตาล					
	การเคลื่อนที่	คาตาเลส	ออกซิเดส	อินโดล	การสร้าง PHB	การย่อยเจลาติน	การสร้างยูรีเอส	MR- VP	TSI	การทดสอบ O-F	การใช้ซิเตรท	กลูโคส	ฟรุกโตส	ซูโครส	แมนนิทอล	กาแลกโตส	มอลโตส
STK-1	-	+	+	–	+	+	+	-/-	K/NC	+/-	+	-	-	-	-	-	-
STK-2	-	+	-	+	-	-	+	-/-	K/NC	+/-	-	-	-	-	-	-	-
STK-3	+	+	+	-	-	-	+	-/-	K/NC	+/-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ

+ : การทดสอบให้ผลบวก สร้างหรือเกิดปฏิกิริยา

- : การทดสอบให้ผลลบ ไม่สร้างหรือไม่เกิดปฏิกิริยา

K (alkaline): เกิดสภาพเบส; NC (no change) คือไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.1 และ 4.2 เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะที่ได้รายงานไว้ในหนังสือคู่มือ Bergey's Manual of systematic bacteriology (1994) พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีของ STK1 STK2 และ STK3 ที่ทดสอบได้นี้ มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียที่จัดอยู่ในสกุล *Zoogloea* sp. *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. ตามลำดับ

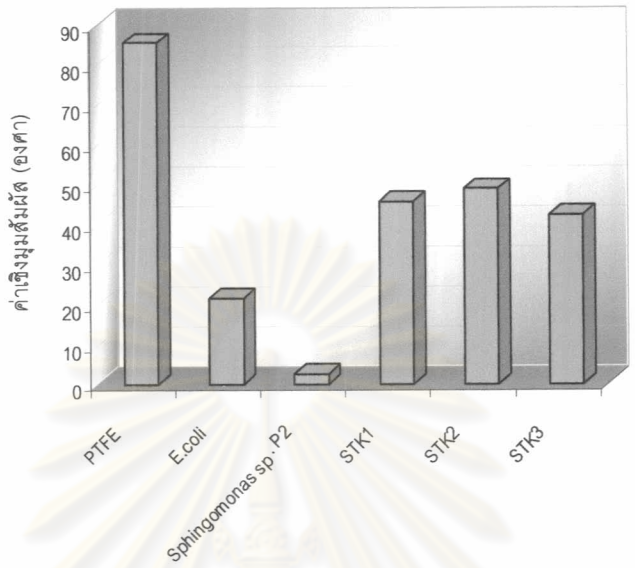
4.3.2 **การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ** (16S rDNA)

จากการนำสารละลายดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบสไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยหน่วยบริการชีวภาพและนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Bioedit แล้วจึงนำข้อมูลที่ได้นี้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน Gen Bank ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าแบคทีเรียบริสุทธิ์ 3 สายพันธุ์มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับแบคทีเรียที่จัดอยู่ในสกุล *Zoogloea ramigera* ATCC19623 (รูปที่ง.1) *Stenotrophomonas maltophilia* สายพันธุ์ LMG10857 (รูปที่ ง.2) และ *Mesorhizobium* sp. Smarlab BioMol-2302657 (รูปที่ ง.3) ตามลำดับ โดยมีร้อยละของความคล้ายคลึง (%homology) ประมาณ 99% ดังนั้น จากผลการทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมีร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 s rDNA ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าแบคทีเรีย STK1 STK2 และ STK3 เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในสกุล *Zoogloea* sp., *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. ตามลำดับ

4.4. ศึกษาสมบัติไฮโดรโฟบิซิตี้ของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยการวิเคราะห์หาค่ามุมสัมผัส (contact angle measurement)

การแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนซึ่งเคลือบติดอยู่กับวัสดุดูดซับ PTFE ที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิกสูงเนื่องจาก PTFE เป็นวัสดุพอลิเมอร์ของพอลิเตตระฟลูออโรเอทธิลีน เมื่อวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสโดยเครื่องวัดค่า contact angle ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่า PTFE มีค่ามุมสัมผัสเท่ากับ 85.4 ± 0.54 องศา ในขณะที่แบคทีเรียที่แยกจากวิธีนี้คือ *Zoogloea* sp., *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. มีค่ามุมสัมผัสเป็น 45.5 ± 9.96, 48.7 ± 1.74 และ 42.3±2.68 องศา ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดมีสมบัติไฮโดรโฟบิกสูง เมื่อเปรียบเทียบกับ *Escherichia coli* (21.5 ± 3.21 องศา) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ *E.coli* 2627 (21.2 ± 0.7 องศา) ที่รายงานไว้โดย Absolom และคณะ

ในปี 1983 และ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 (2.5 ± 0.77 องศา) ซึ่งแยกโดยวิธี enrichment liquid culture สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ (Supaka และคณะ, 2001) ดังรูปที่ 4.9



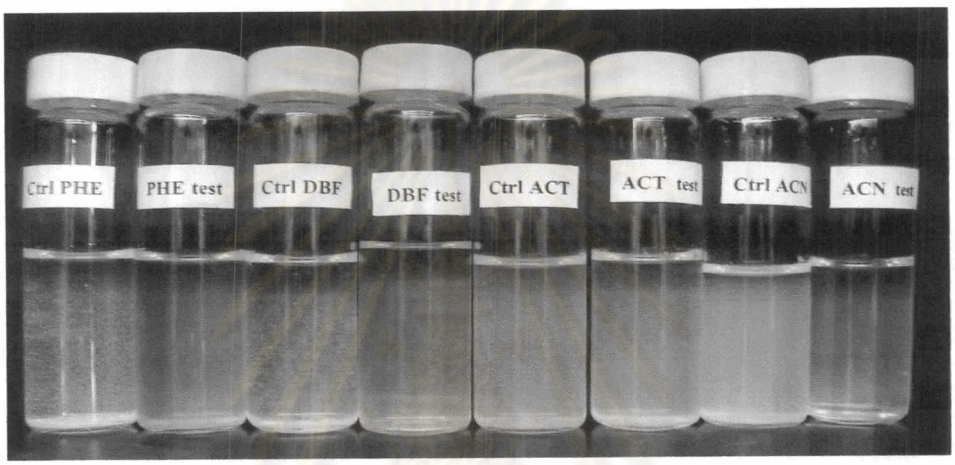
รูปที่ 4.9 ค่ามุมสัมผัสของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ

ด้วยสมบัติเฉพาะของผนังเซลล์แบคทีเรียนี้จึงส่งผลต่อประสิทธิภาพการเกาะติดของแบคทีเรียกับผลึกของไพรีนหรือสาร PAHs อื่นๆ และการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียบนแผ่น PTFE นั่นคือถ้าหากแบคทีเรียสามารถใช้สาร PAHs ที่เคลือบอยู่บนแผ่นวัสดุที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิก อาจจะทำให้แยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ความสามารถเกาะติดได้ง่ายขึ้น ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการแยกให้ได้แบคทีเรียดังกล่าวที่อยู่บนวัสดุดังกล่าว (Bastiaens และคณะ, 2000)

4.5 รูปแบบการเจริญและความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในการย่อยสลายสาร PAHs ชนิดอื่น ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน

โดยทั่วไปการปนเปื้อนของสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อมมักเกิดจากการปนเปื้อนของสาร PAHs มากกว่า 1 ชนิด ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้ศึกษาความจำเพาะในการใช้ PAHs ชนิดอื่นๆ ของกลุ่มแบคทีเรีย STK ซึ่งสาร PAHs ที่ใช้ศึกษามีทั้ง PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (ไดเบนโซฟูแรน อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน ฟลูออรีน ฟีแนนทรีน แอนทราซีน และฟลูออแรนทีน) และ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (ไครซีน เบนโซ[เอ]ไพรีน และเพอริลีน) โดยใช้ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร จากการศึกษาภายในระยะเวลา 21 วัน พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถใช้ PAHs ชนิดอื่นได้โดยเฉพาะสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ได้แก่ ฟีแนนทรีน ไดเบนโซฟูแรน อะซีแนพธิลีน

อะซีแนพธีน ฟลูออรีน รวมทั้งสามารถย่อยสลายแอนทราซีนและได้เพียงเล็กน้อย โดยมีอัตราการย่อยสลายสาร PAHs ที่แตกต่างกัน ดังสรุปไว้ในตารางที่ 4.4 แต่กลุ่มแบคทีเรีย STK ไม่สามารถย่อยสลายฟลูออแรนทีน (รูปที่ 4.11 ฉ) และสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงได้ รูปที่ 4.11 (ช.-ญ.) และพบว่าผลจากการย่อยสลายสาร PAHs บางชนิดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ฟีแนนทรีนจะเปลี่ยนจากสีขาวขุ่นเป็นสีน้ำตาล และไดเบนโซฟูแรนเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเหลืองอ่อน และทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อใสขึ้น ในขณะที่การย่อยสลายอะซีแนพธีนและอะซีแนพธิลีน จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะใสไม่มีสีเกิดขึ้น รูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีการย่อยสลายสาร PAHs ชนิดต่างๆ โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม
(Ctrl; ชุดควบคุมปริมาณ PAHs โดยที่ PHE; ฟีแนนทรีน, DBF; ไดเบนโซฟูแรน, ACT; อะซีแนพธิลีน, ACN; อะซีแนพธีน, test; ชุดทดลองที่มี PAHs+กลุ่มแบคทีเรีย STK)

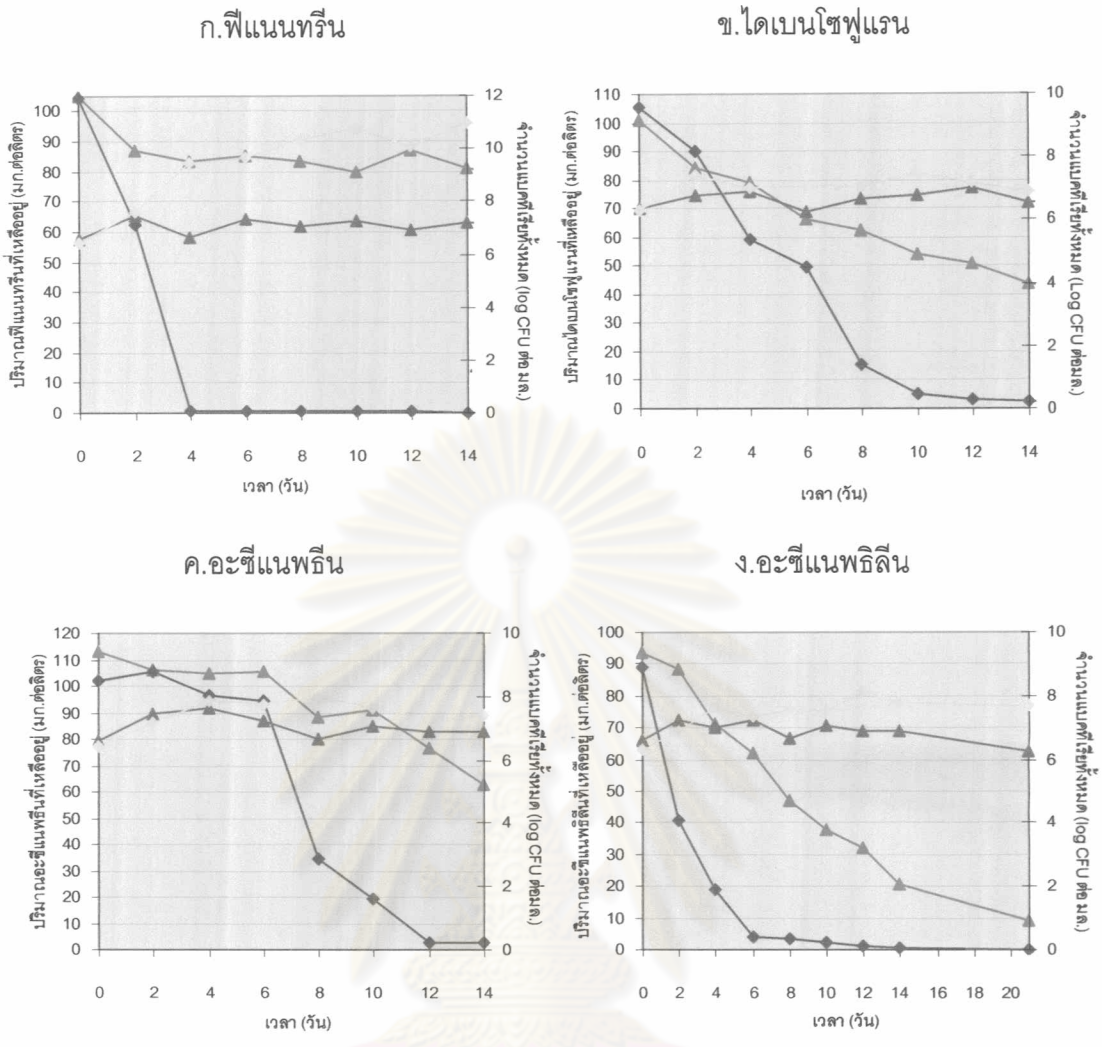
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 การย่อยสลายไพรีนและสาร PAHs อื่นๆ โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในระยะเวลา 14 วัน

PAHs	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (log CFU/ ต่อมล.)		ปริมาณ PAHs ที่ลดลง (มก.ต่อลิตร)	อัตราการย่อยสลาย PAHs เฉลี่ย (มก.ต่อลิตรต่อวัน)
	เริ่มต้น	สุดท้าย		
ฟีแนนทรีน	6.64	10.48	99.72	19.5
ไพรีน	6.75	9.65	100	26.26
ไดเบนโซฟูแรน	6.33	7.15	97.28	7.5
อะซีแนพธีน	6.44	7.6	97.26	22.5
อะซีแนพธิลีน	6.33	7.69	99.66	21.14

จากการศึกษาพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน ไดเบนโซฟูแรน อะซีแนพธีน และอะซีแนพธิลีนได้ 99.72, 97.28, 97.26 และ 99.66 มก.ต่อลิตรภายในระยะเวลาที่ทำการทดลอง โดยพบว่าปริมาณฟีแนนทรีน ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงต้นของการทดลอง (รูปที่ 4.11-ก.) หลังจากวันที่ 4 อัตราเร็วการย่อยสลายในช่วง 4 วันแรกคิดเป็น 19.5 มก./ลิตร/วัน นอกจากนี้ยังพบว่าการย่อยสลายฟีแนนทรีนช่วยส่งเสริมการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยจะเพิ่มขึ้นจากเดิมถึง 4 log CFU/ ต่อมล. โดยไม่พบระยะปรับตัวของกลุ่มแบคทีเรีย ในขณะที่ไดเบนโซฟูแรน (รูปที่ 4.11-ข.) มีอัตราการย่อยสลายเฉลี่ย 7.5 มก./ลิตร/วัน ซึ่งคล้ายคลึงกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจากจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 1 log CFU ต่อ มล. ในขณะเดียวกันกลับพบว่าปริมาณอะซีแนพธิลีนในชุดควบคุมลดลงแต่มีอัตราเร็วการย่อยสลายที่ช้ากว่าชุดทดลองที่มีกลุ่มแบคทีเรีย STK (รูปที่ 4.11-ค.)

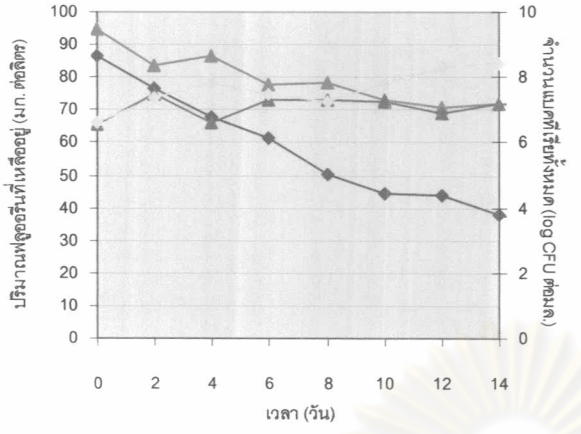
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



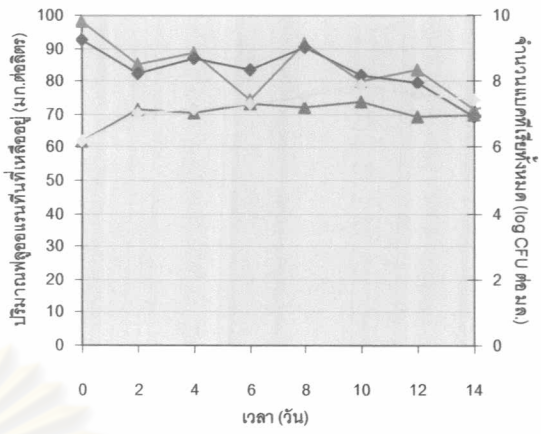
รูปที่ 4.11 การเจริญและปริมาณสาร PAHsอื่นๆ ที่เหลือจากการย่อยสลาย โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK

การย่อยสลายสาร PAHs บางชนิด โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK เกิดขึ้นได้บางส่วนเท่านั้น ได้แก่ ฟลูออรีน และแอนทราซีน ไม่ย่อยสลายฟลูออแรนทีน ซึ่งกลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถย่อยฟลูออรีนลดลงเหลือเพียง 37.79 มก.ต่อลิตร ในวันสุดท้ายของการทดลองและจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก 6.63 log CFU ต่อ มล.ไปเป็น 8.63 log CFU ต่อ มล. สำหรับการย่อยสลายแอนทราซีนเกิดขึ้นเพียง 33.16 มก.ต่อลิตรเท่านั้น โดยพบว่ามีการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียเพียงเล็กน้อย

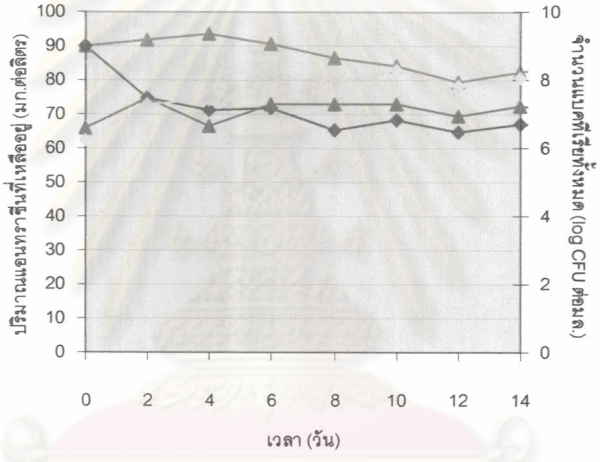
จ.ฟลูออรีน



ฉ.ฟลูออแรนทีน



ช.แอนทราซีน



▲ ปริมาณ PAH ที่เหลืออยู่ในชุดควบคุมที่ไม่มีกลุ่มแบคทีเรีย STK

◆ ปริมาณ PAH ชุดทดลองที่มีกลุ่มแบคทีเรีย STK

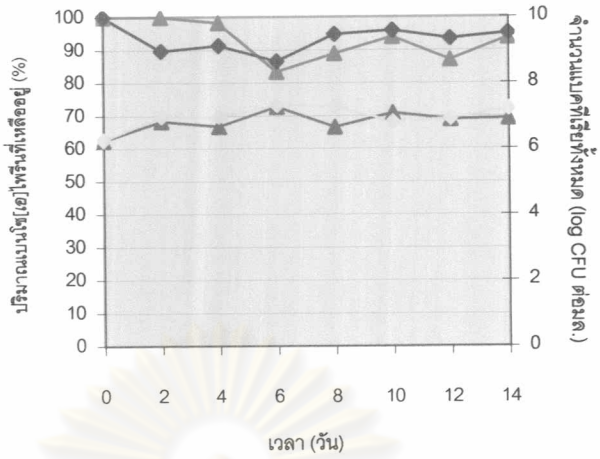
▲ จำนวนแบคทีเรีย STK ในชุดควบคุมที่ไม่มี PAH

จำนวนแบคทีเรีย STK ในชุดทดลองที่มี PAH

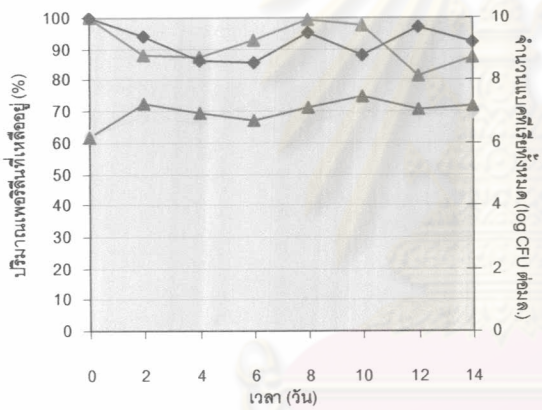
รูปที่ 4.11 (ต่อ) การเจริญและปริมาณสาร PAHsอื่นๆ ที่เหลือจากการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK

สำหรับการย่อยสลายสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีโครงสร้างซับซ้อน พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK ไม่สามารถย่อยสลายสาร PAHs ที่ทำการศึกษาได้ ได้แก่ เบนโซ[เอ]ไพรีน (รูปที่ 4.11-ซ) เพอริลีน (รูปที่ 4.11-ฌ) และไครซีน (รูปที่ 4.11-ญ) อีกทั้งสาร PAHs ดังกล่าวยังไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของกลุ่มแบคทีเรียกลุ่มนี้อีกด้วย

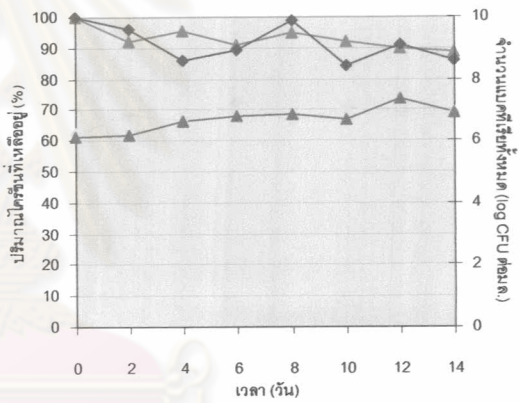
ซ.เบนโซ[เอ]ไพรีน



ฌ.เพอริลีน



ญ.ไครซีน



▲ ปริมาณ PAH ที่เหลืออยู่ในชุดควบคุมที่ไม่มีกลุ่มแบคทีเรีย STK

◆ ปริมาณ PAH ชุดทดลองที่มีกลุ่มแบคทีเรีย STK

▲ จำนวนแบคทีเรีย STK ในชุดควบคุมที่ไม่มี PAH

จำนวนแบคทีเรีย STK ในชุดทดลองที่มี PAH

รูปที่ 4.11(ต่อ) การเจริญและปริมาณสาร PAHsอื่นๆ ที่เหลือจากการย่อยสลาย โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK

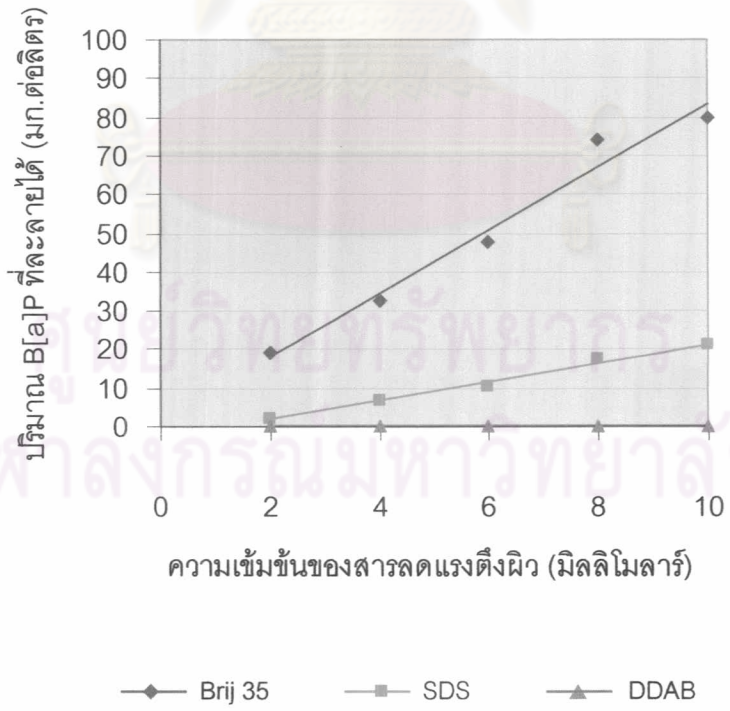
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 การย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนโดยการเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) หรือน้ำมันดีเซล (diesel fuel)

4.6.1. การละลายของเบนโซ[เอ]ไพรีนเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ทดสอบการละลายของเบนโซ[เอ]ไพรีนในสารลดแรงตึงผิว 3 ชนิด ได้แก่ Brij35 SDS และ DDAB โดยเปรียบเทียบการละลายที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวต่างกันตั้งแต่ 2-10 มิลลิโมลาร์ พบว่าในระยะเวลา 2 วัน การเติม Brij35 สามารถละลายเบนโซ[เอ]ไพรีนได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ Brij35 เพิ่มขึ้น สำหรับการละลายของเบนโซ[เอ]ไพรีนเมื่อมี SDS นั้นจะละลายออกมาได้น้อยกว่า Brij35 หากพิจารณาความเข้มข้นของเบนโซ[เอ]ไพรีนที่ละลายออกมา โดยใช้สารลดแรงตึงผิวทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ พบว่า Brij35 ละลายเบนโซ[เอ]ไพรีนได้ประมาณ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ SDS ละลายได้เพียง 20 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้น ในทางตรงกันข้าม จะเห็นได้ว่าการเติม DDAB ลงไปนั้นไม่ส่งผลต่อการละลายของเบนโซ[เอ]ไพรีน แม้ว่าความเข้มข้นที่ใช้นั้นจะเพิ่มขึ้นก็ตาม ดังรูปที่ 4.12

ดังนั้นในการศึกษาต่อไป ผู้วิจัยจะได้นำ Brij 35 มาศึกษาการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนเปรียบเทียบกับการเติมน้ำมันดีเซล ซึ่งมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนได้ (Kanaly และคณะ, 2000)

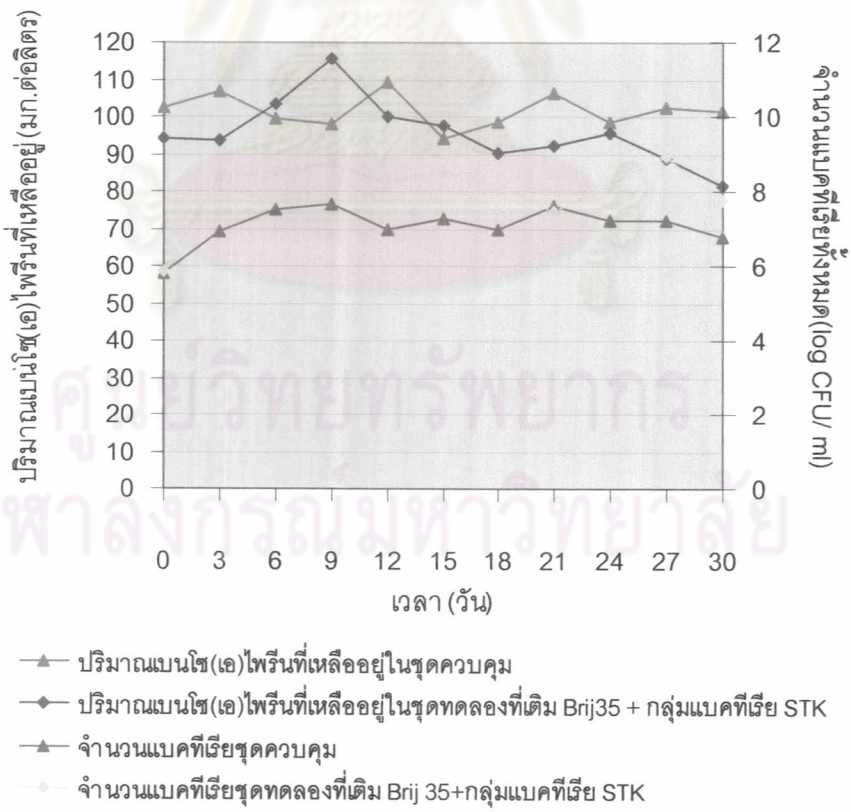


รูปที่ 4.12 การละลายของเบนโซ[เอ]ไพรีนเมื่อมีสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.6.2. ศึกษาการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนเมื่อมีการเติมสารลดแรงตึงผิวหรือน้ำมันดีเซล

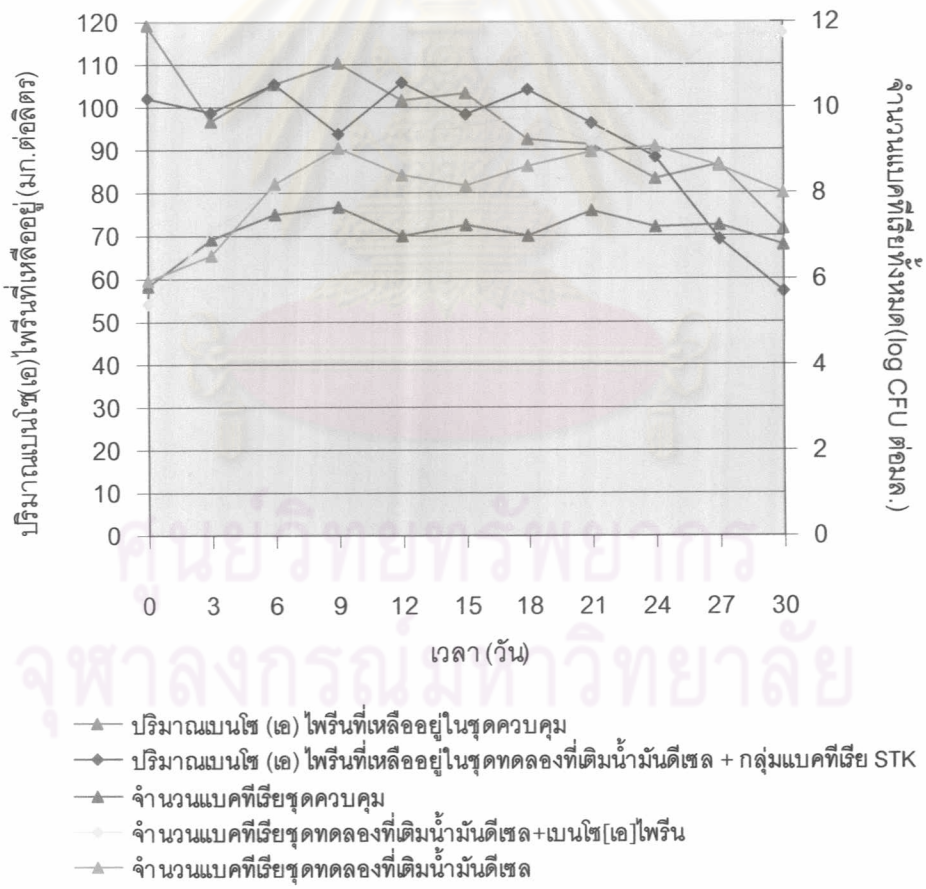
เนื่องจากเบนโซ[เอ]ไพรีนมีน้ำหนักโมเลกุลสูง กลุ่มแบคทีเรีย STK จึงไม่สามารถย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนได้ ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนนอกจากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถและมีประสิทธิภาพแล้ว การเติมสารลดแรงตึงผิวน้ำมันดีเซลหรือสารอิมัลซิไฟด์อื่นๆ ลงไป สามารถช่วยกระตุ้นให้เกิดการละลายของเบนโซ[เอ]ไพรีน ทำให้แบคทีเรียนำเบนโซ[เอ]ไพรีนไปใช้ได้ง่ายขึ้น

พิจารณาการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK เมื่อมีการเติม Brij35 ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้จะสูงกว่าค่าความเข้มข้นวิกฤตที่ทำให้เกิดไมเซลล์ ประมาณ 2 เท่า โดยค่า CMC ของ Brij35 มีค่าเท่ากับ 0.1 มิลลิโมลาร์ (Tiehm, 1994) จากรูปที่ 4.13 เห็นได้ว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถเจริญเติบโตในช่วง 3 วันแรกโดยจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น 5.86 log CFU ต่อมล. เป็น 8.36 log CFU ต่อ มล. ในวันที่ 3 หลังจากนั้นการเจริญของแบคทีเรียจะค่อยๆ คงที่ จนสิ้นสุดการทดลอง แต่พบว่าการเจริญของแบคทีเรียที่เกิดขึ้นนั้น ไม่ได้ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม Brij35

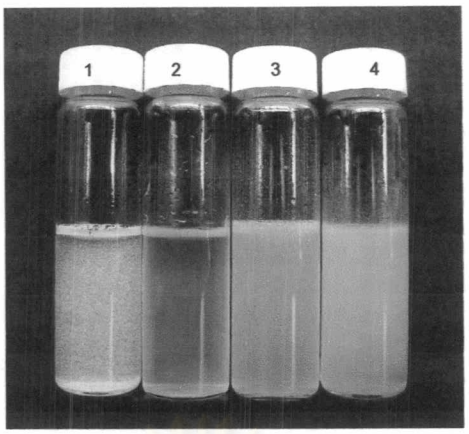


รูปที่ 4.13 การเจริญและการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK เมื่อมีการเติม Brij35 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM

สำหรับการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน เมื่อมีการเติมน้ำมันดีเซลปริมาตร 300 ไมโครลิตร โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK (รูปที่ 4.14) พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งหมดเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง โดยจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตอนเริ่มต้นของการทดลองมีค่า 5.43 log CFU ต่อ มล. จากนั้นค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงเวลา 12 วันและในวันที่ 12 พบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดประมาณ 9.41 log CFU ต่อ มล. เพิ่มขึ้นจากวันแรกถึง 4 log CFU ต่อ มล. และจะค่อยๆ คงที่จนถึงวันที่ 21 จากนั้นจะเห็นได้ว่า จำนวนแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งเป็น 11.76 log CFU ต่อ มล. จากการเพิ่มจำนวนของกลุ่มแบคทีเรียอย่างรวดเร็วนี้เอง จึงทำให้เกิดการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน โดยพบว่าเบนโซ[เอ]ไพรีนลดลงเพียงเล็กน้อยในระยะแรกของการทดลอง (10-15 มก.ต่อลิตร) จากนั้นการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง เบนโซ[เอ]ไพรีนจะถูกย่อยสลายไป 57.26 มก.ต่อลิตร ซึ่งการเจริญเติบโตดังกล่าวนั้นเป็นผลมาจากการที่แบคทีเรียถูกกระตุ้นให้เพิ่มจำนวนโดยน้ำมันดีเซล ซึ่งผลจากการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน ทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นและเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนไปเป็นสีส้ม ดังรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.14 การเจริญและปริมาณเบนโซ[เอ]ไพรีนที่เหลือจากการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK เมื่อเติมน้ำมันดีเซลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM



รูปที่ 4.15 ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK เมื่อมีน้ำมันดีเซลเป็นซับสเตรทร่วม; (1) ชุดควบคุมปริมาณเบนโซ[เอ]ไพรีนที่ไม่มีกลุ่มแบคทีเรีย (2) ชุดควบคุมกลุ่มแบคทีเรียที่มีน้ำมันดีเซล (3) ชุดควบคุมปริมาณเบนโซ[เอ]ไพรีนและน้ำมันดีเซล ที่ไม่มีกลุ่มแบคทีเรีย (4) ชุดทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย