

การย่อยสลายไพลีนและสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น
โดยกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากใบพืชตระกูลถั่ว



นาย จิรทีปณ์ แสนรัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

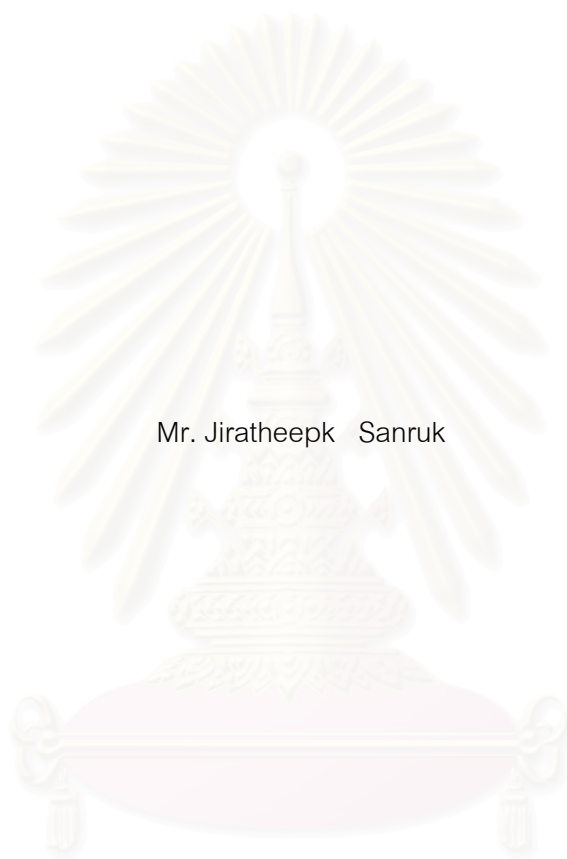
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6052-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PYRENE AND OTHER POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS DEGRADATION BY
A BACTERIAL CONSORTIUM ISOLATED FROM LEGUMINOUS LEAVES



Mr. Jiratheepk Sanruk

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-17-6052-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การย่อยสลายไพลีนและสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติก
ไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นโดยกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากใบพืช
ตระกูลถั่ว

โดย นาย จิรทีปษ์ แสนรัก

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนของ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมณะเศวต)

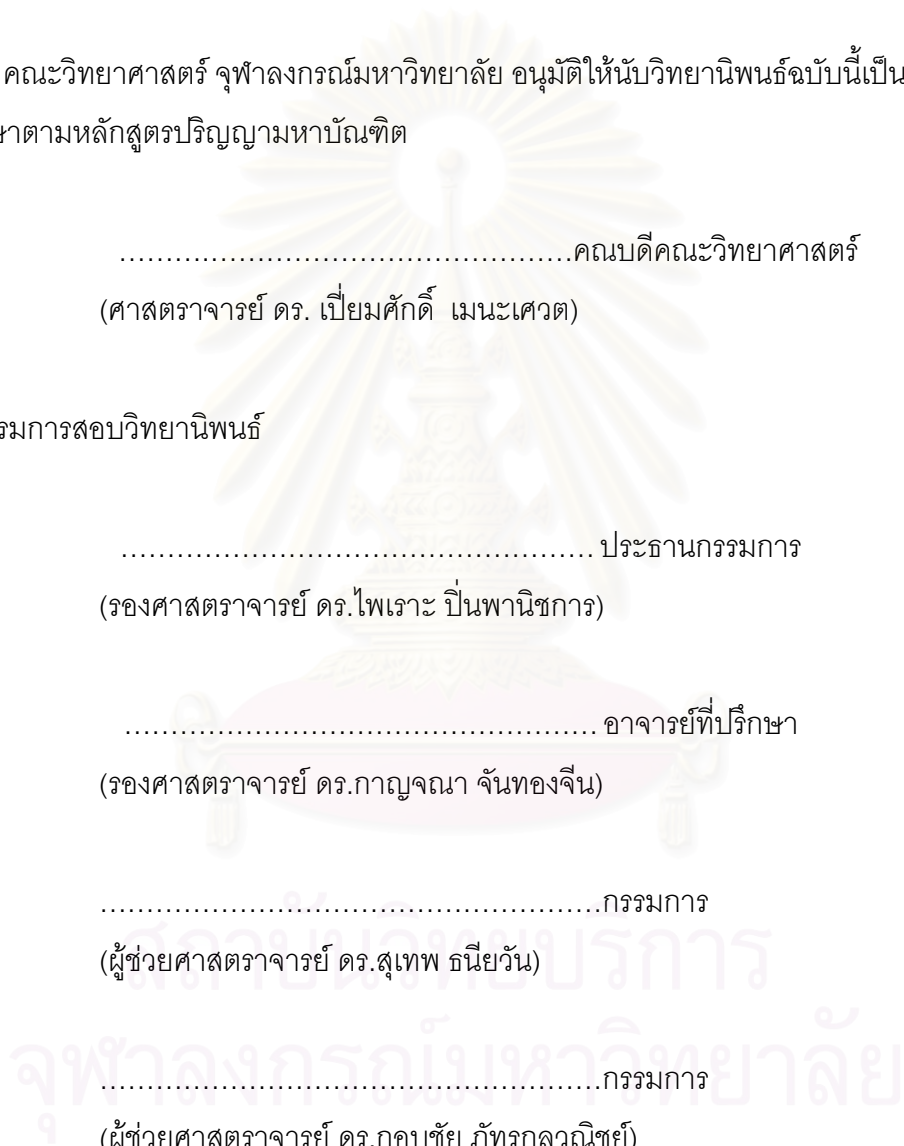
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปั่นพานิชการ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธานีวัน)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)



จิรทีปต์ แสนรัก : การย่อยสลายไพรีนและสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นโดยกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากใบพืชตระกูลถั่ว (PYRENE AND OTHER POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS DEGRADATION BY BACTERIAL CONSORTIUM ISOLATED FROM LEGUMINOUS LEAVES) อ.
ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์.ดร. กาญจนา จันทองจีน;122 หน้า.ISBN 974-17-6052-3.

ใบไม้เป็นทั้งที่รองรับสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนจากอากาศและที่อาศัยของแบคทีเรียบางชนิด การเติมเศษใบไม้จากจามจุรีและมะขามลงในดินที่ถูกทำปนเปื้อนไพรีนและพีแนทรีน พบว่าสามารถลดสารทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นสูงได้ ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากการทำงานของแบคทีเรียที่อยู่บนเศษใบไม้ที่เติมเข้าไป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้จากใบพืชตระกูลถั่วที่ร่วงหล่นและฝูฝัง สามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยไพรีนได้จากเศษใบจามจุรี ใบมะขามและใบกระถินณรงค์ พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จากใบจามจุรีมีประสิทธิภาพสูงสุด จึงเลือกมาศึกษาต่อ กลุ่มแบคทีเรียนี้สามารถย่อยสลายไพรีนได้หมดภายในเวลา 14 วัน ใช้เวลาปรับตัว 2 วัน จากนั้นย่อยสลายไพรีนเฉลี่ยสูงสุด 14.83 ± 0.80 มก.ต่อลิตรต่อวัน(ช่วงวันที่ 3 ถึง 5) และสามารถย่อยสลาย อะซีแนพทีน ฟลูออรีน พีแนทรีน และฟลูออแรนทีนเฉลี่ย 9.83 ± 1.67 , 12.83 ± 1.67 , 9.40 ± 0.40 และ 3.30 ± 2.00 มก.ต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ แต่ไม่ย่อยสลาย อะซีแนพทีลีน แอนทราซีน ไครซีน และ เบนโซ(เอ)ไพรีน ทั้งการย่อยสลายเพียงชนิดเดียวและแบบโคเมตาบอลิสม์ร่วมกับไพรีน อะซีแนพทีลีนทำให้แบคทีเรียตายภายใน 14 วัน ทำให้ไพรีนไม่ถูกย่อยสลาย ส่วนแอนทราซีน ไครซีน และเบนโซ(เอ)ไพรีน ไม่ยับยั้งการย่อยสลายไพรีนด้วยกลุ่มแบคทีเรียนี้ สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ในกลุ่มแบคทีเรียนี้ได้อย่างน้อย 7 ชนิด โดยจัดอยู่ใน 4 สกุล ได้แก่ สกุล *Comamonas* , *Rugamonas* , *Flavimonas*, *Pseudomonas* และส่วนที่เหลือไม่สามารถจำแนกได้ ซึ่งพบว่าทั้งหมดไม่สามารถย่อยสลายไพรีนได้ไม่ว่าจะเป็นชนิดบริสุทธิ์หรือเชื้อผสม 7 ชนิด จากผลการทดลองสนับสนุนว่าการย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจากการเติมใบพืชตระกูลถั่วเกิดจากการทำงานของกลุ่มแบคทีเรียที่อาศัยอยู่และย่อยสลายบนใบไม้

ภาควิชา ...จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อผู้คิด.....
สาขาวิชา... จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา ..2547.....

4472237823 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: PYRENE / CO-METABOLISM / BACTERIAL CONSORTIUM / LEGUMINOUS LEAVES

JIRATHEEPK SANRUK : PYRENE AND OTHER POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS DEGRADATION BY A BACTERIAL CONSORTIUM ISOLATED FROM LEGUMINOUS LEAVES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KANCHANA JUNTONGJIN, Ph. D. 122 pp. ISBN 974-17-6052-3.

Leaf is a site for both accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) which polluted the air and a habitat of some epiphytic bacteria. Additions of the leaf materials from rain tree, tamarind and yellow frame are proved capable of enhancing of phenanthrene and pyrene degradation in the spiked soil (1mg/g each PAHs) samples. This degradation is possibly due to the activity of the organisms inherent to the leguminous leaves. Thus the objective of this research is to isolate pyrene degrading bacterial consortium from decay leguminous leaf materials. A number of consortia were isolated by enrichment culture technique from rain tree, tamarind and wattle. Among these, RRM-V3 consortium possessing the highest degradable efficiency was selected for further study. This consortium degraded pyrene to undetectable level upon HPLC analysis within 14 days using 2 days lag time with the highest degradable rate mean of 14.83 ± 0.80 mg/L/day (day 3 - 5). The consortium was found to be capable of degrading a range of PAHs including acenaphthene, fluorene, phenanthrene, and fluoranthene by 9.83 ± 1.67 , 12.83 ± 1.67 , 9.40 ± 0.40 and 3.30 ± 2.00 mg/L/day respectively, but not against acenaphthylene, anthracene, chrysene and benzo(a)pyrene both metabolically and co-metabolically with pyrene. In the case of cometabolism with pyrene, acenaphthylene, the compound caused bacterial cells death after 14-day of incubation thus inhibit pyrene degradation. Morphological and biochemical characteristics were used to identify 7 pure cultures which at least purified from the consortium. They were assigned belonging to in 4 genera including *Comamonas*, *Rugamonas*, *Flavimonas*, *Pseudomonas* and unidentified bacterium. It also found that each individual organism by itself or mixed culture are not capable of degrading pyrene. It is therefore that the enhanced efficiency upon the addition of the decay leguminous leaf materials is due to the activity of adhesive and decomposing bacterial consortia.

Department.... Microbiology..... Student's Signature.....

Field of study ..Industrial Microbiology.... Advisor's signature.....

Academic year 2004

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา จันทองจีน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบ และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา และมารดา ที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือตลอดมา กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

| | หน้า |
|--------------------------------------|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | จ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ฉ |
| สารบัญ..... | ช |
| สารบัญตาราง..... | ซ |
| สารบัญรูป..... | ฅ |
| คำย่อและสัญลักษณ์..... | ญ |
| บทที่ | |
| 1. บทนำ..... | 1 |
| 2. วารสารปริทัศน์..... | 4 |
| 3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย..... | 36 |
| 4. ผลการทดลอง | 45 |
| 5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... | 74 |
| 6. ข้อเสนอแนะในการวิจัย..... | 81 |
| รายการอ้างอิง..... | 82 |
| ภาคผนวก | |
| ภาคผนวก ก..... | 102 |
| ภาคผนวก ข..... | 104 |
| ภาคผนวก ค..... | 106 |
| ภาคผนวก ง..... | 111 |
| ภาคผนวก จ..... | 114 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... | 122 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|--|------|
| 2.1 | โครงสร้างและสมบัติทางเคมีของสาร PAHs 16 ชนิด (Schirmer และคณะ, 1998)..... | 6 |
| 2.2 | แสดงค่าการละลายของไพรีนในน้ำมันชนิดต่าง ๆ | 9 |
| 2.3 | แสดงแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้..... | 19 |
| 2.4 | แสดงแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายไพรีนแบบโคเมแทบอลิซึม..... | 25 |
| 2.5 | แสดงกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้..... | 29 |
| 3.1 | แสดงชนิดและสถานที่เก็บใบพืชตระกูลถั่ว..... | 39 |
| 4.1 | แสดงการเปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลือในอาหารเหลวที่เติมกลุ่มแบคทีเรียจากการคัดแยกทั้งสองเทคนิคจากใบไม้ต่าง ๆ โดยเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน..... | 46 |
| 4.2 | แสดงเวลารีเทนชันที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC ของสารมัธยันต์ที่เกิดจากไพรีน ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังเติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เป็นเวลา 7 วัน..... | 53 |
| 4.3 | แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกจากกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3..... | 68 |
| 4.4 | แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อบริสุทธิ์..... | 71 |
| 5.1 | แสดงอัตราการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรียบริสุทธิ์และกลุ่มแบคทีเรีย..... | 77 |
| จ.1 | แสดงจำนวนแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บนใบไม้..... | 120 |

สารบัญรูป

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 2.1 | แสดงแหล่งกำเนิดการสะสมในพืชและการเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารของสารประกอบอินทรีย์กึ่งระเหย(semivolatile organic compounds, SOCs) บางชนิด เช่นสาร PAHs (Bakker, 2000)..... | 8 |
| 2.2 | แสดงแนวคิดของการพัฒนาความหลากหลายเมตาบอลิซึมในจุลินทรีย์ เกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างจุลศาสตร์ความร้อน แหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ สรีระวิทยา วัตถุประสงค์ที่ทดแทนได้ จุลินทรีย์และวิวัฒนาการ (Madson, 1998)..... | 16 |
| 2.3 | การย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรีย (Enzymetech, 2001) (A คือ PAHs ถูกละลายโดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แบคทีเรียสร้างขึ้น, B คือ PAHs แพร่ผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรีย, C คือ PAHs ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ในกระบวนการย่อยสลายขั้นแรกภายในเซลล์แบคทีเรีย, D คือ PAHs แพร่ผ่านไซโตพลาสติกเมมเบรนของแบคทีเรีย, E คือ การย่อยสลาย PAHs อย่างสมบูรณ์โดยเอนไซม์หลายชนิด).... | 20 |
| 2.4 | แสดงการย่อยสลายสาร PAHs โดยจุลินทรีย์ (Wilson และ Jones, 1993)..... | 21 |
| 2.5 | แสดงผลผลิตภัณฑ์หรือสารมัธยันต์สุดท้ายหลักที่พบจากการย่อยสลายสาร P A H s (Wilson และ Jones, 1993)..... | 22 |
| 2.6 | แสดงวิธีการย่อยสลาย P A H s โมเลกุลสูงแบบโคเมแทบอลิซึม (สุพินดา ศิริวาราศิลป์, 2545)..... | 23 |
| 2.7 | แสดงวิธีการย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรียบริสุทธี (Pinyakong, 1999)..... | 26 |
| 3.1 | แสดงไบโม่ก่อน (ก) และหลังปั่น (ข)..... | 40 |
| 4.1 | แสดงตัวอย่างโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งที่ได้รับไอไพรีนจากการใช้ผลึกไพรีน (ก) และวงใสรอบโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปนทับด้วยไพรีน (ข)..... | 47 |
| 4.2 | การเจริญของกลุ่มแบคทีเรียจากไบจามจรี(RRM-V3)และไบมะขาม(TAF-CZ1) และปริมาณไพรีนที่เหลือจากการย่อยสลายของกลุ่มแบคทีเรียทั้งสอง | 48 |
| 4.3 | แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และการย่อยสลายไพรีนที่ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ภายในเวลา 14 วัน..... | 50 |
| 4.4 | แสดงลักษณะอาหารเหลวหลังจากการย่อยสลายไพรีนที่ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน..... | 51 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.5 | แสดงโครมาโตแกรม HPLC การวิเคราะห์ของไพรีนที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 (ติดตามโครมาโตแกรมภายในเวลา 20 นาที ซึ่งไพรีนมีค่า Rt ที่ 14 นาที)..... | 52 |
| 4.6 | แสดงลักษณะอาหารเหลวที่มีสีน้ำตาลจากการเพิ่มความเข้มข้นของไพรีนเป็น 200 300 และ 400 มก.ต่อลิตร ซึ่งสีน้ำตาลเข้มขึ้น | 53 |
| 4.7 | แสดงโครมาโตแกรม HPLC การวิเคราะห์ของสารมัธยันต์จากการย่อยสลาย ไพรีน ที่ความเข้มข้น 100 (ก) 200 (ข) 300 (ค) และ 400 (ง) มก.ต่อลิตร หลังเติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เป็นเวลา 7 วัน (ติดตามโครมาโตแกรมภายในเวลา 20 นาที)... | 54 |
| 4.8 | แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้อะซีแนพทีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน..... | 56 |
| 4.9 | แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-1PP/7P โดยใช้ฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน..... | 57 |
| 4.10 | แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้พีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน..... | 58 |
| 4.11 | แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้ฟลูออแรนทีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน..... | 59 |
| 4.12 | แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้โครซีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน..... | 60 |
| 4.13 | แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้เบนโซ(เอ)ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน..... | 61 |
| 4.14 | แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้อะซีแนพทีนและไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานร่วมกัน..... | 64 |
| 4.15 | แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้แอนทราซีนและไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานร่วมกัน..... | 65 |
| 4.16 | แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้โครซีนและไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานร่วมกัน..... | 66 |
| 4.17 | แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้เบนโซ(เอ)ไพรีนและไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานร่วมกัน..... | 67 |
| 4.18 | แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกจากกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3..... | 69 |
| 4.19 | แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3..... | 60 |

| | | |
|-----|---|-----|
| ค.1 | กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไพรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC..... | 106 |
| ค.2 | กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณอะซีแนพทีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC..... | 107 |
| ค.3 | กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC..... | 108 |
| ค.4 | กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณพีแนนทีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC..... | 109 |
| ค.5 | กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออแรนทีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC..... | 110 |
| ง.1 | แสดง HPLC โครมาโตแกรมของสาร PAHs ที่สกัดได้จากใบไม้ ซึ่งถูกใช้ในการทดลองโดยพบพีแนนทีน ไพรีนและสารที่ระบุไม่ได้จากสารมาตรฐานที่ใช้ (ก และ ข) ซึ่งตรวจพบได้เฉพาะใบมะขาม (ค) และใบจามจุรี (ง) (Rt คือรีเทนชันมีหน่วยเป็นนาที, ด้วยความอนุเคราะห์จากคุณประภาพร แดงเรือง, 2545)..... | 111 |
| ง.2 | แสดงการย่อยไพรีนที่ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตรของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ซึ่งเติมหัวเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Optical density, OD ₆₀₀) เท่ากับ 0.1 0.5 และ 1.0 พบว่าการใช้หัวเชื้อที่มีปริมาณสูงจะไม่พบเวลาปรับตัวของแบคทีเรีย แต่จำนวนจะลดลงจากเริ่มการทดลอง..... | 112 |
| ง.3 | แสดงลักษณะของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เกาะเป็นกลุ่มก้อน (ก) และเกาะอยู่รอบผลึกไพรีน (ข) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (บริเวณลูกศรชี้)... | 113 |
| จ.1 | แสดงวิธีการสะสม 3 ชั้นตอนของสาร PAHs สถานะก๊าซจากอากาศเข้าสู่ใบไม้ (Bakker และคณะ, 2000)..... | 115 |
| จ.2 | แสดงส่วนประกอบโครงสร้างของคิวติเคิลของพืช (Bakker และคณะ, 2000)..... | 115 |
| จ.3 | แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log [C_{\text{vegetation}} / C_{\text{gaseous phase}}]$ กับค่า $\log K_{\text{oa}}$ (Bakker และคณะ, 2000)..... | 117 |

คำย่อและสัญลักษณ์

% = เปอร์เซ็นต์

CFU = colony forming unit (หนึ่งโคโลนีที่คาดว่าจะเกิด
จากหนึ่งเซลล์ของแบคทีเรีย)

กก. = กิโลกรัม

มก. = มิลลิกรัม

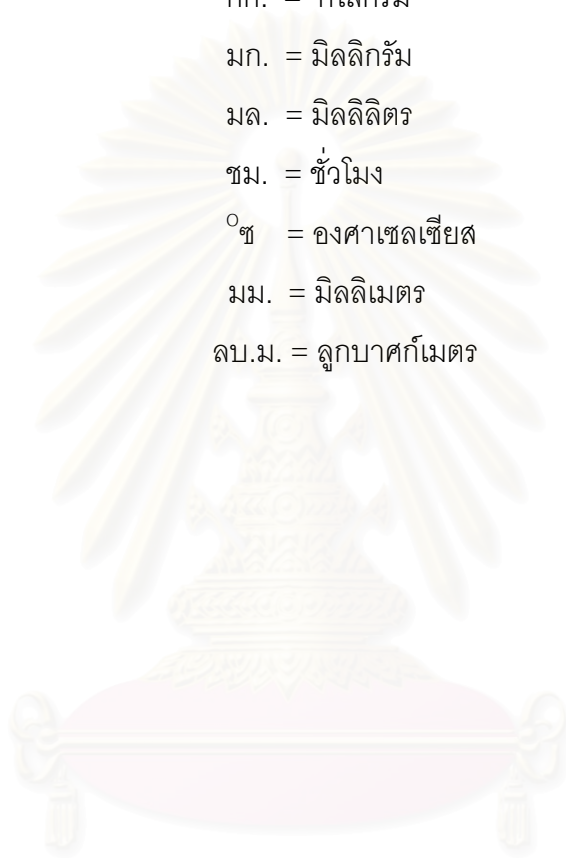
มล. = มิลลิลิตร

ชม. = ชั่วโมง

°ซ = องศาเซลเซียส

มม. = มิลลิเมตร

ลบ.ม. = ลูกบาศก์เมตร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศกำลังพัฒนา ซึ่งหมายถึงการมุ่งสู่ภาคอุตสาหกรรมอย่างเต็มตัว ทำให้ประเทศกลายเป็นเมืองอุตสาหกรรมในทศวรรษที่ผ่านมา มีการใช้สารเคมีชนิดต่าง ๆ เพิ่มขึ้นอย่างมาก ทั้งในภาคอุตสาหกรรม ภาคเกษตรกรรม และการดำเนินชีวิตประจำวัน (กรมควบคุมมลพิษ, 2542) อันเป็นผลมาจากความเจริญก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของประเทศ รวมทั้งการรับเอาความเจริญก้าวหน้าทางเทคโนโลยีอันล้ำหน้าจากต่างประเทศเข้ามาอย่างรวดเร็ว แต่ขาดการจัดการที่ถูกต้อง (กรมควบคุมมลพิษ, 2545) เมื่อผลผลิตจากเทคโนโลยีเหล่านั้นล้นหลามและถูกใช้จนหมดคุณค่าหรือถูกแทนที่ มักถูกทิ้งออกสู่สิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดการสะสมของเสียจากแหล่งต่าง ๆ ข้างต้นในสิ่งแวดล้อม หากเป็นของเสียอันตรายที่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต สะสมในปริมาณที่พอเหมาะจนสามารถก่อพิษในสิ่งมีชีวิตได้ ผิดกับความล้ำหน้าของการจัดการและการกำจัดของเสียอันตรายอย่างถูกวิธี ผลที่ตามมาคือปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษ ยิ่งกว่านั้นควันจากท่อไอเสีย ควันไฟ ก๊าซจากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ ไฟป่า การเผาไร่ นา น้ำทิ้งจากแหล่งชุมชน การเกษตรแผนใหม่ น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม การฝังกลบและการเผาขยะ เป็นต้น ก่อให้เกิดผลกระทบและอันตรายต่อคุณภาพอากาศ น้ำ ดินและสุขภาพของประชาชนที่อาศัยอยู่รอบ ๆ บริเวณนั้น (นิวัติ เรืองผานิช, 2537) ที่ต้องเผชิญกับพิษจากอากาศเสีย แม้ น้ำลึกลับลงน้ำเหม็น และดินเสื่อมสภาพ กรมควบคุมมลพิษ (2546) ได้ประมาณปริมาณกากของเสียอันตรายที่เกิดขึ้นทั่วประเทศจะมีทั้งสิ้น 1.8 ล้านตัน เพิ่มขึ้นจากปี 2545 คิดเป็นร้อยละ 1.5 โดยเป็นกากของเสียอันตรายจากโรงงานอุตสาหกรรมประมาณ 1.4 ล้านตัน คิดเป็นร้อยละ 77.8 ของกากของเสียอันตรายที่เกิดขึ้นทั้งหมด โรงงานอุตสาหกรรมทั่วประเทศ เช่น อุตสาหกรรมปิโตรเลียม อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมกำจัดศัตรูพืช เป็นต้น ซึ่งกากของเสียอันตรายจากภาคอุตสาหกรรมจะถูกส่งเข้ากำจัดประมาณ 0.36 ล้านตัน ทำให้คงค้างในระบบประมาณ 1.54 ล้านตัน ซึ่งนับว่ามีปริมาณสูงมากเมื่อรวมกับจากชุมชน(ประมาณ 1.58 ล้านตัน) ดังนั้นการจัดการของเสียอันตรายควรได้รับการลงมืออย่างเร่งด่วน เพื่อป้องกันผลกระทบที่ร้ายแรงต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตในอนาคต ซึ่งมีโรงงานให้บริการกำจัดอยู่ 39 โรงงานและกำลังดำเนินงานจัดตั้งศูนย์กำจัดของเสียอันตรายจากชุมชน เพื่อรองรับปริมาณกากของเสียอันตรายในพื้นที่กรุงเทพมหานคร ปริมณฑลและภาคกลางฝั่งตะวันตกรวม 18 จังหวัด (กรมควบคุมมลพิษ, 2546) ถึงอย่างไรจำนวนโรงงานรับกำจัดก็ยังมีน้อยและค่าบริการอยู่ในระดับสูง ทำให้ผู้ประกอบการบางรายพยายามหลีกเลี่ยงและนำไปทิ้งในพื้นที่ว่างเปล่า (กรมควบคุมมลพิษ, 2542) จึงมีข้อเสนอแนวทางแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมโดยการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ ๆ ในการลดปริมาณกากของเสียอันตรายไว้ในรายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อม พ.ศ. 2543 จนถึง พ.ศ. 2546 (กรมควบคุมมลพิษ, 2546)

กากของเสียอันตรายที่กล่าวถึงนี้ประกอบด้วยสารอินทรีย์หลายชนิดและที่สำคัญคือ สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) สาร PAHs เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีคาร์บอนและไฮโดรเจนเรียงตัวเป็นวงเบนซินมาเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง มุมงอ หรือเป็นกลุ่มตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป เช่น แอนทราซีน ฟิแนนทรีน ไพรีน เป็นต้น สารประกอบนี้มีความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรังต่อสิ่งมีชีวิต เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) (Wilson และ Jones, 1993) และทำให้ทารกในครรภ์มีรูปร่างผิดปกติ (teratogen) (Narro และคณะ, 1992)

การบำบัดทางชีวภาพ (Bioremediation) เป็นการบำบัดที่มีประสิทธิภาพ ประหยัดและทำได้ง่าย เป็นวิธีที่อาศัยสิ่งมีชีวิตมาช่วยกำจัดสารพิษ รวมทั้งการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร PAHs ได้ ซึ่งประกอบด้วยการกระตุ้นให้จุลินทรีย์ในพื้นที่บำบัดทำงานได้ (Biostimulation) หรือโดยการเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่นที่มีสมบัติย่อยสลายสาร PAHs ลงในดินบริเวณที่ปนเปื้อน (Bioaugmentation) เพื่อให้เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพ แต่จุลินทรีย์ต่างถิ่นมักอยู่รอดได้น้อย เนื่องจากเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นไม่ได้ (Wilson และ Jones, 1993) หรือถูกยับยั้งจากจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Cheung และ Kinkle, 2001)

Handerlein และคณะ (2001) รายงานว่าไบโमेเปิดและหญ้าอัลฟาฟา(alfalfa) มีอยู่ทั่วไปของบริเวณภูมิประเทศสามารถช่วยให้การย่อยสลายไพรีนในดินที่ปนเปื้อนได้เร็วขึ้นมากกว่าก่อนการเติมไบโเมเปิดและหญ้า alfalfa 8 เท่า และการเติมดินที่ได้จากการหมักด้วยไบโเมเปิดและหญ้า alfalfa ลงในดินที่ทำให้ปนเปื้อนด้วยไพรีน พบว่ามีการย่อยสลายไพรีนอย่างรวดเร็วมากกว่า 57 % ในเวลา 21 วัน ซึ่งมากกว่าชุดควบคุมที่มีปริมาณไพรีนลดลงเพียง 3.4 % และการเติม humic acids ที่สกัดจากดินที่หมักด้วยไบโพีสนี้ พบว่าสามารถเพิ่มการย่อยสลายไพรีนได้ 37.5 % ในเวลา 106 วัน (ชุดไม่เติม 20.6 %) โดยสรุปแล้วการเติมไบโไม้และหญ้าสามารถลดไพรีนได้มากกว่าการเติม humic acids เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ Charoenchang และคณะ (2003) รายงานว่าการเติมสารอินทรีย์ที่ได้จากการเกษตรบางชนิด เช่น เปลือกถั่วลิสงและไบจามจรี ลงในดินที่ปนเปื้อนสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน พบว่าสามารถช่วยให้การย่อยสลายฟิแนนทรีนเกิดขึ้นภายใน 28 วัน และย่อยสลายฟลูออแรนทรีนและไพรีนได้ภายใน 42 วัน

ไบโไม้ที่ปนเปื้อนสาร PAHs เช่น ไบข้าว (Liu และ Korenaga, 2001) ไบจามจรี (Charoenchang และคณะ, 2003) ไบมะขาม (Siriwarasin และคณะ, 2002) ที่ร่วงหล่นบนพื้นดินและถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บนผิวดิน พบว่าสามารถช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดินได้ โดยการเติมเศษไบโไม้เหล่านี้และจากที่พบว่าการเติมไบโไม้ที่ทำให้สาร PAHs ลดลงนี้ เนื่องมาจากการทำงานของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บนไบโไม้ (Charoenchang และคณะ, 2003) และสารอินทรีย์จากไบโไม้สามารถดูดซับสาร PAHs ที่ถูกดูดซับโดยเนื้อดินออกมา เป็นผลให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่สามารถนำสาร PAHs นั้นมาใช้ในการย่อยสลายได้ซึ่งเป็นการเพิ่ม bioavailability (Staci และคณะ, 1994)

การศึกษาการย่อยสลายไพรีนหรือสาร PAHs ชนิดอื่นที่ผ่านมามากจะใช้แบคทีเรียเดี่ยวหรือเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถใช้ไพรีนหรือสาร PAHs ชนิดอื่นเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ (Juhasz และ Naidu, 2000a) ซึ่งความสามารถของแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปริมาณไพรีนที่ใช้ในแต่ละการทดลอง เชื้อเดี่ยวอาจสามารถย่อยสลายสาร PAHs ได้เฉพาะบางชนิดและในปริมาณต่ำ รวมทั้งอาจก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่สามารถย่อยสลายต่อได้อย่างสมบูรณ์และเป็นพิษ (dead-end) ทำให้เกิดการสะสมในสิ่งแวดล้อม (Heitkamp และคณะ, 1988a:1988b; Trzesicka-Mlynarz และ Ward, 1995; Boonchan และคณะ, 2000; Kazunga และ Aitken, 2000; Cheung และ Kinkle, 2001) การใช้เชื้อผสมหรือกลุ่มจุลินทรีย์ พบว่ามีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้เชื้อเดี่ยวคือ สามารถย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้มากชนิดกว่าและปริมาณสูงกว่า ไม่ก่อให้เกิดสารมัธยันต์ที่เป็นพิษ (Boonchan และคณะ, 2000; Carvalho และคณะ, 2002)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งคัดแยกและศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไพรีนซึ่งเป็นสาร PAHs ที่มีวงเบนซีน 4 วง ซึ่งถูกย่อยได้ยากโดยจุลินทรีย์ เพื่อพิสูจน์ว่าจุลินทรีย์บนใบไม้มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสาร PAHs จากงานวิจัยที่รายงานมาแล้ว โดยแยกจากใบไม้ที่มีในรายงานของ Charoenchang และคณะ (2003) และ Siriwarasin และคณะ (2002) ซึ่งพบว่าเป็นวัสดุการเกษตรที่สามารถช่วยลดปริมาณไพรีนในแหล่งปนเปื้อนได้ อันเป็นใบไม้ของพืชในวงศ์ Leguminosae (พืชตระกูลถั่ว) และเป็นต้นไม้ที่ปลูกมากในประเทศไทย (วรรษยา สุนทรศารทูล, 2542) ได้แก่ จามจุรี มะขาม มะขามแขก นนทรี มะขามเทศ และกระถินณรงค์ และศึกษาศักยภาพที่จะนำไปใช้ในกระบวนการย่อยสลายไพรีนและสาร PAHs ชนิดอื่นทางชีวภาพในสิ่งแวดล้อมได้ โดยหาข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้ ได้แก่ ประสิทธิภาพของความสามารถในการย่อยสลายไพรีนเปรียบเทียบกับกลุ่มแบคทีเรียที่มีรายงานไว้แล้ว วิธีการย่อยสลายแบบโคเมแทบอลิซึม เพื่อที่จะใช้เป็นแนวทางในการนำกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปใช้ในกระบวนการบำบัดทางชีวภาพในพื้นที่จริงต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

คัดแยก จำแนกชนิดและศึกษาสมบัติบางประการของกลุ่มแบคทีเรียจากเศษใบไม้ชนิดต่าง ๆ ซึ่งสามารถย่อยสลายไพรีนและศึกษาการย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น โดยกลุ่มแบคทีเรียนี้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัยนี้

ได้กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนหรือเปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลของไพรีนจากใบไม้ที่ปลูกในประเทศไทย เพื่อนำไปใช้พัฒนาสู่การบำบัดสารพิษอันตรายในพื้นที่ปนเปื้อน

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 สารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

สารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในแหล่งน้ำ ดิน และอากาศ สาร PAHs เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ตามธรรมชาติ หรือจากกิจกรรมต่างๆของมนุษย์ เช่น การเผาไหม้เชื้อเพลิงในชีวิตประจำวัน การเผาไหม้เชื้อเพลิงของเครื่องยนต์ การประกอบอาหารในครัวเรือน และจากควันบุหรี่ รวมทั้งบริเวณแหล่งโรงงานอุตสาหกรรมปิโตรเคมี อุตสาหกรรมการผลิต และใช้สารรักษาเนื้อไม้ เป็นต้น (Cerniglia, 1992) ทำให้พบการปนเปื้อนสาร PAHs ในปริมาณสูง ซึ่งจะตกค้างและสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน เนื่องจากมีโครงสร้างโมเลกุลที่เสถียร ในรูปของผลึกของแข็ง และละลายอยู่ในน้ำแต่น้อยมาก รวมทั้งถูกดูดซับกับสารอินทรีย์ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้สาร PAHs สลายตัวได้ช้ามาก (Grosser และคณะ, 1991) PAHs สามารถเข้าสู่ร่างกายได้ โดยการสะสมอยู่ในพืชที่ขึ้นบนดินและน้ำที่ปนเปื้อนและเข้าสู่สัตว์ผ่านทางห่วงโซ่อาหารทำให้เข้าสู่มนุษย์ได้ในที่สุด (Means และคณะ, 1980) โดยสาร PAHs สามารถเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้ทั้งทางหายใจ รับประทาน และสัมผัสโดยตรงทางผิวหนัง (U.S. National Library of Medicine, 2002)

สาร PAHs มีทั้งหมด 16 ชนิด รวมกันเป็นสารก่อมลพิษที่สำคัญซึ่งทางหน่วยงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The United State Environment Protection Agency, USEPA) จัดให้อยู่ในกลุ่มของสารก่อมลพิษที่ต้องกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างเร่งด่วน (Cerniglia, 1992) ดังแสดงในตารางที่ 2.1 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ สาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight PAHs, LMW PAHs) ซึ่งเป็นสารที่มีวงแหวนเบนซีน (benzene ring) น้อยกว่า 4 วง และสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight PAHs, HMW PAHs) ซึ่งมีวงแหวนเบนซีนตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป (Kanaly และคณะ, 2000) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารเหล่านี้มีความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรังต่อสิ่งมีชีวิต เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) (Wilson และ Jones, 1993) และทำให้ทารกในครรภ์มีรูปร่างผิดปกติ (teratogen) (Narro และคณะ, 1992)

เมื่อสารเหล่านี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงไปโดยกระบวนการต่างๆ ทั้งทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ (Ashok และ Saxena, 1995) การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์เป็นกระบวนการสำคัญในการกำจัดหรือลดความเป็นพิษของสาร PAHs ความสามารถในการย่อย

สลายสาร PAHs พบได้ในจุลินทรีย์ทุกกลุ่มทั้ง แบคทีเรีย รา ไชยาโนแบคทีเรีย และสาหร่ายเซลล์เดียว โดยจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มจะมีกลไกการย่อยสลายเฉพาะและแตกต่างกัน (Cerniglia, 1992)

การกำจัดสารปนเปื้อนเหล่านี้มีหลายวิธี โดยสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติหลายวิธี ซึ่งรวมวิธีการบำบัดทางชีวภาพที่ใช้จุลินทรีย์ย่อยสลาย โดยพบว่าสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเกิดการย่อยสลายได้ง่ายกว่ากลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ดังนั้นจุลินทรีย์อาจต้องอาศัยความร่วมมือซึ่งกันและกัน (synergism) และอาจจะต้องใช้กระบวนการโคเมแทบอลิซึมในการย่อยสลายสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Bouchez และคณะ, 1995) ดังนั้นการศึกษากลไกและปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายสาร PAHs โดยจุลินทรีย์จึงมีความสำคัญในการใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพมาใช้ในกระบวนการเร่งการย่อยสลายตามธรรมชาติ (bioremediation) เพื่อกำจัดสาร PAHs ออกจากสิ่งแวดล้อม (Wilson และ Jones, 1993)

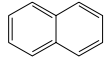
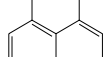
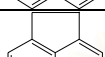
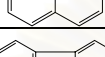
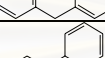
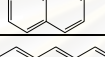
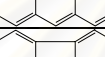
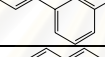
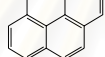
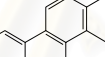
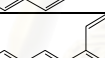
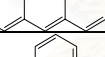
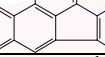
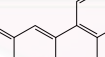
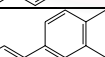
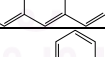
2.2 แหล่งกำเนิดและการเข้าสู่สิ่งแวดล้อมของสาร PAHs

สาร PAHs ส่วนมากเกิดจากการที่สารอินทรีย์ได้รับความร้อนสูง แล้วโมเลกุลเกิดการเรียงตัวใหม่ได้โครงสร้างวงเบนซินแล้วรวมตัวกันเพิ่มมากขึ้นและเรียงตัวใหม่จนได้สารนี้หลายชนิดสุดท้ายเป็นเขม่าสีดำ (Warnatz, 2001) ซึ่งสามารถพบได้จาก 2 แหล่งสำคัญ คือ

1. สิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ เกิดจากปฏิกิริยาการเผาไหม้ของกระบวนการไพโรไลซิส (pyrolysis) ภายใต้อุณหภูมิโลกจากความร้อนสูงของลาวาและแมกมาในใจกลางโลกที่ยังไม่เย็นตัว ซึ่งทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเกิดไพโรไลซิสอย่างช้า ๆ โดยมีการเรียงตัวใหม่จากสายไฮโดรคาร์บอนได้เป็นวงเบนซินจาก 1 เป็น 2 และ 3 วง ไปเรื่อย ๆ จนทำให้เกิดเป็นน้ำมันดิบและถ่านกัมมันต์ ซึ่งได้จากซากพืช ต้นไม้ในป่า รวมถึงปฏิกิริยาการสร้างสีในพืชและแบคทีเรีย บางชนิด (Blumer, 1976)

2. กิจกรรมของมนุษย์ การเผาทำลายสิ่งต่าง ๆ ของมนุษย์เอง เป็นต้นกำเนิดอันสำคัญของสารเหล่านี้ โดยเฉพาะการใช้น้ำมันดิบ เชื้อเพลิงฟอสซิล การกลั่นน้ำมันปิโตรเลียม และผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่ได้จากน้ำมันดิบ เช่น โคลทาร์ คาร์บอนแบล็ค โดยถูกใช้เป็นเชื้อเพลิงหลักของโลกปัจจุบัน (Jones และคณะ, 1989) ไอเสียรถยนต์ (Grimmer และคณะ, 1977) รวมถึงการเผาไหม้วัสดุต่าง ๆ เช่น ฐูป (Lin และคณะ, 2001) บุหรี่ซิการ์ (Neurath, 1972) ซึ่งเกิดจากการเผาไหม้ของกรดอะมิโนฟีนอลอะลานีน (Wang และคณะ, 2004) ที่เป็นองค์ประกอบหลักในบุหรี่ และชาที่ใช้ดื่ม (Fiedler และคณะ, 2002)

ตารางที่ 2.1 โครงสร้างและสมบัติทางเคมีของสาร PAHs 16 ชนิด (Schirmer และคณะ, 1998)

| สาร PAHs | โครงสร้าง | น้ำหนัก โมเลกุล | การละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 25 ^o ซ (มก.ต่อลิตร) |
|----------------------------|---|--------------------|--|
| แนพทาลีน |  | 128.18 | 31 |
| อะซีแนพทิลีน |  | 152.20 | 4.3 |
| อะซีแนพทีน |  | 154.22 | 3.9 |
| ฟลูออรีน |  | 166.23 | 1.9 |
| ฟิแนนทรีน |  | 178.24 | 1.1 |
| แอนทราซีน |  | 178.24 | 0.05 |
| ฟลูออแรนทีน |  | 178.24 | 0.26 |
| ไพรีน |  | 202.26 | 0.13 |
| ไครซีน |  | 228.30 | 0.002 |
| เบนซ์[เอ]แอนทราซีน |  | 228.30 | 0.002 |
| เบนซ์[บี]ฟลูออแรนทีน |  | 252.32 | 0.0015 |
| เบนซ์[เค]ฟลูออแรนทีน |  | 252.32 | 0.0008 |
| เบนโซ[เอ]ไพรีน |  | 252.32 | 0.003 |
| เบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอร์ลิซีน |  | 276.34 | 0.0003 |
| อินดีโน[1,2,3-ซีดี]ไพรีน |  | 276.34 | 0.062 |
| ไดเบนซ์[เอ,เอช]แอนทราซีน |  | 278.36 | 0.0003 |

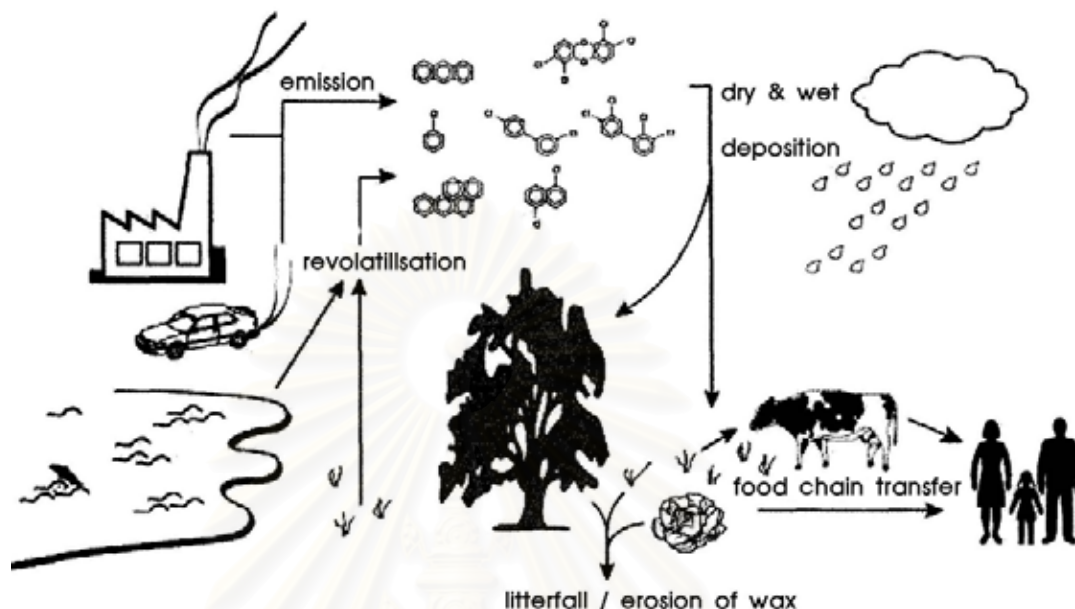
การเผาไหม้ น้ำมันดีเซลทำให้เกิดสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง 0.016 – 0.048 กก.ต่อซีเถ้า ของน้ำมันดีเซล 1000 กก. (Wang และคณะ, 2000)

ดังนั้นจึงสามารถตรวจพบไพรีนจากของเสียที่ปล่อยออกมาจากโรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ถนอมและรักษาเนื้อไม้ โรงงานอุตสาหกรรมทางปิโตรเคมีต่าง ๆ ซึ่งเป็นแหล่งผลิตสารประกอบ PAHs ที่สำคัญ ซึ่งปล่อยสารพิษนี้ออกสู่สิ่งแวดล้อมมากที่สุด (Wilson และ Jones, 1993) และการรั่วไหลของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจากการนำไปใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรม รวมทั้งการขนส่ง การดูแลเก็บรักษา ตลอดจนการกำจัดกากของเสียจากอุตสาหกรรมดังกล่าว (Pereira Netto, Sisino และคณะ, 2002)

โดย Cerniglia (1992) และ Wilson และ Jones (1993) สรุปไว้ดังนี้

กระบวนการแยกและแปรสภาพก๊าซธรรมชาติจากเชื้อเพลิงฟอสซิล
การใช้แหล่งพลังงานและความร้อนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล
กระบวนการกลั่นน้ำมันดิบ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากน้ำมันดิบ
กระบวนการการผลิตถ่านโค้ก
การผลิตและการใช้คาร์บอนแบล็ค
การผลิตและการใช้แอสฟัลท์
กระบวนการรักษาเนื้อไม้
การผลิตผลิตภัณฑ์ถนอมเนื้อไม้ที่ใช้คลอรีนไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบหลัก
การเก็บ การขนส่ง กระบวนการผลิต การใช้และการกำจัดน้ำมันเชื้อเพลิง
การกำจัดสิ่งปฏิกูลโดยการฝังดิน
การเผาไหม้ของถ่านหินในระบบแบบเปิด
การเผาสสิ่งปฏิกูล
การซึมของน้ำมันดิบในธรรมชาติ
การรั่วไหลที่เกิดจากอุบัติเหตุจากเรือบรรทุกน้ำมันและเรือชนิดอื่น
การแพร่กระจายของน้ำเสียชุมชนและอุตสาหกรรมปิโตรเคมี
สาร PAHs จะกระจายออกสู่สิ่งแวดล้อมทั่วไปแล้วถูกสะสมในดิน (Wilson และ Jones, 1993 ; Romantschuk และคณะ, 2000) ตะกอนบริเวณอ่าวทะเล (Storelli และ Marcotrigiano, 2000 ; Botello และคณะ, 2001 ; Egthesadi และคณะ, 2002) บรรยากาศ (Cotham และ Bidleman, 1995 ; Prevedouros และคณะ, 2004) ฝุ่น (Pereira Netto, Muniz และคณะ, 2002) ต้นไม้ (Wagrowski และ Hites, 1997 ; Bakker และคณะ, 1999 ; Howsam และคณะ, 2000) ผัก (Simonich และ Hites, 1994 ; Kipopoulou และคณะ, 1999) และทุกที่ทุกสิ่งสัมผัสกับสารเหล่านี้ได้ทั่วโลก รวมถึงสิ่งมีชีวิตในบริเวณนั้นด้วย เช่น ปลา น้ำจืด (Deshpande

และคณะ, 2002 ; White และ Triplett, 2002) แพลงตอนสัตว์ในทะเล (Nour El-Din และคณะ, 2001) จะมีปริมาณมากหรือน้อยแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ ร่วมด้วย ซึ่งมีวงจrdังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงแหล่งกำเนิด การสะสมในพืชและการเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารของสารประกอบอินทรีย์กึ่งระเหย(semivolatile organic compounds, SOCs) บางชนิด เช่น สาร PAHs (Bakker, 2000)

2.3 สมบัติของไพรีน

ไพรีน (Pyrene) หรือชื่อทางเคมีเบนโซ(ดี,อี,เอฟ)ฟีแนนทริน (benzo[d,e,f]phenanthrene) เป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งในกลุ่มสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ประกอบด้วยวงเบนซีน 4 วงเชื่อมต่อกัน มีหมายเลขสากลทางเคมี(Cas Number) 129-00-0 (Verschueren, 1997)

สูตรโมเลกุล $C_{16}H_{10}$ (Verschueren, 1997)

น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 202.26 กรัมต่อโมล (Verschueren, 1997)

การละลายในน้ำ 0.13 มก.ต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 °ซ และ 140 นาโนกรัมต่อมล.ที่ 30 °ซ (Jimenez และ Bartha, 1996)

ความถ่วงจำเพาะ 1.271 ที่ 23 °ซ (Verschueren, 1997)

อุณหภูมิหลอมเหลว 151 - 156 °ซ (Verschueren, 1997)

อุณหภูมิกลายเป็นไอ 360 - 404 °ซ (Verschueren, 1997)

ความดันไอ 6.85×10^{-7} มม.ปรอท ที่อุณหภูมิ 20°C (Verschueren, 1997)
 เป็นผลึกสีขาว หรือ สีเหลือง (Patnaik, 1992)
 ละลายในน้ำมันพาราฟิน 25 มก.ต่อมล.(Jimenez และ Bartha, 1996)
 มีค่าครึ่งชีวิตในดินและตะกอนดิน 19.4-630 วัน (Daugulis และ McCracken, 2003)
 ไพรีนมีโครงสร้างโมเลกุลที่เสถียร ละลายน้ำได้น้อยมาก (Verschueren, 1997) ทำให้
 ทนทานต่อการย่อยสลาย (Trzesicka-Mlynarz และ Ward, 1996) ไพรีนละลายในตัวทำละลาย
 อินทรีย์ (เมทานอล, เฮกเซน, อะซีโตน เป็นต้น) ได้ดีแตกต่างกัน (Patnaik, 1992) มีการรวบรวม
 ปริมาณไพรีนจากแหล่งต่างทั่วโลกในสิ่งแวดล้อมจนถึงปี ค.ศ.1997 ไว้ใน Verschueren (1997)
 หลังจากนั้นมีการสำรวจเพิ่มขึ้นมากมาย เช่น ในปี ค.ศ.2002 รายงานการตรวจพบว่าในตะกอน
 ประมาณ 5 มก.ต่อกก.ตะกอน ในดินหมักที่ปนเปื้อนประมาณ 200 มก.ต่อกก.ดิน และในดินเขต
 อุตสาหกรรมมีประมาณ 150-230 มก.ต่อกก.ดิน (Hwang และ Cutright, 2002) ไพรีนมีค่า
 สัมประสิทธิ์แบ่งการละลายในน้ำกับอ็อกทานอล (Octanol-water partition coefficients, K_{ow}) ใน
 ค่า $\log K_{ow}$ เท่ากับ 5.13 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการศึกษาในน้ำมัน(nonaqueous phase,
 NAP)ชนิดต่าง ๆ (ตารางที่ 2.2) ไพรีนจะละลายในน้ำได้ดีในช่วง 2 – 3 ชั่วโมงแรกแล้วจากนั้น
 ลดลงตามเวลา จนไม่ละลาย เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 100 วัน เช่นเดียวกันกับน้ำมันต่าง ๆ ที่ถูก
 ทดสอบ ยกเว้น Pump oil และ Grease ที่สามารถแพร่ละลายได้ในอัตราคงที่ตลอดเวลา (0.00–
 0.02 เซนติเมตรต่ออนาที) ซึ่งการแพร่ของไพรีนใน NAP จะเท่ากับ $10^{-11} - 10^{-12}$ ตารางเซนติเมตร
 ต่อวินาที (Ortiz และคณะ, 1999)

ตารางที่ 2.2 แสดงค่าการละลายของไพรีนในน้ำมันชนิดต่าง ๆ

| NAP ^a | $\log K_p$ ^b |
|----------------------|-------------------------|
| Pump oil | 5.35 |
| SAE250 | 5.59 |
| Grease | 5.16 |
| Paraffin | 5.61 |
| Petrolatum | 5.37 |
| Octanol (K_{ow}) | 5.13 |

^a nonaqueous phase

^b NAP-water pyrene partition coefficients

ไพรีนจะจับกับอนุภาคดินและตะกอนดินด้วยแรงและปริมาณที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของชนิด(น้ำหนักโมเลกุล, ปริมาณวงใน humic acid)และปริมาณของอนุภาคดิน (organic carbons, OC) (Chin และคณะ, 1997) ซึ่งสามารถประมาณได้จากสูตร

$$\% \text{pyrene-OC} = \{ [\text{OC}] \cdot K_{\text{doc}} \} / \{ 1 + [\text{OC}] \cdot K_{\text{doc}} \} \times 100$$

โดย %pyrene-OC คือ %ของไพรีนที่จับกับอนุภาคดิน

K_{doc} คือ สัมประสิทธิ์การเกิดพันธะ(จับ)ของไพรีน หรือ สัมประสิทธิ์การแบ่งละลายของ humic material กับ nonpolar neutral organic contaminants (NOC) (ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของอนุภาคดินจากแหล่งต่าง ๆ)

[OC] คือ ความเข้มข้นของอนุภาคดิน (กก.ต่อลิตร)

2.4 รายงานไพรีนและสาร PAHs อื่น ๆ ในประเทศไทย

สำหรับประเทศไทยมีหลายงานวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม โดยพบไพรีนและสาร PAHs ชนิดอื่นในปริมาณที่ต่างกัน

ตัวอย่างอากาศที่เก็บจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ ในเดือนมีนาคม พ.ศ.2536 ถึง มีนาคม พ.ศ.2537 เป็นเวลาหนึ่งปีซึ่งสามารถตรวจพบไพรีนเฉลี่ย 0.55 นาโนกรัมต่อลบ.ม. และสาร PAHs ชนิดอื่นอีก 19 ชนิดแตกต่างกันมีความเข้มข้นเฉลี่ย 0.125 – 1.875 นาโนกรัมต่อลบ.ม. โดยพบ เบนโซ(เอ)ไพรีน อะซีแนฟธิซีน อะซีแนฟธิน และเบนโซ(จี,เอช,ไอ)เพอริรีน มีปริมาณเข้มข้นมากที่สุด (Panther และคณะ, 1996)

ในอากาศเขตกรุงเทพมหานคร พบปริมาณสูงในบริเวณเส้นทางการจราจร โดยสาร PAHs จะเกาะติดกับฝุ่นละอองขนาดเล็ก ซึ่งพบไพรีนเข้มข้น 14 นาโนกรัมต่อลบ.ม.ของอากาศ แบ่งออกเป็นสถานะก๊าซ 12.70 และจับติดอยู่กับฝุ่นละออง 1.30 นาโนกรัมต่อลบ.ม.ของอากาศ ตามลำดับ และการกระจายตัวของสาร PAHs ในบรรยากาศเขตกรุงเทพมหานครปีพ.ศ.2539 โดยการศึกษาของ Garivait และคณะ (2002) พบว่าสาร PAHs น้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 252 ดาลตัน เช่น ไพรีน เบนโซ(อี)ไพรีน และ เบนโซ(เอ)ไพรีน จะอยู่ในรูปของก๊าซเป็นส่วนใหญ่ คือ 80 40 และ 24 % ตามลำดับ ในขณะที่สาร PAHs น้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า จะอยู่ในรูปของฝุ่นละอองเกือบทั้งหมด ซึ่ง 30 – 60 % โดยน้ำหนักของสาร PAHs ที่ศึกษาอยู่ในฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 0.43 ไมครอน และ กว่า 70 % พบอยู่ในฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 2.1 ไมครอน ซึ่งสาร PAHs มีความเข้มข้นรวม(9 ชนิด) ระวัง 19.48 (แหล่งที่พักอาศัยและย่านธุรกิจ) ถึง 42.95 นาโนกรัมต่อลบ.ม. (แหล่งการจราจรหนาแน่น) โดยมีค่ามากกว่าพื้นที่อ้างอิงประมาณ 1.5 - 3 เท่า (14.68 นาโน

กรัมต่อลบ.ม.) จากการศึกษานี้พบไพรีนเข้มข้น 15.0 – 30.1 นาโนกรัมต่อลบ.ม. (ทั้งในรูปของก๊าซ และอยู่ในฝุ่นละออง) เกาะอยู่กับฝุ่นละออง 0.96 – 3.83 นาโนกรัมต่อ ลบ.ม. เท่านั้น ความเข้มข้นรวมดังกล่าวมีปริมาณที่สูงเมื่อเทียบกับที่อื่นทั่วโลก คณะผู้วิจัยคิดว่าแหล่งที่มาของสาร PAHs ในบรรยากาศนั้นเกิดจากควันที่ปล่อยออกมาจากเครื่องยนต์บนเส้นทางจราจร ดินที่เก็บจากเมือง เชียงใหม่ ในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2539 พบสาร PAHs ที่มี 4-7 วงแหวนเบนซีนเฉลี่ย 824 ± 399 (205-2196) นาโนกรัมต่อกรัมดิน(ดินทั้งหมด 30 ตัวอย่าง) เป็นไพรีน 168 ± 103 (39.7-526) และ ฟลูออแรนธิน 146 ± 75 (37.1-418) นาโนกรัมต่อกรัมดิน ซึ่งพบมากที่สุดในการวิจัยนี้ โดยคาดว่า ยานพาหนะเป็นแหล่งหลักที่ปล่อยสาร PAHs สู่อากาศแล้วสะสมในดิน เพราะตัวอย่างที่มีปริมาณ มากอยู่ติดกับถนนที่มีการจราจรแออัดเช่นเดียวกับกรุงเทพฯ (Amagai และคณะ, 1999) และดินที่ กรุงเทพฯมีสาร PAHs รวม 20 ชนิดอยู่ระหว่าง 20 – 380 ไมโครกรัมตกก.ดิน ซึ่งน้อยกว่าข้างต้น มี ไพรีน 0.3 – 48.3 ไมโครกรัมตกก.ดิน โดยพบแพธาลีนสูงสุด ซึ่งคาดว่าเกิดจากปัจจัยหลายอย่าง จึงพบได้ต่ำ และได้รับการเผาไหม้ น้ำมันเป็นหลัก (Wilcke และคณะ, 1999)

2.5 ประโยชน์ของไพรีน

เนื่องจากโมเลกุลของไพรีนรับและเปล่งคลื่นแสงได้ดีจึงถูกนำมาใช้เป็นตัวติดตามโดยเป็น ตัวขยายสัญญาณทางพันธุศาสตร์ (Yamana และคณะ, 1999) โดย Kostenko และคณะ (2001) ใช้ไพรีน 2 โมเลกุลเชื่อมกับ oligonucleotide ตรงด้าน 5'-phosphate แล้วสามารถใช้เป็นตัว ติดตาม (Probe) เพื่อติดตามศึกษาลำดับเบสและโครงสร้างของอาร์เอ็นเอ พบว่าตัวติดตามนี้มี ความไวต่อโครงสร้างทุติยภูมิของ oligonucleotide binding site ซึ่งสามารถพัฒนาเพื่อศึกษา โครงสร้างของอาร์เอ็นเอที่มีความแตกต่างกันเล็กน้อยได้ และเพิ่มความสามารถในทางเทคนิค ไฮบริดไดเซชันร่วมกับเพอร์ลีน โดยไพรีนเป็นตัวจ่ายสัญญาณและเพอร์ลีนเป็นตัวรับสัญญาณ (Masuko และคณะ, 2000)

ไพรีนถูกนำมาติดฉลาก(ผนึก)กับเส้นใยซิลิกาขนาดเล็ก(silica microfibreres) หลังจากถูก เคลือบผิวด้วย 3-aminopropyl triethoxysilanes(APTES) แล้ว เพื่อใช้ติดตามขบวนการเคอริง (curing) ของระบบ epoxy ของ polymers จาก fluorescence ที่ปล่อยออกมาจากโมเลกุลของ ไพรีน เพราะไพรีนและอนุพันธ์ของไพรีนเช่น 1-pyrenesulphonyl chloride(PSC) ให้แสงที่อยู่นาน และมีสเปคตรัมไวต่อช่วงของสารในสิ่งแวดล้อม (González-Benito และคณะ, 2003) เนื่องจาก คุณสมบัติดังกล่าวไพรีนจึงถูกพัฒนานำมาใช้ในเทคโนโลยีนาโนทิวป์ โดยนำไพรีนมาเชื่อมต่อที่ ด้านปลายของนาโนทิวป์ด้วยพันธะเอมีน เพื่อที่จะช่วยให้การศึกษาทางด้านเคมีของแสง

(Photochemistry) ของนาโนทิวป์ที่มีผนังชั้นเดียวซึ่งถูกปรับปรุงหรือดัดแปลง (modified single wall carbon nanotubes, SWNT) ทำให้การศึกษาง่ายขึ้นโดยไม่ต้องอาศัยความสามารถในการละลายของนาโนทิวป์ เพราะแสงที่ได้จากไฟรีนมีความชัดเจนคงทน (Álvaro และคณะ, 2004)

สำหรับทางการแพทย์ ไฟรีนถูกนำมาเชื่อมต่อกับ crisnatol โดยผ่าน aminopyrene ได้เป็นยาผูกผสมที่ชื่อว่า pyrene-linked PBD hybrids (PBDs=pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines) ซึ่งมีแนวโน้มที่สามารถต้านเซลล์มะเร็งที่แยกได้จากมนุษย์ เนื่องจากจับกับดีเอ็นเอได้ดีกว่ายาต้นแบบ (Kamal และคณะ, 2004)

2.6 ความเป็นพิษของไฟรีน

หน่วยงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกาไม่จัดให้ไฟรีนเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ แต่ทำให้ผิวหนังเกิดการระคายเคืองหากสัมผัสโดยตรง (skin irritant) มีรายงานคนงานที่เตาอบถ่านโค้กมีอุบัติการณ์เป็นมะเร็งปอดและระบบไตเพิ่มขึ้น คนงานที่สัมผัสครีโอลิตพบว่าเป็นมะเร็งผิวหนัง ส่วนในสัตว์ทดลองยังมีข้อมูลไม่พอที่จะสรุปว่าเป็นสารก่อมะเร็ง พบเพียงว่าหนู mice ที่กินไฟรีนจะมีปัญหาของเลือดเล็กน้อย น้ำหนักไตลด น้ำหนักตับเพิ่ม และท่อกรวยไตเสื่อมสภาพในหนูแรท ทำให้ตับมีไขมันมาเกาะมาก ถ้าฉีดเข้าช่องท้อง จะทำให้ตับเสียหาย แต่มีบางรายงานที่สามารถพบมะเร็งผิวหนังในหนู mice และหนู mouse ได้ (Randerath และคณะ, 1997) และมีค่า oral LD₅₀ เท่ากับ 800 มก.ต่อกก. (Patnaik, 1992) ซึ่งการได้รับไฟรีนนั่นส่วนใหญ่เกิดจากการหายใจเอาควันที่เกิดจากการเผาไหม้เข้าไป การสัมผัสทางผิวหนัง การหายใจเอาอากาศทั่วไป โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีการจราจรแออัดหรือบริเวณใกล้กับแหล่งอุตสาหกรรม และอาจได้จากการปนเปื้อนในอาหารและน้ำดื่ม มีการประมาณว่าในปี ค.ศ.1987 ผู้หญิงญี่ปุ่นได้รับไฟรีนเฉลี่ยวันละ 0.98 ไมโครกรัม (Faust, 1998 ; U.S. National Library of Medicine, 2002) ความเข้มข้น 10 มก.ต่อลิตร สามารถทำให้ปลา (*Pimephales promelas*) ตายได้ภายใน 1 วัน (Verschueren, 1997) ความเข้มข้นที่สามารถรับไฟรีนทางปากกำหนดได้ที่ 0.3 และ 0.03 มก.ต่อกก.ต่อวัน สำหรับการรับบางโอกาสและการรับเป็นประจำ (subchronic and chronic oral exposure) ตามลำดับ และมีไฟรีนกระตุ้น เบนโซ(เอ)ไพรีนให้ก่อมะเร็งได้ (Faust, 1998) ซึ่งไฟรีนสามารถจับกับดีเอ็นเอได้ 2 รูปแบบ คือ 1. ดีเอ็นเอสายคู่ตรง poly(dA-dT):poly(dA-dT) 2. ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกจากกัน หรือ polynucleotides อื่น เช่น poly(dA):poly(dT) (Chen, 1983)

Hansen และคณะ (2004) พบว่า ในกลุ่มพนักงานขับรถประจำทางและคนส่งจดหมายที่ไม่สูบบุหรี่ของประเทศเดนมาร์ค มีการรับเอาไฟรีนเข้าไปในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยในปีสภาวะของพนักงานขับรถมีปริมาณสาร 1-hydroxypyrene มากกว่าและมี mutagenic activity สูงกว่า

คนส่งจดหมาย ซึ่งความแตกต่างนี้ น่าจะเกิดจากการรับสาร PAHs ของสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน รวมถึงระยะเวลาและระยะห่างจากแหล่งกำเนิด

2.7 การบำบัดไพรีนและสาร PAHs อื่นในสิ่งแวดล้อม

เมื่อไพรีนและสาร PAHs เข้าสู่สิ่งแวดล้อม มักจะสะสมอยู่ในดิน ตะกอนดิน น้ำ ฝุ่นละอองพืช และอากาศ โดยจะเกาะติดอยู่ในอนุภาคของดิน ตะกอนดิน หรือฝุ่น ซึ่งสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้โดยขบวนการต่าง ๆ ทั้งทางด้านกายภาพ เคมีและชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงของไพรีนและสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อมได้หลายวิธีดังนี้ (Cerniglia, 1992)

การกลายเป็นไอ(volatilization)

ปฏิกิริยาออกซิเดชันของแสง(photooxidation)

ปฏิกิริยาออกซิเดชันทางเคมี(chemicaloxidation)

การสะสมอยู่ในสิ่งมีชีวิต(bioaccumulation)

การดูดซับโดยอนุภาคของดิน(adsorption)

การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์(microbial degradation)

โดยจะเกิดขึ้นได้มากหรือน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสาร PAHs นั้น ๆ รวมทั้งขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อมนั้น (Ashok และ Saxena, 1995) โดยรวมสามารถแยกได้ดังนี้

2.7.1 การบำบัดทางกายภาพ

2.7.1.1 การดูดซับ (Sorption)

เนื่องจากสาร PAHs เป็นสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำ จึงถูกดูดซับติดกับอนุภาคของดินหรือตะกอน (organic matter) ได้อย่างแน่นหนาในปริมาณมาก โดยความแน่นของการจับมีความสัมพันธ์โดยตรงกับน้ำหนักโมเลกุลที่เพิ่มขึ้นของสาร PAHs (Pignatello และ Xing, 1996 ; Luthy และคณะ, 1997) ซึ่งขึ้นอยู่กับความไม่มีขั้วของสาร PAHs ดังนั้นจึงทำให้สาร PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงถูกเกาะติดแน่นเป็นเวลานานกว่าสาร PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (Chin และคณะ, 1997) จากข้อมูลดังกล่าวจึงมีงานวิจัยศึกษาการใช้สลายจากต้นไม้เข้ามาช่วยดูดซับไว้ก่อนนำไปทำลายเช่น aspen wood fibers (*Populus tremula*) มาดูดซับไพรีนที่ละลายน้ำได้ (15-50 ไมโครกรัมต่อลิตร) ซึ่งสามารถซับได้มากกว่า 50 % จนสลายอิมิตัวภายในเวลา 12.5 วัน โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดซับ(aspen wood-water sorption coefficient, K_{ww}) เท่ากับ 462 ± 7.9 (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)/(ไมโครกรัมต่อลิตร)⁻¹ ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่าลอคของสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายในน้ำกับอ็อกทานอล(octanol-water partition

coefficient, K_{ow} เท่ากับ 5.13 (โมลต่อลิตร)(โมลต่อลิตร)⁻¹) ซึ่งสามารถพัฒนาไปใช้บำบัดสารประกอบ PAHs ที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำต่าง ๆ (Boving และ Zhang, 2004)

2.7.1.2 การระเหย (Volatilization)

ส่วนใหญ่สาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดิน ระเหยได้ช้าและน้อยมาก เนื่องจากสาร PAHs เกาะติดแน่นอยู่ในอนุภาคดิน การระเหยของสาร PAHs เกิดจากการรวมตัวกับโครงสร้างของน้ำแล้วระเหยไป ซึ่งสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในน้ำและอยู่ผิวน้ำจะมีอัตราการระเหยสูงกว่าสารประกอบ PAHs ที่อยู่ผิวดิน จากการศึกษาพบว่าสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น แนพทาซีน จะมีอัตราการระเหยได้สูงกว่าสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง (Ashok และ Saxena, 1995)

2.7.1.3 การแตกสลายจากแสง (Photochemical degradation)

การแตกสลายของสาร PAHs โดยแสงนั้นเป็นกระบวนการทางเคมี ซึ่งจะมีออกซิเจนเป็นตัวสำคัญที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา กลไกการย่อยสลายจะขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิ และปริมาณความเข้มข้นของแสง (Reyes และคณะ, 1998 ; Warner และคณะ, 2004) รวมถึงการใช้รังสีต่าง ๆ เช่น รังสีแกมมา (Melcher และคณะ, 2002)

2.7.2 การบำบัดทางเคมี

2.7.2.1 การใช้ก๊าซโอโซน เพราะว่าโอโซนเป็นตัวออกซิไดซ์ที่แรง จึงใช้มาแตกโมเลกุลสารประกอบอินทรีย์ได้ พบว่าประสิทธิภาพยังไม่ดีนักลดได้เฉพาะสาร PAHs โมเลกุลต่ำ แต่จะเป็นการดีหากใช้ร่วมกับการใช้จุลินทรีย์ (Nam และ Kukor, 2000)

2.7.2.2 การใช้สารเคมี อนุพันธ์ของสารเคมีที่มีสมบัติเกิดไฮดรอกซีเรดิคัล (hydroxyl (OH[•]) radicles) จะสามารถแตกสลายสาร PAHs ได้ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) เพียงอย่างเดียว หรือผสมกับเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO₄) สามารถเปลี่ยนแอนทราซีน และเบนโซ(เอ)ไพรีนได้ประมาณ 40 % ซึ่งจะให้ดีกว่านี้ต้องเติมร่วมกับแบคทีเรียที่สามารถใช้สารเหล่านั้นได้ โดยพบว่ามีประสิทธิภาพเป็นอย่างดี (Nadarajah และคณะ, 2002)

2.8.3 การบำบัดทางชีวภาพ

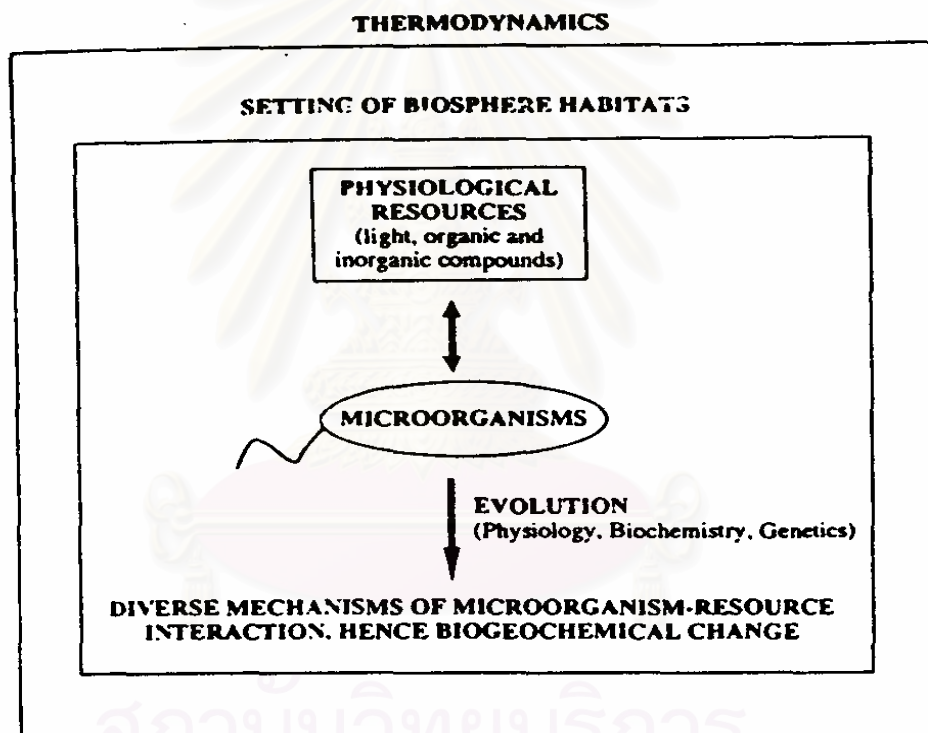
การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่เป็นขบวนการซึ่งใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติหรือมีการดัดแปรพันธุกรรมแล้ว เช่น ยีสต์ รา แบคทีเรีย เพื่อให้เปลี่ยนโครงสร้างสารอินทรีย์อันตรายที่ปนเปื้อนให้เป็นสารมีพิษน้อยลงหรือหมดพิษ โดยจุลินทรีย์ใช้สารปนเปื้อนเป็นแหล่งอาหาร คาร์บอน และพลังงาน เพื่อเจริญเติบโตและดำรงชีวิต (Maria, 1999 ; Dua และคณะ, 2002)

จุดประสงค์เพื่อกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่นหรือเหนี่ยวนำจุลินทรีย์บริเวณนั้นให้เกิดการย่อยสลายสารปนเปื้อน ประโยชน์ของวิธีการนี้คือ เป็นกระบวนการทางธรรมชาติที่ไม่เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม มีการทำลายสารปนเปื้อนตรงบริเวณที่ปนเปื้อนนั่น และมักจะมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธีการบำบัดอื่น ๆ (Korda และคณะ, 1997) แต่มีข้อเสียคือใช้เวลานาน ถึงแม้ว่าอย่างไรก็ตามวิธีการนี้กำลังถูกพิจารณานำมาใช้ในอนาคต (Korfiatis และ Chermisinoff, 1994) วิธีการนี้เริ่มนำมาใช้ในปลายศตวรรษที่ 70 (ค.ศ.1970-79) โดยใช้แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* มาย่อยสลายผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ลอยอยู่บนน้ำทะเล และในเดือนมีนาคม ค.ศ.1989 ถังเก็บน้ำมันดิบ Exxon Valdez ในอะลาสกา เกิดรั่ว ทำให้ชายหาดมีน้ำมันดิบปกคลุมหนาครึ่งเมตร มีการให้สารอาหารแก่จุลินทรีย์บริเวณนั้นโดยการพ่นหลังจากวิธีการอื่น ๆ ใช้ไม่ได้ผล พบว่าสามารถลดสาร PAHs ได้ 45 % ในเวลาสามเดือน และในสงครามอ่าว(Gulf War)ค.ศ.1991 เกิดมีน้ำมันกระจายทั่วทะเลทราย ต่อมาสามารถแยกเชื้อที่ใช้ น้ำมันเหล่านั้นได้เช่น *Arthrobacter* แล้วจึงมีการศึกษาวิจัยด้านนี้กันมากขึ้น (Maria, 1999) ข้อจำกัดของวิธีการบำบัดทางชีวภาพที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการย่อยสลายต้องคำนึงถึง ชนิดของสารปนเปื้อน อุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง ปริมาณออกซิเจนที่สามารถนำไปใช้ได้ ความชื้น สารอาหารที่สามารถใช้ได้ สมบัติทางฟิสิกส์ของสารปนเปื้อน เป็นต้น ซึ่งมีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ เพราะอาจจะทำให้มีภาวะดังต่อไปนี้

1. ไม่มีจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารปนเปื้อนได้หรือมีน้อยมากและมีปฏิกิริยาทางชีวเคมีจำกัดในการย่อยสลาย
2. สารปนเปื้อนไม่อยู่ในภาวะที่เหมาะสมกับการใช้ของจุลินทรีย์และการถ่ายทอดมวลมีจำกัด (poor bioavailability)
3. สารปนเปื้อนหรือสารมัธยันต์ มีพิษต่อจุลินทรีย์ในบริเวณนั้นและการย่อยสลายถูกยับยั้ง ข้อจำกัดที่ 2 เกิดได้จากธรรมชาติของจุลินทรีย์ องค์ประกอบและสมบัติของสารปนเปื้อนและธรรมชาติของดิน แต่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้ โดยการใช้สารลดแรงตึงผิวจากจุลินทรีย์สร้างหรือสังเคราะห์ขึ้นเติมเข้าไปด้วย การเติมสารละลายอินทรีย์ช่วยละลายก่อน ซึ่งการใช้สารลดแรงตึงผิวจะต้องเป็นชนิดที่ไม่มีอันตรายต่อจุลินทรีย์และสามารถเพิ่มการละลายของสารปนเปื้อนนิยมเติมจุลินทรีย์ที่สร้างสารลดแรงตึงผิวเข้าไปมากกว่าการเติมสารลดแรงตึงผิวบริสุทธิ์ โดยขึ้นอยู่กับชนิดและลักษณะของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดและต้องไม่รบกวนการสกัดสารปนเปื้อนและติดตามได้ง่าย (Korfiatis และ Chermisinoff, 1994 ; Gutiérrez-rojas, 2000 ; Dua และคณะ, 2002)

2.8 การย่อยสลายไพรีนโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ในธรรมชาติใช้กระบวนการเมตาบอลิซึมหลายแบบในการย่อยสลายสารประกอบทางธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่มนุษย์สร้างขึ้น ในขณะที่ภาคอุตสาหกรรมมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว จุลินทรีย์ก็มีวิวัฒนาการให้มีความสามารถย่อยสลายสารสังเคราะห์ชนิดต่างๆ ที่ปนเปื้อนเข้ามาในสิ่งแวดล้อม รวมทั้งสาร PAHs การปรับตัวของจุลินทรีย์เพื่อให้มีความสามารถในการย่อยสลายสารดังกล่าวได้อาจเกิดขึ้นโดยมีการชักนำให้สร้างเอนไซม์ที่จำเป็นหรือการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนซึ่งเป็นผลทำให้จุลินทรีย์สามารถพัฒนาวิถีเมตาบอลิซึมขึ้นมาใหม่เพื่อใช้ในการย่อยสลายสาร PAHs ได้ (Madson, 1998) โดยมีความสัมพันธ์กันดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงแนวคิดของการพัฒนาความหลากหลายเมตาบอลิซึมในจุลินทรีย์ เกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างจุลศาสตร์ความร้อน แหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ สรีระวิทยา วัตถุประสงค์ที่ทดแทนได้ จุลินทรีย์และวิวัฒนาการ (Madson, 1998)

จุลินทรีย์แต่ละกลุ่มจะมีกลไกการย่อยสลายสาร PAHs แตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามพบว่าการย่อยสลายสาร PAHs โดยจุลินทรีย์เป็นกระบวนการสำคัญในการบำบัดสารปนเปื้อนความสามารถในการย่อยสลายของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารปนเปื้อนทางฟิสิกส์และเคมี ปริมาณและอัตราเร็วของการแพร่ในสิ่งแวดล้อมและความง่ายในการเข้าถึง

และถูกใช้โดยจุลินทรีย์ ซึ่งสัมพันธ์กับชนิดของดิน น้ำและออกซิเจนที่สามารถใช้ได้ สารอาหาร ความสามารถของจุลินทรีย์ ความคุ้นเคยกับสารปนเปื้อน พิษของตะกอน ความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ และผลกระทบตามฤดูกาลอื่น ๆ (Sutherland และ Cerniglia, 1995 ; Sutherland และ คณะ, 1995)

นอกจากจะคำนึงถึงชนิดและความสามารถของจุลินทรีย์ที่จะนำมาบำบัดแล้ว ยังต้องคำนึงถึงระยะเวลาที่ไพลินอยู่ในแหล่งปนเปื้อนนั้นด้วย เพราะหากปล่อยนานการบำบัดก็จะยากขึ้น เนื่องจากไพลินจะจับกับส่วนอนุภาคอินทรีย์ดิน (soil organic matter, SOM) ด้วยพันธะโควาเลนต์ได้แน่นยิ่งขึ้นตามเวลา(270 วัน) ทำให้สกัดออกมายากขึ้นและถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ลดลง เพราะโอกาสการพบกันของจุลินทรีย์และไพลินก็ลดลงตามเวลา ซึ่งรวมถึงสารมัธยันต์จากไพลินด้วยเช่นกัน (Gothrie และ Peaender, 1998) ความสำเร็จของการบำบัดสาร PAHs โดยจุลินทรีย์นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยในสิ่งแวดล้อม ดังต่อไปนี้ (Trejo และ Quintero, 2000)

1. การมีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสาร PAHs ได้และสามารถย่อยสลายสาร PAHs ได้ง่าย โดยที่นำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนได้
2. การมีตัวกระตุ้นหรือสารกระตุ้น เพื่อสังเคราะห์เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อสาร PAHs
3. การมีตัวให้และรับอิเล็กตรอนที่เหมาะสม
4. ความสมดุลของสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการเข้าย่อยสลาย เช่น ความชื้น และความเป็นกรดค่า
5. สารอาหารที่จำเป็น เพื่อสนับสนุนการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ เช่น ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส
6. ช่วงอุณหภูมิที่สนับสนุนกิจกรรมของจุลินทรีย์และปฏิกิริยาการสลายสาร PAHs
7. การไม่มีสารพิษในระบบจากสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้น
8. มีจุลินทรีย์ที่สลายสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้น
9. มีจุลินทรีย์ที่ป้องกันการสร้างสารมัธยันต์ที่เป็นพิษ
10. สิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม มีการแก่งแย่งโดยจุลินทรีย์น้อย

ดังนั้นผลการทดลองต่าง ๆ ที่มีรายงานแล้วจึงมีความแตกต่างกัน บางครั้งสอดคล้องกันดี ในขณะที่บางการทดลองขัดแย้งกันอย่างมาก ซึ่งต้องมีการปรับระบบการทดลองให้เหมือนกันแล้ว จะสามารถวิเคราะห์เปรียบเทียบกันได้ในอนาคต

2.9 การย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรีย

2.9.1 แบคทีเรียบริสุทธิ์

มีรายงานการวิจัยที่ผ่านหลายสิบปี นิยมใช้วิธีการคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดิน น้ำ ดิน ตะกอนที่มีประวัติการปนเปื้อนสารประกอบนี้มาก่อน จากของเสียที่ถูกทิ้งจากภาคอุตสาหกรรมต่าง ๆ ภาคเกษตรกรรมและแหล่งที่อยู่อาศัยต่าง ๆ โดยวิธีการ Enrichment culture technique ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายสาร PAHs ที่แท้จริงโดยไม่หายไปในช่วงการทำเจือจางต่อไป (Wackett, 2001) แล้วคัดแยกเชื้อด้วยวิธีเกลี่ยเชื้อที่ค่าเจือจางต่าง ๆ ลงอาหารแข็ง จากนั้นพ่นสารประกอบไพรีนที่ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมทับอีกครั้ง คัดเลือกโคโลนีที่มีวงใสรอบ ๆ โคโลนี (Kiyohara และคณะ, 1982) แต่การพ่นเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติ จึงมีการพัฒนาเป็นวิธีการทำในจานหลุมขนาดเล็ก (micoplates) โดยนำสาร PAHs ใส่ก่อนแล้วเติมจุลินทรีย์เจือจางแล้วตามเข้าไป ติดตามการใช้สาร PAHs จากความขุ่น และการเปลี่ยนสี เป็นสีเหลืองน้ำตาล สีเขียว (Stieber และคณะ, 1994) หรือการอาศัยความสามารถในการเกาะกับแผ่นสังเคราะห์ที่ไม่ชอบน้ำซึ่งมีผลึกไพรีนติดอยู่ เมื่อมีการถ่ายเชื้อหลายครั้งจึงนำแผ่นนั้นมาแยกแบคทีเรีย (Bastiaens และคณะ, 2000) จากนั้นจึงนำแบคทีเรียที่มีสมารถใช้ไพรีนได้มาศึกษาการย่อยสลายต่อไป ซึ่งเท่าที่ผ่านมาสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.3 แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่คัดแยกได้มักมีลักษณะ coryneforms แกรมลบ ไม่หมักน้ำตาล เช่น *Mycobacterium* sp. (Saval, 2000) และแบคทีเรียที่คัดแยกได้จะมาจากดินและตะกอนที่ถูกปนเปื้อนด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

การย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรียบริสุทธิ์จะได้เซลล์เพิ่มมากขึ้นและได้น้ำกับคาร์บอนไดออกไซด์ หากมีการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ (Cerniglia, 1992 ; Wilson และ Jones, 1993) โดยปกติแบคทีเรียจะย่อยสลายสารที่ละลายน้ำได้ง่ายกว่าสารที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นการย่อยสลายสาร PAHs ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ แบคทีเรียทั่วไปจะไม่สามารถย่อยสลายสารนี้ได้ แต่มีแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้นที่สามารถสร้างเอนไซม์ต่างๆ ที่ใช้ในการย่อยสลายสาร PAHs เพื่อจะนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ส่วนใหญ่แบคทีเรียสายพันธุ์เดียวจะสามารถย่อยสลายสาร PAHs น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ที่ประกอบไปด้วยวงเบนซีน 2-3 วง แบคทีเรียมีกลไกนำสาร PAHs ไปใช้ โดยเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารโดยการสัมผัสโดยตรงกับผลึกสาร PAHs แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ซึ่งจะเพิ่มการละลายน้ำของสาร PAHs ช่วยให้แบคทีเรียสัมผัสกับสาร PAHs ได้ง่าย ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นที่ผนังเซลล์ จากนั้นสาร PAHs จะถูกส่งผ่านผนังเซลล์โดยการแพร่ (passive diffusion) โดยไม่ใช้พลังงานจากเซลล์ (Bugg และคณะ, 2000) เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยชั้นฟอสโฟไลปิด เมื่อสาร PAHs เข้าสู่เซลล์ เอนไซม์ตัวแรกที่เริ่มการย่อยสลายคือ ออกซิจีเนส

กระบวนการต่าง ๆ จะดำเนินอย่างต่อเนื่องจนได้คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และพลังงานที่ใช้ในการเจริญของแบคทีเรียโดยดั่งที่กล่าวมาข้างต้น กระบวนการดังกล่าวจะเกิดอย่างสมบูรณ์ ต้องอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด (รูปที่ 2.3)

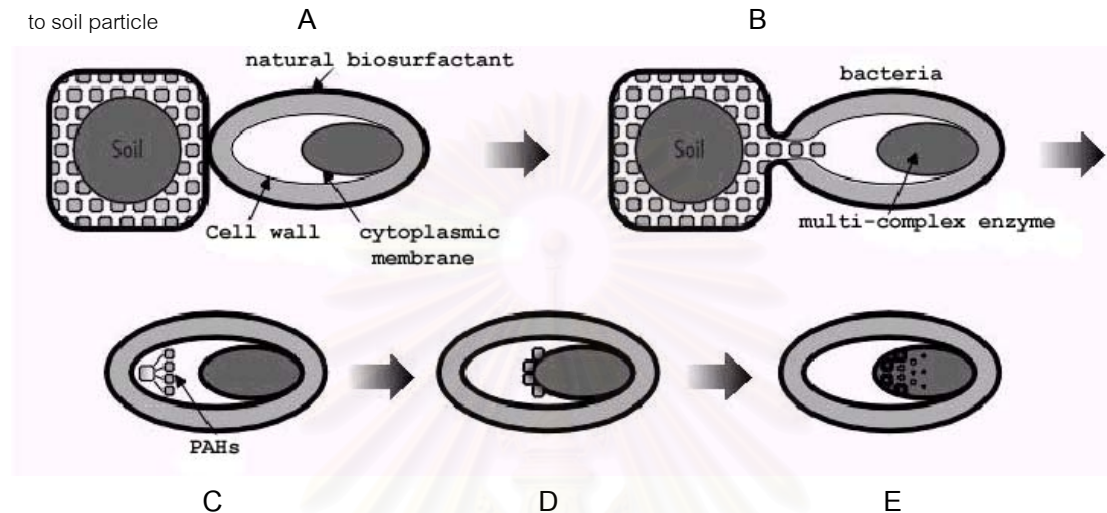
ตารางที่ 2.3 แสดงแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้

| แบคทีเรีย | เอกสารอ้างอิง |
|---|--------------------------------|
| <i>Rhodococcus</i> sp. สายพันธุ์ UW1 | Walter และคณะ(1991) |
| <i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ BB1 | Boldrin และคณะ(1993) |
| <i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ VF1 | Kastner และคณะ(1994) |
| <i>Gordona</i> sp. สายพันธุ์ BP9 | Kastner และคณะ(1994) |
| <i>Rhodococcus</i> sp. สายพันธุ์ S Pyr Na 1 | Bouchez และคณะ(1995) |
| <i>Rhodococcus</i> sp. สายพันธุ์ S Flt Na 1 | Bouchez และคณะ(1995) |
| Genus <i>Aureobacterium</i> สายพันธุ์ S Ant Mu 3 | Bouchez และคณะ(1995) |
| <i>Mycobacterium flavescens</i> | Dean-Ross และ Cerniglia (1996) |
| <i>Burkholderia cepacia</i> สายพันธุ์ VUN10,001 | Juhasz และคณะ(1997) |
| <i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ KR2 | Rehmann และคณะ(1998) |
| <i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ CH1 | Churchill และคณะ(1999) |
| <i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ MR-1 | Molina และคณะ(1999) |
| <i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ LB208 | Bastiaens และคณะ(2000) |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> สายพันธุ์ VUN10,010 | Boonchan และคณะ(2000) |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> สายพันธุ์ VUN10,003 | Juhasz และคณะ(2000) |
| <i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ AP1 | Vila และคณะ(2001) |
| <i>Mycobacterium gilvum</i> สายพันธุ์ B1 | Gauthier และคณะ(2003) |
| <i>Mycobacterium esteraromaticum</i> สายพันธุ์ B21 | Gauthier และคณะ(2003) |
| Genus <i>Porphyrobacter</i> สายพันธุ์ B51 | Gauthier และคณะ(2003) |

พบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถดังกล่าว จะสามารถย่อยสลายสาร PAHs ได้หลายชนิด เนื่องจากออกซิจีเนส เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสับสเตรตได้หลายชนิด (broad specificity)

enzyme) ซึ่งถือว่าเป็นลักษณะที่ดี เพราะในสิ่งแวดล้อมมีการปนเปื้อนสาร PAHs หลายชนิด (Baver และ Capone, 1988 ; Stringfellow และ Aitken, 1995)

hydrophobic PAHs adsorbed

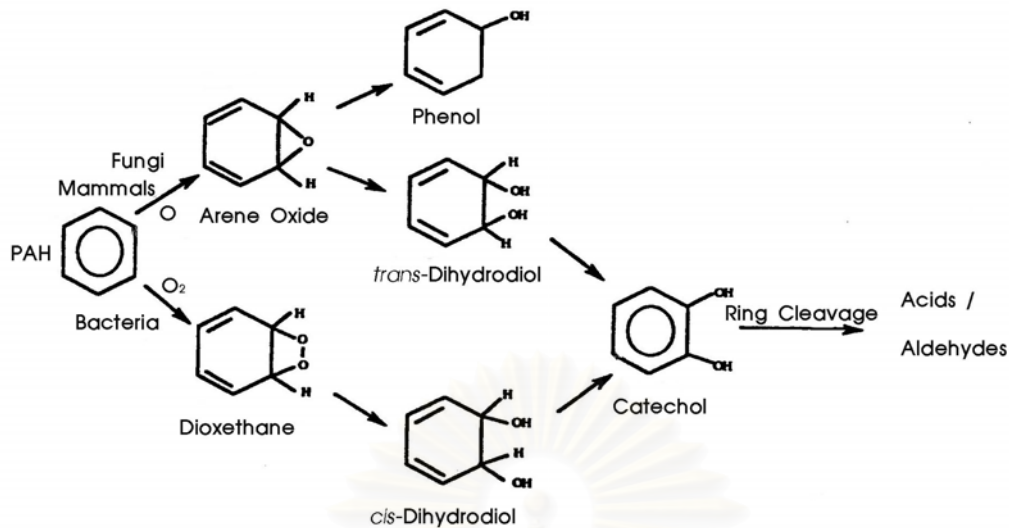


รูปที่ 2.3 การย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรีย (Enzymetech, 2001)

(A คือ PAHs ถูกละลายโดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แบคทีเรียสร้างขึ้น, B คือ PAHs แพร่ผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรีย, C คือ PAHs ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ในกระบวนการย่อยสลายขั้นแรกภายในเซลล์แบคทีเรีย, D คือ PAHs แพร่ผ่านไซโตพลาสซึมเมมเบรนของแบคทีเรีย, E คือ การย่อยสลาย PAHs อย่างสมบูรณ์โดยเอนไซม์หลายชนิด)

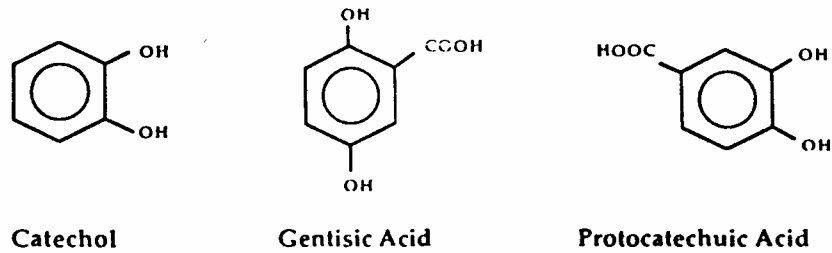
การย่อยสลายไพรีนส่วนมากเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ใช้ออกซิเจนในการแตกโมเลกุลหรือเปลี่ยนโครงสร้างบางส่วน (transformation) โดยโปรคาริโอตและยูคาริโอตใช้เอนไซม์กลุ่มออกซิจีเนสเหมือนกันในการเกิดปฏิกิริยา(รูปที่ 2.4, Wilson และ Jones, 1993) การออกซิเดชันของแบคทีเรียจะอาศัยเอนไซม์ ไดออกซิจีเนส (dioxygenases) เปลี่ยนโครงสร้างเป็น ไพรีน ซีส-ไดไฮโดรไดอัลล์ ไดฟีนอลส์ แล้วถูกแตกโมเลกุลต่อไปโดยไดออกซิจีเนสตัวอื่น ๆ ต่อไป

สุดท้ายจะได้ผลิตภัณฑ์หลัก 3 ชนิด คือ แคททีคอล กรดเจนทีลิก และกรดโปรโตแคททีชูอิก (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.4 แสดงการย่อยสลายสาร PAHs โดยจุลินทรีย์ (Wilson และ Jones, 1993)

แต่บางครั้งการทำงานของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ไม่สามารถใช้ไพรินได้โดยตรงต้องอาศัยสารสับสเตรทร่วม (co-substrate) หรือสารอาหารชนิดอื่น เป็นสารตั้งต้นในการย่อยสลายและ/หรือใช้ในการเพิ่มจำนวนให้พอเสียก่อน หรือช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาก่อน ซึ่งเป็นการย่อยสลายแบบโคเมแทบอลิซึม (co-metabolism) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนโครงสร้างของสาร PAHs บางส่วน โดยไม่ได้ใช้สารนั้นเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน จะเกิดก็ต่อเมื่อมีสารอาหารหรือสารอื่นเข้ามาอยู่ในระบบเสียก่อน โดยอาศัยสารอาหารหรือสารอื่นเป็นแหล่งอาหาร(คาร์บอนและพลังงาน)ในการเจริญเติบโตในขั้นตอนแรก จากนั้นจึงมีการเปลี่ยนโครงสร้างสาร PAHs ต่อไป (Cerniglia, 1992 ; Alexander, 1994) วิธีการนี้เป็นส่วนหนึ่งของ bioconversion หรือ biotransformation เป็นการนำจุลินทรีย์บริสุทธิ์มาเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ จุลินทรีย์ที่ใช้เช่น *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Achromobacter* บางครั้งเอนไซม์เพียงชนิดเดียวจะเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน ออกซิเดชัน ดีอะมีเนชัน แต่บางครั้งต้องอาศัยเอนไซม์มากกว่า 1 ชนิด เข้ามาช่วยในการเกิดปฏิกิริยาเหล่านี้ได้ครบ (Alexander, 1994)

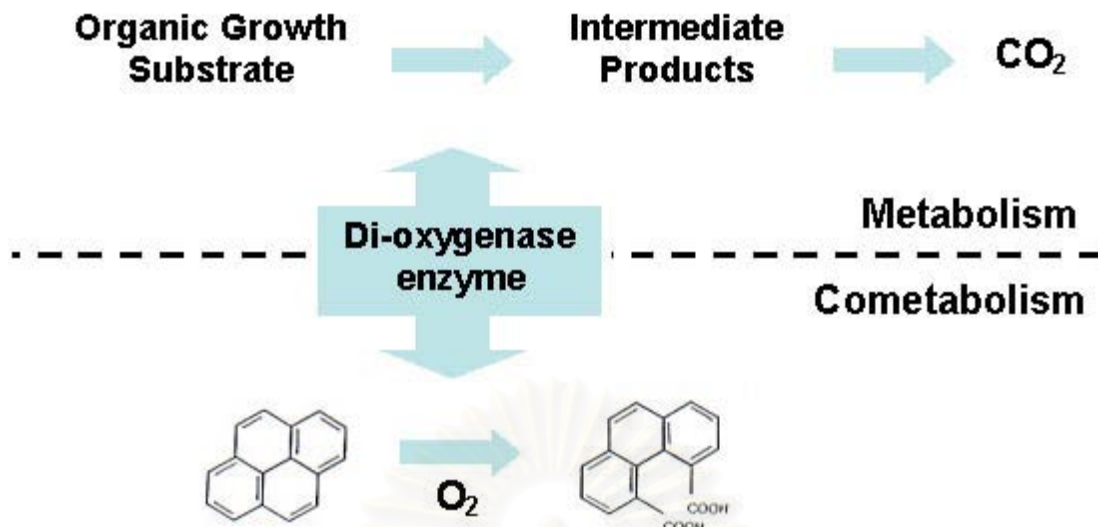


รูปที่ 2.5 แสดงผลิตภัณฑ์หรือสารมัธยันต์สุดท้ายหลักที่พบจากการย่อยสลายสาร PAHs (Wilson และ Jones, 1993)

การที่จุลินทรีย์ไม่สามารถใช้สาร PAHs ได้ เพราะว่าขาดปัจจัยสำคัญที่ต้องการในการเจริญเติบโต หรืออาจเกิดจากตัวจุลินทรีย์เอง ซึ่งอาจเป็นแบคทีเรียแบบ auxotrophs และบางครั้งมีการสะสมสารมัธยันต์ที่ถูกเปลี่ยนมา ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าเกิดจาก

1. ผลิตภัณฑ์จากเอนไซม์ตัวแรกไม่ถูกเปลี่ยนต่อไปโดยเอนไซม์ตัวอื่น
2. ผลิตภัณฑ์ที่ถูกเปลี่ยนมาไปยับยั้งเอนไซม์ตัวถัดไปหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์
3. จุลินทรีย์ขาดสารตัวที่สอง เข้ามาช่วยในบางช่วงของปฏิกิริยาในขั้นต่อไป

แต่บางกรณีการเกิดการย่อยสลายแบบโคเมแทบอลิซึม จะเกิดได้ก็ต่อเมื่อที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมค่าหนึ่งเท่านั้น เพราะปริมาณที่มากเกินไปหรือน้อยเกินไปมีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และเหนี่ยวนำการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีได้ (Alexander, 1994) ดังนั้นการย่อยสลาย PAHs ที่มีวงเบนซีน 4-5 วง มักจะต้องมีสาร PAHs ที่มีวงเบนซีนต่ำกว่าอยู่ด้วย เพราะสาร PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าสาร PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง บางรายงานพบว่าการย่อยสลายไพลีนอาจต้องมีการกระตุ้นความสามารถของเอนไซม์ก่อนด้วยสาร PAHs ชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันก่อน ประสิทธิภาพจะดีขึ้น (Molina และคณะ, 1999) วิธีการย่อยสลายแบบโคเมแทบอลิซึมแสดงไว้ในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 แสดงวิถีการย่อยสลาย PAHs โมเลกุลสูงแบบโคเมแทบอลิซึม
(สุพินดา ศิริวราศิลป์, 2545)

มีรายงานการย่อยไฟรีนแบบโคเมแทบอลิซึมออกมาหลายงานวิจัย(ตารางที่ 2.4) โดยเริ่มแรกมีการใช้สารอาหารเป็นโคสับสเตรทก่อน ซึ่งประกอบด้วย เปปโติน สารสกัดจากยีสต์และแป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch) โดยใช้เปปโตินเป็นแหล่งไนโตรเจน คาร์บอน และพลังงาน สำหรับสารสกัดยีสต์ใช้เป็นแหล่งวิตามินที่จำเป็นในการเจริญ แป้งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเช่นกัน (Heitkamp และคณะ, 1988a ; Grosser และคณะ, 1991 ; Trezesicka-Mlynarz และ Ward, 1995) ต่อมาจึงมีการนำเอาสาร PAHs ที่มีวงเบนซีน 2-3 วงมาใช้เป็นโคสับสเตรท โดยเฉพาะพีแนทรีน ซึ่งพบว่าเป็นสารที่แบคทีเรียใช้ง่ายและไม่เกิดสารมัธยันต์ที่เป็นพิษ และเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายไฟรีน (Geiselbrecht และคณะ, 1998 ; Bouchez และคณะ, 1999 ; Bastiaens และคณะ, 2000) บางครั้งแบคทีเรียบริสุทธิ์ใช้พีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน แต่ไม่สามารถใช้ไฟรีนได้จึงใช้วิถีการย่อยสลายไฟรีนแบบโคเมแทบอลิซึมเข้าช่วย ซึ่งผลที่ได้ที่น่าพอใจ เพราะสามารถลดไฟรีนได้ระดับหนึ่ง (Supaka และคณะ, 2001)

วิถีการย่อยสลายไฟรีนที่ใช้ออกซิเจนในการเกิดปฏิกิริยาทั้งแบบอาศัยและไม่อาศัยโคสับสเตรท สามารถตรวจพบสารมัธยันต์ได้หลายชนิดที่เหมือนและแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ซึ่งสามารถนำมาเขียนสรุปรวมกันได้ดังแสดงในรูปที่ 2.7

เมื่อมีการย่อยสลายเพียงบางส่วนของไฟรีน แล้วไม่สามารถย่อยสลายต่อไปได้ เกิดการสะสมอยู่ในระบบ จะเรียกสารมัธยันต์นั้นว่า “dead-end metabolites” ซึ่งบางชนิดเป็นอันตราย

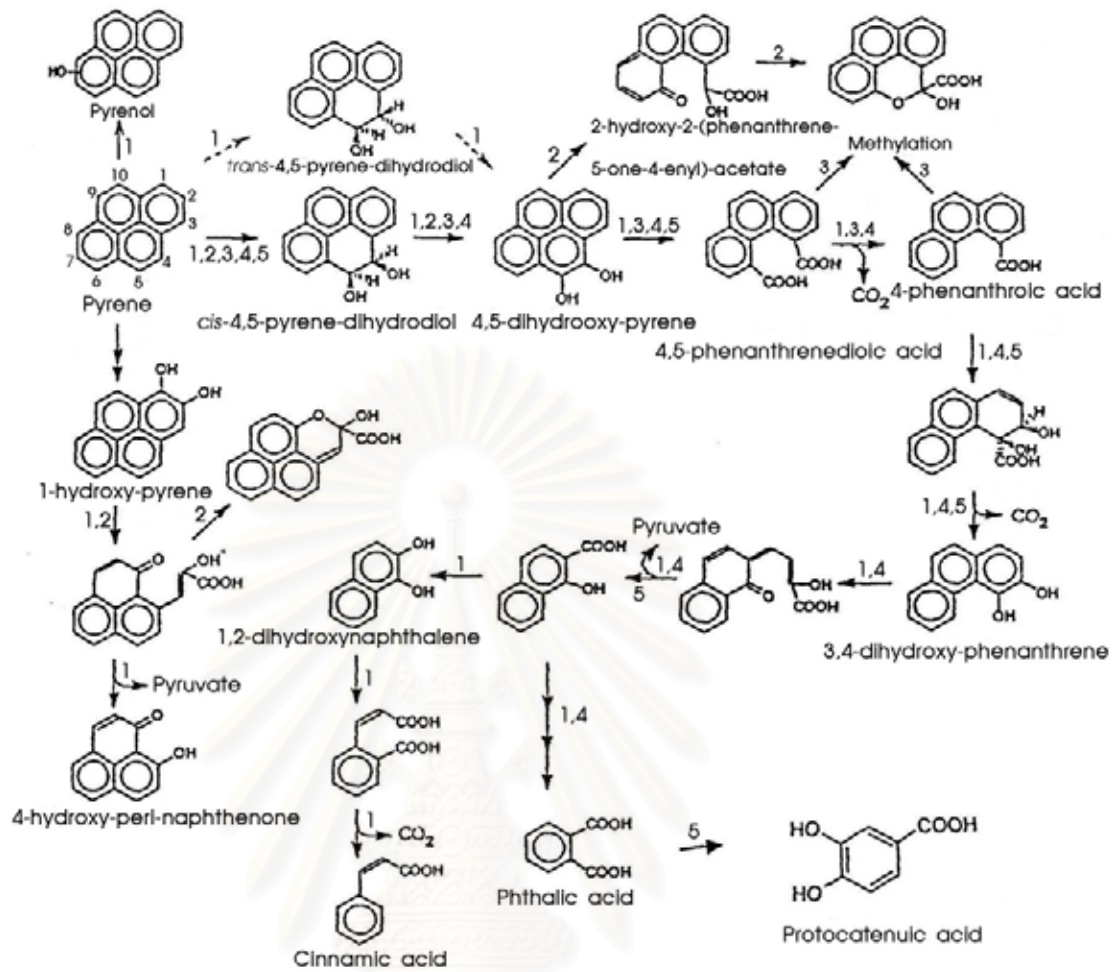
ต่อแบคทีเรียหรือสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น 6,6'-dihydroxy-2,2'-biphenyl dicarboxylic acid สร้างโดย *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ AP1 (Bouchez และคณะ, 1995 ; Vila และคณะ, 2001)

สารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนส่วนมากมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน เพราะคาดว่าเกิดจากการทำงานได้ของเอนไซม์ที่คล้ายกันและมีตำแหน่งที่เข้าจับคล้ายกันครอบคลุมสาร PAHs หลายชนิด (รูปที่ 2.6) (Heitkamp และคณะ, 1988b) สามารถกล่าวได้ว่าการย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรียจะเกิดจากการแตกโมเลกุลไพรีนตรงระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับ 2 และ 4 กับ 5 เป็นส่วนใหญ่ ได้สารมัธยันต์ทั้ง ซีส- และ ทราน-ไดไฮโดรไดอัลล์ จากการดำเนินงานของเอนไซม์ไดออกซีจีเนส และ/หรือโมโนออกซีจีเนส (Heitkamp และคณะ, 1988b ; Walter และคณะ, 1991) ซึ่งไม่จำเพาะเจาะจงมากนักขึ้นอยู่กับความสามารถเฉพาะของสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้ (Dean-Ross และคณะ, 2002) การทำงานจะเกิดจากเอนไซม์ตัวเดิมหรือตัวใหม่ตามขั้นตอนของแต่ละวิถีของแบคทีเรียเหล่านั้น เมื่อย่อยได้จนเหลือ 3 วงเบนซีนจะเข้าสู่วิถีการย่อยพีแนทรีนและสุดท้ายจะได้คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และเซลล์โปรตีน เมื่อมีวิถีเมตาบอลิซึมสมบูรณ์ (Wilson และ Jones, 1993) แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้บางครั้งใช้เวลาในการปรับตัวก่อนระยะเวลาหนึ่ง อาจเป็นเพราะพิษของสาร PAHs ที่ละลายในตัวทำลายอินทรีย์เองมีผลต่อแบคทีเรีย (Bouchez และคณะ, 1997) เพื่อเป็นการลดเวลานี้ลง จึงอาจจะต้องมีการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ก่อนโดยเลี้ยงในไพรีนที่ความเข้มข้นต่ำกว่าที่ทดลองจริง หรืออาจจะเติมสารอาหารที่ใช้ง่ายเช่น น้ำตาลกลูโคส ร่วมด้วย แล้วจึงนำเชื้อมาทดสอบการย่อยสลายไพรีนอีกครั้งจะช่วยลดเวลาปรับตัวได้และช่วยให้ประสิทธิภาพการย่อยไพรีนอย่างสมบูรณ์ได้เพิ่มขึ้นเท่าตัว (Heitkamp และคณะ, 1988a)

การย่อยสลายไพรีนแบบโคเมแทบอลิซึม ส่วนมากจะมีผลดีต่อการย่อยสาร PAHs แต่ละชนิดในระบบ ซึ่งถูกย่อยสลายมากขึ้น แต่บางงานวิจัยพบว่าพีแนทรีนมีผลยับยั้งการย่อยสลายไพรีน โดยชะลออัตราการย่อยให้ช้ากว่าปกติ เนื่องจากแบคทีเรียเลือกใช้พีแนทรีนก่อน ซึ่งใช้ได้ง่ายกว่าแล้วจึงใช้ไพรีนเมื่อพีแนทรีนหมด (Yuan และคณะ, 2000) จากการศึกษาหลายการทดลอง พบว่าในภาวะที่ไพรีนอยู่ร่วมกับสาร PAHs อื่น จะเกิดทั้งการส่งเสริมเร่งการย่อยไพรีนและการยับยั้งแบบแข่งขัน (Dean-Ross และคณะ, 2002) ทำให้การย่อยไพรีนให้ช้าลงแตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะของสารว่าอยู่ในรูปของผลึกหรือละลายอยู่ในตัวทำละลาย เพราะรูปผลึกมีผลยับยั้งมากกว่า (Tiehm และ Fritzsich, 1995) และการย่อยสลายไพรีนยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและจำนวนชนิดของสาร PAHs ในระบบนั้น ๆ (Bouchez และคณะ, 1995 ; Bastiaens และคณะ, 2000) รวมถึงการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ชอบน้ำบางชนิดเข้าไปในระบบ จะลดประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนได้ (Jimenez และ Bartha, 1996)

ตารางที่ 2.4 แสดงแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายไพลีนแบบโคเมแทบอลิซึม

| แบคทีเรีย | โคสับสเตรท | เอกสารอ้างอิง |
|--|--|------------------------------------|
| <i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ PYR-1 | เปปโตินและสารสกัด จากยีสต์และแป้งที่ ละลายน้ำ | Heitkamp และคณะ (1988a) |
| <i>Mycobacterium</i> sp. | เปปโตินและสารสกัด จากยีสต์และแป้งที่ ละลายน้ำ | Grosser และคณะ(1991) |
| <i>Flavobacterium</i> sp | เปปโตินและสารสกัด | Trezesicka-Mlynarz และ Ward (1995) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | จากยีสต์ | |
| <i>Pseudomonas putida</i> | | |
| <i>Rhodococcus</i> sp. สายพันธุ์ S Flt Na 1 | เนพทาลีน ฟลูออรีน พีแนนทรีน แอนทราซีน | Bouchez และคณะ(1995) |
| <i>Mycobacterium</i> sp. | สารอินทรีย์ | Jimenez และ Bartha (1996) |
| <i>Cycloclasticus</i> sp. | พีแนนทรีน | Geiselbrecht และคณะ (1998) |
| <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ Phe Na 1 และ สายพันธุ์ S Flu Au 1 | พีแนนทรีน | Bouchez และคณะ(1999) |
| <i>Mycobacterium</i> sp. | สารสกัดจากยีสต์ เปปโติน ทริปโติน และน้ำตาลกลูโคส | Ho และคณะ(2000) |
| <i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ LB208 | ฟลูออรีน พีแนนทรีน ไดเบนโซไทโอฟิน | Bastiaens และคณะ(2000) |
| <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ P2 | ฟลูออแรนทีน พีแนนทรีน | Supaka และคณะ (2001) |



1. *Mycobacterium* sp. PYR-1 (Heitkamp และคณะ, 1988b)
2. *Rhodococcus* sp. UW1 (Walter และคณะ, 1991)
3. *Mycobacterium* sp. RJGII-135 (Grosser และคณะ, 1991 ; Schneider และคณะ, 1996)
4. *Mycobacterium flavescens* ATCC700033 (Dean-Ross และ Cerniglia, 1996)
5. *Mycobacterium* sp KP1 (Rehmann และคณะ, 1999)

รูปที่ 2.7 แสดงวิถีการย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรียบริสุทธิ์ (Pinyakong, 1999)

ไพรีนสามารถเป็นโคสับสเตรทในการย่อยสลายสาร PAHs อื่น ๆ ได้ ได้แก่ ฟลูออรีน (Tiehm และ Fritsch, 1995) ฟลูออแรนทีน ในทางกลับกันฟลูออแรนทีนก็เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน(competitive inhibitor) สำหรับการย่อยไพรีนโดย *Mycobacterium flavescens* (Dean-Ross และคณะ, 2002)

จำนวนแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบการย่อยสลายก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการย่อยสลายไพลีน โดย Grosser และคณะ(1991) รายงานว่าการเติมจำนวนหัวเชื้อให้เพิ่มขึ้นจาก 10^8 เป็น 2×10^9 CFUต่อกรัมดิน จะกระตุ้นการย่อยไพลีนได้อย่างมีประสิทธิภาพได้ดียิ่งขึ้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Daane และคณะ(2001) ที่เติมเชื้อ 10^9 เซลล์ต่อมล. ในดินที่เติมไพลีน พบว่าสามารถลดไพลีนได้อย่างมาก ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้ไม่สามารถย่อยสลายไพลีนได้ที่ความเข้มข้น 10^6 - 10^7 เซลล์ต่อมล. และรายงานของ Juhasz และคณะ(2000) ที่ใช้หัวเชื้อที่มีความเข้มข้นสูงกว่าปกติ(7.5×10^7 เซลล์ต่อมล.) จะสามารถย่อยไพลีนได้ 98 %ในเวลา 5 วัน และย่อยได้ 74 %ในเวลา 42 วัน เมื่อใช้สาร PAHs ผสมกันหลายชนิด แต่มีระยะเวลาปรับตัว 7 วันและเชื้อลดลงเป็น 2.5×10^7 เซลล์ต่อมล. ซึ่งเชื้อแบคทีเรียนี้แยกจากดินที่ปนเปื้อนจากโรงงานอุตสาหกรรม ให้ผลเช่นเดียวกับ Ye และคณะ(1996) ซึ่งใช้หัวเชื้อ 10^8 เซลล์ต่อมล.

2.9.2 กลุ่มแบคทีเรีย

ปกติในสิ่งแวดล้อมที่ถูกปนเปื้อนนั้นโดยเฉพาะดินหรือตะกอนดินต่าง ๆ ที่นำมาคัดแยกแบคทีเรียที่ใช้ไพลีนได้ จากสภาวะแวดล้อมทั่วไป แบคทีเรียในแหล่งนั้น ๆ จะมีการทำงานแบบอาศัยซึ่งกันและกันอยู่แล้ว รวมทั้งความสัมพันธ์กับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในดิน อาทิ รา แอคติโนมัยซิส โปรโตซัว และไซยาโนแบคทีเรีย เพราะดินมี แบคทีเรีย รา แอคติโนมัยซิส และจุลินทรีย์อื่นในปริมาณที่ต่างกัน โดยมีแบคทีเรียมากที่สุด ซึ่งจำนวนของแต่ละชนิดจะลดลงตามความลึกของดิน โดยจะพบจำนวนมากสุดที่ความลึกไม่เกิน 25 เซนติเมตรจากผิวดิน (Csuros, 1999 ; Saval, 2000) จากคุณลักษณะที่กล่าวมาจึงมีวิธีการบำบัดสารพิษในดิน โดยการเติมสารอาหารต่าง ๆ ลงในดินนั้น ๆ และเพิ่มปัจจัยต่าง ๆ ในการย่อยสลายและช่วยในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่าง ๆ มากมายหลายงานวิจัย (Korda และคณะ, 1997) แต่วิธีการนี้ไม่สามารถระบุการทำงานได้ชัดเจน เพราะในดินมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการและมีผลการทดสอบเฉพาะในดิน ซึ่งใช้เวลานานกว่าจะเห็นผล จึงมีแนวความคิดที่จะศึกษาการย่อยสลายโดยเชื้อผสม เช่น แบคทีเรียกับแบคทีเรีย (Bouchez และคณะ, 1995) แบคทีเรียกับรา (Boonchan และคณะ, 2000) ซึ่งช่วยให้สามารถอธิบายความสัมพันธ์ได้ชัดเจนขึ้นกว่าเดิม

การศึกษากำบัดทางชีวภาพในสิ่งแวดล้อมโดยกลุ่มแบคทีเรีย เริ่มจากการบำบัดสารไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนที่สามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติดังที่กล่าวมาแล้ว ในรายงานของปี ค.ศ.1975 ของ Horowitz และคณะ ซึ่งพบว่ามีเชื้อเดี่ยวใช้บางส่วนของสายไฮโดรคาร์บอนก่อน แล้วเกิดสายไฮโดรคาร์บอนใหม่ที่สามารถใช้ได้โดยแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เป็นสารอาหารในการเจริญเติบโต (Ghazali และคณะ, 2004) ต่อมาในปี ค.ศ.1984 Rambeloarisoa และคณะ ศึกษาแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์(6 สกุล) ซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถพิสูจน์ได้ว่ามี 3 สายพันธุ์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลาย เพราะเมื่อ

ขาดแบคทีเรียทั้งสาม ประสิทธิภาพการย่อยลดลงอย่างมาก เป็นการสนับสนุนทฤษฎีที่ว่า “แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ในกลุ่มแบคทีเรียสามารถช่วยย่อยสลายสารปนเปื้อนได้อาจต้องอาศัยการทำงานของสายพันธุ์อื่นในระบบในการดำรงชีวิต ซึ่งสารนั้นจะเป็นแหล่งพลังงานบางส่วนและแหล่งคาร์บอนที่หาได้ยากในขณะนั้น” เช่นเดียวกับรายงานของ Komukai-Nakamura และคณะ ในปี ค.ศ.1996 ที่พบว่า *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ T4 จะย่อยอัลเคนและไฮโดรคาร์บอนอื่น ๆ ในน้ำมันดิบชนิดเบาแล้วเกิดสารมัธยันต์ที่ถูกสะสมไว้ จากนั้น *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ PB4 จะใช้สารมัธยันต์ที่สะสมนั้นต่อไปและพร้อมกับย่อยสลายสารที่มีวงเบนซีนในน้ำมันดิบต่อไป จนหมดในเวลาต่อมา โดยคาดว่าเป็นการทำงานส่งเสริมกันและกันที่ละขั้นตอนของแบคทีเรียอย่างมีประสิทธิภาพ (Ghazali และคณะ, 2004) สอดคล้องกับการทดลองของ Bouchez และคณะ (1995) ที่ใช้แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ SNaPKa1 ที่สามารถใช้เนฟทาซีนได้และ *Pseudomonas* sp.สายพันธุ์ SPheNa1 ที่สามารถใช้พีแนนทรีนได้ เมื่อเติมเชื้อทั้งสองในภาวะที่มีเนฟทาซีนและพีแนนทรีน พบว่าสามารถลดเนฟทาซีนได้หมดและลดพีแนนทรีนได้ 83 % แม้ว่าเนฟทาซีนจะมีพิษต่อสายพันธุ์ SPheNa1 ก็ตาม และเมื่อใช้ *Rhodomonas* sp. SFltNa1 ร่วมกับ *Pseudomonas* sp.สายพันธุ์ SPheNa1 ที่สามารถใช้พีแนนทรีนและฟลูออแรนทีนได้ทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อเติมรวมกันพบว่ามีประสิทธิภาพการย่อยทั้งพีแนนทรีนและฟลูออแรนทีนสูงชันอย่างมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงคาดว่าการทำงานย่อยสาร PAHs ตามสภาวะจริงของสิ่งแวดล้อม(รวมกันมากกว่า 1 ชนิด) จะเกิดการทำงานร่วมกันของกลุ่มแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่นอย่างมีประสิทธิภาพสมบูรณ์ ดังผลการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียสกุล *Sphingomonas* 2 สายพันธุ์(*Sp.aromaticivorans* สายพันธุ์ B0695 และ *Sp. paucimibilis* สายพันธุ์ EPA505) ที่สามารถย่อยสลายสาร PAHs ที่วงเบนซีน 2-5 วง(6ชนิด) ในถังหมักที่เป็นแบบสองสถานะระหว่างน้ำกับโดเดเคน(dodecane) ได้ดีมากกว่าการใช้แบคทีเรียบริสุทธิ์และไม่เกิดผลกระทบจากสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Daugulis และ McCracken, 2003) ซึ่งการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรียเท่าที่ผ่านมามีดังตารางที่ 2.5

ในปัจจุบันพบว่าจำนวนของสายพันธุ์ของแบคทีเรียมีผลต่อการบำบัดไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดิน ดังรายงานของ Ghazali และคณะ(2004) ที่พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม 2 ที่ประกอบด้วยแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์(3 สกุล ประกอบด้วย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ S4.1 และ S5 กับ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S3.2, O63 และ 113i กับ *Micrococcus* sp. สายพันธุ์ S) สามารถย่อยอัลเคนและไฮโดรคาร์บอนสายสั้น(C₁₅-C₂₂) และพีรีนได้มากกว่าแบคทีเรียกลุ่ม 1 ที่ประกอบด้วย 3 สายพันธุ์(2 สกุล ประกอบด้วย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ S4.1 และ S5 กับ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S3.2) ผู้วิจัยคาดว่าแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ซึ่งเป็นแกรมบวกที่มีผนังเซลล์

หนากว่าและมีภาวะเอนโดสปอร์ ทำให้สามารถทนต่อพิษของสารปนเปื้อนได้สูงกว่าแกรมลบ อันน่าจะเป็นแบคทีเรียที่จะได้รับความสนใจศึกษาถึงความสำคัญในการบำบัดทางชีวภาพในอนาคต

ตารางที่ 2.5 แสดงกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้

| กลุ่มแบคทีเรีย | โคสับสเตรท | เอกสารอ้างอิง |
|--|----------------------------|-----------------------------------|
| Bacterial consortium F2 | เปปโตเน สารสกัดจากยีสต์ | Trzesicka-Mlynarz และ Ward (1995) |
| <i>Pseudomonas putida</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> + Flavobacterium sp. + Unclassified bacterium | เปปโตเน สารสกัดจากยีสต์ | Trzesicka-Mlynarz และ Ward (1995) |
| Bacterial consortium DC1 (4 gram negative rods) | ไม่มี | Smith และคณะ (1997) |
| Bacterial consortium VUN10,009 | ไม่มี | Boonchan และคณะ (2000) |
| The mixed culture (<i>Ps.fluorescens</i> + <i>Haemophilus</i> sp. + Unidentified gram negative rods 3 strains and cocci) | ไม่มี | Yuan และคณะ (2000) |
| Bacterial consortium (3 major strains: <i>Ps.fluorescens</i> and <i>Ps. aeruginosa</i> 2 strains) | พีแนทรีน | Ramivez และคณะ (2001) |
| Bacterial consortium | ไม่มี | Hwang และ Curright (2002) |

เนื่องจากพบว่ากลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสาร PAHs ที่น้ำหนักโมเลกุลสูงได้ จึงทำให้ผู้วิจัยพยายามแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เพื่อจะศึกษาความสำคัญและหน้าที่การทำงานในกลุ่มแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าเชื้อบริสุทธิ์ยังคงมีความสามารถในการย่อยพีแนทรีนได้ แต่ประสิทธิภาพต่ำกว่าเชื้อรวม (Yuan และคณะ, 2000) และเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ไม่มีศักยภาพดั้งเดิม แต่ส่งเสริมให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายของกลุ่มแบคทีเรียดั้งเดิมสูงขึ้นและมีการเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามเวลาในกลุ่มแบคทีเรีย ในขณะที่อัตราการย่อยสลายก็เพิ่มขึ้น (Kanaly และคณะ, 2002)

การทดลองในห้องปฏิบัติการแสดงให้เห็นว่ากระบวนการย่อยสลายโดยกลุ่มจุลินทรีย์ มีความสำคัญต่อการย่อยสลายสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ดังต่อไปนี้

Cerniglia และคณะ (1979) รายงานว่า *Beijerinckia* สายพันธุ์กลาย และ *Cunninghamella elegans* ร่วมกันย่อยสลายไดเบนโซฟลูแรน โดยราย่อยสลายไดเบนโซฟลูแรนได้ ทรานส์-ไดไฮโดรไดคอล แล้วแบคทีเรียจะย่อยสลายต่อจนได้คาทาคอล

ในปี 1996 Juhasz และคณะ รายงานว่า *Pseudomonas cepacia* สายพันธุ์ VUN 10,001 VUN 10,002 และ VUN 10,003 สามารถย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน ไดเบนซี [เอ,เอช] แอนทราซีน และไครซีน ที่มีโครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีน 5, 6 และ 4 ตามลำดับ เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงานได้

การศึกษาของ Boonchan และคณะ (2000) ใช้ *Penicillium janthinellum* สายพันธุ์ VUO10,004 ย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน ได้เป็นสารมัธยันตร์ที่ไม่ถูกย่อยสลายต่อ เมื่อนำ *Stenotrophomonas maltophilia* สายพันธุ์ VUN10,010 มาเลี้ยงร่วมกันกับราชนิดนี้ในอาหาร BSM เพื่อทำการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน พบการเจริญของแบคทีเรียและเกิดการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนได้อย่างสมบูรณ์

2.10 การเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดไพรีน

2.10.1 การเติมสารลดแรงตึงผิว

สารลดแรงตึงผิว เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มี 2 ส่วนสำคัญ คือ ส่วนที่มีประจุ(ขั้ว) กับ ส่วนที่ไม่มีประจุ(ไม่มีขั้ว) ซึ่งมีคุณสมบัติชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ผ่านมา พบว่ามีบางชนิดที่สามารถเพิ่มการละลายของไพรีนและสาร PAHs อื่นได้มากขึ้น ดังรายงานของ Madsen และ Kristensen (1997) เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยไพรีนในดินปนเปื้อนได้เกิน 50 % ในเวลา 42 วัน โดยเติม non-ionic surfactant ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อกรัมของดินในขณะที่บางชนิดยับยั้งการลดไพรีน แต่ส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โดยรวม ยกเว้นจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้(degraders) (Carmichael และ Pfaender, 1997)

2.10.2 ปุ๋ยหมักธรรมชาติ

เนื่องจากในปัจจุบันวิธีการบำบัดในพื้นที่ปนเปื้อนห้องปฏิบัติการสามารถในระดับหนึ่งเท่านั้น ซึ่งในสนามจริงต้องใช้ปริมาณหัวเชื้อสูงมาก และโอกาสการรอดชีวิตของแบคทีเรียมีจำกัด เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลกระทบต่อความอยู่รอดและศักยภาพในการย่อยสลายของแบคทีเรียผนวกกับปัจจุบันวัสดุทางการเกษตรและมูลสัตว์เหลืออยู่ในสิ่งแวดล้อมจำนวนมาก จึงมีการคิดนำมาใช้ในการบำบัดสารปนเปื้อน เพื่อให้แบคทีเรียท้องถิ่นใช้เป็นแหล่งอาหารและเป็นการลดระยะเวลาในทางอ้อม ซึ่งคาดว่าจะเกิดการย่อยสลายได้โดยตรงและแบบโคเมแทบอลิซึม

ปุ๋ยหมัก (compost) เป็นขบวนการทางชีวภาพที่จุลินทรีย์ทำการย่อยสลายและใช้สารประกอบอินทรีย์ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม เช่น ที่อุณหภูมิที่มากกว่า 50 °C ซึ่งสามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลาย การละลายของสารและอัตราการเคลื่อนที่ออกจากสิ่งที่ยับอยู่ ต้องมีอากาศถ่ายเท (ออกซิเจนมากกว่า 75 %) สำหรับการแตกโมเลกุลสารได้อย่างสมบูรณ์ (Wan และคณะ, 2003) โดยมีการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ 4 ขั้นตอน (Šašek และคณะ, 2003)

1. มีการเจริญของจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิ 30-45 °C (mesophilic microorganisms) ซึ่งมีความหลากหลายสูง
2. มีการเจริญของจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิ 45-75 °C (thermophilic microorganisms) และสามารถพบแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และราที่ทนร้อน
3. อุณหภูมิลดลง จะพบราที่ชอบอุณหภูมิ 30-45 °C
4. เกิดการย่อยสมบูรณ์ได้ปุ๋ยหมัก สารประกอบอินทรีย์ถูกใช้หมด ชนิดของจุลินทรีย์มีจำนวนคงที่และเนื้อปุ๋ยหมักมีสภาพคงตัว

ด้วยความหลากหลายของกิจกรรมและชนิดของจุลินทรีย์จึงมีประโยชน์ต่อการบำบัดทางชีวภาพ โดยไม่ต้องมีการดูแลยุ่งยากและต้นทุนต่ำ จึงมีการใช้ในการบำบัดไพรีนและสาร PAHs อื่นดังรายงานต่อไปนี้

Potter และคณะ (1999) รายงานว่าการเติมปุ๋ยหมักหรือสารอาหารแบบต่าง ๆ กันในดินที่ปนเปื้อนไพรีนและสาร PAHs อื่น ๆ สามารถลดปริมาณไพรีนได้อย่างรวดเร็วใน 4 สัปดาห์แรก แล้วคงที่ในสัปดาห์ที่ 8 โดยการลดลงอย่างช้า ๆ จนคงที่นั้น อาจเกิดจากจุลินทรีย์ไม่สามารถเข้าถึงและทำลายบางส่วนของไพรีนที่จับอย่างหนาแน่นกับอนุภาคดิน หรือ เกิดจาก long-term stress ซึ่งมีผลให้ผนังเซลล์เปลี่ยนองค์ประกอบ มีผลให้ผนังเซลล์มีความเสียด้านไพรีนและสาร PAHs ลดลง ทำให้ลักษณะการย่อยคงที่ (เพิ่มสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวไซโคลโพรเพนชนิด cyclo 19:0 ต่อ กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด 18:1w7cis ให้สูงขึ้น) หรือ ผลจากอุณหภูมิสูงในดินที่ทดลอง เพราะผู้วิจัยเคยพบว่าที่สูงกว่า 60 °C ทำให้จุลินทรีย์ที่ย่อยพีแนทรีนหายไป จากการทดลองนี้สามารถลดสาร PAHs ที่มี 2-3 และ 4 วงแหวนเบนซีนได้ประมาณ 87 และ 61 %

ตามลำดับ แต่ไม่สามารถลดที่มี 5-6 วงแหวนเบนซีนได้ เมื่อพิจารณาไพรีน พบว่าการเติม 1 % activated sludge ในดินปนเปื้อนลดไพรีนได้สูงสุดเท่ากับ 76.5 %

Haderlein และคณะ (2001) เติมนุ้หมักไบโเมเปิลและหญ้าอัลฟาฟาอายุ 1 เดือนในดินปนเปื้อนสาร PAHs 630 มก.ต่อกก.ดิน ที่มีไพรีน 130 มก.ต่อกก.ดิน ทิ้งได้ 3 เดือน พบว่าสามารถลดไพรีนเหลือประมาณ 16 มก.ต่อกก.ดิน และทำให้กรดฮิวมิคเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า เมื่อดินที่เติมนุ้หมักเติมในดินปนเปื้อนไพรีน พบว่าสามารถลดไพรีนได้มากกว่า 50 % ภายใน 15 วัน ดึกว่าการเติมกรดฮิวมิคอย่างเดียว ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการลดไพรีน เช่น การเพิ่มแหล่งอาหาร วิตามิน แร่ธาตุ จุลินทรีย์ประจำถิ่น หรือการเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของออกซิเจนในระหว่างที่เกิดการหมัก

Šašek และคณะ (2003) เติมนุ้หมักจากเศษเห็ด(white button mushroom, *Agaricus bisporus*) ผสมกับ ฟางข้าว มูลไก่และยิบซั่ม จากนั้นเติมในดินปนเปื้อนสาร PAHs พบว่าสามารถลดสาร PAHs แต่ละชนิดได้ 37-80 % ภายในเวลา 100 วัน โดยลดไพรีนได้ 51 % (131.7 ± 3.4 เหลือ 67.4 ± 2.8 มก.ต่อกก.ดิน)

Wan และคณะ (2003) เติมนุ้หมักของเสียจากโรงงาน(sewage sludge)และกากถั่วเหลือง ในดินที่เติมพีแนนทรีน แอนทราซีนและไพรีน พบว่าลดสาร PAHs ได้สูงสุดในวันที่ 4 ถึง 30 หลังจากเติมนุ้หมักแต่ละชนิดและมีแบคทีเรียเพิ่มสูงสุด โดยไพรีนมีเวลาก่อนการลด 14 วัน และการเติมนุ้หมัก 3 ชนิด พบว่ามูลสุกรมีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs ดีที่สุด โดยคาดว่าสาร PAHs นั้นเกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์เป็นสำคัญ

Charoenchang และคณะ (2003) พบว่าการเติมวัสดุทางการเกษตรได้แก่ เปลือกถั่วลิสงและไบจามจุรี สามารถช่วยเร่งการย่อยสลายสาร PAHs ในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยลดไพรีนจนตรวจไม่พบภายในเวลา 42 วันของการทดลอง ซึ่งคาดว่าเกิดจากการทำงานของแบคทีเรียที่อยู่บนวัสดุทางการเกษตร

สุพินดา ศิริวราศิลป์ (2545) ใช้ไบโม่ของพืชตระกูลถั่วที่ร่วงหล่น(ไบจามจุรี ไบมะขามและไบนนทรี) เติมนดินที่ถูกปนเปื้อนด้วยไพรีน พบว่าไบมะขามสามารถลดไพรีนได้หมด ภายใน 56 วัน รองลงมาคือ ไบจามจุรีและไบนนทรี และเมื่อปรับพารามิเตอร์ให้เหมาะสมด้วยแล้ว พบว่าการย่อยสลายไพรีนเพิ่มขึ้นเป็น 93 % จาก 75 % ในขณะที่เดียวกันจำนวนแบคทีเรียที่เกิดวงไฮบิจานเลี้ยงเชื้อที่ปนทับด้วยไพรีนก็เพิ่มขึ้นอย่างสอดคล้องกันกับการลดลงของไพรีน

จากผลการทดลองที่มีรายงาน อาจสรุปได้ว่าการลดของไพรีนและสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดินเกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ที่อยู่บนเศษวัสดุและปุ๋ยหมักที่เติม ดังนั้นแบคทีเรียที่อยู่ในปุ๋ยหมักนั้นจึงมีความสำคัญต่อการบำบัดไพรีนในสิ่งแวดล้อม

2.11 ความสัมพันธ์ระหว่างพืชและจุลินทรีย์ในการบำบัดทางชีวภาพ

การบำบัดสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยพืชที่เกี่ยวกับจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่นักวิจัยมุ่งศึกษาสภาพแวดล้อมบริเวณรากพืช (Rhizosphere) ซึ่งรากพืชช่วยป้องกันการกัดกร่อน ให้ความมั่นคงและเพิ่มปริมาณและชนิดจุลินทรีย์ สารจากรากพืช (root exudates) อาจจะเป็น co-substrates ในการย่อยสลายสารพิษของจุลินทรีย์ โดยการกระตุ้นชุดยีนที่ถูกต้องในการย่อยสลายสารได้ ในขณะที่เดียวกันรากพืชยังเปลี่ยนสภาพของรูในดิน เป็นการเพิ่มการไหลเวียนอากาศ ดังที่กล่าวมาสามารถอธิบายถึงประโยชน์ของรากพืชได้ดังนี้ (Romantschuk และคณะ, 2000)

1. ช่วยรักษาแบคทีเรียเป้าหมายให้มีจำนวนสูงตลอดเวลาที่บริเวณราก
2. สร้างสภาวะพลังงานสูง ทำให้เกิดการ ทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายได้
3. ผลของความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่ย่อยสลายได้บริเวณรากพืช ทำให้จุลินทรีย์อื่นที่มีประโยชน์สามารถช่วยย่อยสลายได้ เช่น รากที่สามารถย่อยสลายร่วม(co-degrade) ของสารชนิดเดียวกันหรือสารมัธยันต์ที่ได้จากแบคทีเรีย ให้ถูกย่อยต่อไปจนสมบูรณ์
4. รากพืชบางชนิดอาจผลิตสารบางชนิดที่เป็นสารอาหารร่วม(co-substrates)ตามธรรมชาติ ออกมาช่วยในการย่อยสลายของแบคทีเรีย เมื่อสารปนเปื้อนมีอยู่ในระดับต่ำ
5. ไม้ยืนต้นส่งเสริมให้แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกัน มีชีวิตอยู่ได้ตลอดปี
6. รากพืชพาจุลินทรีย์ไปยังดินชั้นต่าง ๆ ได้ โดยไม่ต้องมีการผสมกลับหน้าชั้นดิน
7. พืชยึดอยู่บนผิวดิน ช่วยป้องกันการชะล้างหน้าดินและน้ำท่วมที่พัดทำลายหน้าดิน มีผลให้สารพิษไม่ถูกพาขึ้นสู่ผิวดิน
8. พืชช่วยเก็บน้ำไว้ ช่วยลดอัตราการไหลของน้ำ เป็นการชะลอการแพร่สู่น้ำผิวดินของสารพิษ
9. พืชอาจเก็บสะสมโลหะหนักจากดินไว้ในต้นพืช
10. พืชทำตัวเป็นผู้เติมแต่งความงามตามธรรมชาติให้กับพื้นที่ที่ถูกปนเปื้อนให้ดูดีขึ้น

Romantschuk และคณะ (2000) รายงานว่าดินที่ปนเปื้อน ถ้าไม่มีพืชในภาวะที่มีสารปนเปื้อน และแบคทีเรียที่สามารถย่อยสารปนเปื้อนนั้นได้ ความเข้มข้นของสารปนเปื้อนนั้นลดลง อาจเกิดจากแบคทีเรียชนิดนั้นตายไปเพราะไม่มีพืชที่ให้สารบางอย่างอยู่ร่วมด้วย ถึงอย่างไรควรที่จะดูความเหมาะสมของพืชและแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ที่จะใช้บำบัด ว่าจำเป็นจะต้องอยู่ร่วมกันจริงหรือไม่ก่อนทำการบำบัดจริง เพราะหากมีข้อมูลไม่เพียงพอ อาจเกิดผลเสียมากกว่าผลดีตามมาภายหลังได้ เช่น พืชเป็นโรคและตาย จุลินทรีย์ตายไม่สามารถลดสารปนเปื้อนได้

2.12 การปนเปื้อนสาร PAHs ในพืช (Bakker และคณะ, 2000)

สาร PAHs เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของสารประกอบอินทรีย์กึ่งระเหย (semivolatile organic compounds, SOCs) ที่มีความดันไอระหว่าง 10^{-6} ถึง 10 พาสคาล ในปี ค.ศ.1980 พบว่าในใบสนและใบของต้นไม้สะสมสารข้างต้นจากอากาศและเป็นที่ยอมรับกันว่า สารเหล่านี้จะถ่ายทอมาสู่คนและสัตว์โดยผ่านทางพืชที่รับประทานเข้าไป (รูปที่ 2.1) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดขึ้นในประเทศที่พัฒนาได้รับจากอาหารที่ทำจากธัญพืช น้ำมันและไขมันจากพืช และผักต่าง ๆ พืชเป็นเสมือนที่รองรับสารเหล่านี้ ซึ่งในปี ค.ศ.1994 พบว่า 44 % ของสาร PAHs ที่ปล่อยออกมาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของสหรัฐอเมริกาถูกดูดซับโดยพืช อย่างไรก็ตามตั้งแต่หลังจากเก็บตัวอย่างหลายแห่งให้มากขึ้น ในปี ค.ศ.1997 พบว่าค่าการดูดซับได้ลดลงเป็น 4 % โดยแสดงให้เห็นว่าป่าไม้ทำตัวเป็นตัวกรองสารอินทรีย์เหล่านี้จากอากาศในท้ายที่สุดแล้วก็คือ สารประกอบที่ไม่ชอบน้ำอย่างมาก ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์แบ่งละลายระหว่างออกทานอลกับอากาศมีค่าสูง ($\log K_{ow}$ อยู่ระหว่าง 7 และ 11) ซึ่งเป็นช่วงที่บอกว่ามีปริมาณสาร PAHs, PCBs, PCDD/Ps อย่างมาก

โดยทั่วไปพืชสามารถเป็นที่รองรับได้เพียงชั่วคราว เพราะพืชจะมีอายุอยู่เพียงเวลาหนึ่งเท่านั้น การร่วงของใบไม้และกิ่งก้านและแขนงของต้นไม้ การหลุดลอก ลีกร่อนของชั้นไข (wax layers) เกิดจากกระแสน้ำลม ฝน และหรือ การขูดและเสียดสีใบไม้ เป็นเหตุให้สาร PAHs ที่ถูกสะสมไว้เข้าไปปนเปื้อนในดิน(รูปที่ 2.1) นอกจากนี้ มีบางรายงานว่าหลังจากนั้นจะถูกทำลายโดยแสงแดด (Photodegraded) แต่ยังไม่มีการทดลองสนับสนุน ท้ายนี้การปนเปื้อนในพืชจะถูกนำไปติดตามมลพิษทางอากาศ เพราะว่าพืชมีการปนเปื้อนอยู่ตลอดเวลาและเก็บได้มากกว่าตัวอย่างอากาศ ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้แหล่งกำเนิดและบ่งบอกระดับการปนเปื้อนของแต่ละแหล่งได้ในเชิงคุณภาพ ตัวอย่างเช่น จากการเปรียบเทียบตัวอย่างพืชทั่วโลก พบว่าสามารถบอกผลกระทบการกลั่นตัว/รวมตัวของสารนี้ของโลกได้ อาทิ สารนี้จะถูกพัดพาจากบริเวณอบอุ่นไปยังบริเวณที่เย็นกว่าที่ซึ่งเกิดจากการควบแน่น ลักษณะการสะสมสารเหล่านี้มีอยู่สองสภาวะแบ่งเป็น

- 1.สภาวะสมดุล โดยพืชสะสมสารนี้ แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปริมาณและส่วนประกอบของไขของใบพืชแต่ละชนิด และอุณหภูมิมีผลกระทบอย่างมาก
- 2.สภาวะไม่สมดุล โดยพืชสะสมสารนี้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับอายุ พื้นที่และโครงสร้างของใบพืชแต่ละชนิด และอุณหภูมิไม่ค่อยมีผลกระทบ เพราะต้องอาศัยเวลา โดยเฉพาะสารที่มีค่า $\log K_{ow}$ สูง ๆ กระแสน้ำลมมีผลกระทบ โดยเพิ่มการปนเปื้อนเมื่อแรงลมเพิ่มและลดความหนาของชั้น laminar boundary ลง

หลังจากที่สาร PAHs สัมผัสบนใบหรือลำต้นของพืช จะถูกส่งผ่านไปชั้นคิวติเคิล (cuticle) (ชั้นนอกสุดของใบพืชที่มีลักษณะเหมือนไขมันที่กั้นระหว่างอากาศกับพืช) หรือ

บางครั้งอาจเป็นไปได้ว่าสารนี้จะถูกดูดซับไว้ที่รากพืช(ส่วนที่ละลายน้ำ) เช่น รากของพืชในวงศ์ *Cuburbitaceae* (*Zucchini*, *pumkin*) ที่สามารถสร้างสารคัดหลั่งจากราก(*root extract*) ที่ซึ่งช่วยเพิ่มการดูดซับสารกึ่งระเหยชนิดนี้ได้ (Bakker และคณะ, 2000) การสะสมสาร PAHs ของพืชกล่าวในภาคผนวก จ

2.13 แบคทีเรียคัดแยกจากพืชที่สามารถย่อยสลายสาร PAHs ได้

เนื่องจากว่าพืชสามารถสะสมสาร PAHs และจุลินทรีย์สามารถอาศัยอยู่บนใบพืชได้ เช่นเดียวกัน (ภาคผนวก จ) รวมทั้งการเติมปุ๋ยหมักจากเศษพืชสามารถลดสาร PAHs ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงน่าจะมีความเป็นไปได้ว่าในใบไม้ธรรมชาติมีจุลินทรีย์ที่สามารถใช้สารปนเปื้อนนี้ได้

โดยมีผู้คัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์จากใบและเปลือกของต้นยูคาลิปตัสและต้นสนที่ถูกย่อยสลายบางส่วน พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายพีแนนทรีน สารประกอบคลอรีนและ nitroaromatic เช่น ดีดีที และสารมัลชันต์ได้ ซึ่งผู้วิจัยคิดว่าสารประกอบธรรมชาติในพืชอาจกระตุ้นยีนของจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายสารประกอบเหล่านี้ (Juhasz และ Naidu, 2000b) รวมทั้งบริเวณรากพืชที่เจริญในที่ปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอน ซึ่งบริเวณตะกอนดินชายฝั่งปากแม่น้ำ โดยพบว่าพืชที่ใช้แยกทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *Distichlis spicata*, *Juncus gerardi*, *Phragmites australis*, *Spartina alterniflora*, และ *Sporobolus airoids* มีแบคทีเรียที่สามารถใช้สาร PAHs ได้ 3 สกุล คือ แกรมลบสกุล *Pseudomonas* แกรมบวกที่ไม่สร้างสปอร์ Nocardioforms และแกรมบวกที่สร้างสปอร์สกุล *Paenibacillus* แต่ไม่มีสายพันธุ์ใดใช้ไฟรีนได้ ยกเว้น สายพันธุ์ PR-P1 (*Paenibacillus validus*) และ PR-P3 (*Arthrobacter oxydans*) ที่สามารถลดไฟรีนในดินได้ 94 และ 78 % ตามลำดับ เมื่อเติมหัวเชื้อเข้มข้น 10^9 เซลล์ต่อมล. โดยคาดว่า การลดของไฟรีนเกิดจากความสัมพันธ์แบบส่งเสริมร่วมกันอย่างจำเพาะระหว่างแบคทีเรียที่เติมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นในตะกอนดิน (Daane และคณะ, 2001)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ในการทดลอง

1. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA.
2. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
3. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) ของบริษัท Kokusan, Japan.
4. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO larminar flow รุ่น BVT-124 ของบริษัท International Scientific Supply, USA.
5. เครื่องเขย่า (Gyrotory shaker) รุ่น G10 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.
6. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -70° C ของบริษัท Forma Scientific, USA.
7. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -20° C ของบริษัท Sanyo Electric, Japan
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
9. ตู้บ่มเชื้อ (Contherm digital series cooled incubator) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand.
10. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ของบริษัท Memmert, Germany.
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Bench-top centrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan.
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งพื้น (Centrifuge) รุ่น ของบริษัท Kubota, Japan.
14. ตู้อบแห้ง (Contherm digital series oven) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand.
15. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 20, 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France.
16. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.

17. เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น N-N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
18. กระจกฉีดยาพลาสติกขนาด 1, 5 และ 10 มล. ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
19. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดช่อง 0.2 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
20. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตต ขนาด 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-25CS ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
21. แผ่นกรองชนิด FH ขนาดช่อง 0.5 ไมโครเมตร ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan. Disposable micropipette. ของบริษัท E. Merck, Germany.
22. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
23. ชุดเครื่องมือไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High performance liquid chromatography, HPLC) (สำหรับตรวจสอบปริมาณ PAHs ที่เหลือและตรวจสอบสารมัธยันตร์)
 - ลิควิดโครมาโตกราฟี (Liquid chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
 - คอลัมน์ (Column) : Senshu Pak Pegasil ODS ขนาด 4.6 × 150 มม. ของบริษัท Senshu Scientific, Japan
 - เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-2A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
 - เครื่องบันทึก (Recorder) Chromatopac รุ่น C-R1A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
24. กระจกฉีดยาแก้วขนาดเล็ก (Microsyringe) รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, USA.
25. ชุดเครื่องมือ Mini Sub-Cell GT agarose gel eletrophoresis system ของบริษัท Bio-Rad, USA.
26. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (Thermo-block) รุ่น MylabTH Thermo-Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea.
27. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (Cryotube) ของบริษัท Nalgene, USA.

3.2 เคมีภัณฑ์

1. อะซีแนฟทีลีน (acenaphthylene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
2. อะซีแนฟทีน (acenaphthene) ของบริษัท Sigma, USA
3. ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) ของบริษัท Sigma, USA
4. ฟลูออรีน (fluorene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
5. ฟลูออแรนทีน (fluoranthene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
6. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
7. แอนทราซีน (anthracene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
8. ไครซีน (chrysene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
9. เบนโซ(เอ)ไพรีน (benzo(a)pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
10. กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy
11. ไดเมทิลซัลโฟกไซด์ (CH_3SOCH_3) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy
12. แบคโตอะการ์ (bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
13. โซเดียมซัลไฟด์ (Na_2S) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia
14. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia
15. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดเดคาไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy
16. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia
17. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy
18. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท May & Baker, England
19. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia
20. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
21. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
22. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E. Merck, Germany
23. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merck, Germany
24. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia
25. เมทานอล (CH_3OH) ของบริษัท E. Merck, Germany
26. เอทิลอะซิเตต ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) ของบริษัท E. Merck, Germany
27. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮไดรรัส (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท E. Merck, Germany
28. นอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) ของบริษัท J.T. Baker, USA

29. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

เก็บตัวอย่างใบไม้ของพืชตระกูลถั่ว (วงศ์ Leguminosae) ได้แก่ ใบจามจุรี ใบมะขาม ใบนนทรี ใบมะขามเทศ และใบกระถินณรงค์ ที่ปนเปื้อนควั่นหรือไอเสียเครื่องยนต์จากบริเวณที่มีการจราจรหนาแน่นเป็นเวลานาน (ตารางที่ 3.1) โดยเก็บใบไม้ที่ค่อนข้างแห้งมาล้างให้แห้ง คัดแยกเอาเฉพาะใบ ปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องสำหรับปั่นน้ำผลไม้ โดยมีลักษณะทางกายภาพก่อนและหลังปั่นดังแสดงในรูปที่ 3.1 แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำมาใช้ โดยใบมะขามจาก จ.ชลบุรี สามารถกระตุ้นการย่อยสลายไพรีนและพีแนทรีนที่เติมในดินได้ ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากจุลินทรีย์บนใบที่คล้ายเคยกกับเขม่าจากการเผาต้นข้าวในทุ่งนาเป็นเวลานาน (สุพินดา ศิริวราศิลป์, 2545) เพราะเขม่าเกิดจากการรวมตัวกันของสาร PAHs จนเป็นก้อนสีดำ (Warnatz, 2001) ใบกระถินณรงค์มีขนาดใหญ่ที่สุด ซึ่งมีโอกาสสัมผัสไอเสียจากรถยนต์มากที่สุด รองลงมาคือ ใบจามจุรี ใบมะขามและใบมะขามเทศ ตามลำดับ ใบจามจุรี ใบมะขามเทศและใบนนทรีมีขนาดเล็ก เป็นลักษณะที่มักพบแบคทีเรียมากกว่า (Yadav และคณะ, 2004)

ตารางที่ 3.1 แสดงชนิดและสถานที่เก็บใบพืชตระกูลถั่ว

| ลำดับที่ (ชื่อย่อ) | ชนิดของใบไม้ | บริเวณที่เก็บ |
|--------------------|--------------|------------------------------------|
| 1 (TRF) | มะขาม | สนามหลวง กทม. |
| 2 (TAF) | มะขาม | ทุ่งนา อ.เมือง จ.ชลบุรี |
| 3 (MCT) | มะขามเทศ | ตีภาควิชาเคมีเทคนิค จุฬาย กทม. |
| 4 (KOR) | กระถินณรงค์ | เกาะกลางถนนอังรีดูนังท์ กทม. |
| 5 (RJJ) | จามจุรี | ตึกจุลจักรพงษ์ จุฬาย กทม. |
| 6 (RRM) | จามจุรี | พระบรมรูปสองรัชกาล จุฬาย กทม. |
| 7 (FCM) | นนทรี | ทางเดินเท้าหน้าคณะบัญชี จุฬาย กทม. |

ก



ข



รูปที่ 3.1 แสดงใบไม้ก่อน (ก) และหลังบั่น (ข)

3.3.1 คัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไฟรีนจากเศษใบไม้ โดยวิธี

Enrichment culture technique

การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไฟรีนจากเศษใบไม้

เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียโดยการเติมเศษใบไม้ที่เตรียมได้ในข้อ 3.3 ปริมาณ 1 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารเหลว CFMM (carbon-free minimal medium) ที่มีสารสกัดจากยีสต์ 0.05 % ปริมาตร 100 มล. (Komukai-Nakamura และคณะ, 1996 และ Daane และคณะ, 2001) เขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดังตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เศษใบไม้และอนุภาคขนาดใหญ่ตกตะกอน จากนั้นในส่วนน้ำใสปริมาตร 5 มล. เติมน้ำลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ซึ่งบรรจุอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 45 มล. และเติมไฟรีนในรูปสารละลายไฟรีนในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของไฟรีนเท่ากับ 0.1 มก. ต่อมล. และอีกชุดเติมไฟรีนรวมกับพีแนทรีนที่ความเข้มข้นชนิดละ 0.1 มก. ต่อมล. เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานของแบคทีเรีย เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °C สังเกตการเจริญของแบคทีเรียจากความขุ่นของอาหารเหลวที่เพิ่มขึ้น การเปลี่ยนสีของอาหารเหลว และการลดลงของผลึกไฟรีนเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ถ่ายอาหารเหลวที่พบการเจริญของแบคทีเรียปริมาตร 5 มล. ลงในอาหารเหลวชนิดเดิมที่เตรียมใหม่ โดยทำขั้นตอนนี้ซ้ำทั้งหมด 5 ครั้ง เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไฟรีนให้มากขึ้น (Wackett, 2001)

การคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไฟรีน

นำอาหารเหลวที่มีการเจริญของแบคทีเรียหลังจากถ่ายเชื้อ 5 ครั้งมาเจือจางให้ ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ และนำไปเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารแข็ง CFMM แล้วพ่นทับผิวหน้าอาหารแข็งด้วยสารละลายไฟรีน 2 % ในไดเอทิลอีเทอร์ บ่มอาหารแข็งที่ 30 °C จนกระทั่งพบการเจริญของแบคทีเรียโดยแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไฟรีนได้จะสร้างบริเวณใสล้อมรอบโคโลนีบนผิวหน้าของอาหารแข็ง (Kiyohara และคณะ, 1982) นำโคโลนีนั้นมาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีไฟรีนเข้มข้น 0.1 มก. ต่อมล. อีกวิธีคือหลังจากที่เกลี่ยเชื้อเรียบร้อยแล้ว นำผลึกไฟรีนที่บดเป็นผงมาวางที่ฝาให้มีปริมาณเท่ากับหัวไม้ขีดไฟ จากนั้นเคาะเบา ๆ ให้กระจายทั่วฝา โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ เสร็จแล้วพันรอยต่อระหว่างฝากับตัวจานเพาะเชื้อให้สนิทด้วยเทปกาว เพื่อป้องกันไอระเหยของไฟรีนออกมาภายนอกและลดการระเหยของน้ำในอาหารแข็ง (Carvalho และคณะ, 2002) บ่มอาหารแข็งที่ 30 °C จนพบการเจริญของโคโลนีแบคทีเรีย

ซึ่งแสดงว่าสามารถใช้ไอไพรีนได้ เก็บเชื้อโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีนเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญอยู่ในช่วงท้ายของช่วงลอการิทึม นำอาหารเหลวบรรจุลงในหลอดแช่แข็ง (cryotube) และเติมกลีเซอรอลปลอดเชื้อ 50 % ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 หรือ -70 °C (ณัฐพันธุ์ ศุภกา, 2542)

การจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

แยกกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง LB และลักษณะการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ร่วมกับการจำแนกด้วยลักษณะทางสรีระวิทยาและทางชีวเคมีตามคู่มือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt และคณะ, 1994)

3.3.2 การศึกษาการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้โดยใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน

เตรียมหัวเชื้อของกลุ่มแบคทีเรียโดยเกลี่ยกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ซึ่งเจริญในอาหารมีไพรีนอายุ 3 วัน ด้วยไม้ปั่นสำลีที่ปราศจากเชื้อบนอาหารแข็ง CFMM ที่มีโซเดียมซัคซิเนตเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. เลี้ยงเชื้อในตู้อบ อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบเวลาให้ใช้ไม้ปั่นสำลีปราศจากเชื้อชุดเซลล์มาละลายในสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ วัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและเจือจางให้ได้ค่าเท่ากับ 0.1 แล้วเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 16 – 18 ชม. เพื่อทำให้เป็น resting cells (Grifoll และคณะ, 1995)

เติมเซลล์แขวนลอย(หัวเชื้อ)ของ resting cells ปริมาตร 0.1 มล.ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีไพรีนเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. ในหลอดทดลองขนาด 22 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °C เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 14 วัน โดยมีชุดควบคุม 2 ชุด คือ ชุดมีอาหารที่มีไพรีนแต่ไม่เติมหัวเชื้อและชุดอาหารเติมหัวเชื้อแต่ไม่มีไพรีน ซึ่งชุดควบคุมและชุดทดลองทำ 2 และ 3 ซ้ำ ตามลำดับ ติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยรวมด้วยวิธี Total plate count และติดตามไพรีนด้วยวิธีสกัดไพรีนที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวตามวิธีของ Grifoll และคณะ(1992) เก็บตัวอย่างที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะวิเคราะห์ด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC)

วิธีการสกัดไพรีนและสาร PAHs อื่นที่เหลืออยู่ในอาหารเหลว (Grifoll และคณะ1992)

ทำการปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเหลวในเป็นกรดที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง จากนั้นเติมเอทิลอะซีเตท 5 มล. ปั่นผสมที่ความเร็วสูงเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น เก็บของเหลวส่วนชั้นบนใส่ในหลอดทดลองขนาด 22 มล. อันใหม่ เติมเอทิลอะซีเตทปริมาตรเท่าเดิมในอาหารเหลวเดิม ให้ทำการสกัดข้างต้นอีก 2 ครั้ง (รวมเป็นสกัด 3 ครั้ง) โดยรวบรวมส่วนเอทิลอะซีเตทเข้าด้วยกัน หลังจากนั้นให้เติมไซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสในส่วนเอทิลอะซีเตท เพื่อกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ ผสมด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงจนกว่าส่วนของเหลวแยกจากกันไซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสอย่างชัดเจน(ทำการกำจัดน้ำได้สมบูรณ์) ถ่ายส่วนของเหลว(เอทิลอะซีเตท)ใส่ในขวดรูปชมพู่ของเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน(ขดลวดปริมาตร) จากนั้นระเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน เมื่อแห้งสมบูรณ์ให้เติมเมทานอลเข้มข้น(95%) 1 มล. เขย่าแบบหมุนให้ละลายไพรีนหรือสาร PAHs อื่นออกมาทั้งหมด ใช้กระบอกฉีดยาเบอร์ 21 ดูดสารละลายแล้วกรองผ่านหัวกรองไม่ชอบน้ำชนิด PTFE ภูขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บใน eppendorf tube ขนาดความจุ 1.5 มล. พันรอบฝาปิดด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยวิธี HPLC

การวิเคราะห์ HPLC ฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้คอลัมน์ Senshu Pak Pegasil ODS (C_{18}) ที่อุณหภูมิ 40°C เครื่องตรวจรับแบบยูวีที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ใช้สารละลาย 80 % เมทานอลเป็นตัวพาและอัตราการไหลเท่ากับ 1 มล.ต่อนาที นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่างไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณของสารตัวอย่างในชุดทดลอง

การวัดการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย

นำอาหารเหลวที่เลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย 100 ไมโครลิตร มาเจือจางให้เหมาะสมด้วย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ แล้วนำ 100 ไมโครลิตรเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB บ่มเชื้อ 30°C เป็นเวลา 5 วันแล้วนับจำนวนโคโลนี

3.3.3 ศึกษาการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้โดยการใช้สารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2 แต่เปลี่ยนไฟรีนเป็นสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น ได้แก่ อะซีแนพทีน อะซีแนพธาดีน ฟลูออรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนทีรีน ไครซีน และเบนโซ(เอ)ไพรีน และเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน

3.3.4 ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนแบบโคเมตาบอลิซึมโดยกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้

นำสาร PAHs ทดสอบที่แบคทีเรียไม่สามารถใช้ในการเจริญได้โดยตรงในข้อ 3.4 มาทดสอบการย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิซึมร่วมกับไฟรีน โดยวิธีการเตรียมหัวเชื้อและขั้นตอนการทำเหมือนกับข้อ 3.3.2 โดยเติมสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดที่ไม่ย่อยสลายได้ในข้อ 3.3.3 ร่วมกับไฟรีนในความเข้มข้นชนิดละ 0.1 มก.ต่อมล.

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 คัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนจากเศษใบไม้โดยวิธี Enrichment culture technique

เมื่อทำการคัดแยกเชื้อจากเศษใบไม้ที่เตรียมได้ในข้อ 3.1 พบว่าการใช้ไพรีนเป็นแหล่งอาหารเพียงอย่างเดียวไม่สามารถเพิ่มจำนวนแบคทีเรียได้ จึงต้องใช้ร่วมกับพีแนทรีนในปริมาณที่เท่ากัน โดยคาดว่าน่าจะเกิดการใช้ไพรีนแบบโคเมแทบอลิซึม ซึ่งพีแนทรีนถูกใช้เป็นโคสับสเตรต (co-substrate) ร่วมกับไพรีน เป็นการเพิ่มโอกาสของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารดังกล่าวให้มากขึ้น (Bouchez และคณะ, 1999 ; Supaka และคณะ, 2001) พบว่าวิธีนี้สามารถเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียและตรวจความสามารถในการย่อยสลายไพรีนได้ โดยติดตามการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวเป็นสีน้ำตาลส้ม ซึ่งอาจเกิดจากสารสะสมสารมัธยันต์ชนิด catechol-like compounds meta-ring และ cleavage compounds ที่เกิดจากการย่อยสลายสาร PAHs โดยจุลินทรีย์ (Mueller และคณะ, 1989) การลดลงของผลึกไพรีน การเจริญบนอาหารแข็งปราศจากแหล่งคาร์บอนแต่ได้รับไอของไพรีน (เจริญภายใน 7-14 วัน) และการเกิดวงใสรอบโคโลนี (เจริญภายใน 1-3 เดือน) (รูปที่ 4.1) ซึ่งจากการสังเกตดังกล่าวทำให้ได้กลุ่มแบคทีเรียต่างๆ ที่ใช้ไพรีนในการเจริญได้จากใบไม้เกือบทุกชนิด ยกเว้น ชนิดที่ 1 3 และ 7 (ตารางที่ 3.1)

หลังจากนั้นจึงคัดเลือกกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยการติดตามการลดไพรีนภายใน 30 วัน ด้วยวิธีสกัดแล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ผลการทดลองได้แสดงในตารางที่ 4.1 เลือกกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และ TAF-CZ1 ซึ่งสามารถลดไพรีนได้หมดมาเปรียบเทียบการลดไพรีนภายใน 14 วัน เพื่อจะคัดว่ากลุ่มแบคทีเรียใดลดไพรีนได้เร็วที่สุด ซึ่งพบว่ากลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากใบจามจุรีจากแปลงปลูกต้นชบาข้างพระบรมรูปสองรัชกาลชื่อกลุ่ม RRM-V3 มีประสิทธิภาพในการลดไพรีนได้เร็วที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่มที่แยกได้จากใบมะขาม ชื่อกลุ่ม TAF-CZ1 ซึ่งได้จากเทคนิควางผลึกที่ฝาจานเพาะเชื้อและเกิดวงใสรอบโคโลนี ตามลำดับ (รูปที่ 4.2) ดังนั้นจึงเลือกกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จากใบจามจุรีมาศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลือในอาหารเหลวที่เติมกลุ่มแบคทีเรียจาก การคัดแยกทั้งสองเทคนิคจากไปไม้ต่าง ๆ โดยเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

| กลุ่มแบคทีเรีย | ปริมาณไพรีนที่เหลือ (%) |
|-------------------------------|-------------------------|
| <u>เทคนิควางผลึกไพรีน</u> | |
| ไบจามจุรี | |
| RRM-V1 | 1.02 |
| RRM-V2 | 0.80 |
| RRM-V3 | 0.00 |
| RRM-V4 | 3.70 |
| RRM-V5 | 0.08 |
| RJJ-V1 | 0.14 |
| RJJ-V2 | 0.33 |
| ไบมะขาม | |
| TAF-V1 | 77.80 |
| TAF-V2 | 0.70 |
| TAF-V3 | 1.04 |
| TAF-V4 | 79.80 |
| <u>เทคนิคปั่นทับด้วยไพรีน</u> | |
| ไบมะขาม | |
| TAF-CZ1 | 0.00 |
| TAF-CZ2 | 5.80 |
| TAF-CZ3 | 15.00 |
| ไบกระถินณรงค์ | |
| KOR-CZ1 | 32.90 |
| KOR-CZ2 | 70.60 |
| KOR-CZ3 | 55.60 |

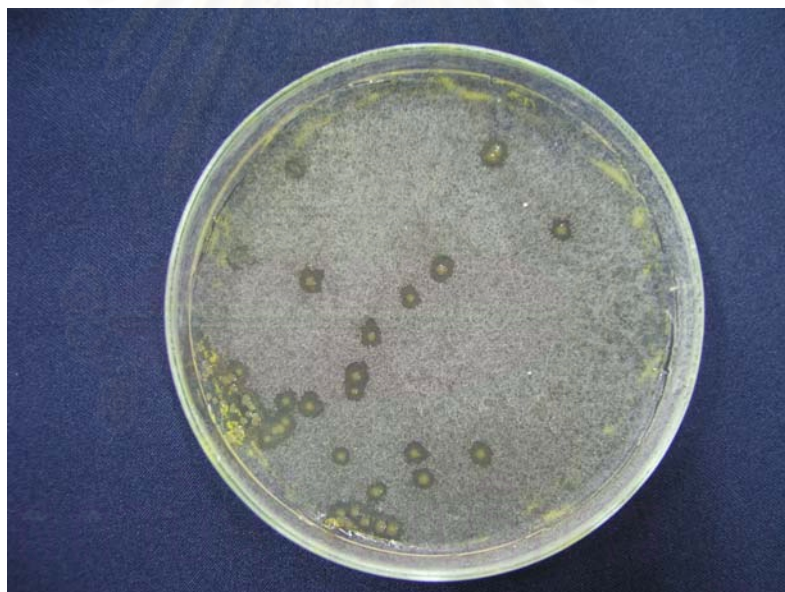
หมายเหตุ - รายละเอียดของสถานะการเลี้ยงกล่าวในวิธีการทดลองของบทที่ 3

- การคำนวณปริมาณไพรีนที่เหลือ จะให้ค่าของชุดควบคุมในวันที่ 30 ของการทดลองเป็น 100 % จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

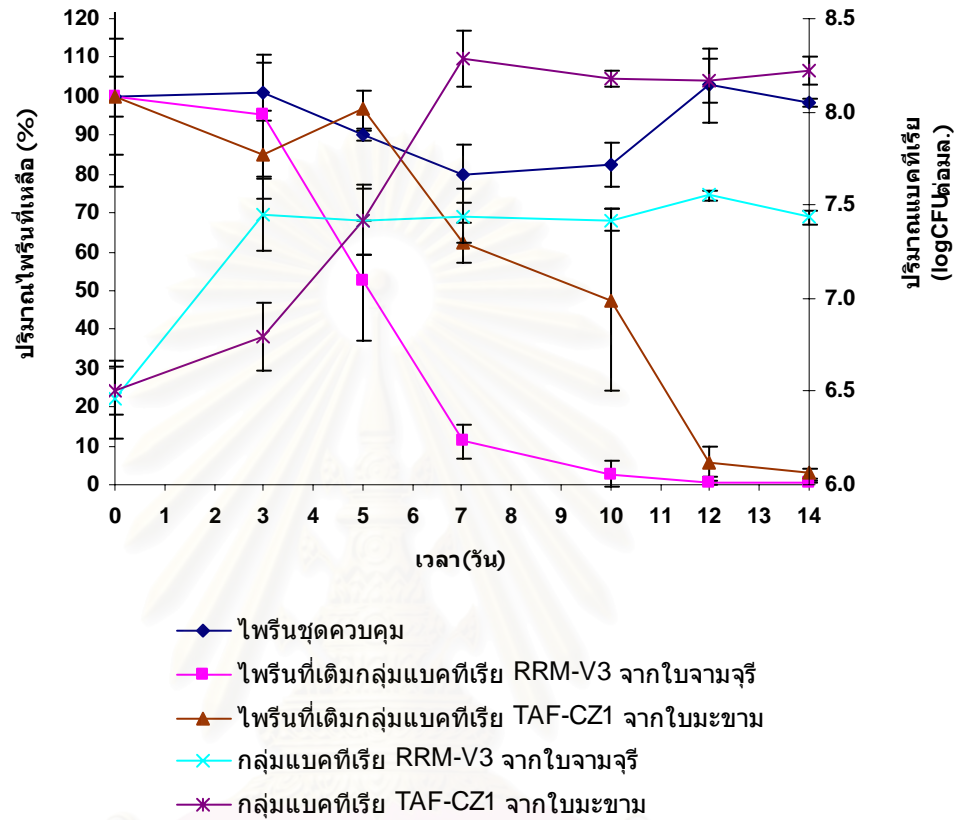
ก



ข



รูปที่ 4.1 แสดงตัวอย่างโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งที่ได้รับไฮไพรีนจากการใช้ผลิตภัณฑ์ไพรีน (ก) และวงใสรอบโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปนทับด้วยไพรีน (ข)



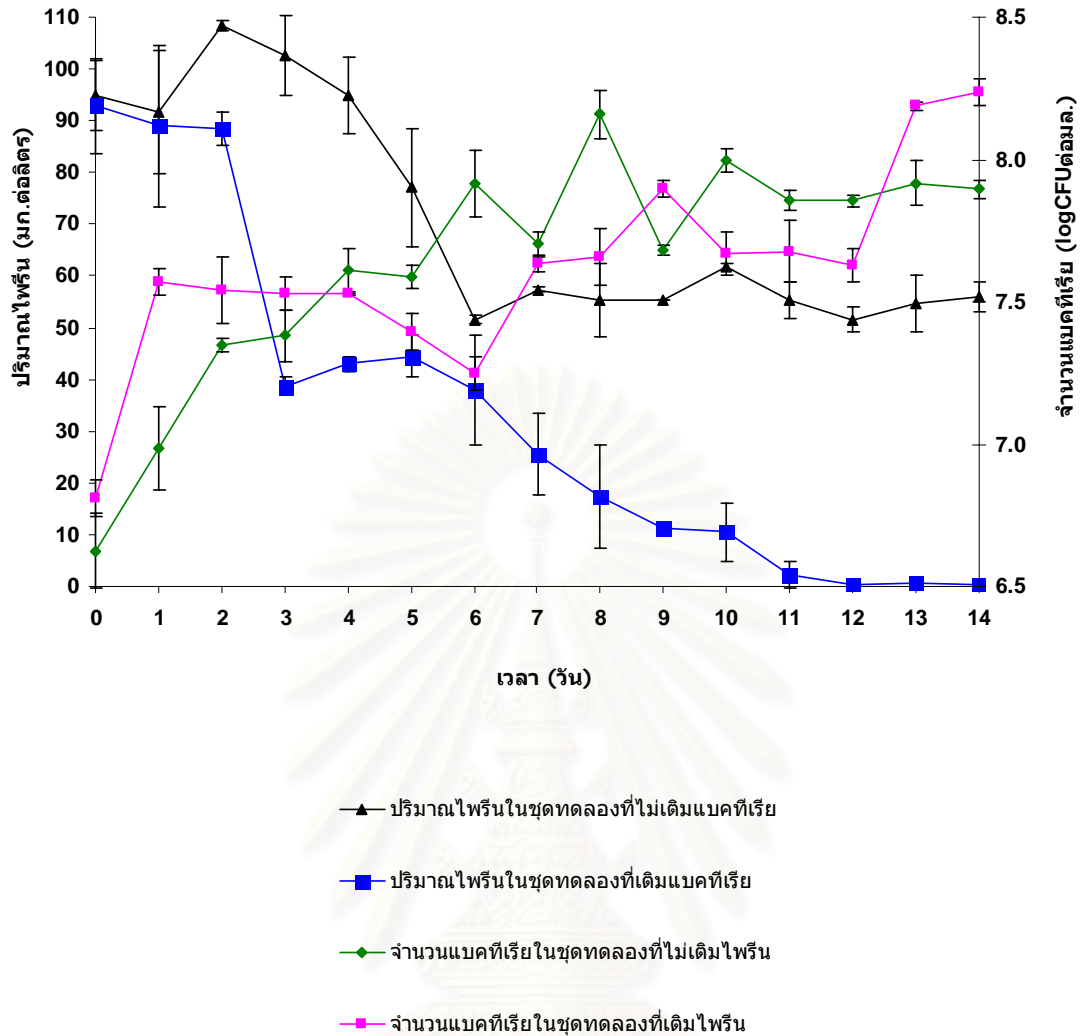
รูปที่ 4.2 การเจริญของกลุ่มแบคทีเรียจากใบจามจรี(RRM-V3) และใบมะขาม(TAF-CZ1) และปริมาณไฟรินที่เหลือจากการย่อยลายของกลุ่มแบคทีเรียทั้งสอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การเจริญของกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากใบจามจุรี (RRM-V3) โดยการใช้ไพริน เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน

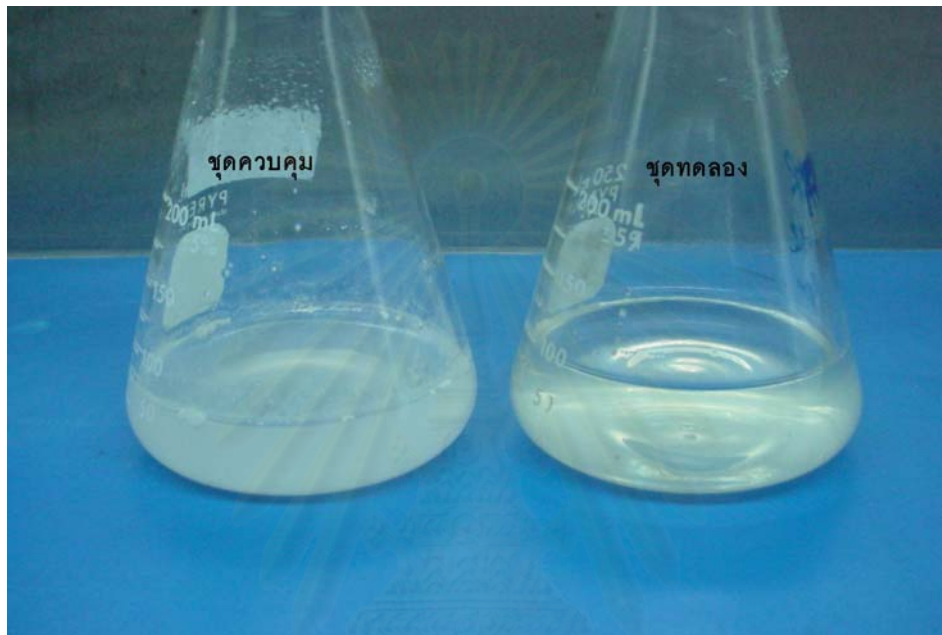
กลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากใบจามจุรีซึ่งเตรียมหัวเชื้อบนอาหารแข็งที่เติมไฮเดียมซัคซิเนต แล้วมาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพริน พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถย่อยสลายไพรินได้หมดภายในเวลา 14 วัน (92.8 ± 9.1 เหลือ 0.4 ± 0.2 มก.ต่อลิตร) โดยมีช่วงเวลาปรับตัว (lag phase) 2 วัน หลังจากนั้นจึงเริ่มย่อยไพรินแบ่งเป็น 3 ช่วงอย่างชัดเจนด้วยอัตราเร็วเฉลี่ย 14.67 ± 0.80 มก.ต่อลิตรต่อวันในวันที่ 3 ถึง 5 และลดลงเฉลี่ย 7.03 ± 0.97 มก.ต่อลิตรต่อวัน ในวันที่ 6 ถึง 11 ของการทดลอง หลังจากนั้นไพรินลดลงเฉลี่ย 0.67 ± 0.80 มก.ต่อลิตรต่อวัน จนถึงวันที่ 14 ของการทดลอง ในขณะที่ชุดควบคุมปริมาณไพรินลดลงเกือบครึ่งหนึ่งจาก 94.9 ± 6.8 เหลือ 55.9 ± 2.8 มก.ต่อลิตร (รูปที่ 4.3) การลดของไพรินในชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรียจะลดอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 แล้วลดอย่างคงที่จนหมดในวันที่ 12 ของการทดลอง ซึ่งการย่อยสลายไพรินในชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรียสามารถลดได้มากกว่าชุดควบคุมประมาณ 2.4 เท่า ในขณะที่จำนวนของแบคทีเรียรวมของทั้งสองชุดเพิ่มขึ้นตามเวลา โดยไม่มีระยะเวลาปรับตัวของแบคทีเรีย (รูปที่ 4.3)

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าในชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย แบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก $6.8 \log \text{ CFU ต่อ มล.}$ ($6.53 \times 10^6 \text{ CFU ต่อ มล.}$) เป็น $8.2 \log \text{ CFU ต่อ มล.}$ ($1.72 \times 10^8 \text{ CFU ต่อ มล.}$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมพบว่าไม่แตกต่างกันมาก ซึ่งชุดควบคุมจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นตลอดเวลาในช่วง 7 วันแรกและมีการเพิ่มขึ้น-ลดลงจนค่าคงที่ในวันที่ 11 ของการทดลอง การเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียของทั้งสองชุด พบว่าในช่วง 5 วันแรก ชุดที่เติมไพรินมีจำนวนมากกว่าชุดควบคุม แต่หลังจากนั้นชุดควบคุมมีจำนวนมากกว่าจนถึงวันที่ 12 จำนวนแบคทีเรียในชุดที่เติมไพรินกลับมีจำนวนมากกว่าอีกครั้งในท้ายการทดลอง ซึ่งจำนวนแบคทีเรียทั้งสองชุดมีจำนวนเพิ่มขึ้นจากวันเริ่มต้นประมาณ 2 เท่าเช่นเดียวกัน



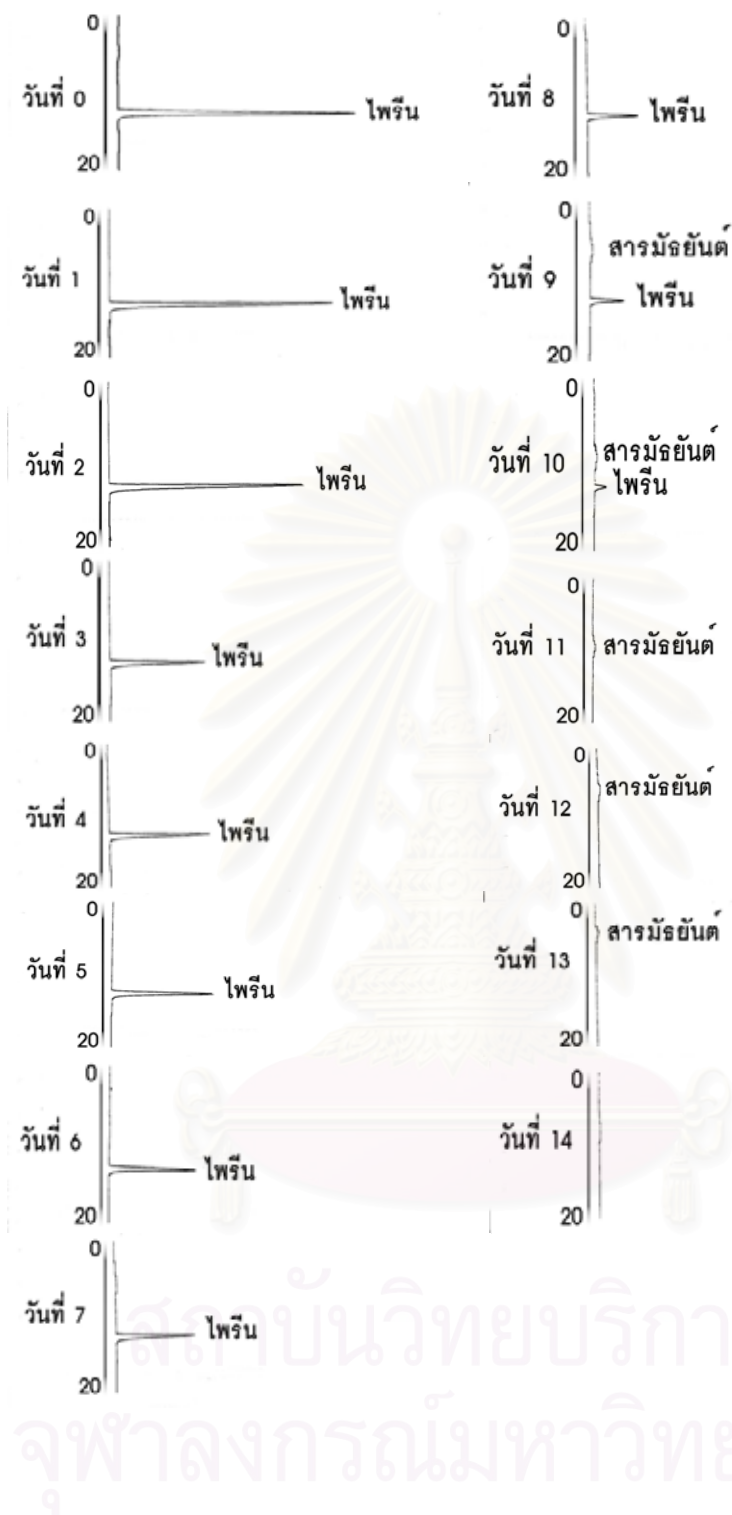
รูปที่ 4.3 แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และการย่อยสลายไพรีนที่ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ภายในเวลา 14 วัน

จากการติดตามการย่อยสลายไพรีนภายใน 14 วัน (รูปที่ 4.3) จะไม่พบการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวชัดเจน กลับพบว่ามึลักษณะเหนียวข้นขึ้น และผลึกไพรีนหายไป (รูปที่ 4.4) ซึ่งผลจากโครมาโตแกรมสามารถพบการลดลงของไพรีนตามเวลาและมีสารมัธยันต์ในช่วงทำการทดลองเล็กน้อย (รูปที่ 4.5) เพื่อศึกษาหาข้อมูลเบื้องต้นของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีน จึงเพิ่มความเข้มข้นของไพรีนให้มากขึ้นเป็น 200 300 และ 400 มก.ต่อลิตร พบว่าอาหารเหลวมีสีน้ำตาลเข้มขึ้นในระยะเวลา 7 วัน ตามลำดับ (รูปที่ 4.6) และสามารถตรวจพบสารมัธยันต์ที่สะสมตรงตำแหน่งรีเทนชัน (Retention time, Rt) ต่าง ๆ กันของแต่ละความเข้มข้น (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.7) ซึ่ง Rt ที่ 2 3 4 7 9 และ 11 นาที จะตรวจพบได้แทบทุกความเข้มข้น โดยไพรีนมีค่า Rt ที่ 14 นาที



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะอาหารเหลวหลังจากการย่อยสลายไพลินที่ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



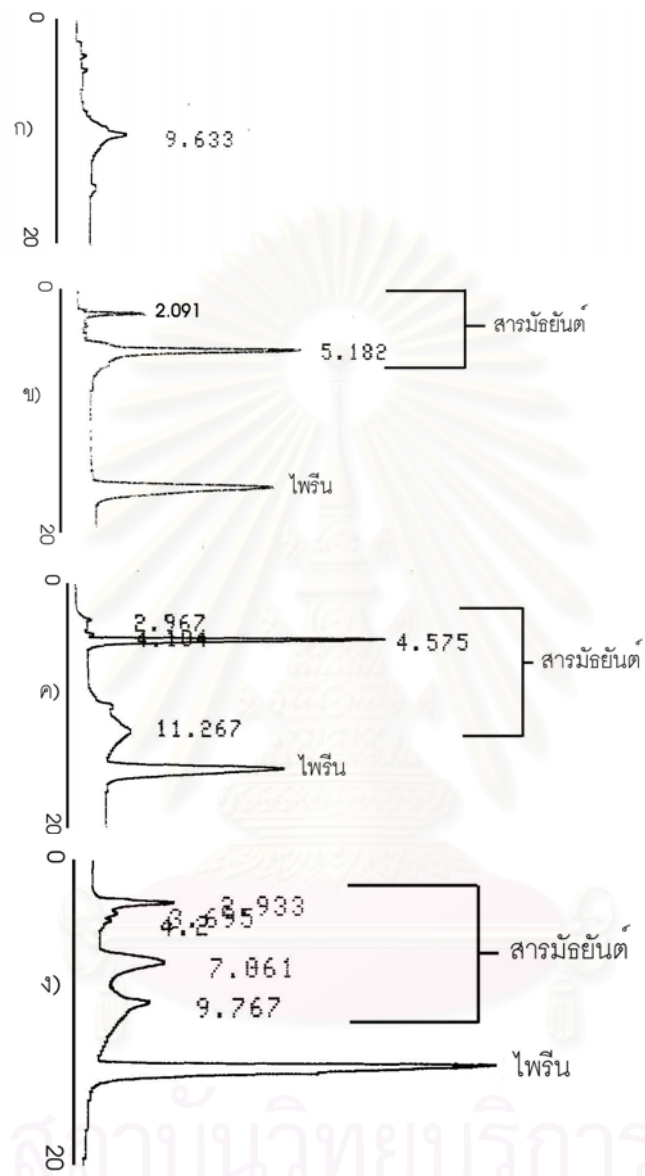
รูปที่ 4.5 แสดงโครมาโตแกรม HPLC การวิเคราะห์ของไพรีนที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 (ติดตามโครมาโตแกรมภายในเวลา 20 นาที ซึ่งไพรีนมีค่า Rt ที่ 14 นาที)



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะอาหารเหลวที่มีสีน้ำตาลจากการเพิ่มความเข้มข้นของไฟรีนเป็น 200 300 และ 400 มก.ต่อลิตร ซึ่งสีน้ำตาลเข้มขึ้น

ตารางที่ 4.2 แสดงเวลารีเทนชันที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC ของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายไฟรีนความเข้มข้นต่าง ๆ หลังเติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เป็นเวลา 7 วัน

| ความเข้มข้นของไฟรีน (มก.ต่อลิตร) | รีเทนชัน (นาที) |
|----------------------------------|-----------------|
| 100 | 9.633 |
| 200 | 2.091 |
| | 5.182 |
| 300 | 2.967 |
| | 4.104 |
| | 4.575 |
| | 11.267 |
| 400 | 2.933 |
| | 3.695 |
| | 4.200 |
| | 7.061 |
| | 9.767 |



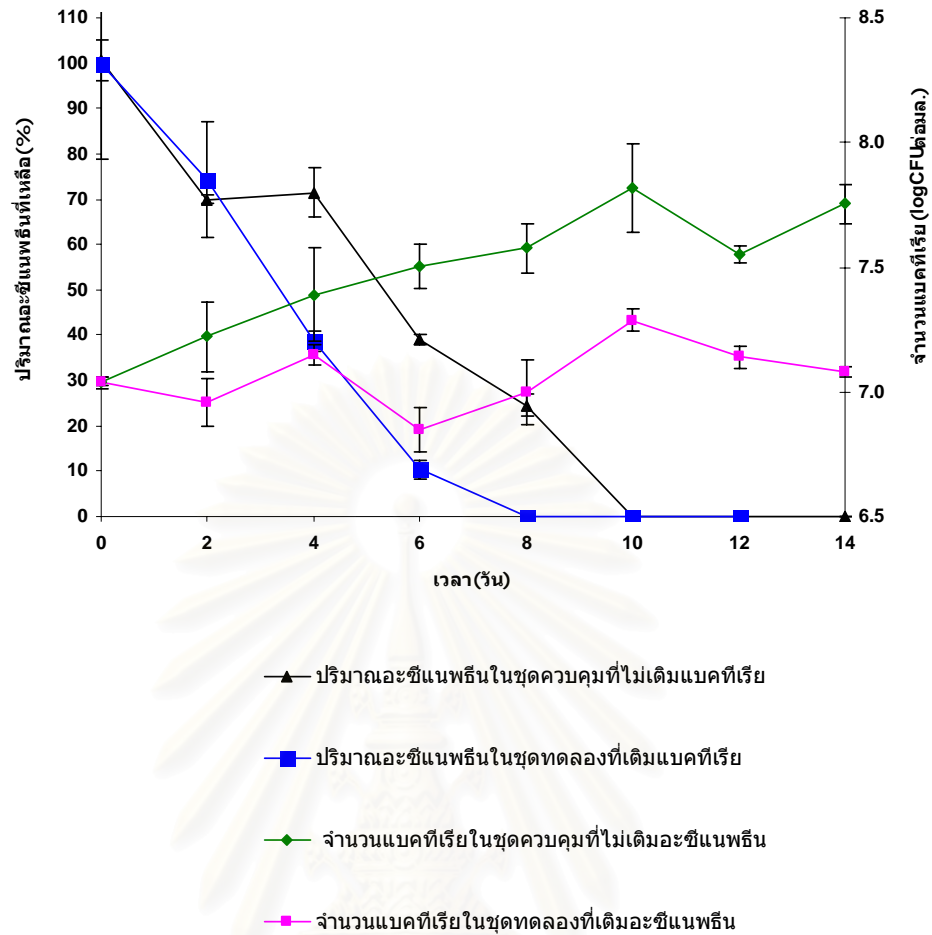
รูปที่ 4.7 แสดงโครมาโตแกรม HPLC การวิเคราะห์ของสารมัยันต์จากการย่อยสลายไพรินที่ความเข้มข้น 100 (ก) 200 (ข) 300 (ค) และ 400 (ง) มก.ต่อลิตร หลังเติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เป็นเวลา 7 วัน (ติดตามโครมาโตแกรมภายในเวลา 20 นาที)

4.3 การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยการใช้ PAHs ชนิดอื่นเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน

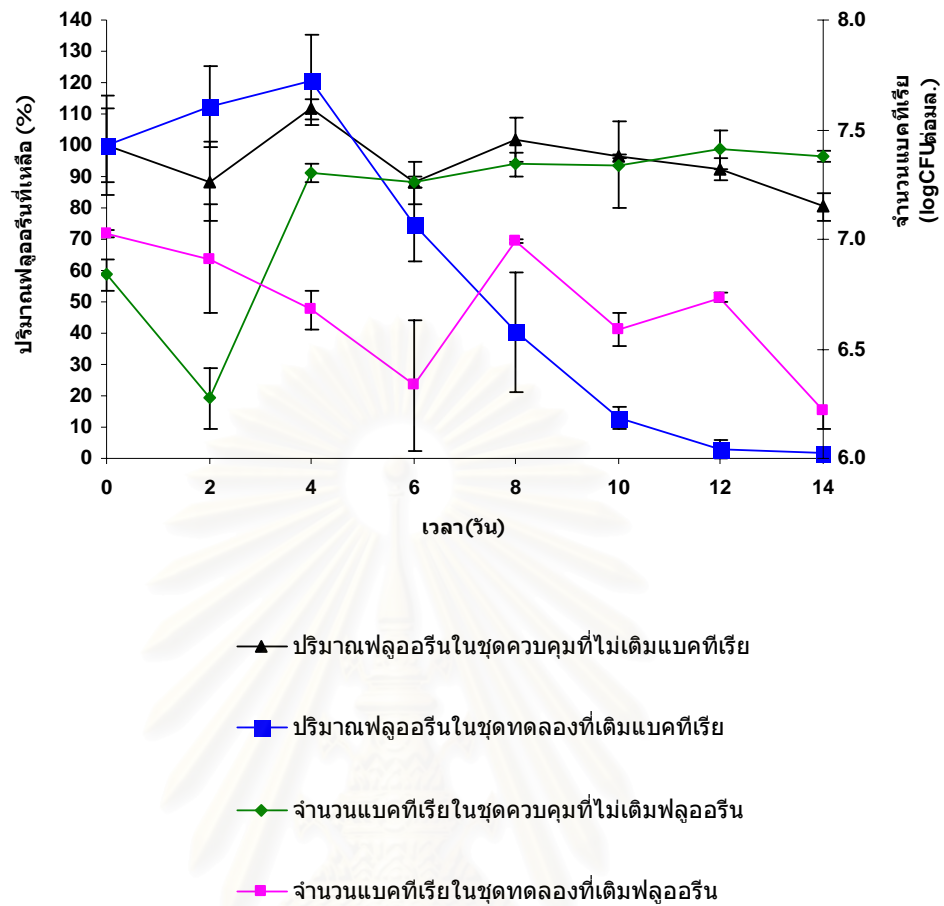
กลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากใบจามจุรี ถูกนำมาศึกษาความสามารถในการใช้สาร PAHs อื่นที่ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร จากการศึกษาพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถใช้ อะซีแนพทีน (รูปที่ 4.8) ฟลูออรีน (รูปที่ 4.9) พีแนนทีน (รูปที่ 4.10) และฟลูออแรนทีน (รูปที่ 4.11) ได้ แต่ไม่สามารถใช้ อะซีแนพทีลีน แอนทราซีน ไครซีน (รูปที่ 4.12) และ เบนโซ(เอ)ไพรีน (รูปที่ 4.13) ได้ภายในเวลา 14 วัน โดยย่อยสลายแต่ละชนิดในปริมาณที่แตกต่างกัน



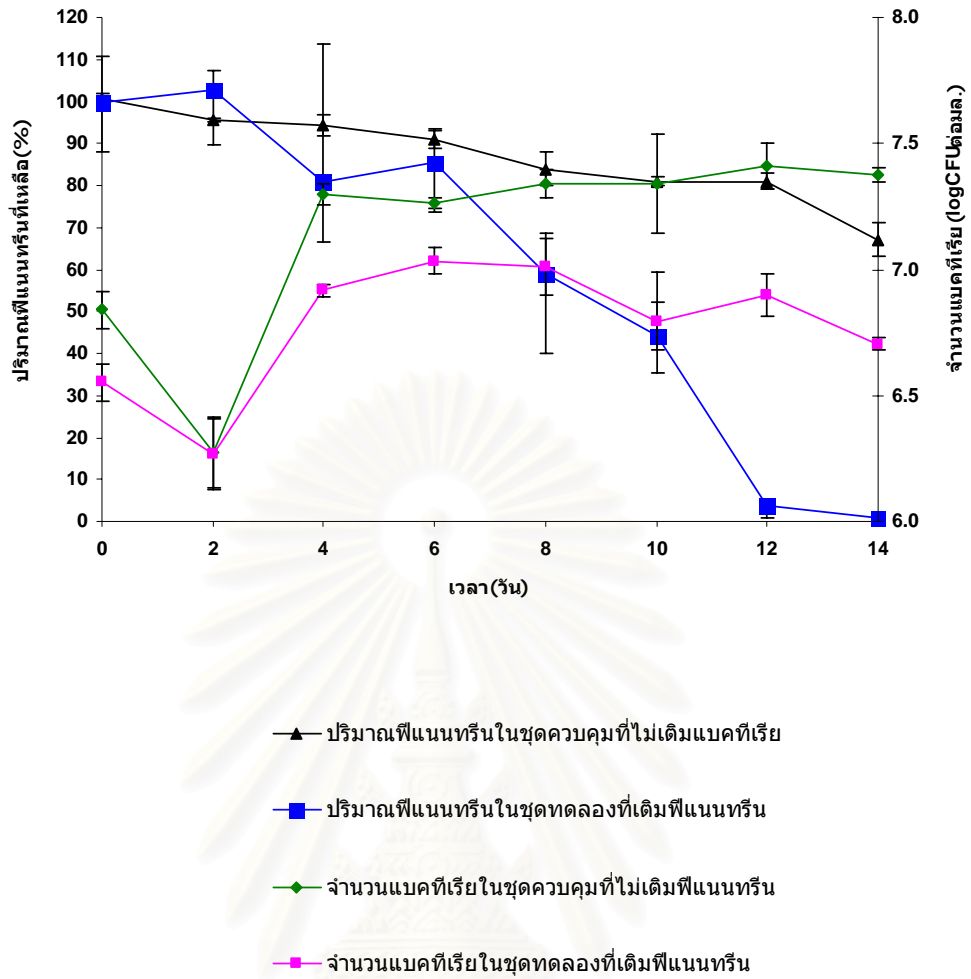
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



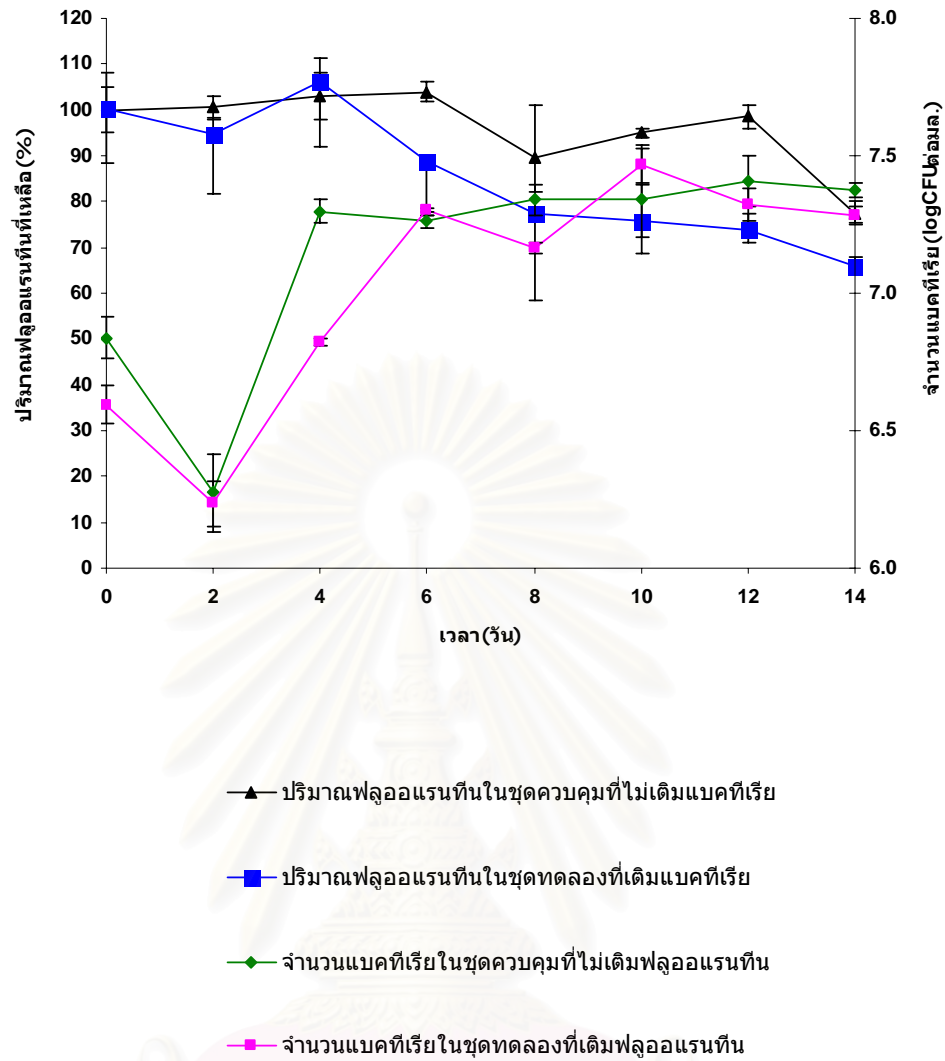
รูปที่ 4.8 แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้อะซิแนพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน



รูปที่ 4.9 แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้ฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน

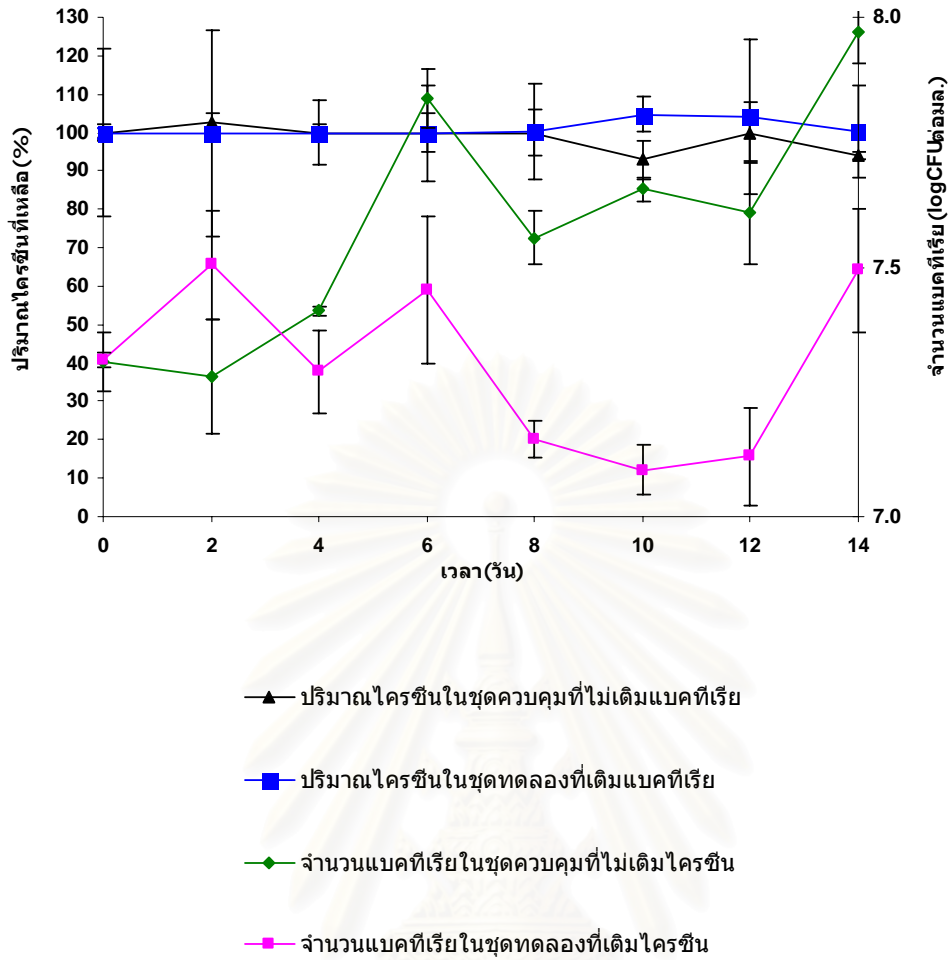


รูปที่ 4.10 แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้พีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน



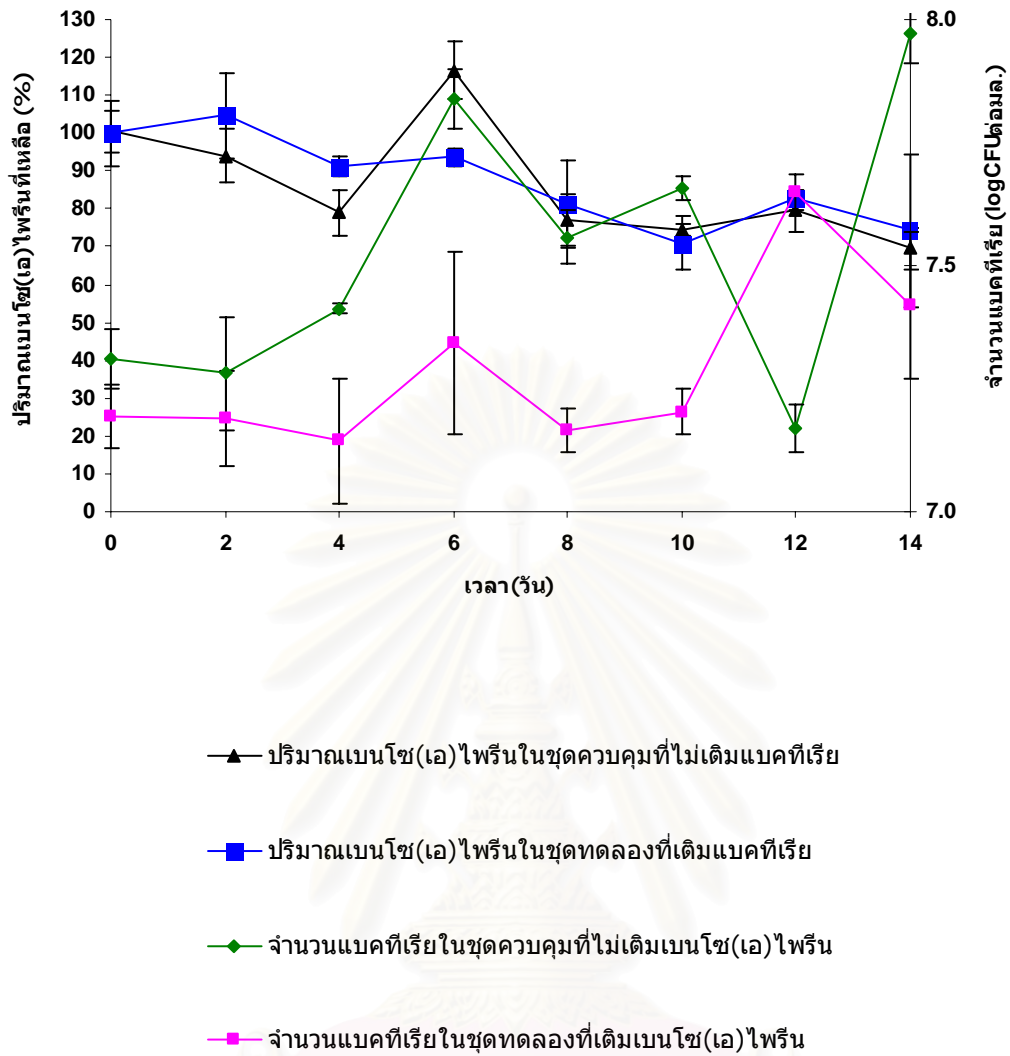
รูปที่ 4.11 แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้ฟลูออเรสเซนซ์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.12 แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

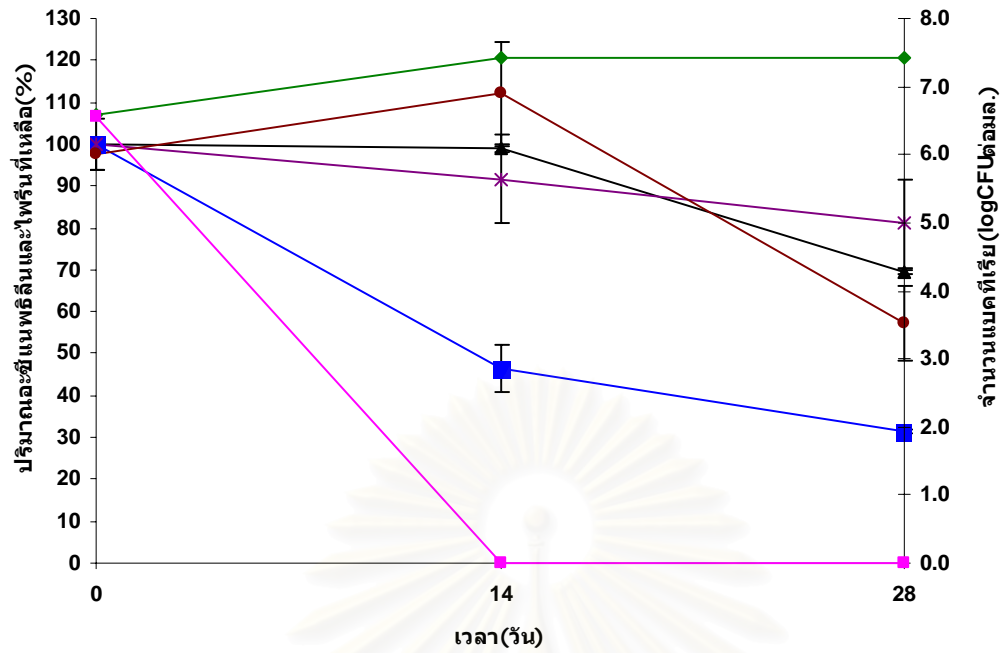


รูปที่ 4.13 แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้เบนโซอิลไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

จากผลการทดลอง พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถลดอะซีแนพทินได้อย่างต่อเนื่องจากความเข้มข้น 86 ± 6 มก.ต่อลิตร จนหมดในเวลา 8 วัน โดยมีการย่อยเฉลี่ย 9.83 ± 1.67 มก.ต่อลิตรต่อวัน(ระหว่างวันที่ 2 - 8) ซึ่งเร็วกว่าชุดควบคุม 2 วัน จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 4.8) การลดฟลูออรีน พบว่ากลุ่มแบคทีเรียใช้เวลาปรับตัว 4 วัน ก่อนที่จะเริ่มย่อยฟลูออรีนด้วยอัตราเร็วคงที่จนเกือบหมดภายใน 14 วัน จากความเข้มข้น 86 ± 8 เหลือ 1 ± 1 มก.ต่อลิตร โดยมีการย่อยสลายเฉลี่ย 12.83 ± 1.67 มก.ต่อลิตรต่อวัน (ระหว่างวันที่ 4 - 10) อาหารเหลวมีสีส้มอิฐในวันที่ 6 ของการทดลอง ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียลดลงอย่างต่อเนื่องเช่นกันจนวันที่ 6 ของการทดลอง จากนั้นจึงเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับเริ่มการทดลองแล้วกลับลดลงอีกครั้งในวันสุดท้ายของการทดลอง ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมเพิ่มสูงขึ้นใน 4 วันแล้วคงที่จนจบการทดลอง (รูปที่ 4.9) สำหรับพีแนทรีน จากการทดลองพบว่ากลุ่มแบคทีเรียใช้เวลาปรับตัว 2 วัน จึงเริ่มย่อยสลายพีแนทรีนอย่างช้าๆ ด้วยอัตราเร็วคงที่ตลอดการทดลองจนเกือบหมดจากความเข้มข้น 96 ± 9 มก.ต่อลิตร เหลือ 1 ± 1 มก.ต่อลิตร (คิดเป็นการย่อยสลายเฉลี่ย 9.40 ± 0.40 มก.ต่อลิตรต่อวันในระหว่างวันที่ 2 - 12) โดยอาหารเหลวเปลี่ยนเป็นสีส้มในวันที่ 12 ของการทดลอง ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (รูปที่ 4.10) ส่วนการย่อยสลายฟลูออแรนทีน พบว่ากลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายได้จากความเข้มข้น 83 ± 6 มก.ต่อลิตร เหลือ 55 ± 2 มก.ต่อลิตร คิดเป็นการย่อยสลายได้ร้อยละ 34 ในเวลา 14 วัน (คิดเป็นการย่อยสลายเฉลี่ย 3.30 ± 2.00 มก.ต่อลิตรต่อวันในระหว่างวันที่ 4 - 14) โดยอาหารเหลวเปลี่ยนเป็นสีแดงในวันที่ 12 ของการทดลอง ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นไม่มาก (รูปที่ 4.11) (ความเข้มข้นที่แสดงได้จากการคำนวณจากกราฟมาตรฐานในภาคผนวก ค) สำหรับสาร PAHs ที่น้ำหนักโมเลกุลสูงชนิดอื่นที่นำมาทดสอบนั้น พบว่าไม่สามารถย่อยได้ ได้แก่ ไครซีน และเบนโซ(เอ)ไพรีน ซึ่งจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อจบการทดลอง ซึ่งเชื้อแบคทีเรียไม่ได้ใช้ไครซีน แต่อาจใช้สารประกอบอินทรีย์จากแบคทีเรียบางชนิดที่สลายตัว และเชื้อแบคทีเรียไม่ได้ใช้เบนโซ(เอ)ไพรีนเช่นกัน แต่ทำการทดลองกลับมีจำนวนเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากการที่มีแบคทีเรียบางชนิดที่ทนสารนี้ได้แต่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานไม่ได้ แต่สามารถใช้แบคทีเรียชนิดอื่นที่ตายและแตกสลายเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานแทน (รูปที่ 4.12, 4.13 ตามลำดับ) ดังนั้นจากผลการทดลองการใช้สาร PAHs ชนิดอื่น สามารถสรุปได้ว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถใช้สาร PAHs ที่มีวงแหวนเบนซีนตั้งแต่ 3 ถึง 4 วงได้ ยกเว้น ไครซีน โดยต้องใช้เวลาปรับตัวอย่างน้อย 2 วัน และมีอัตราการย่อยสลายคงที่ต่อไปจนสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่จำนวนแบคทีเรียในชุดที่เติมสาร PAHs ชนิดอื่นทั้งหมดมีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อย

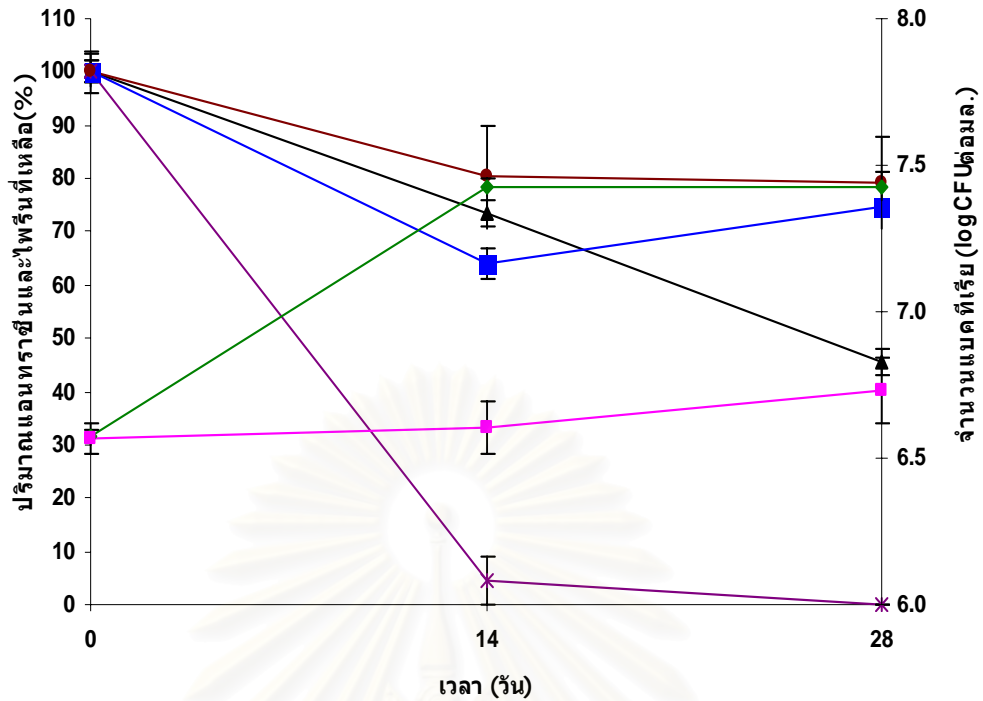
4.4 การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เมื่อใช้สาร PAHs อื่นร่วมกับไพรีน แบบโคเมแทบอลิซึม

เนื่องจากกลุ่มแบคทีเรียไม่สามารถใช้สาร PAHs บางชนิดได้และเพื่อศึกษาศักยภาพของกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสาร PAHs ที่อยู่ร่วมกันมากกว่าหนึ่งชนิดได้หรือไม่ ดังนั้นจึงนำสาร PAHs ที่ไม่สามารถใช้ได้ข้อ 4.3 มาศึกษาการย่อยสลายแบบโคเมแทบอลิซึมร่วมกับไพรีน ซึ่งพบว่า เมื่อเติมไพรีนร่วมกับอะซีแนพริลีน พบว่าไม่พบการเจริญของแบคทีเรียหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน คาดว่าแบคทีเรียตาย ทำให้ไพรีนและอะซีแนพริลีนยังคงอยู่ทั้งสองชุดการทดลอง แต่อะซีแนพริลีนที่ไม่เติมแบคทีเรียลดลงประมาณ 68 % และไพรีนลดลงประมาณ 20 % (รูปที่ 4.14) สำหรับแอนทราซีน พบว่าในเวลา 28 วัน แอนทราซีนไม่ถูกย่อยสลายเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่ ไพรีนถูกลดจนหมด แต่แบคทีเรียเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (รูปที่ 4.15) เช่นเดียวกับโคโรซีน ที่พบว่ากลุ่มแบคทีเรียไม่ได้ช่วยการย่อยสลายโคโรซีน แต่ใช้ไพรีนจนหมดภายใน 14 วัน ในขณะที่โคโรซีนในชุดควบคุมลดลงประมาณ 30 % (รูปที่ 4.16) และเบนโซ(เอ)ไพรีน พบว่ากลุ่มแบคทีเรียไม่สามารถย่อยสลายเบนโซ(เอ)ไพรีนได้ แต่ใช้ไพรีนได้ 96 % มีผลให้จำนวนแบคทีเรียเพิ่มสูงกว่าชุดควบคุมในท้ายการทดลอง (รูปที่ 4.17)



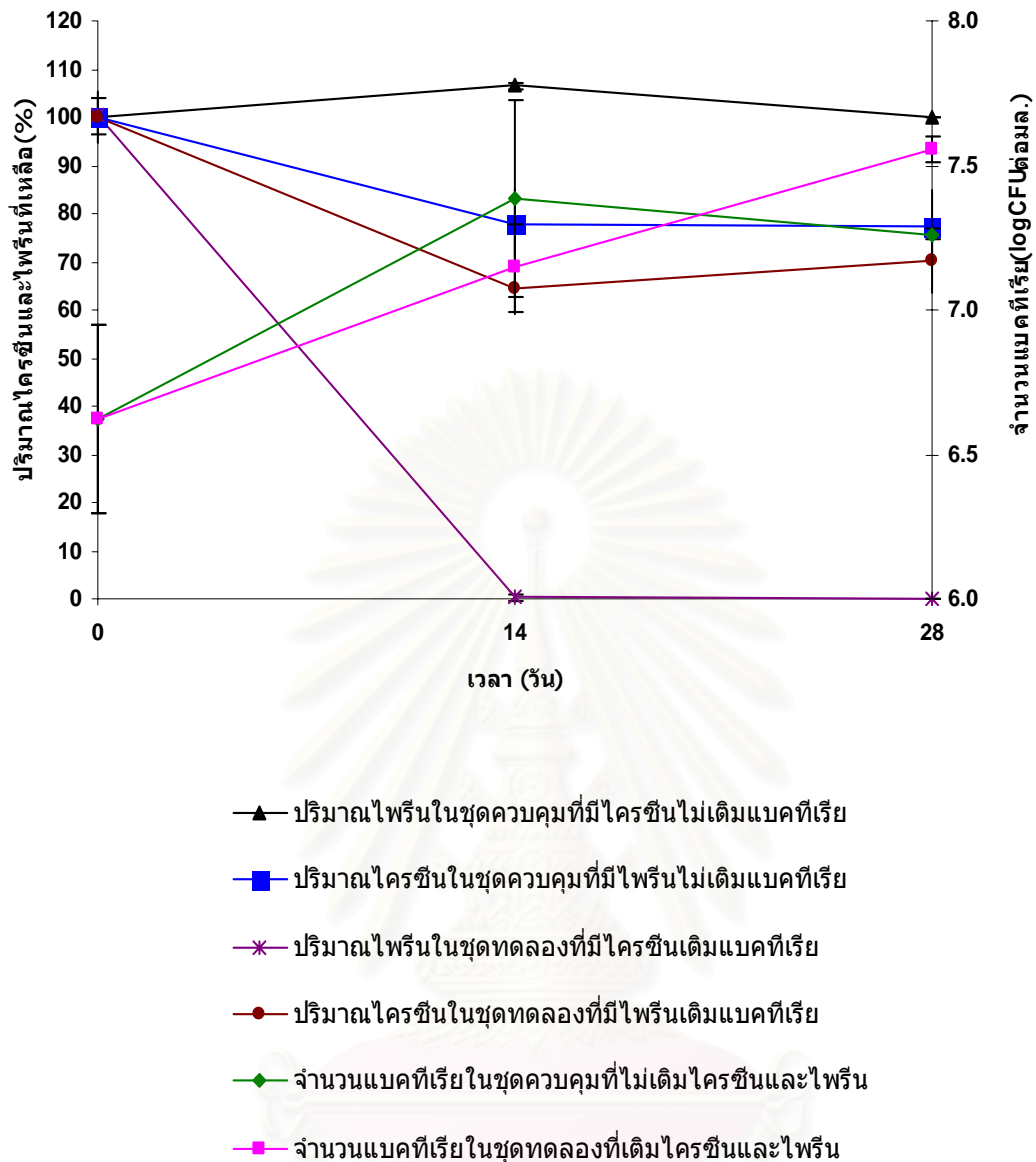
- ▲— ปริมาณไฟรีนในชุดควบคุมที่เติมอะซีแนพทิลีนไม่เติมแบคทีเรีย
- ปริมาณอะซีแนพทิลีนในชุดควบคุมที่มีไฟรีนไม่เติมแบคทีเรีย
- *— ปริมาณไฟรีนในชุดทดลองที่มีอะซีแนพทิลีนเติมแบคทีเรีย
- ปริมาณอะซีแนพทิลีนในชุดทดลองที่มีไฟรีนเติมแบคทีเรีย
- ◆— จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่ไม่เติมอะซีแนพทิลีนและไฟรีน
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมอะซีแนพทิลีนและไฟรีน

รูปที่ 4.14 แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้อะซีแนพทิลีนและไฟรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานร่วมกัน

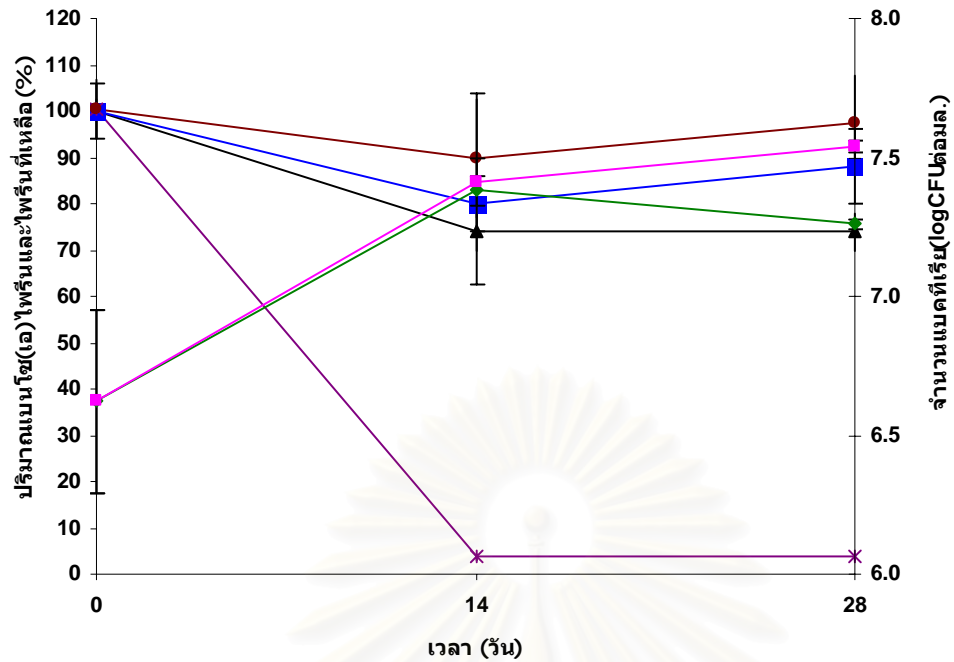


- ▲ ปริมาณไพรีนในชุดควบคุมที่มีแอนทราซีนไม่เติมแบคทีเรีย
- ปริมาณแอนทราซีนในชุดควบคุมที่มีไพรีนไม่เติมแบคทีเรีย
- * ปริมาณไพรีนในชุดทดลองที่มีแอนทราซีนเติมแบคทีเรีย
- ปริมาณแอนทราซีนในชุดทดลองที่มีไพรีนเติมแบคทีเรีย
- ◆ จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมไม่เติมแอนทราซีนและไพรีน
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมแอนทราซีนและไพรีน

รูปที่ 4.15 แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้แอนทราซีนและไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานร่วมกัน



รูปที่ 4.16 แสดงการเจริญของกลุ่มแมคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้ไครซีนและไฟรีนเป็น แหล่งคาร์บอนและพลังงานร่วมกัน



- ▲ ปริมาณไพรีนในชุดควบคุมที่มีเบนโซ(เอ)ไพรีนไม่เติมแบคทีเรีย
- ปริมาณเบนโซ(เอ)ไพรีนในชุดควบคุมที่มีไพรีนไม่เติมแบคทีเรีย
- * ปริมาณไพรีนในชุดทดลองที่มีเบนโซ(เอ)ไพรีนเติมแบคทีเรีย
- ปริมาณเบนโซ(เอ)ไพรีนในชุดทดลองที่มีไพรีนเติมแบคทีเรีย
- ◆ จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่ไม่เติมเบนโซ(เอ)ไพรีนและไพรีน
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมเบนโซ(เอ)ไพรีนและไพรีน

รูปที่ 4.17 แสดงการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้เบนโซ(เอ)ไพรีนและไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานร่วมกัน

จากผลการทดลองแบบโคเมแทบอลิซึม สรุปได้ว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ไม่สามารถใช้สาร PAHs ชนิดอื่น (อะซีแนฟธิลีน แอนทราซีน ไครซีน และ เบนโซ(เอ)ไพรีน) ได้เมื่อเติมร่วมกับไพรีน โดยแอนทราซีน ไครซีน และ เบนโซ(เอ)ไพรีน ไม่มีผลต่อการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย ยกเว้น อะซีแนฟธิลีนที่ทำให้แบคทีเรียตายภายใน 14 วัน

4.5 การแยกเชื้อบริสุทธิ์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อที่แยกได้จากกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่คัดแยกจากใบจามจุรี

4.5.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา

ทำเจือจางเชื้ออายุ 3 วันที่ถ่ายเชื้อในฟรินด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เพราะว่าการวัดความเข้มข้นของโคโลนีได้(จากการสังเกตเปรียบเทียบกับน้ำเกลืออนอร์มัลซาลายน์)ร่วมกับการเติม Tween-80 (Tween-80) เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมล.ที่ช่วยให้แบคทีเรียไม่เกาะกลุ่มกัน (Veiji และ Albright, 1993) จากนั้นเกลี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง LB บ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 5 วัน (รูปที่ 4.18) จึงทำการตรวจสอบลักษณะโคโลนีเดี่ยวและเชยเชื้อซ้ำบนอาหารชนิดเดิมจนกว่าได้เชื้อบริสุทธิ์จากการทำดังกล่าวสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.19

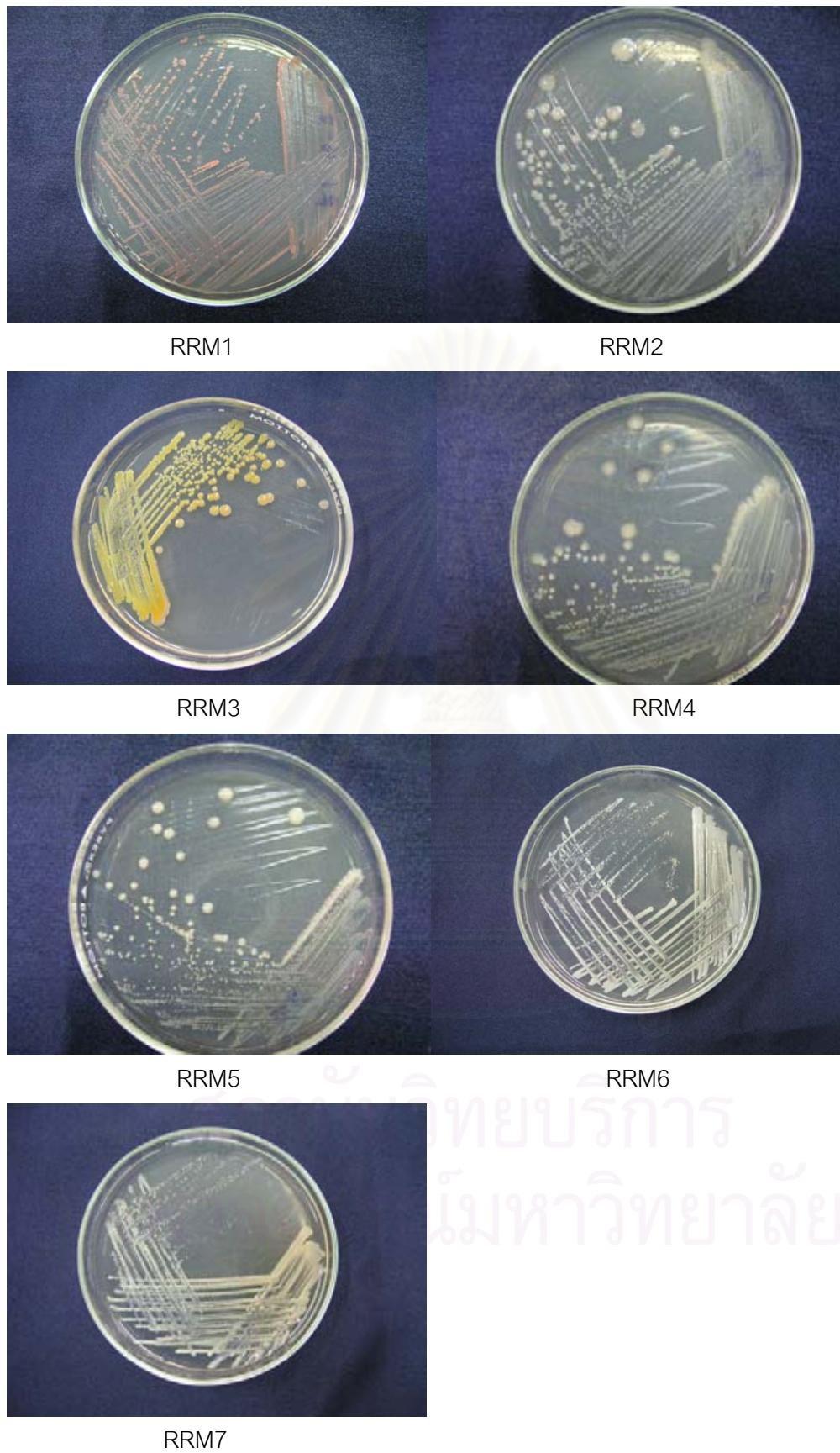
ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกจากกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

| เชื้อบริสุทธิ์ | ลักษณะโคโลนี |
|----------------|---|
| RRM1 | โคโลนีกลมสีแดงส้ม ขนาด 1-2 มม. กลางโคโลนีโค้งขึ้น ผิวและขอบเรียบ ทึบแสง |
| RRM2 | โคโลนีกลมสีเหลืองเนื้อ ขนาด 4-5 มม. กลางโคโลนีนูนโค้งเล็กน้อย ผิวและขอบเรียบ ทึบแสง |
| RRM3 | โคโลนีสี่เหลี่ยมสีส้ม ขนาด 3-4 มม. ตรงกลางนูนโค้งขึ้นเล็กน้อย ผิวและขอบเรียบ ทึบแสง |
| RRM4 | โคโลนีกลมสีขาวขุ่น โตช้ามาก ขนาด 2-3 มม. ผิวและขอบเรียบ ขอบมักแผ่อกบนอาหารแข็ง ทึบแสง (พบขึ้นอยู่บนเชื้อ RRM2 ก่อนทำบริสุทธิ์ได้มีขนาดเล็ก) |
| RRM5 | โคโลนีสี่เหลี่ยมอมชมพูอ่อน ขนาด 2-3 มม. กลางโคโลนีนูน ผิวหน้าขรุขระคล้ายดอกกะหล่ำ ขอบไม่เรียบ ทึบแสง |
| RRM6 | โคโลนีกลมสีขาวขุ่น ขนาด 2-3 มม. กลางโคโลนีโค้งขึ้น ผิวและขอบเรียบ ทึบแสง |
| RRM7 | โคโลนีกลมสีขาวขุ่น ขนาด 0.5-1 มม. กลางโคโลนีโค้งขึ้น ผิวและขอบเรียบ ทึบแสง |



รูปที่ 4.18 แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกจากกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.19 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

4.5.2 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมี

สำหรับเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ในข้อ 4.6.1 จะนำมาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt และคณะ, 1994) หลังจากย้อมสีแกรม และระบุรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (1000 เท่า) ได้ผลดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อบริสุทธิ์

| ลักษณะที่ศึกษา / เชื้อบริสุทธิ์ | RRM1 | RRM2 | RRM3 | RRM4 |
|---------------------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|
| ลักษณะเซลล์ | | | | |
| การติดสีแกรม | แกรมลบ | แกรมลบ | แกรมลบ | แกรมลบ |
| รูปร่างของเซลล์ | แท่งสั้น | แท่งยาว | แท่งสั้นรี | แท่งยาว |
| 1.การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส | + | + | - | + |
| 2.การเคลื่อนที่ | +/S | +/T | - | +/T |
| 3.การสร้างเอนไซม์คาตาเลส | + | + | + | + |
| 4.การสร้างอินโดล | - | - | - | - |
| 5.การไฮโดรไลซ์เจลาติน | - | - | + | - |
| 6.การสร้างไขมัน(PHB) | + | + | - | + |
| 7.การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ | - | - | - | - |
| 8.การหมักน้ำตาล | | | | |
| ดี-กลูโคส | - | - | + | - |
| ดีแอล-แลคโตส | - | - | - | - |
| ดี-แมนนิทอล | - | - | - | - |
| 9.การใช้ไซโตเคมีคชีเนท | + | + | + | + |
| 10.การผลิตกรดจากกลูโคส | - | - | - | - |
| สกุลของเชื้อบริสุทธิ์ | <i>Rugamonas</i> | <i>Comamonas</i> | <i>Flavimonas</i> | <i>Comamonas</i> |

+ หมายถึง ผลบวก : สร้าง หรือ เกิดปฏิกิริยา หรือ เจริญ หรือ ผลิต ได้

- หมายถึง ผลลบ : ไม่สามารถ สร้าง หรือ เกิดปฏิกิริยา หรือ เจริญ หรือ ผลิต ได้

* หมายถึง ย้อมตามวิธี Ryu stain (Jitsurong, 1995) โดย S =single polar flagella ,

T=polar tuft flagella (lophotrichous), A= amphitrichous และ P =peripheral flagella (peritrichous)

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อบริสุทธิ์

| ลักษณะที่ศึกษา / เชื้อบริสุทธิ์ | RRM5 | RRM6 | RRM7 |
|---------------------------------|------------------|--------------------|------------------------|
| ลักษณะเซลล์ | | | |
| การติดสีแกรม | แกรมลบ | แกรมลบ | แกรมลบ |
| รูปร่างของเซลล์ | แท่งยาว | แท่งสั้นรี | แท่งสั้นรี |
| 1.การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส | + | - | - |
| 2.การเคลื่อนที่* | + / T | - | - |
| 3.การสร้างเอนไซม์คาตาเลส | + | + | - |
| 4.การสร้างอินโดล | - | - | - |
| 5.การไฮโดรไลซ์เจลาติน | - | - | - |
| 6.การสร้างไขมัน(PHB) | + | + | - |
| 7.การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ | - | - | - |
| 8.การหมักน้ำตาล | | | |
| ดี-กลูโคส | - | - | - |
| ดีแอล-แลคโตส | - | - | - |
| ดี-แมนนิทอล | - | - | - |
| 9.การใช้ไซโตเคียมซัคซีเนท | + | + | + |
| 10.การผลิตกรดจากกลูโคส | - | - | - |
| สกุลของเชื้อบริสุทธิ์ | <i>Comamonas</i> | <i>Pseudomonas</i> | Unidentified bacterium |

+ หมายถึง ผลบวก : สร้าง หรือ เกิดปฏิกิริยา หรือ เจริญ หรือ ผลิต ได้

- หมายถึง ผลลบ : ไม่สามารถ สร้าง หรือ เกิดปฏิกิริยา หรือ เจริญ หรือ ผลิต ได้

* หมายถึง ย้อมตามวิธี Ryu stain (Jitsurong, 1995) โดย S =single polar flagella ,

T=polar tuft flagella (lophotrichous), A= amphitrichous และ P =peripheral flagella (peritrichous)

นอกจากการศึกษาคุณสมบัติ 10 อย่างดังในตารางที่ 4.4 จะต้องมีการทดลองเฉพาะอย่างเพื่อระบุสกุลเชื้อบริสุทธิ์ตามคำอธิบายในคู่มือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ดังนี้

RRM1 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20⁰ซ กลางโคโลนียุบลงและหยาบเมื่ออายุมากขึ้น

RRM3 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20⁰ซ

RRM4 ไม่เจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 6 %

RRM6 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20⁰ซ และไม่เจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 20 %

จากนั้นจึงทำการสรุปตามคำอธิบายในคู่มือดังแสดงในท้ายของตารางที่ 4.4 ซึ่งข้อมูลที่ได้จากตารางที่ 4.3 และ 4.4 สามารถระบุสกุลของแบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้ง 7 ชนิดได้ 4 สกุล ได้แก่ สกุล *Comamonas* จำนวน 3 ชนิด สกุล *Rugamonas* จำนวน 1 ชนิด สกุล *Flavimonas* จำนวน 1 ชนิด สกุล *Pseudomonas* จำนวน 1 ชนิด และไม่สามารถจำแนกได้ในขณะนี้จำนวน 1 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดและเมื่อนำทั้ง 7 ชนิดมารวมกัน จากนั้นทดสอบการย่อยสลายพีแนนทรีนและไพรีน พบว่าทั้งแบบเชื้อบริสุทธิ์และเชื้อผสมชนิดไม่สามารถย่อยพีแนนทรีนและไพรีนได้เช่นเดียวกับกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ก่อนการทำบริสุทธิ์

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ใบไม้ของพืชเป็นทั้งที่รองรับสารประกอบอินทรีย์ที่เป็นพิษและไม่เป็นพิษ จากอากาศทั้งสถานะก๊าซและที่เกาะกับฝุ่นละออง (Bakker และคณะ, 2000) และเป็นที่อยู่อาศัยของแบคทีเรีย (Hirano และ Upper, 1991 ; Yadav และคณะ, 2004) ดังนั้นพืชและแบคทีเรียย่อมมีความสัมพันธ์กัน โดยคาดว่ารากพืชตระกูลถั่วสามารถผลิตสารกระตุ้นเอนไซม์และเป็นอาหารของแบคทีเรียบริเวณนั้น (Romantschuk และคณะ, 2000) และเนื่องจากแบคทีเรียในดินมีโอกาสสัมผัสสารปนเปื้อนที่มากับน้ำหรือลงสู่ดินโดยตรง จึงทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนเหล่านั้นได้ทั้งแบบชนิดเดียวและโคเมแทบอลิซึม โดยจะเกิดจากเชื้อบริสุทธิ์หรือทำงานเป็นกลุ่มแบคทีเรีย ใบไม้ที่ร่วงหล่นบนดินมีโอกาสที่จะได้รับจุลินทรีย์จากดินเช่นกัน (Bakker และคณะ, 2000) การเติมใบไม้สามารถลดสาร PAHs ในดินที่ทำปนเปื้อนได้ (Siriwarasin และคณะ, 2002 ; Handerlein และคณะ, 2001 ; Charoenchang และคณะ, 2003) จึงเป็นไปได้ว่าใบไม้จะสามารถพบแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรีนจากเศษใบไม้ของพืชตระกูลถั่ว (Legume) 3 ชนิด (ตารางที่ 4.1) ได้แก่ ใบจามจุรี ใบมะขามและใบกระถินณรงค์ โดยได้แบคทีเรียหลายกลุ่มจากการติดตาม 2 วิธี ซึ่งใช้ไฟรีนในการเจริญเติบโตได้ ในบรรดากลุ่มแบคทีเรียทั้งหมด พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถลดไฟรีนได้เร็วที่สุดและสามารถลดปริมาณของ อะซีแนพทีน ฟลูออรีน พีแนนทรินและฟลูออแรนทีนได้เป็นจำนวน 100 99 และ 34 % ตามลำดับ ภายในเวลา 14 วัน ซึ่งใกล้เคียงกันกับผลการทดลองของ Yuan และคณะ (2000) ที่ใช้กลุ่มแบคทีเรียที่แยกจากตะกอนดินปนเปื้อนของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมลบ 6 ชนิด ที่สามารถใช้พีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้มา ย่อยสลายไฟรีนเข้มข้น 5 มก.ต่อลิตร พบว่าสามารถลดไฟรีนได้หมดภายใน 12 วัน ในขณะที่กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีประสิทธิภาพดีว่ามาก เพราะในการทดลองนี้ใช้ไฟรีนในความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าถึง 20 เท่า การที่สามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียได้น่าจะเกิดจากแบคทีเรียบนเศษใบไม้เคยถูกกระตุ้นการย่อยสลายสาร PAHs ในอากาศที่ถูกสะสมในใบไม้พืชและ/หรือสารประกอบที่คล้ายกันกับที่สร้างโดยพืช (Juhász และ Naidu, 2000b) เพราะใบไม้บางชนิดที่ใช้ในการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียถูกตรวจวิเคราะห์แล้วพบสาร PAHs ในปริมาณหนึ่ง (ภาคผนวก ง, รูปที่ ง.1)

กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ไม่มีความจำเพาะของการย่อยสลายต่อไฟรีนเพียงอย่างเดียว เพราะยังสามารถย่อยสลายสาร PAHs ชนิดอื่นได้อีกหลายชนิด แต่ก็ยังเป็นสาร PAHs ที่มีขนาดเล็ก

กว่า ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะใช้สาร PAHs ได้น้อยชนิดหรือใช้ได้เพียงบางชนิดเท่านั้น (Kästner และคณะ, 1994) ซึ่งเป็นผลดีต่อการบำบัดจริงในแหล่งปนเปื้อน เพราะในธรรมชาติการปนเปื้อนสาร PAHs จะมีมากกว่าหนึ่งชนิดและมีปริมาณต่างกัน (Wilson และ Jones, 1993) แต่อย่างไรก็ตาม อะซีแนพธิลีนทำให้กลุ่มแบคทีเรียนี้ตายหมด (รูปที่ 4.14) น่าจะเกิดจากพิษของอะซีแนพธิลีนต่อแบคทีเรียเพราะว่าอะซีแนพธิลีนที่มีความเป็นพิษแบบเฉียบพลันต่อสัตว์น้ำจืด สหราชอาณาจักร และสัตว์น้ำเค็มที่ความเข้มข้นต่ำสุด 1,700 520 และ 970 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีพิษแบบเรื้อรังในสัตว์น้ำเค็มและสหราชอาณาจักรที่ค่าต่ำสุดเท่ากับ 710 และ 500 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Lederer, 1985) โดยการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นสูงกว่ามาก(100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร) ความเป็นพิษย่อมสูงกว่าเช่นกันและเนื่องจากแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวย่อมมีความทนต่อพิษอะซีแนพธิลีนได้ต่ำกว่าสัตว์และสหราชอาณาจักร หรือมีความไวต่อพิษสูงกว่าจึงทำให้แบคทีเรียในกลุ่มนี้ตายหมด (Lederer, 1985) ยกเว้นสำหรับแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ดังรายงานของ ศรีลยา แพงไตร (2543) ที่คัดแยกแบคทีเรีย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ซึ่งสามารถทนและใช้อะซีแนพธิลีนที่ความเข้มข้นสูง(300 – 900 มก.ต่อลิตร)ได้ แต่ไม่สามารถใช้อะซีแนพธีนในการเจริญได้โดยตรงต้องใช้ในภาวะที่มีอะซีแนพธิลีนรวมด้วย ซึ่งตรงข้ามกับงานวิจัยนี้และงานวิจัยของ อรสุภาวี สายเพชร (2545) ที่พบว่าแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 สามารถใช้อะซีแนพธีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนได้และอะซีแนพธิลีนทำให้เชื้อไม่สามารถใช้อะซีแนพธีนได้เมื่อทำการศึกษาแบบโคเมแทบอลิซึม ซึ่งเกิดจากอะซีแนพธิลีนยับยั้งหรือขัดขวางการสร้างเอนไซม์เริ่มต้นที่จำเป็นต่อการย่อยสลายอะซีแนพธีน โดยคาดว่าอะซีแนพธิลีนแข่งขันเข้าจับกับตำแหน่งเร่งได้ดีกว่าอะซีแนพธีน เพราะอะซีแนพธิลีนมีโครงสร้างคล้ายและละลายน้ำได้ดีกว่าอะซีแนพธีน ซึ่งอาจจะเกิดกับแบคทีเรียในกลุ่ม RRM-V3 ได้ โดยที่อะซีแนพธิลีนอาจจะมีผลต่อเอนไซม์ที่ใช้ในการเจริญของแบคทีเรียทุกชนิดในกลุ่มนี้ แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากอะซีแนพธีนและอะซีแนพธิลีนมีโครงสร้างคล้ายกันมาก จึงควรจะสามารถย่อยสลายได้ทั้งสองชนิดดังบางรายงานที่พบว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถย่อยสลายได้ทั้งสองชนิด เช่น *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 แต่แบคทีเรียนี้ไม่สามารถใช้สาร PAHs อื่นได้ (Komatsu และคณะ, 1993) *Beijerinckia* sp. และสายพันธุ์คล้าย *Beijerinckia* sp. B8/36 เมื่อโคเมแทบอลิซึมกับไบฟีนิล (Schocken และ Gibson, 1984)

จากผลความเป็นพิษของอะซีแนพธิลีนต่อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่กล่าวมาข้างต้น ดังนั้นหากแหล่งปนเปื้อนนั้นมีสาร PAHs ชนิดนี้ในปริมาณสูงควรหลีกเลี่ยงการใช้กลุ่มแบคทีเรียนี้ หรือจะต้องทำการลดสารนั้นเสียก่อนแล้วจึงเติมกลุ่มแบคทีเรียนี้ หรือสร้างกลุ่มแบคทีเรียใหม่ด้วยการเพิ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ชนิดนั้นเข้าไปในกลุ่มแบคทีเรีย (Daugulis และ McCracken, 2003) แต่จะต้องมั่นใจว่าในระหว่างแบคทีเรียที่สร้างขึ้นนั้นไม่มีการขัดขวางการ

ทำงานซึ่งกันและกัน กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ไม่สามารถย่อย อะซีแนพริลีน แอนทราซีน ไครซีน และเบนโซ(เอ)ไพรีน แบบโคเมแทบอลิซึมกับไพรีนได้ เพราะว่ากลุ่มแบคทีเรียใช้ไพรีนในการเจริญแทน จึงไม่มีการใช้สาร PAHs ชนิดอื่นในระบบ หรืออาจจะเกิดจากสารมัธยันต์ที่ได้จากการย่อยไพรีนไปยับยั้งการย่อยสาร PAHs ชนิดอื่น (Kazunga และ Aitken, 2000) ดังนั้นอาจจะต้องเติมแหล่งอาหารชนิดอื่นที่ไม่ใช่ไพรีนเข้าไป เพื่อให้มีการย่อยสาร PAHs อื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น น้ำมันดีเซล (Kanaly และคณะ, 2000) สารลดแรงตึงผิวแรมโนไลปิด (Rhamnolipids) น้ำมันซิลิโคน หรือสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า (Marcoux และคณะ, 2000) หรือเติมแบคทีเรียที่สามารถย่อยสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นได้เข้าไป (Kazunga และ Aitken, 2000)

การย่อยไพรีนของกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวจะใช้เวลาปรับตัว 2 วัน เพราะอาจจะเกิดจากความไม่คุ้นเคยของกลุ่มแบคทีเรียที่ถูกเลี้ยงในไซเดียมซัคซิเนตและทำเป็น resting cell ก่อนการทดลอง ดังนั้นจึงต้องอาศัยเวลาในการสร้างความคุ้นเคยกับไพรีนก่อนยื่นที่เกี่ยวกับการย่อยสลายจึงจะถูกกระตุ้นให้ทำงานสร้างเอนไซม์ (Grosser และคณะ, 1991 ; Li และคณะ, 1996 ; Ho และคณะ, 2000) หรือความเข้มข้นของไพรีนสูง ต่างกับการทดลองของ Ramirez และคณะ (2001) ที่ใช้ไพรีนเข้มข้นเพียง 120.5 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งไม่พบระยะเวลาปรับตัวของกลุ่มแบคทีเรีย หรืออาจเป็นเพราะว่าใช้เชื้อในปริมาณที่น้อยไป (Juhasz และคณะ, 1995) เนื่องจากการเติมหัวเชื้อในปริมาณมากจะสามารถลดเวลาการปรับตัวได้หรือไม่มีเวลาปรับตัว (ภาคผนวก ง, รูปที่ ง.2) ดังรายงานของ Juhasz และคณะ (1996) ที่ใช้หัวเชื้อในปริมาณมาก 5 มล. (มีโปรตีนเข้มข้น 0.7 – 1.5 มก.ต่อมล.) พบว่าสามารถย่อยสลายสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงได้ถึง 70 % โดยส่วนมากแล้วไม่ว่าจะใช้แบคทีเรียบริสุทธิ์หรือกลุ่มแบคทีเรียจะพบระยะเวลาในการปรับตัวเสมอ แต่จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับเตรียมหัวเชื้อ ปริมาณของหัวเชื้อ ศักยภาพเฉพาะของสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ ความเข้มข้นของไพรีน (Bouchez และคณะ, 1995 ; Bastiaens และคณะ, 2000) และลักษณะของไพรีนที่เติมว่าเป็นสารละลายในตัวทำละลายหรือเป็นผลึก (Tiehm และ Fritzsich, 1995) ซึ่งปัจจัยที่กล่าวมามีผลต่อผลการทดลองการย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรีย แต่ท้ายที่สุดแล้วไพรีนจะถูกย่อยสลายต่อจากนั้น โดยอัตราการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์และแต่ละกลุ่มแตกต่างกัน ซึ่งบางรายงานคำนวณไว้ ดังตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 แสดงอัตราการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรียบริสุทธิ์และกลุ่มแบคทีเรีย

| แบคทีเรีย | อัตราการย่อยไพรีน | เอกสารอ้างอิง |
|-------------------------------|---|----------------------|
| Mixed culture (6 strains) | 0.42 มก.ต่อลิตรต่อชม. | Yuan และคณะ(2000) |
| Bacterial consortium | 27 มก.ต่อลิตรต่อวัน | Marcoux และคณะ(2000) |
| Enriched consortium | 1.1×10^{-9} ไมโครกรัมต่อCFUต่อชม. | Ramirez และคณะ(2001) |
| <i>Mycobacterium</i> sp. PYR1 | 1.3×10^{-9} ไมโครกรัมต่อCFUต่อชม. | Ramirez และคณะ(2001) |
| RRM-V3 | 14.67 ± 0.80 มก.ต่อลิตรต่อวัน (ระหว่างวันที่ 2 - 5) | การทดลองนี้ |
| | 7.03 ± 0.97 มก.ต่อลิตรต่อวัน (ระหว่างวันที่ 5 - 11) | การทดลองนี้ |
| | 0.67 ± 0.80 มก.ต่อลิตรต่อวัน (ระหว่างวันที่ 11 - 14) | การทดลองนี้ |

สารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถตรวจพบได้โดย HPLC แบบ reversed-phase chromatography ที่เวลาริเทนชันต่าง ๆ ซึ่งน้อยกว่าไพรีน (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.7) แสดงว่ากลุ่มแบคทีเรียนี้มีการเปลี่ยนโครงสร้างไพรีนโดยแตกโมเลกุลให้เล็กลงและความมีขั้ว(polarity)เพิ่มขึ้นจึงตรวจได้ที่เวลาน้อยกว่า เช่นรายงานของ Li และคณะ (1996) ที่พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย Pysed-1 และ Pysed-2 ย่อยไพรีนได้ 4,5-dihydrodiol pyrene สอดคล้องกับรายงานแบคทีเรียบริสุทธิ์ในรูปที่ 2.7 สารมัธยันต์จะถูกสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีน้ำตาลเข้มขึ้นตามความเข้มข้นของไพรีนที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.6) เช่นเดียวกับสีน้ำตาลที่เห็นได้ของผลึกไพรีนที่มีแผ่นฟิล์มแบคทีเรียหุ้มอยู่ (Eriksson และคณะ, 2002) แต่มีบางงานวิจัยที่พบสีเขียวน้ำตาลเข้มเมื่อใช้พีแนทรีนร่วมกับไพรีน ซึ่งไม่พบสารมัธยันต์ของไพรีนจากการติดตามหลายวิธี (Pinyakong, 1999) หรือเกิดสีเขียวน้ำตาลของโคโลนีแต่ไม่พบวงใสรอบโคโลนีที่พันทับด้วยไพรีน (Ho และคณะ, 2000) จากผลการเพิ่มปริมาณไพรีนเป็น 200 300 และ 400 มก.ต่อลิตร (รูปที่ 4.6) เนื่องจากการใช้ที่ 100 มก.ต่อลิตร ตรวจพบได้ปริมาณน้อยจึงต้องเพิ่มความเข้มข้น เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นและประโยชน์ในการจะศึกษาสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 พบว่าจำนวนพีกของสารมัธยันต์ที่ริเทนชันต่าง ๆ เพิ่มขึ้นตามปริมาณไพรีนที่เพิ่มขึ้น โดยมีริเทนชันจำนวน 2 4 และ 5 พีกจากไพรีนเข้ม 200 300 และ 400 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.7 และตารางที่ 4.2)

จำนวนของแบคทีเรียในการทดลองที่เติมสาร PAHs แทบทุกชนิด มีจำนวนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรือเท่าเดิม ซึ่งทั้งหมดจะมีจำนวนเท่ากับหรือน้อยกว่าในชุดควบคุมที่ไม่เติมสาร PAHs คาดว่าน่าจะเกิดจากพิษของสาร PAHs ต่อแบคทีเรีย (Sikkema และคณะ, 1995 ; Buchez และคณะ, 1997 ; Lee และคณะ, 2003) มีการเกาะเป็นกลุ่มก้อนของแบคทีเรีย (ภาคผนวก ง, รูปที่ ง.3(ก)) มีผลให้เทคนิคการเจือจางธรรมดาไม่สามารถแยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ได้หมด หรือแบคทีเรียเกาะกับผลึกของสาร PAHs เป็นแผ่นฟิล์มเคลือบรอบผลึก ทำให้การเจือจางไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร (Eriksson และคณะ, 2002 ; ภาคผนวก ง, รูปที่ ง.3(ข)) หรืออาจเป็นเพราะว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์ในชุดควบคุมที่ไม่เติมสาร PAHs ตายแล้วแตกสลายให้แหล่งอาหารใหม่แก่แบคทีเรียสายพันธุ์อื่นในการเจริญเติบโต (ธีระ เกรอต, 2539) ผมงกับไม่มีแรงกดดันจากสาร PAHs (chemical stress) (Lewis, 2000) จึงทำให้มีการเพิ่มจำนวนได้มากกว่า เพราะในแต่ละเซลล์ของแบคทีเรียมีสารประกอบหลายชนิด เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต(น้ำตาล) โกลโคโปรตีน กรดนิวคลีอิก สารอาหารต่าง ๆ ผลิตภัณฑ์ของเสียและไขมัน (Singleton และ Sainsbury, 1981 ; Nicklin และคณะ, 1999)

กรณีที่จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมมีปริมาณมากกว่าชุดทดลองที่เติมสาร PAHs หากพิจารณาเฉพาะเนื่องมาจากพิษของสาร PAHs โดยถ้าหากจำนวนแบคทีเรียลดลงจากวันเริ่มต้นให้ถือว่าสาร PAHs ที่เติมมีพิษต่อเซลล์แบคทีเรีย พบว่าอะซีแนพทีน พีแนนทีน ฟลูออแรนทีน และไพรีน ไม่เป็นพิษต่อกลุ่มแบคทีเรีย แต่ฟลูออรีน ไครซีน และเบนโซ(เอ)ไพรีน เป็นพิษต่อกลุ่มแบคทีเรียเมื่อใช้แบบสารเดี่ยว และเมื่อใช้สารบางชนิดร่วมกับไพรีน พบว่าอะซีแนพทีน เป็นพิษต่อกลุ่มแบคทีเรียอย่างมาก ส่วนแอนทราซีน ไครซีน และเบนโซ(เอ)ไพรีน ไม่เป็นพิษต่อกลุ่มแบคทีเรีย ซึ่งที่น่าสนใจคือ ไครซีน และเบนโซ(เอ)ไพรีน ที่มีพิษลดลงมากเมื่อใช้ร่วมกับไพรีนทั้งนี้เกิดจากกลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยไพรีนได้จึงมีปริมาณเพิ่มขึ้นและอาจจะสร้างสารบางอย่างที่ช่วยให้เซลล์ทนต่อความเป็นพิษได้ ไม่เหมือนกับในภาวะที่มีไครซีนและเบนโซ(เอ)ไพรีนเดี่ยว ซึ่งแบคทีเรียมีปริมาณเพิ่มขึ้นในทำการทดลอง โดยคาดว่าเกิดจากแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบกรดไขมันภายในและผนังของเซลล์ให้ทนต่อพิษของสารทั้งสองได้ (Sikkema และคณะ, 1995 ; Mrozik และคณะ, 2004) การทดลองแบบโคเมแทบอลิซึมร่วมกับไพรีน พบว่าปริมาณอะซีแนพทีน แอนทราซีน และเบนโซ(เอ)ไพรีนที่มีไพรีนไม่เติมแบคทีเรียมีปริมาณต่ำกว่าชุดที่เติมแบคทีเรีย น่าจะเกิดจากเทคนิคการสกัดไม่ดีพอ

สามารถทำบริสุทธิ์เชื้อแบคทีเรียจากกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ได้อย่างน้อย 7 ชนิด ซึ่งผลทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีสามารถจัดอยู่ในสกุล *Rugamonas*, *Comamonas*, *Flavimonas*, และ *Pseudomonas* และไม่สามารถระบุได้จำนวน 1 ชนิด โดยเป็นแกรมลบทั้งหมดสอดคล้องกับรายงานอื่น ๆ ที่พบว่าแกรมลบแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ได้หลายชนิด และในกลุ่มแบคทีเรียที่เพิ่มคัดกรองจากดินและตะกอนดิน มีแบคทีเรียแกรมลบสกุลหลัก เช่น สกุล

Pseudomonas (Bouchez และคณะ, 1999 ; Juhasz และคณะ, 1995, 1996) สกุล *Sphingomonas* (Supaka และคณะ, 2001) และแกรมบวกบางสกุล โดยส่วนมากคือ สกุล *Mycobacterium* (ตารางที่ 2.3 และ 2.4) ซึ่งหากมีแกรมบวกในกลุ่มจะช่วยให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายดีขึ้น (Ghazali และคณะ, 2004) แต่ละสายพันธุ์อาจจะใช้แหล่งคาร์บอนเดี่ยวและ/หรือใช้สาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำได้หรือไม่ได้ (Daugulis และ McCracken, 2003) แต่เมื่ออยู่ร่วมกันแล้วประสิทธิภาพดีขึ้นสามารถใช้สารประกอบได้มากขึ้นดีกว่าอยู่เดี่ยว ๆ (Carvalho และคณะ, 2002) บางรายงานยังไม่สามารถคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อย (degrader) ได้ (Li และคณะ, 1996 ; Eriksson และคณะ, 2002) แต่สามารถระบุสายพันธุ์ที่ทำให้บริสุทธิ์ได้ มีความสัมพันธ์โดยส่งเสริมการทำงานและเจริญเพิ่มจำนวนในกลุ่มแบคทีเรียเริ่มต้น (Kanaly และคณะ, 2002) เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ ที่พบว่าแต่ละเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมทั้ง 7 ชนิดไม่สามารถใช้พีแนทรีนและไพรีนได้ ดังนั้นจึงไม่ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค 16S ribosomal DNA ซึ่งการที่เชื้อบริสุทธิ์ไม่สามารถย่อยพีแนทรีนและไพรีนได้ อาจเป็นเพราะในระหว่างที่ทำการบริสุทธิ์มีการเชื่อมต่ออาหารสมบูรณ์หลายครั้งจนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งอาจทำให้สูญเสียความสามารถในการย่อยสลายได้ เพราะยีนไม่ถูกกระตุ้นในระหว่างนี้และแบคทีเรียใช้สารประกอบอินทรีย์ในอาหารที่ใช้คัดแยกได้ง่ายกว่า (Li และคณะ, 1996) หรือแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพไม่ถูกคัดแยกออกมาโดยวิธีที่ใช้ในการทดลอง (จึงต้องใช้ค่าว่าอย่างน้อย 7 ชนิด) หรืออาจเป็นเพราะว่าแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ชอบที่จะอยู่ในภาวะอาหารเหลวจึงจะมีการพัฒนาความสามารถในการย่อยสลายไพรีนได้ (Li และคณะ, 1996) และเนื่องจากแบคทีเรียที่มีความสามารถไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่ใช้ในการทดลองได้ (unculturable strain(s)) (Eriksson และคณะ, 2002)

แบคทีเรียสกุล *Comamonas* ถูกรายงานหลายสายพันธุ์ที่สามารถใช้สารประกอบอินทรีย์ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ ได้แก่ *C. acidovorans* TB-35 ย่อยสลาย polyester-polyurethane (PUR) (Nakajima-Kambe และคณะ, 1995) *C. testosteroni* B-356 ย่อยสลาย biphenyl และ chlorobiphenyls และ polychlorinated biphenyl (PCBs) (Sylvestre, 1995) *C. testosteroni* ย่อยสลาย p-toluenesulphonic acid (Khlebnikov และ Péringer, 1996) *C. testosteroni* T-2 ย่อยสลาย p-toluenesulfonate (pTS) (Bokhany และคณะ, 1997) *Comamonas* sp.GC (*C. testosteroni*) ใช้เนพทาซีนและพีแนทรีน *Comamonas* sp.H ใช้เนพทาซีน และพีแนทรีนที่อยู่ในอาหาร 10 %Trypticase soy broth (TSB) และ *Comamonas* sp.M7 (*C. terrigena*) ใช้เนพทาซีนได้ (Meyer และคณะ, 1999) แบคทีเรียสกุลนี้ส่วนมากคัดแยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานบำบัดน้ำเสียจากชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรม

แบคทีเรียสกุล *Rugamonas* ยังไม่พบรายงานที่สามารถย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม คัดแยกได้จากแม่น้ำ (Holt และคณะ, 1994) ซึ่งนักวิจัยสนใจจะนำสีแดงส้มที่แบคทีเรียสร้างมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมสีผสมอาหาร (Moss, 2002)

แบคทีเรียสกุล *Flavimonas* สามารถพบได้ในดินและแหล่งน้ำ รวมทั้งในโรงพยาบาล ซึ่งมี 1 สายพันธุ์ที่ถูกรายงานว่าสามารถก่อโรคในคนได้ คือ *F. oryzihabitans* ที่ก่อโรคสมองอักเสบแท้และเทียม (Grinchenko และคณะ, 2003) ในขณะที่เดียวกันสายพันธุ์นี้ยังถูกแยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียจากโรงงานที่ปนเปื้อนสารประกอบฟีนอล โดยที่สายพันธุ์นี้สามารถย่อยฟีนอลและ 4-คลอโรฟีนอล (4-chlorophenol, 4CP) ได้เช่นเดียวกับอีก 3 สายพันธุ์ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (*Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Chryseomonas luteola*) ที่แยกได้จากที่เดียวกัน (Buitrón และ González, 1996)

แบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* พบทั่วไปในธรรมชาติทุกแหล่ง บางสายพันธุ์ก่อโรคในคนและสัตว์ เช่น *P. aeruginosa* (Holt และคณะ, 1994) แบคทีเรียในสกุลนี้ถูกรายงานว่าสามารถย่อยสลายสาร PAHs ได้ อาทิ แนพทาลีน ฟิแนนทรีน ไพรีน เป็นต้น โดยสายพันธุ์ที่มีรายงานได้แก่ *P. putida* (Juhász และคณะ, 1996 ; Daane และคณะ, 2001) *P. mendocina* (Tian และคณะ, 2002) *P. atutzeri* AN10 (Bosch และคณะ, 2000) เพราะว่าแบคทีเรียสกุลนี้สามารถสร้างการลดแรงตึงผิวออกมาช่วยเพิ่มการละลายสารเหล่านี้ได้ดีขึ้น (Juhász และคณะ, 1996 ; Bouchez และคณะ, 1999 ; Daane และคณะ, 2001)

จากการสังเกตรูปแบบการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในชุดควบคุม พบว่ามีจำนวนเพิ่มขึ้นตลอดการทดลองเช่นเดียวกับชุดทดลอง ซึ่งแตกต่างจากรูปแบบการเจริญของแบคทีเรียบริสุทธิ์โดยใช้ไพรีนเช่นกัน พบว่าปริมาณแบคทีเรียในชุดควบคุมที่ปริมาณลดลงในท้ายการทดลอง (Prapatsompinyo, 2003) ซึ่งได้อธิบายเหตุผลการเพิ่มของจำนวนแบคทีเรียของกลุ่มแบคทีเรียในชุดควบคุมไว้ข้างต้น

การคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสาร PAHs ได้จากเศษใบไม้ในครั้งนี้อย่างสนับสนุนความเป็นไปได้ที่เราจะสามารถแยกเชื้อจากส่วนต่างๆ ของพืชที่สามารถย่อยสาร PAHs ได้อีกในอนาคต เหมือนกับรายงานของ Daane และคณะ (2001) ที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียจากรากพืชในบริเวณปนเปื้อนและ Juhász และคณะ (2000) ที่คัดแยกกลุ่มแบคทีเรียจากใบและเปลือกของยูคาลิปตัสและใบสนที่กำลังผุผัง ซึ่งพบกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมหลายชนิด นอกจากนี้ยังเป็นการสนับสนุนงานวิจัยของ นาวิรัตน์ เจริญช่าง (2544) และ สุพินดา ศิริวาราศิลป์ (2545) ที่รายงานว่าแบคทีเรียซึ่งมีอยู่ที่ใบไม้ของพืชบางชนิดที่ดูดซับสาร PAHs มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการย่อยสลายสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดินที่ทำการทดลอง

บทที่ 6

ข้อเสนอแนะงานวิจัย

6.1 เนื่องจากในงานวิจัยนี้พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งในชุดควบคุมและชุดทดลองบางครั้งมีช่วงของข้อมูลกว้าง (ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Derivative, SD) กว้าง) ซึ่งอาจเป็นเพราะเทคนิคที่ใช้ติดตามนั้นไม่เหมาะสม ดังนั้นอาจจะต้องใช้การติดตามการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียด้วยเทคนิคใหม่ เช่น การวัดปริมาณโปรตีน ซึ่งแปรผันโดยตรงกับปริมาณแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น (Juhasz และคณะ, 1996 ; Tian และคณะ, 2002) แต่จะต้องมีวิธีในการกรองแยกสาร PAHs ที่ใช้ไม่หมดออกจากอาหารที่ใช้ทดลองแยกจากแบคทีเรียให้ได้

6.2 การทำบริสุทธิ์เชื้อแบคทีเรียของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วยวิธีเจือจางแล้วเกลี่ยเชื้อที่ค่าเจือจางเหมาะสม จากนั้นสังเกตโคโลนีเดี่ยวที่แตกต่างกัน แต่ไม่สามารถพบแบคทีเรียเดี่ยวที่สามารถย่อยไพรีนได้ หรือแม้แต่นำมารวมกันก็ตาม ซึ่งคาดว่าวิธีดังกล่าวไม่เหมาะสมดังรายละเอียดในบทสรุปและวิเคราะห์ผล ดังนั้นการระบุสมาชิกของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ควรที่จะใช้วิธีทางพันธุศาสตร์ที่มีความไวและความจำเพาะสูงกว่า โดยจะใช้เทคนิคเดียวหรือหลายเทคนิคร่วมกัน เพื่อความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

6.3 ผลจากการย่อยไพรีนที่ความเข้มข้นสูงขึ้น จะพบสารมัธยันต์ได้มากและชัดเจนขึ้นซึ่งน่าจะมีการศึกษาวิธีการย่อยไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้ไพรีนที่ความเข้มข้นสูง ๆ เพราะจะช่วยให้ปริมาณและชนิดของสารมัธยันต์ที่ตรวจพบได้มากขึ้น และถ้าสามารถคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถใช้ไพรีนและสารมัธยันต์บางชนิดได้ ก็จะทำให้ได้ข้อมูลการทำงานของแบคทีเรียนี้ละเอียดมากยิ่งขึ้น ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ในการวิจัยต่อไปในอนาคต

6.4 การบำบัดจริงในสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วยสาร PAHs จะต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการอยู่รอดและประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ต่อการย่อยสลายและการเปลี่ยนแปลงของสมาชิกในกลุ่มอย่างละเอียด รวมถึงความปลอดภัยของแบคทีเรียเสียก่อนในระดับห้องปฏิบัติการก่อนการออกสู่สิ่งแวดล้อม

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กรมควบคุมมลพิษ. 2542. รายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อม พ.ศ.2542.
กรุงเทพมหานคร : ที.พรินติ้ง.กรุ๊ป.
- กรมควบคุมมลพิษ. 2545. สถานการณ์มลพิษด้านของเสียอันตราย. สรุปสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย พ.ศ.2545.กรุงเทพมหานคร :ที.พรินติ้ง.กรุ๊ป.
- กรมควบคุมมลพิษ. 2546. ของเสียอันตราย. สรุปสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย พ.ศ.2546.
กรุงเทพมหานคร : ที.พรินติ้ง.กรุ๊ป.
- ณัฐพันธุ์ ศุภกา. 2542. ความสามารถของแบคทีเรียดินที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายพีแนนทรินและพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น.วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ธีระ เกรอต. 2539. พื้นฐานความรู้ทางชีวเคมีและจุลชีววิทยา. ใน วิศวกรรมน้ำเสีย : การบำบัดทางชีวภาพ. กทม.: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นารีรัตน์ เจริญช่าง. 2544. การใช้วัสดุจากกากเกษตรเร่งการย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ในดิน.วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิวัติ เรืองพานิช. 2537. การอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. พิมพ์ครั้งที่ 2.
กรุงเทพมหานคร : สหมิตรออฟเซต.
- ประภาพร แดงเรือง. 2545. แบคทีเรียจากไบโจามจุรีและไบโประดูที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้.
โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- พรศรี สุทธนารักษ์. 2533. ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสภาวะแวดล้อมทางทะเลบริเวณอุตสาหกรรมแปรสภาพเรือเหล็กเก่า มาบตาพุด จังหวัดระยอง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วรรษยา สุนทรสารทูล. 2542. ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดนก พันธุ์พืช และการจัดการสวนสาธารณะเขตกรุงเทพมหานคร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

- ศรัลยา แพงไตร. 2543. การย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรียที่ออกซิไดส์อะซีแนพทีลิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุพินดา ศิริวราศิลป์. 2545. การใช้ไบโไฟตรักกูลถั่วและพารามิเตอร์บางประการในการเสริมการย่อยสลายไพรีนในดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อรุณการ์ สายเพชร. 2545. การย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรียที่ย่อยสลายอะซีแนพทีลิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Amagai, T., Takaharashi, Y., Mutsushita, H., Morkjoy, D., Sukasem, P., and Tabucanon, M. 1999. A survey on polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in soil in Chiang-Mai, Thailand. Environ. Interantional. 25: 593-572.
- Alexander, M. 1994. Cometabolism. In : Biodegradation and Bioremediation. pp. 177-195. USA : Academic press.
- Álvaro, M., Atienzar, P., Bourdelande, J. L., and Gercía, H. 2004. An organically modified single wall carbon nanotubes containing a pyrene chromophore: fluorescence and diffuse reflectance laser flash photolysis study. Chemical Physics Letters 384: 119-123.
- Ashok, B. T. and Saxena, S. 1995. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons- a review. J. Sci. Ind. Res. 54 : 443-451.
- Bakker, M. 2000. Atmospheric deposition of semivolatile organic compounds to Plants [Online]. Master's thesis. Available from: <http://www.library.uu.nl/digiarchief/dip/diss/1922442/inhoud.html>[July 20, 2004]
- Bakker, M., Tolls, J., and Kollöffel, C. 2000. Chapter 16. In: Persistent, bioaccumulative and toxic chemicals I: Fate and exposure, pp 218-236. Lipnick, R. L., Hermens, J. L. M., Jones, K. C., Muir, D. C. G. (ed). American Chemical Society Symposium Series.

- Bakker, M., Vorenhout, M., and Kollöffel, C. 1999. Dry deposition of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in three plantago species. Environ. Toxicol. Chemis. 18 : 2289-2294.
- Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., and et al. 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. Appl. Environ. Microbiol. 66(5): 1834-1843.
- Baver, J. E., and Capone, D. G. 1988. Effect of co-occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons I marine sediment slurries. Appl. Environ. Microbiol. 54:1649-1655.
- Blumer, M. 1976. Polycyclic aromatic compounds in nature. Scientific American 234(3) : 34-45.
- Böhme, F., Welsch-Pausch, K., and McLachlan, M. S. 1999. Uptake of airborne semivolatile organic compounds in agricultural plants: Field measurements of interspecies variability. Environ. Toxicol. Chem. 33 : 1805-1813.
- Boldrin, B., Tiehm, A., and Fritzsche, C. 1993. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene and pyrene by a *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1927-1930.
- Bolhamy, M., Deront, M., Adler, N., and Peringer, P. 1997. Survival and activity of *Comamonas testosteroni* in mixed population. Wat. Res. 31(11): 2802-2810.
- 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.
- Bosch, R., García-Valdés, E., and Moore, E. R. B. 2000. Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. Gene 245: 65-74.
- Botello, A. V., Calva B, L. G., and Ponce V, G. 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from coastal lagoons of Veracruz state, Gulf of Mexico. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 67 : 889-897.
- Bouchez, M., Blanchet, D., and Bardin, V. 1999. Efficiency of defined strains and of soil consortia in the biodegradation of PAH mixtures. Biodegradation. 10: 429-435.

- 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.
- Bouchez, M., Blanchet, D., and Vandecasteele, J-P. 1997. An interfacial uptake mechanism for the degradation of pyrene by a *Rhodococcus* strain. Microbiology 143: 1087-1093.
- Boving, T. B. , and Zhang, W. 2004. Removal of aqueous-phase polynuclear aromatic hydrocarbons using aspen wood fibers. Chemosphere 54: 831-839.
- Bugg, T., Foght, J. M., Pickard, M. A., and Gray, M. R. 2000. Uptake and active efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* LP6a. Appl. Environ. Microbiol. 66 : 5387-5392.
- Buitrón , G., and González , A. 1996. Characterization of the microorganisms from an acclimated activated sludge degrading phenolic compounds . Water Science and Technology 34 (5-6): 289-294.
- Carnicharl, L. M., and Pfaender, F. K. 1997. The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. Biodegradation 8 : 1-13.
- Carvalho, M. F., Alves, C. C. T., Ferreira, M. I. M., Marco, P. D., and Castro, P. M. L. 2002. Isolation and initial characterization of bacterial consortium able to mineralize fluorobenzene. Appl. Environ. Microbiol. 68(1) : 102-105.
- Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3: 351-368.
- Cerniglia, C. E., Freeman, J. R., and Baulen, C. 1993. Metabolism and toxicity of 1-and 2-methylnaphthalene and their derivatives in cyanobacteria. Arch. Microbiol. 136: 177-183.
- Cerniglia, C. E., Morgan, J. C. and Gibson, D. T. 1979. Bacteria and fungal oxidation of dibenzoran. Biochem. J. 180: 175-185.
- Charoenchang, N., Pinpanichakan, P., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarn, S., and Juntongjin, K. 2003. Utilization of agricultural materials to enhance microbial degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in soil. J. Sci. Res. Chula.

- Univ. 28 (special issue I,NRC-EHWM) : 1-13.
- Chen, P-M. 1983. Binding of pyrene to DNA, base sequence specificity and its implication. *Nucleic Acids Research* 11: 7231-7250.
- Cheung, P. Y., and Kinkle, B. K. 2001. *Mycobacterium* diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(5) : 2222-2229.
- Chin, Y-P., Aiken, G. R., and Danielsen, K. M. 1997. Binding of pyrene to aquatic and commercial humic substances: The role of molecular weight and aromaticity. *Environ. Sci. Technol* : 1630-1635.
- Churchill, S. A., Harper, J. P., and Churchill, P. F. 1999. Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 549-552.
- Crosse, J. E., 1959. Bacteria canker of stone fruits. IV. Investigation of a method for measuring the inoculum potential of cherry trees. *Ann. Appl. Biol.* 47: 306-317.
- Cotham, W. E., and Bidleman, T. F. 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in air at an urban and a rural site near Lake Michigan. *Environ. Sci. Technol.* 29 : 2782-2789.
- Csuros, M. 1999. Chapter 5 : Microorganisms in soil. In : Microbiological examination of water and wastewater, pp. 66-70. Florida, USA: CRC press LLC.
- Daane, L. L., Harjono, I., Zylstra, G. J., and Häggblom, M. M. 2001. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(6): 2683-2691.
- Daugulis, A. J., and McCracken, C. M. 2003. Microbial degradation of high and low molecular weight polyaromatic hydrocarbons in a two-phase partitioning bioreactor by two strains of *Sphingomonas* sp. *Biotechnology Letters* 25: 1441-1444.
- Dean-Ross, D., and Cerniglia, C. E. 1996. Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 307-312.
- Dean-Ross, D., Moody, J., and Cerniglia, C. E. 2002. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment.

FEMS Microbiology Ecology. 41: 1-7.

Deshpande, A. D., Huggett, R. J., and Halbrook, R. A. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in the bile of a territorial benthic fish, Oyster Toadfish(*Opsanus tau*) from the Elizabeth river, Virginia. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42 : 43-52.

Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., and Johri, A. K. 2002. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59:143-152.

Eghetesadi, P., Riazi, G., Taghikhani, M., and Ranaei Siadat, S. O. 2002. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Northern Persian Gulf as indicated by kinetic and thermodynamic criteria. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 69 : 704-711.

Enzymetech, Inc. 2001. PAHs: Creosote and coal tar [On line]. Available from: <http://www.enzymetech.com/knowledge/pahs-cre-coal>. [August 16, 2004]

Ercolani, G. L. 1991 Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. Microb. Ecol. 21: 35-48.

Eriksson, M., Dalhammar, G., and Mohn, W. M. 2002. Bacterial growth and biofilm production on pyrene. FEMS Microbiology Ecology 40: 21-27.

Faust, R. A. 1998. Toxicity summary for pyrene [On line]. Available from: http://rais.ornl.gov/tox/profiles/pyrene_c_V1.shtml [Last updated 2/13/98]

Fiedler, H., Cheung, C. K., and Wong, M. H. 2002. PCDD/PCDF, chlorinated pesticides and PAH in Chinese teas. Chemosphere 46 : 1429-1433.

Garivait, H., Laowagul, W., Sukasem, P., Ngod-Ngam, S., Polprasert, C., and Reutergardh, L. B. 2002. Airborne polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in Bangkok urban air II. Level and distribution. ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ.2537-2545 ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมด้านสิ่งแวดล้อม . หน้า ค57-73. กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม, กทม : ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

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

- Geiselbrecht, A. D., Hedlund, B. P., Tichi, M. A., and Stanley, J. T. 1998. Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH)-degrading *Cycloclasticus* strains from the Gulf of Mexico and comparison other PAH degradation ability with that of Puget Sound *Cycloclasticus* strains. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4703-4710.
- Ghazali, F. M., Rahman, R.N.Z.A., Salleh, A. B., and Basri, M. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. International Biodeterioration & Biodegradation 54 : 61-67.
- Grifoll, M., Casellas, M., Bayona, J. M., and Solanas, A. M. 1992. Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium: identification of ring oxidation and ring fission products. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2910-2917.
- Grifoll, M., Selifenov, S. A., Galtin, C. V., and Chapman, P. J. 1995. Actions of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3711-3723.
- Grinchenko, T., Peme, P., and Cunha, B. A. 2003. *Flavimonas oryzihabitans* pseudomeningitis. American Journal of Infection Control 31(6): 385-386.
- González-Benito, J., Olmos, D., Sánchez, P. G., Aznar, A. J., and Baselga, J. 2003. Kinetic study of the cure process at the silica microfibres/epoxy interface using pyrene fluorescence response. Journal of Materials Processing Technology 143-144: 153-157.
- Grimmer, G. H., Bohnke, A., and Glaser, A. 1977. Investigation on the carcinogenic burden by air pollution in marine polycyclic aromatic hydrocarbons in automobile exhaust gas-an inventory. Zentralb. J. Bakteriologie, Abt. I Orig. Reihe B. 164: 218-234.
- Grosser, R. J., Warshawsky, D., and Yestal, J. R. 1991. Indigenous and enhanced mineralisation of pyrene, benzo[a]pyrene and carbazole in soil. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 3462-3469.
- Gothrie, E. A., and Pfaender, F. K. 1998. Reduces pyrene bioavailability in microbially active soils. Environ. Sci. Technol. 32(4): 501-508.
- Gutiérrez-rojas, M. 2000. Increasing bioavailability of recalcitrant molecules in contaminated soils. In: Environmental biotechnology and cleaner bioprocesses. pp. 167-177. Olguria, E.(ed). USA : Taylor & Francis.
- Haderlein, A., Legros, R., and Ramsay, B. 2001. Enhancing pyrene mineralization in

- contaminated soil by the addition of humic acids or composted contaminated soil. Appl.Microbiol.Biotechnol. 56 : 555-559.
- Hansen, Å. M., Wallin, H., Binderup, M. L., and et al. 2004. Urinary 1-hydroxypyrene and mutagenicity in bus drivers and mail carriers exposed to urban air pollution in Denmark. Mutation Research 557: 7-17.
- Heitkamp, A. M., Franklin, W., and Cerniglia, C. E. 1988a. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons : Isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. Appl.Environ.Microbiol. 54(10) : 2549-2555.
- Heitkamp, A. M., Freeman, J. P., Miller, D. W., and Cerniglia, C. E. 1988b. Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp. : Identification of ring oxidation and ring fission products. Appl.Environ.Microbiol. 54(10) : 2556-2565.
- Hirano, S. S., Nordhgeim, E. V., Army, D. C., and Upper, C. D. 1982. Lognormal distribution of epiphytic bacterial populations on leaf surfaces. Appl. Environ. Microbiol. 44: 695-700.
- Hirano, S. S., and Upper, C. D. 1991. Bacterial community dynamics. In : Microbial ecology of leaves. pp.271-294. Andrews, J. H., and Hirano, S. S. (ed.). NY, USA: Springer-Verlag.
- Ho, Y., Jackson, M., Yang, Y., Mueller, J. G., and Pritchard, P. H. 2000. Characterization of fluoranthene- and pyrene-degrading bacteria isolated from PAH-contaminated soils and sediments. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 24: 100-112.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T. 1994. Group 4 Gram-negative aerobic/microaerophilic rods and cocci. In: Bergey's manual of determinative bacteriology (9th ed.), pp.71-102. Hott, J. G., and et al.(eds.). Baltimore, Maryland, USA: The William & Wikins.
- Howsam, M., Jones, K. C., and Ineson, P. 2000. PAHs associated with the leaves of three deciduous tree species: I—concentrations and profiles. Environ. Pollut 108 : 413-424.
- Hwang, S., and Curight, T. J. 2002. Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. Chemosphere 47: 891-899.

- Ishimaru, C., Eskridge, K. M., Bidaver, A. K. 1991. Distribution analyses of naturally occurring epiphytic populations of *Xanthomonas compestris* pv. *phaseoli* on dry beans. Pyhtopathology . 81: 262-268.
- Jimenez, I. Y., and Bartha, R. 1996. Solvent-augmented mineralization of pyrene by a *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 62(7): 2311-2316.
- Jitsurong, S. 1995. A simple technique for bacterial flagella staining. J Med Tech Assoc Thailand 23(2): 161-167.
- Jones, K. C., Stratford, J. A., Waterhouse, K. S., and Vogt, N. B. 1989. Organic contaminants in welsh soils : polynuclear aromatic hydrocarbons, Environ. Sci. Technol. 23 : 540-550.
- Juhasz, A. L., Britz, M. L., and Stanley, G. A. 1997. Degradation of fluoranthene, pyrene, benz [a] anthracene and dibenz [a,h] anthracene by *Burkholderia cepacia*. J. Appl. Microbiol. 83: 189-198.
- Juhasz, A. L., Britz, M. L., and Stanley, G. A. 2000. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. Lett.Appl.Microbiol. 30: 396-401.
- Juhasz, A. L., and Naidu, R. 2000a. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons:a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. International Biodeterioration & Biodegradation 45 : 57-88.
- Juhasz, A. L., and Naidu, R. 2000b. Enrichment and isolation of non-specific aromatic degraders from unique uncontaminated (plant and faecal material) sources and contaminated soils. J. Appl. Microbiol. 89: 642-650.
- Juhasz, A. L., Sanley, G. A., and Britz, M. L. 2000. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* VUN10,003. Letters in Applied Microbiology 30: 396-401.
- Kamal, A., Ramesh, G., Srinivas, O., and Ramulu, P. 2004. Synthesis and antitumour activity of pyrene-linked pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 14: 471-474.

- Kanally, R. A., and Harayama, S. 2000. Biodegradation of high- molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by Bacteria. Bacteriol. J. 182 : 2059- 2097.
- Kanally, R. A., Harayama, S., and Watanabe, K. 2002. *Rhodanobacter* sp. strain BPC1 in a benzo[a]pyrene-mineralizing bacterial consortium. Appl. Environ. Microbiol. 68(12): 5826-5833.
- Karamanoli, K., Vokou, D., Menkissogly, U., and Constantinidou, H.-I. 2000. Bacterial colonization of phyllosphere of Mediterranean aromatic plants. J Chem. Ecol. 26: 2035-2048.
- 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.
- Kazunga, C., and Aitken, M. D. 2000. Products from the Incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66(5) : 1917-1922.
- Kipopoulou, A. M., Manoli, E., and Samara, C. 1999. Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. Environmental Pollution 106 : 369-380.
- Kiyohara, H., Nagao, K., and Yana, K. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. Appl. Environ. Microbiol. 43(2): 454-457.
- Khlebnikov, A., and Péringer , P. 1996. Biodegradation of p-toluenesulphonic acid by *comamonas testosteroni* in an aerobic counter-current structured packing biofilm reactor . Water Science and Technology 34(5-6) : 257-266
- Komukai-Nakamura, S., Sugiura, K., Yamauchi-Inomata, Y., and et al. 1996. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil. Journal of fermentation and Bioengineering. 82(6): 570-574.
- Komatsu, T., Omori, T. and Kodama, T. 1993. Microbial degradation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterial culture. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57: 864–865.

- 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.
- Korfiatis, G. P., and Chermisinoff, P. N. 1994. Environmental technology and engineering. In: Environmental strategies handbook: A guide to effective policies & practices. Kolluru, R. V. (ed). pp.155-160 : R.R. Donnelley & sons.
- Kostenko, E., Dobrikov, M., Pyshmyi, D., and et al. 2001. 5'-bis-pyrenylated oligonucleotides displaying excimer fluorescence provide sensitive probes of RNA sequence and structure. *Nucleic Acids Research* 29(17): 3611-3620.
- Lederer, W. H. 1985. Acenaphthylene. In Regulatory Chemicals of Health and Environmental Concern. P. 1., Lederer, W. H. (ed.). Van Nostrand Reinhold Company.
- Lee, H. J., Villaume, J., Cullen, D. C., Kim, B. C., and Gu, B. G. 2003. Monitoring and classification of PAH toxicity using and immobilized bioluminescent bacteria. *Biosensors and Bioelectronics* 18: 571-577.
- Lewis, K. 2000. Programmed Death in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64(3): 503-514.
- Li, X-F., Cullen, W. R., Reimer, K. J., and Le, X-C. 1996. Microbial degradation of pyrene and characterization of a metabolite. *The Science of the Total Environment* 177: 17-29.
- Limpert, E., Stahol, W.A., Abbt, M. 2001. Log-normal distributions across the sciences: keys and clues. *BioScience*. 51: 341-352.
- Lin, T-C., Chang, F-H., Hsieh, J-H., Chao, H-R., and Chao, M-R. 2001. Environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and total suspended particulates in a Taiwanese temple. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67 : 332-338.
- Lindow, S. E. 1996. Role of immigration and other processes in determining epiphytic bacterial populations: implications for disease management. In: Aerial Plant Surface Microbiology, pp 155-168. Morris, C. E., Nicot, P. C., Nguyen, C.(Eds.). New York, USA: Plenum Press.

- Lindow, S. E., Arny, D. C., Upper, C. D. 1978. Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature. Appl. Environ. Microbiol. 36: 831-838.
- Liu, X., and Korenaga, T. 2001. Dynamics analysis for the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice. J. Health Science 47(5) : 446-451.
- Luthy, R. G. 1997. Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. Environ. Sci. Technol. 31(12): 3341-3347.
- Madson, E. L. 1998. Epistemology of environmental microbiology. Environ. Sci. Technol. 32(4): 429-439.
- Maria, C. S. 1999. Bioremediation of organic contaminants. In : Microbiological examination of water and wastewater. pp.79-84. CRC Florida, USA : Press LLC.
- Madsen, T., and Kristensen, P. 1997. Effects of bacterial inoculation and nonionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environmental Toxicology and chemistry 16(4): 631-637.
- Marcoux, J., Déziel, E., Villemur, R., Lépine, F., Bisailon, J. G. and Beaudet, R. 2000. Optimization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Degradation in a Two-Liquid-Phase Bioreactor. J. Appl. Microbiol. 88: 655- .
- Masuko, M., Ohuchi, S., Sode, K., Ohtani, H., and Shumadzu, A. 2000. Fluorescence resonance energy transfer from pyrene to perylene labels for nucleic acid hybridization assays under homogeneous solution conditions. Nucleic Acids Research 28(8) e34: i-viii.
- McLachlan, M. S., Welsch-Pausch, K., and Tolls, J. 1995. Field validation of a model of the uptake of gaseous SOC in *Lolium multiflorum* (rye grass). Environ. Sci. Technol. 29 : 1998-2004.
- Means, J. C., Ward, S. G., Hassett, J. J., and Banwart, W.L., 1980. Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soil. Environ. Sci. Technol. 14: 1524-1528.
- Melcher, R. J., Apitz, S. E., and Hemmingsen, B. B. 2002. Impact of Irradiation and polycyclic aromatic hydrocarbon spiking in microbial populations in marine sediment for future aging and biodegradability studies. Appl. Environ. Microbiol. 68(6): 2858-2868.

- Meyer, S., Moser, R., Neef, A., Stahl, U., and Kämpfer, P. 1999. Differential detection of keyenzymes of polyaromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. Microbiology 145: 1731–1741.
- Microbiology fact sheets for schools. 2004. Microbes on leaves [On line]. Available from: <http://www.microbiologyonline.org.uk/forms/leaves.pdf> [March 4, 2004]
- Molina, M., Araujo, R., and Hodson, R. E. 1999. Cross-induction of pyrene and phenanthrene in a *Mycobacterium* sp. isolated from polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated river sediments. Can. J. Microbiol. 45: 520-529.
- Moss, M. 2002. Bacterial pigments. In : Microbiolgis [On line]. Available from: www.sam.org.uk [December, 2002]
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., and Labuzek, S. 2004. Changes in whole cell-derived fatty acids induced by naphthalene in bacteria from genus *Pseudomonas*. Microbiology Research 159:87-95.
- Nadarajah, N., Hamme, J. B. Pannu, J., Sungh, A., and Ward, O. 2002. Enhanced transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons using a combined Fenton's reagent, microbial treatment and surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 540-544.
- Nakajima-Kambe, T., Onuma, F., Kimpara, N., and Naka-bara, T. 1995. Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. FEMS Microbiol. Lett. 129: 39-42.
- Nam, K., and Kukor, J. J. 2000. combined ozonation and biodegradation for remediation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Biodegradation 11: 1-9.
- Narro, M. L., Cerniglia, C. E., Balen, C. and Gibson, D. T. 1992. Metabolism of phenanthrene on the marine cyanobactrium *Agmellum quadruplicatum* PR-6. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1351-1359.
- Neurath, G. B. 1972. Recent advances in knowledge of the chemical composition of tobacco smoke. In The Chemistry of Tobacco and Tobacco smoke. pp. 77-97., Schmeltz, I. (ed.). New York : Plenum Publishing Corp.

- Nour El-Din, N. M., and Abdel-Moati, M. A. R. 2001. Accumulation of trace metals, petroleum hydrocarbons, and polycyclic aromatic hydrocarbons in marine copepods from the Arabian Gulf. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 66 : 110-117.
- Ortiz, E., Kraatz, M., and Luthy, R. G. 1999. Organic phase resistance to dissolution of polycyclic aromatic compounds. Environ. Sci. Technol. 33 : 235-242.
- Panther, B., Hooper, M., Limpaseni, W., and Hooper, B. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons as environmental contaminants: some results from Bangkok. In: Proceedings of the Third International Symposium of ETER NET-APR: Conservation of the Hydrospheric Environment. pp. 178-181.
- Patnaik, P. 1992. hydrocarbon, Aromatic. In: A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances. pp. 429-445. New York: Van Nortrand Reinhold.
- Pereira Netto, A. D., Sisinno, C. L. S., Moreira, J. C., Arbilla, G., and Dufrayer, M. C. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons in leachate from a municipal solid waste dump of Niterói City, RJ, Brazil. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 68 : 148-154.
- Pereira Netto, A. D., Muniz, F. C., and Laurentino, E. C. P. R. 2002. Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in street dust of Niterói City, RJ, Brazil. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 68 : 831-838.
- Périssol, C., Roux, M., Le Petit, J. 1993. Succession of bacteria attached to evergreen oak leaf surfaces. Eur. J. Soil Biol. 29: 167-176.
- Pignatello, J. J. and Xing, B. 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. Environ. Sci. Technol. 30(1):1-11.
- Pinyakong, O. 1999. Identification of metabolites from degradation of pyrene and fluoranthene via co-metabolism with phenanthrene by *Sphingomonas* sp. strain P2 and preliminary study on genes involved in phenanthrene degradation. Master's thesis, Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.
- Prapatsornpinyo, S. 2003. Isolation and identification of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from river and canal sediments in Bangkok metropolis. Master's Thesis. Inter-Department of Science in Environmental Management, Chulalongkorn University.

- Prevedouros, K., Brorström-Lundén, E., Halsall, C. J., Jones, K., Lee, R. G. M., and Sweetman, A. J. 2004. Seasonal and long-term trends in atmospheric PAH concentrations: evidence and implications. Environmental Pollution 128 : 17-27.
- Potter, C. L., Glaser, J. A., Chang, L. W., Meier, J. R., Dosani, M. A., and Herrmann, R. F. 1999. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons under bench-scale compost conditions. Environ. Sci. Technol. 33: 1717-1725.
- Ramirez, N., Curight, T., and Ju, L-K. 2001. Pyrene biodegradation in aqueous solutions and soil slurries by *Mycobacterium* PYR-1 and enriched consortium. Chemosphere 44: 1079-1086.
- Randerath, K., Zhou, G.-D., Randerath, E., Safe, S. H., and Donnelly, K., C. 1997. Comparative ³²P-postlabeling analysis of exogenous and endogenous DNA adducts in mouse skin exposed to a wood-preserving waste extract, a complex mixture of poly cyclic and polychlorinated chemicals. Environmental and Molecular Mutagenesis 29: 372-378.
- Rehmann, K., Noll, H. P., Steinberg, C. E., and Kettrup, A. A. 1998. Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. Strain KR2. Chemosphere. 36: 2977-2992.
- Romantschuk, M., Sarand, I., Petänen, T., and et al. 2000. Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. Environmental Pollution 107 : 179-185.
- Reyes, C., Sigman, M. E., Arce, R., Barbas, J. T., and Dabestani, R. 1998. Photochemistry of acenaphthene at a silica gel/air interface. J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. 122: 277-283.
- Šašek, V., Bhatt, M., Cajthaml, K., and Lednická, D. 2003. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 44: 336-342.
- Saval, S. 2000. Bioremediation : Clean-up biotechnology for soils and aquifers. In : Environmental biotechnology and cleaner bioprocesses. pp 155-166. Olquin, E. (ed.). UK: Tayler & Francis.
- 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.

- Schneider, J., Grosser, R., Jayasimhulu, K., Xue, W., and Warshawsky, D. 1996. Degradation of pyrene, benz(a)anthracene and benz(a)pyrene by *Mycobacterium* sp. Strain RKGII-135, isolated from a former coal gasification site. Appl. Environ. Microbiol. 62: 13-19.
- Schocken, M. J., and Gibson, D. T. 1984. Bacterial oxidation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene. Appl. Environ. Microbiol. 48: 10-16.
- Shuttleworth, K. L., and Cerniglia, C. E. 1995. Environmental aspects of PAH biodegradation. Appl. Biochem. Biotechnol. 54: 291-302.
- Siriwarasin, S., Pattaragulwanit, K., Pinpanichakan, P., Thaniyavarn, S., and Juntongjin, K. 2002. Utilization of Leguminous leaves for enhancing polycyclic aromatic hydrocarbons degradation in soil. Abstract Book. The 14th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology : Biotechnology for Better Living in the New Economy Abstracts. November 12-15, 2002. Khon Kaen, Thailand. p89.
- Sikka, J., DE-Bont, J. A. M., and Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol Rev 59(2): 201-222.
- Smith, J., Lethbridge, G., and Burns, R. G. 1997. FEMS microbiology Letters 152 : 141-147.
- Staci, L., Simonich, and Hites, R.A. 1994. Vegetation-atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. Environ.Sci.Technol. 28: 939-943.
- Stieber, M., Haeseler, F., Werner, P., and Frimmel, F. H. 1994. A rapid screening method for micro-organisms degrading polycyclic aromatic hydrocarbons in microplates. Appl.Microbiol.Biotechnol.40: 753-755.
- Stringfellow, W., and Aitken, M. D. 1995. Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading Pseudomonads. Appl. Environ. Microbiol. 61: 357-362.
- Storelli, M. M., and Marcotrigiano, G. O. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbon distributions in sediments from the Mar Piccolo, Ionian Sea, Italy. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 65 : 537-544.
- Supaka, N., Pinphanichakarn, P., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarn, S., Omori, T., and Juntongjin, K. 2001. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading

- Sphingomonas* sp. strain P2 and its ability to degrade fluoranthene and pyrene via cometabolism. Science Asia. 27: 21-28.
- Sutherland, J. B., Rafill, F., Khan, A. A., and Cerniglia, C. E. 1995. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. In: Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals, pp.269-306. Young, L. Y., and Cerniglia, C. E.(ed). USA : Wiley-Liss.
- Sylvestre, M. 1995. Biphenyl/Chlorobiphenyls Catabolic Pathway of *Comamonas testosteroni* B-356: Prospect for use in Bioremediation. Internationnl Biodeterioration & Biodegradation : 189-211.
- Tian, L., Ma, P., and Zhong, J-J. 2002. Kinetics and key enzyme activities of phenanthrene degradation by *Pseudomonas mendocina*. Process Biochemistry 37: 1431-1437.
- Tiehm, A., and Fritzsche, C. 1995. Utilization of solubilized and crystalline mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* sp. Appl Microbiol Biotechnol 42: 964-968.
- Trejo, M., and Quintero, R. 2000. Bioremediation of contaminated soils. In: J. O. Eugenia, G. Sanchez and H. Elizabeth (eds.), Environmental biotechnology and cleaner bioprocess, pp. 179-189. London: Taylor and Francis.
- Trzesicka-Mlynarz, D., and Ward, O. P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) by mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. Can.J.Microbiol. 41 : 470-476.
- Trzesicka-Mlynarz, D.T., and Ward, O.P. 1996. Degradation of fluoranthene in a soil matrix by indigenous and introduced bacteria. Biotechnol. Lett. 18: 181-186.
- U.S. National Library of Medicine. 2002. [On line]. Available from: <http://toxnet.nlm.nih.gov> [Last modified on May 8, 2002]
- Veili, M. I., and Albright, L. J. 1993. Improved sample preparation for enumeration of aggregated aquatic substrate bacteria. In: Handbook of methods in aquatic microbial ecology. pp. 139-142. Kemp, P. F., and et al.(eds.). Tokyo, Japan : Lewis Publishers.
- Verschueren, K. 1997. Handbook of environmental data on organic chemicals. 596-599. New York: Thomson publishing.

- Vila, J., López, Z., Sabaté, J., Minguillón, C., Solanas, A. M., and Grifoll, M. 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1: Actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 67(12): 5497-5505.
- Wackett, L. P. 2001. Identifying novel microbial catalysis by enrichment culture and screening. In : Biocatalysis and biodegradation : Microbial transformation of organic compounds. pp. 27-38. USA: ASM press.
- Wagrowski, D. M., and Hites. R. A. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon accumulation in urban, suburban, and rural vegetation. Environ. Sci. Technol. 31 : 279-282.
- Walter, U., Beyer, M., Klein, J., and Rehm, H. J. 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 671-676
- Wan, C. K., Wong, J. W. C., Fang, M., and Ye, D. Y. 2003. Effect of organic waste amendments on degradation of PAHs in soil using thermophilic composting. Environmental Technology 24: 23-30.
- Wang, Z., Fingas, M., Landriault, M., and et al .2000. Distribution of PAHs in Burn Residue and Soot Samples and Differentiation of Pyrogenic and Petrogenic PAHs – The 1994 and 1997 Mobile Burn Study. In : Chemistry of Diesel Fuels. Song, Chunshan, (ed.), 237-254. NY, USA : Taylor & Francis,
- Wang, S., Liu, B., Sun, K., and Su, Q. 2004. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons formed during the pyrolysis of phenylalanine. Journal of Chromatography A 1025 : 255-261.
- Warnatz, J. 2001. Formation of hydrocarbons and soot. In : Combustion : physical and chemical fundamentals modeling and stimulation, experiments, pollutant formation (3 ed), 257-272. Germany : Springer-Verlag Berlin Heidelberg,
- Warner, S. D., Farant, J-P., and Butler, I. S. 2004. Photochemical degradation of selected nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in solution and adsorbed to solid particles. Chemosphere 54: 1207-1215.
- White, J. C., and Triplett, T. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) in the sediments and fish of the Mill River, New Haven, Connecticut, USA. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 68 : 104-110.

- Wilcke, W., Müller, S., Kanchanakool, N., Niamskul, C., and Zech, W. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in hydromorphic soils of the tropical metropolis Bangkok. *Geoderma* 91 : 297-309.
- Wilson, S. C., and Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Environ. Pollut.* 81: 229-249.
- Yadav, R. K. P., Halley, J. M., Karamanoli, K. K., Constantinidou, H.-I., and Vokou, D. 2004. Bacterial populations on the leaves of Mediterranean plants: quantitative features and testing of distribution models. *Environmental and Experimental Botany*. 52: 63-77.
- Yamana, K., Iwase, R., Furutani, S., and et al. 1999. 2'-Pyrene modified oligonucleotide provides a highly sensitive fluorescent probe of RNA. *Nucleic Acids Research* 27(11): 2387-2392.
- Yuan, S. Y., Wei, S. H., and Chang, B. V. 2000. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by mixed culture. *Chemosphere* 41: 1463-1468.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM)

| | | |
|--|-------|------|
| แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) | 3.0 | กรัม |
| ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) | 5.5 | กรัม |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) | 0.8 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 0.01 | กรัม |
| เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) | 0.005 | กรัม |
| แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | 0.005 | กรัม |

ละลายสารสามชนิดแรกในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ในส่วนของสารละลายสามชนิดหลังทำการเตรียมแยกแต่ละชนิดแล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงเติมลงในอาหารที่ทำกรนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM (CFMM agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเหลว CFMM แต่ละลายแบคทีโอะการ์ 15 กรัมต่ออาหาร 1,000 มล. ลงไปในสารสามชนิดแรกก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ที่งัวจันได้อุณหภูมิ 50-60 °ซ จึงเติมสารสามชนิดหลังที่ฆ่าเชื้อแล้วก่อนนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีโซเดียมซัคซิเนต (CFMM + Sodium succinate agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเหลว CFMM และเติมโซเดียมซัคซิเนต ความเข้มข้น 0.01 % คนให้ละลายหมด แล้วเติมแบคโตอะการ์ 15 กรัมต่ออาหาร 1,000 มล. ลงไปในสารสามชนิดแรกก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ที่งั้วจันได้อุณหภูมิ 50-60 °ซ จึงเติมสารสามชนิดหลังที่ฆ่าเชื้อแล้วก่อนนำไปใช้เทใส่จานเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

| | | |
|----------------|------|------|
| ทริปโตน | 10.0 | กรัม |
| ผงสกัดจากยีสต์ | 5.0 | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ | 5.0 | กรัม |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แต่ละลายวุ้นผง 15 กรัมต่ออาหาร 1,000 มล. ลงไปในอาหารก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารละลายไพรีนในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (pyrene in DMSO solution)

ชั่งไพรีน 0.1 กรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 1.0 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนอะซีแนฟทีนละลายหมด ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เดิมลงในอาหารเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

สารละลาย PAHs ชนิดอื่นในไดเมทิลซัลฟอกไซด์

ชั่งสาร PAHs ชนิดอื่น 0.1 กรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 1.0 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนสาร PAHs ละลายหมด ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เดิมลงในอาหารเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

สารละลายมาตรฐานของไพรีนและสาร PAHs อื่นในเมทานอล

ชั่งไพรีน 0.1 กรัม ละลายสารมาตรฐานแต่ละชนิดในเมทานอลปริมาตร 10 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนสารละลายหมด กรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานไพรีนก่อนฉีดตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และใช้เตรียมกราฟมาตรฐานโดยเติมให้ได้ความเข้มข้น 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 และ 100 มก.ต่อลิตร สำหรับไพรีน และความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 มก.ต่อลิตร สำหรับสาร PAHs อื่น แล้วทำการสกัดตามวิธีในบทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย แล้ววิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC จากนั้นนำข้อมูลมาสร้างกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค) ไพรีน (รูปที่ ค.1) อะซีแนฟทีน (รูปที่ ค.2) ฟลูออรีน (รูปที่ ค.3) พีแนนทีน (รูปที่ ค.4) และฟลูออแรนทีน (รูปที่ ค.5)

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

ซิงโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

กลีเซอรอล

นำกลีเซอรอลมานึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมานึ่งฆ่าเชื้อใหม่อีก 2 ครั้ง

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

ซิงโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

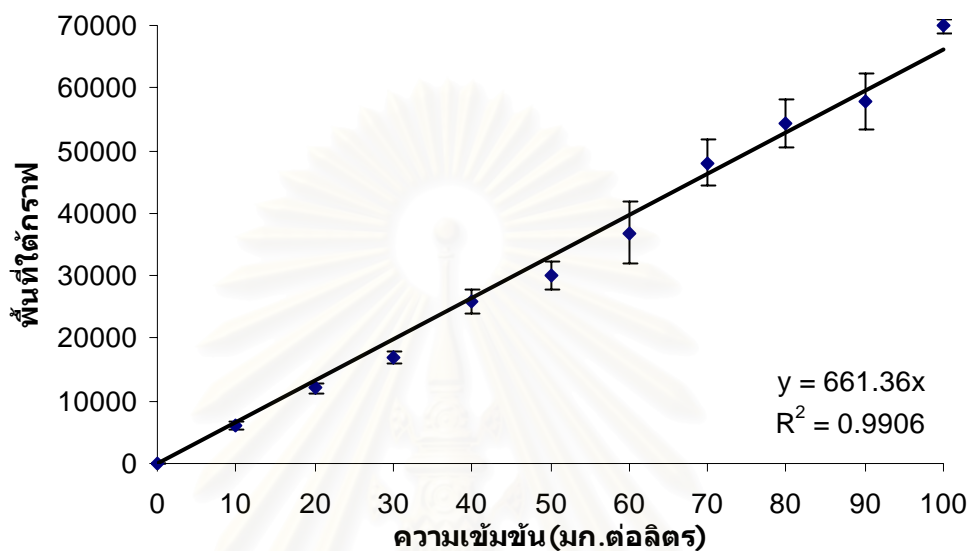
สารละลายเมทานอลเข้มข้น 80% ในน้ำ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

กรองเมทานอล 100% ผ่านเยื่อกรองชนิด FH ที่มีขนาดรูกว้าง 0.5 ไมโครเมตร และน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว (deionized distilled water, DDW) ผ่านแผ่นกรองชนิด GS ที่มีขนาดรูกว้าง 0.22 ไมโครเมตร ด้วยระบบสุญญากาศ ทำการผสมเมทานอลและน้ำกลั่นในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 (ปริมาตรต่อปริมาตร) กำจัดอากาศและฟองอากาศ (degas) ออกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ร่วมกับเครื่องสูบลม (vacuum pump) จนกว่าไม่พบฟองอากาศ โดยเติมน้ำแข็งในเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง เพื่อลดความร้อนที่เกิดขึ้น ซึ่งความร้อนจะทำให้เมทานอลระเหยได้มาก ปิดทางเปิดของแขนของขวดรูปชมพู่ด้วยพาราฟิล์มหลังจากเตรียมสารละลายตัวพาเสร็จเรียบร้อยแล้ว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานของไพรีน

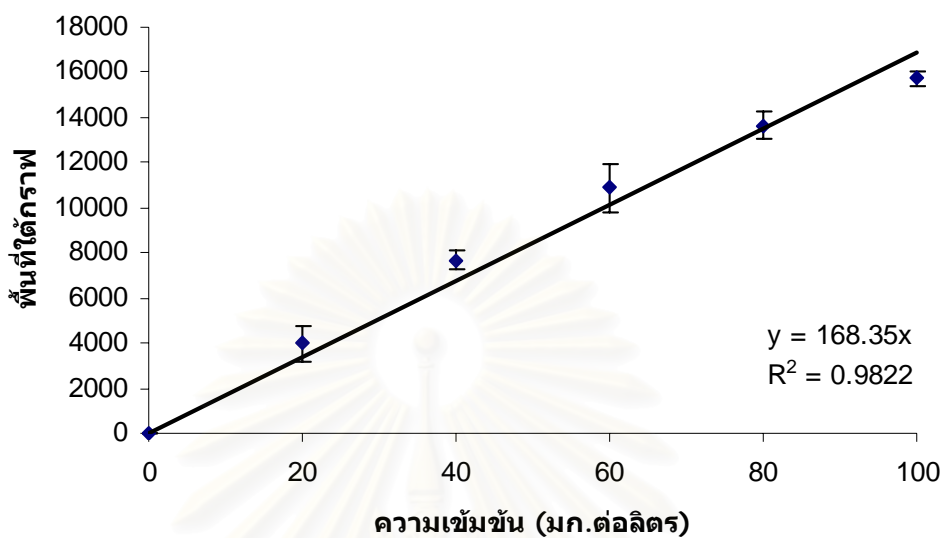


รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไพรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

ความเข้มข้นของไพรีนหาได้จากนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

$$\begin{aligned} \text{พื้นที่ใต้กราฟ} &= (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณไพรีน}) + \text{จุดตัดแกนวาย} \\ \text{โดยที่} \quad \text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} &= 661.36 \\ \text{จุดตัดแกนวาย} &= 0.0 \end{aligned}$$

กราฟมาตรฐานของอะซีแนพธิน

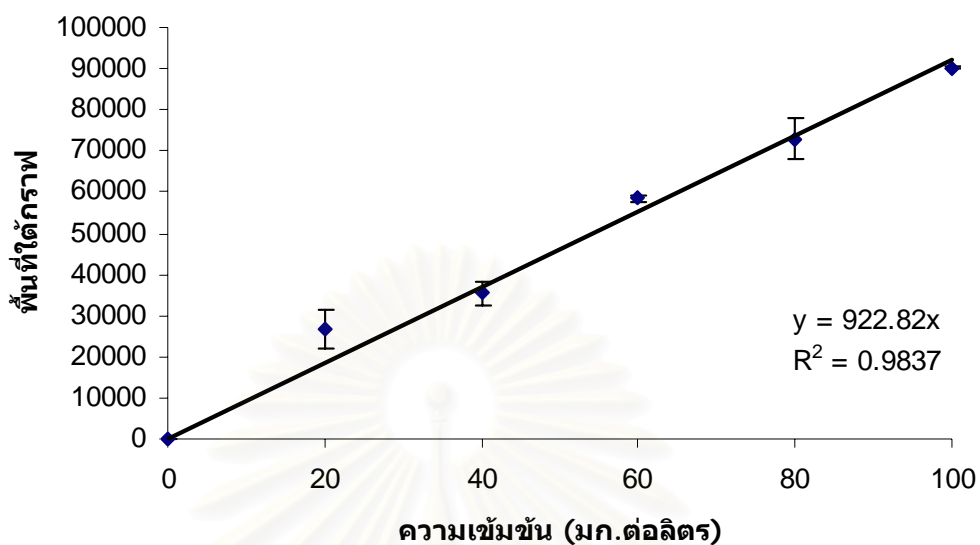


รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณอะซีแนพธินกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

ความเข้มข้นของอะซีแนพธินหาได้จากนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

$$\begin{aligned} \text{พื้นที่ใต้กราฟ} &= (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณอะซีแนพธิน}) + \text{จุดตัดแกนวาย} \\ \text{โดยที่} \quad \text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} &= 168.35 \\ \text{จุดตัดแกนวาย} &= 0.0 \end{aligned}$$

กราฟมาตรฐานของฟลูออรีน



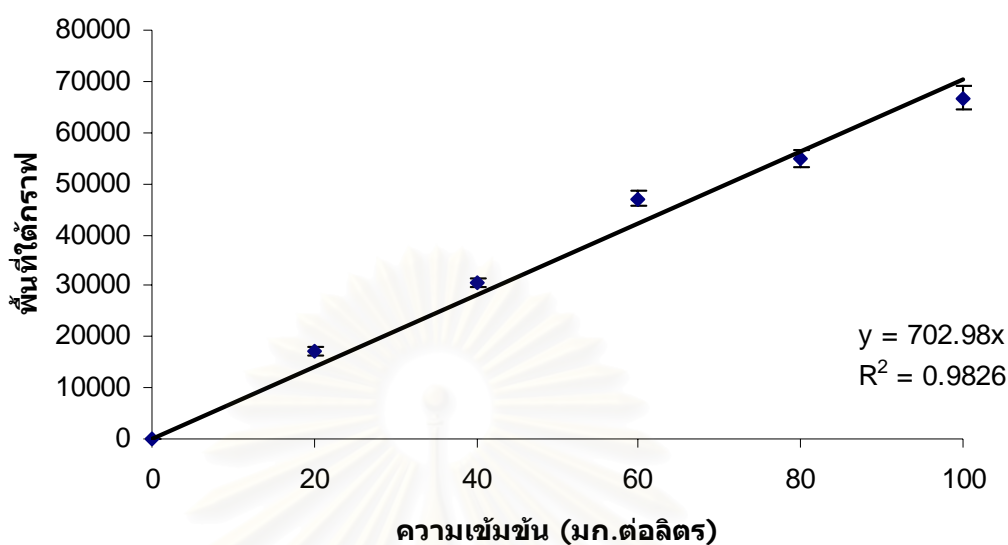
รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

ความเข้มข้นของฟลูออรีนหาได้จากนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

$$\begin{aligned} \text{พื้นที่ใต้กราฟ} &= (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณฟลูออรีน}) + \text{จุดตัดแกนวาย} \\ \text{โดยที่} \quad \text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} &= 922.82 \\ \text{จุดตัดแกนวาย} &= 0.0 \end{aligned}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟมาตรฐานของฟีแนนทรีน



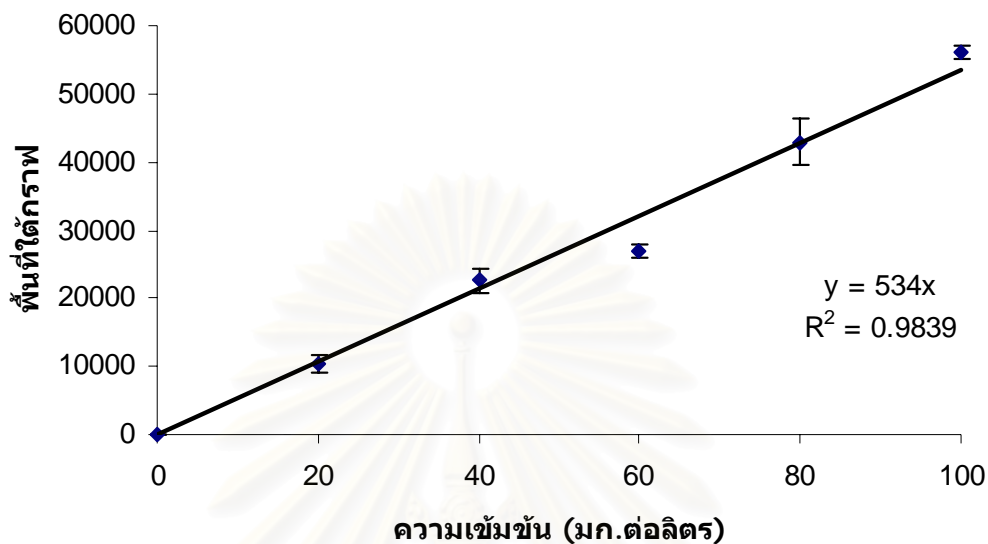
รูปที่ ค.4 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟีแนนทรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

ความเข้มข้นของฟีแนนทรีนหาได้จากนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

$$\begin{aligned} \text{พื้นที่ใต้กราฟ} &= (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณฟีแนนทรีน}) + \text{จุดตัดแกนวาย} \\ \text{โดยที่} \quad \text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} &= 702.98 \\ \text{จุดตัดแกนวาย} &= 0.0 \end{aligned}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟมาตรฐานของฟลูออแรนทีน



รูปที่ ค.5 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออแรนทีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

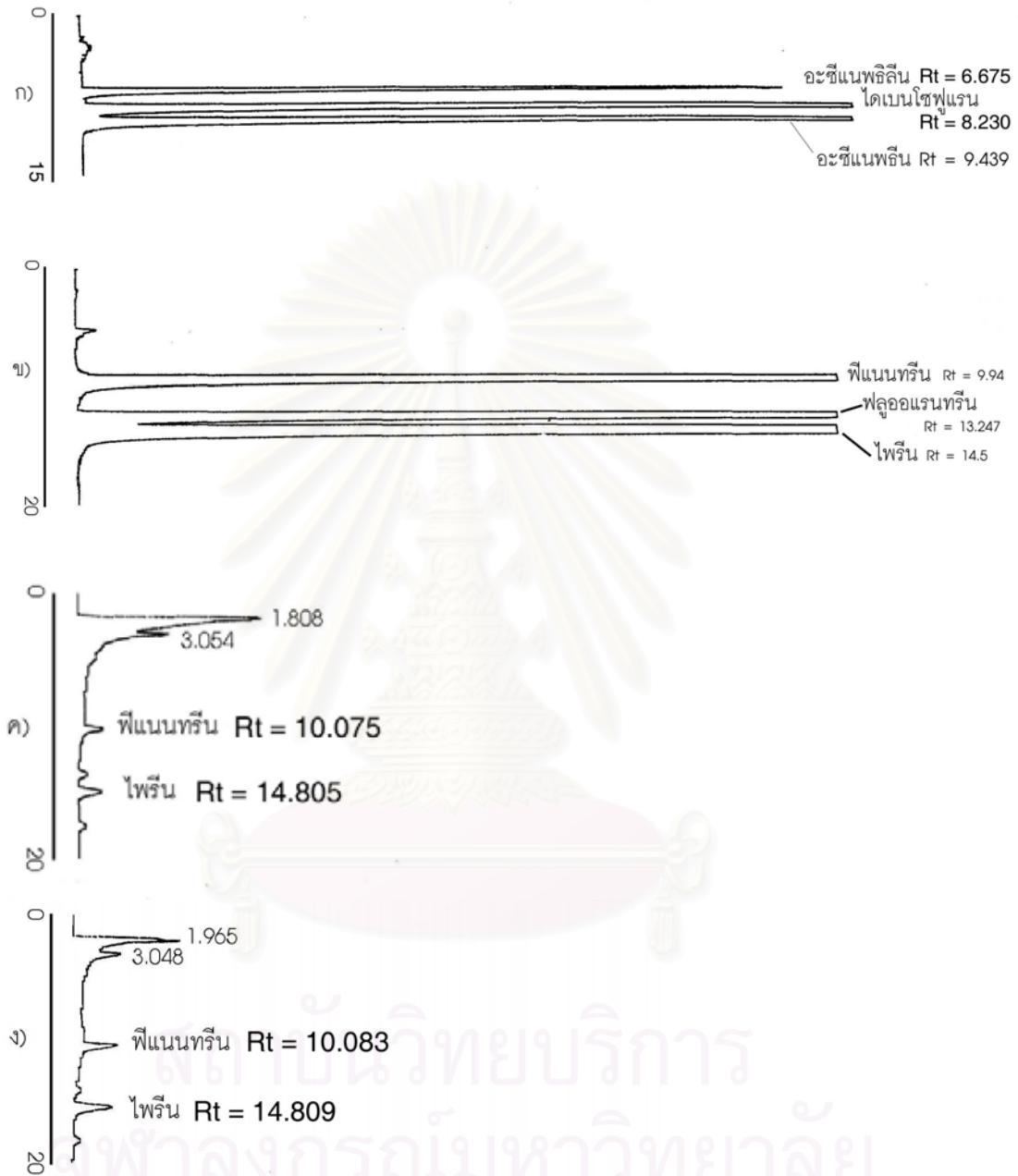
ความเข้มข้นของฟลูออแรนทีนหาได้จากนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

$$\begin{aligned} \text{พื้นที่ใต้กราฟ} &= (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณฟลูออแรนทีน}) + \text{จุดตัดแกนวาย} \\ \text{โดยที่} \quad \text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} &= 534 \\ \text{จุดตัดแกนวาย} &= 0.0 \end{aligned}$$

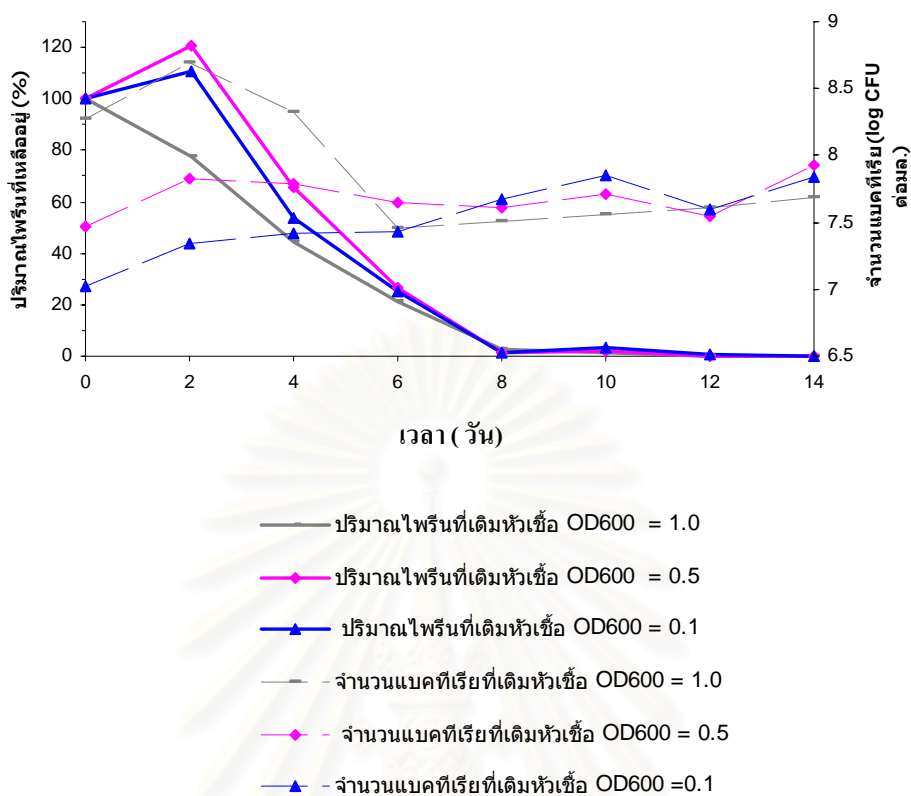
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ข้อมูลผลการทดลอง



รูปที่ ง.1 แสดง HPLC โครมาโตแกรมของสาร PAHs ที่สกัดได้จากใบไม้ ซึ่งถูกใช้ในการทดลอง โดยพบพีแนนทรีน ไพรีนและสารที่ระบุไม่ได้จากสารมาตรฐานที่ใช้ (ก และ ข) ซึ่งตรวจพบได้เฉพาะใบมะขาม (ค) และใบจามจุรี (ง) (Rt คือรีเทนชันไทม์มีหน่วยเป็นนาที, ด้วยความอนุเคราะห์จากคุณประภาพร แดงเรือง, 2545)



รูปที่ 2 แสดงการย่อยไฟรีนที่ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตรของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ซึ่งเติมหัวเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Optical density, OD_{600}) เท่ากับ 0.1 0.5 และ 1.0 พบว่าการใช้หัวเชื้อที่มีปริมาณสูงจะไม่พบเวลาปรับตัวของแบคทีเรีย แต่จำนวนจะลดลงจากรีเริ่มการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก



ข



รูปที่ ๓.๓ แสดงลักษณะของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เกาะเป็นกลุ่มก้อน (ก) และเกาะอยู่รอบผลึกไพรีน (ข) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (บริเวณลูกศรชี้)

ภาคผนวก จ

การสะสมสาร PAHs ของพืชและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บนพืช

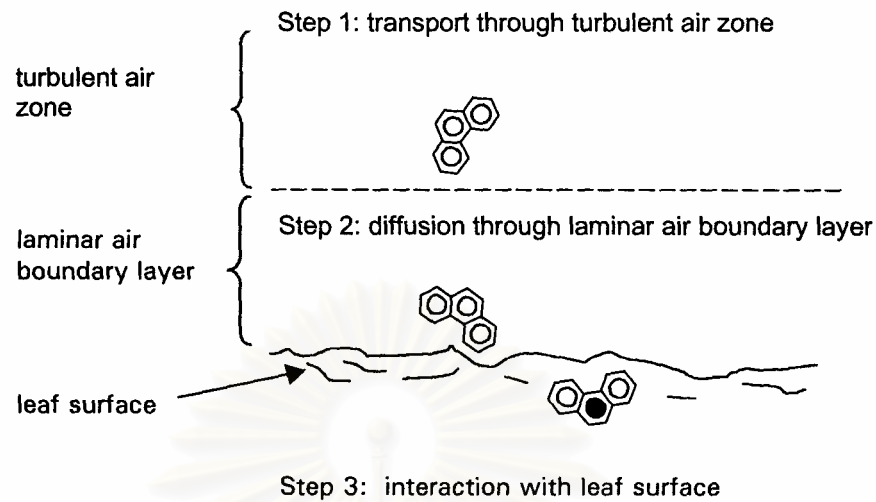
1. วิธีการสะสมสาร PAHs ของพืช (Bakker และคณะ, 2000)

เกิดขึ้นได้หลายทาง เนื่องจากสาร PAHs จะอยู่ในสถานะก๊าซและจับกับอนุภาคฝุ่นละอองในอากาศและละลายน้ำได้น้อย ดังนั้นการที่สาร PAHs จะมากับน้ำฝนจึงเกิดขึ้นได้น้อย ซึ่งสารที่จับกับฝุ่นจะเข้าสู่พืชได้ทั้งทางสภาวะแห้งและเปียก รวมถึงการรับเอาสาร PAHs จากไอที่ระเหยมาจากพื้นดิน โดยเฉพาะส่วนของพืชที่มีโครงสร้างพื้นฐานที่ต้องมีอากาศไหลผ่านได้ดี เพราะฉะนั้นอนุภาคดินที่ปนเปื้อนจะถูกถ่ายทอดสู่พืชได้โดยกระแสลมหรือการกระเด็นมาเปื้อนได้ วิธีการปนเปื้อนนั่นจะเป็นความสัมพันธ์ระหว่างสาร PAHs กับผิวใบ ฝุ่นอาจจะเกาะกับผิวใบอย่างง่ายตายด้วยปฏิกิริยาคุณสมบัติทางเคมี หรือแดงกลับถ้าผิวใบเรียบ วิธีการอื่นเกิดจาก 1) คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารประกอบ เช่น ความดันไอ ความไม่ชอบน้ำ น้ำหนักโมเลกุล 2) คุณลักษณะทางสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ลม 3) คุณลักษณะของพืช เช่น ลักษณะผิวใบ ปริมาณและส่วนประกอบของใบ โครงสร้างของพืช

1.1 วิธีการเข้าสู่ใบพืชของสาร PAHs สถานะก๊าซ (Dry gaseous deposition) (Bakker และคณะ, 2000) วิธีการนี้เกิดขึ้น 3 ขั้นตอน (รูปที่ จ.1) ขั้นตอนแรกสาร PAHs จะลอยผ่านชั้น turbulent air zone เข้าสู่ชั้น laminar air boundary ที่อยู่รอบ ๆ ใบพืชใน ขั้นตอนที่สองสาร PAHs ที่ผ่านเข้ามาจะถูกส่งผ่านชั้นนี้โดยอาศัยทิศทางการไหลของอากาศที่ขนานกับผิวใบและมีอัตราเร็วลมลดลงอย่างมาก หลังจากนั้นสารจะสัมผัสกับผิวใบแล้วเกิดการแพร่เข้าไปในชั้นคิวติเคิลต่อไปในขั้นตอนที่สาม ในขณะที่สารทั้งหมดในมวลอากาศจะปนเปื้อนโดยผ่านกระแสลมวน แต่สารในสถานะก๊าซและจับกับอนุภาคฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 0.1 ไมโครเมตรจะผ่านชั้น laminar boundary ด้วยการเคลื่อนที่แบบบราวน์เนียน(Brownian) เท่านั้น ซึ่งช้ากว่า 3-7 เท่าตัว

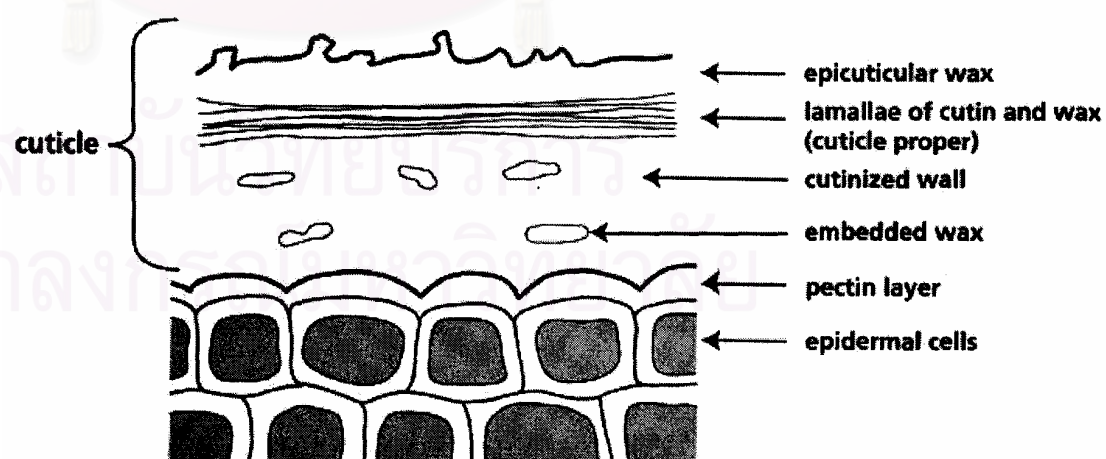
ในชั้นคิวติเคิลจะเกิดการแพร่แบบไม่ใช้พลังงาน(passive diffusion) ของสาร PAHs ในอากาศเข้าสู่ชั้นคิวติเคิลของพืช (คิวติเคิล คือ ชั้นไขมันที่อยู่นอกเซลล์ที่ไม่มีชีวิต ซึ่งเป็นชั้นที่สร้างขึ้นระหว่างอากาศกับพืช เพื่อป้องกันพืชแห้งและการทำลายจากราและแมลง, รูปที่ จ.2)

ด้วยความซับซ้อนของชั้นคิวติเคิล ซึ่งมีความหนาต่างกันจากมากกว่าร้อยละ ไมโครเมตรถึงมากกว่าสิบไมโครเมตร ในขณะที่ชั้นไข epicuticular หนาประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของคิวติเคิล ดังนั้นส่วนประกอบและการเรียงตัวของชั้นคิวติเคิลเป็นปัจจัยสำคัญต่อการแพร่มากกว่าความหนาของคิวติเคิล



รูปที่ ๑.1 แสดงวิธีการสะสม 3 ขั้นตอนของสาร PAHs สถานะก๊าซจากอากาศเข้าสู่ใบไม้ (Bakker และคณะ, 2000)

โครงสร้างของคิวติเคิลแบ่งได้ 2 ภาวะคือ กลุ่มก้อน (amorphous) และแถบผลึก(crystalline) การแพร่จะเกิดในภาวะกลุ่มก้อนเท่านั้น ภาวะแถบผลึกลดการแพร่ได้ 2 ทางคือ ลดช่องว่างและเกิดช่องทางที่คดเคี้ยววกวนขึ้น ดังนั้นความหนาแน่นและการเรียงตัวของผลึกบ่งชี้การเคลื่อนที่ผ่านไซ(ไม่เปลี่ยนแปลงที่ 5-40 องศาเซลเซียส) เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เนื่องจากอากาศร้อน(จัด)เป็นผลให้โครงสร้างแถบผลึกเสียไป ลดความเป็นผลึกลง ทำให้สารขนาดใหญ่เคลื่อนที่ได้ดีขึ้น



รูปที่ ๑.2 แสดงส่วนประกอบโครงสร้างของคิวติเคิลของพืช (Bakker และคณะ, 2000)

ความซับซ้อนของช่องทางในคิวติเคิลของพืชแต่ละชนิดต่างกันมาก เช่น อยู่ที่แฟคเตอร์ 28 (Factor 28) ใน *Citrus grandis* จนถึง แฟคเตอร์ 759 ใน *Ilex paragrannis* ซึ่งมีความซับซ้อนของช่องทาง 7-410 ไมโครเมตร ร่วมกับสารกลุ่มนี้มีปริมาตรมวล 121-195 ลบ.ซม.ต่อโมล ทำให้ได้สัมประสิทธิ์การแพร่เท่ากับ $10^{-16} - 10^{-17}$ ตร.เมตรต่อวินาที (ในพืช *Hordeum vulgare*, *Picea abies*, *Fagus sylvatica*) ซึ่งต้องใช้เวลา 68 ชั่วโมง ถึง 28 วัน เพื่อแพร่ผ่าน Citrus และ 27 ถึง 270 ปี เพื่อแพร่ผ่านใน Ilex จนถึงชั้นคิวติน

1.2 วิธีการเข้าสู่พืชของสาร PAHs ที่จับกับอนุภาคฝุ่นละออง

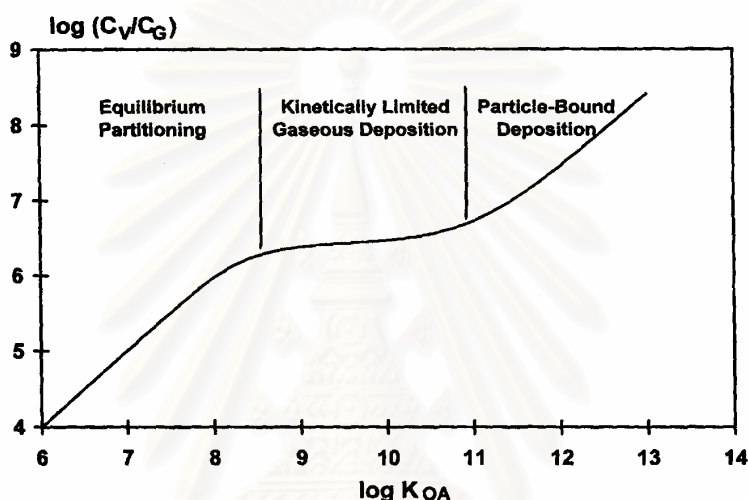
การปนเปื้อนวิธีนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ผิวของอนุภาคฝุ่นและความสามารถของการระเหยของสาร ในปี 1997 Finizia และคณะ คาดว่าค่าสัมประสิทธิ์แบ่งละลายของสาร PAHs ระหว่างออกทานอลกับอากาศควบคุมการจับกันของผิวอนุภาคฝุ่นกับสารสถานะก๊าซ ถ้าค่านี้สูง จะจับกันได้สูงกว่า ซึ่งสาร PAHs เกาะกับอนุภาคฝุ่นขนาดน้อยกว่า 1-2 ไมโครเมตรได้มากแต่อนุภาคที่ตกลงสู่พื้นโลกกลับมีขนาดใหญ่กว่า เรียกว่า Dry particle deposition ในทางกลับกันการตกแบบ Wet particle deposition ส่วนใหญ่มีขนาดเล็กกว่าแบบแห้ง

อย่างไรก็ดีไม่ว่าจะตกแบบแห้งหรือเปียก ก็เป็นวิธีที่สำคัญที่ปนเปื้อนบริเวณผิวของพืช ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณที่ตกลงมากระทบพืช แถวชายฝั่งทะเล มีแบบเปียกมากกว่าในพื้นที่มีการศึกษาบ่งชี้ว่าปริมาณของอนุภาคฝุ่นที่ปนเปื้อนทั้งหมดที่ตกลงสู่พื้นโลกหรือแหล่งน้ำต่าง ๆ นั้นเกิดจากการตกแบบเปียก แต่ยังไม่ชัดเจนนัก อีกทางหนึ่งเกิดจากสายฝนที่แรงและลูกเห็บที่ช่วยเพิ่มสารให้พืช ในทางกลับกัน คาดว่าแรงของสายฝนและลูกเห็บอาจช่วยชะล้างส่วนอนุภาคที่ฝังตกบนผิวใบใหม่ ๆ ให้หลุดออกจากผิวใบได้ด้วย

หลังจากอนุภาคฝุ่นตกลงบนผิวใบ สาร PAHs อาจจะเคลื่อนเข้าสู่ชั้นคิวติเคิล จากการล้างฝุ่นออกมาศึกษาพบว่าการล้างใบผักกาดหอมด้วยน้ำจะล้างเอาสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงออกได้มากกว่าสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ โดยคาดว่าสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่คงอยู่นั้นมาจากสถานะก๊าซที่ถูกดูดซับไว้ในคิวติเคิล ในขณะที่การล้างใบข้าวโพดด้วยน้ำจะสามารถชะเอาสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงได้เพียงบางส่วน ซึ่งคาดว่าหลุดออกจากอนุภาคฝุ่นหรืออนุภาคฝุ่นถูกฝังได้ในคิวติเคิลเรียบร้อยแล้ว แต่ยังไม่ชัดเจนว่า ดังนั้นผู้วิจัยจึงเรียกส่วนที่ถูกดูดซับได้บางส่วนว่าเป็นสาร PAHs ที่ตกลงมาปนเปื้อนแบบ Dry gaseous deposition

1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมสาร PAHs จากอากาศสู่พืช

- ค่า K_{oa} มีผลต่อการสะสมดังแสดงในรูปที่ ๑.3 ซึ่งสามารถแบ่งได้ 3 แบบ
 - สารที่มีค่า K_{oa} ต่ำพืชจะรับเข้าไปแบบแปรผันกับค่านี้ (equilibrium partitioning)
 - ปริมาณขึ้นอยู่กับ dry gaseous deposition ไม่ขึ้นอยู่กับค่านี้ (ขึ้นกับเวลาแบบ kinetically limited gaseous deposition)
 - สารที่มีค่า K_{oa} ที่สูงจะมีผลต่อความสามารถในการเกาะติดกับอนุภาคฝุ่นละอองได้ดี (แบบ particle-bound deposition)



รูปที่ ๑.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log [C_{\text{vegetation}} / C_{\text{gaseous phase}}]$ กับค่า $\log K_{oa}$ (Bakker และคณะ, 2000)

รูปที่ ๑.3 ครอบคลุมการสะสมสารปนเปื้อนจากอากาศสู่พืชได้อย่างดี ซึ่งทดลองพิสูจน์โดย Böhme และคณะ (1999) ยกเว้นสาร PAHs บางชนิดที่มีค่า gas-particle distribution ต่างจากชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกัน อย่างไรก็ตามขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม ชนิดของพืชด้วย

2. อุณหภูมิ จากกราฟระหว่าง $\ln K_{pa}$ และ $1/T$ ได้กราฟเส้นตรงเชิงบวก หมายถึงเมื่ออุณหภูมิลดลงจะทำให้สารแพร่สู่พืชเพิ่มขึ้น แต่จากผลการทดลองของ McLachlan และคณะ (1995) พบว่าอุณหภูมิมิมีผลต่อความเข้มข้นของสารกลุ่มนี้เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย และยังพบว่าอุณหภูมิมิมีผลต่อค่า K_{oa} ที่สูง แต่ค่า K_{oa} ที่ต่ำจะเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วตามอุณหภูมิที่เปลี่ยนไป แต่บางการทดลอง พบว่าสาร PAHs ในอากาศและในพืชที่ปลูกตามฤดูกาลมีความสัมพันธ์แบบแปรผันกับอุณหภูมิข้างต้น บางการทดลองพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน

3. คุณลักษณะของพืช สามารถแบ่งได้ดังนี้

- ปริมาณไขมัน ไขมันที่สกัดจากใบ ก้านใบ เมล็ด และเปลือกไม้ที่เก็บจากที่เดียวกัน มี PAHs แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามปริมาณไขมันจะสำคัญในภาวะ(ใกล้)จุดสมดุของการแพร่ เพราะว่าการสะสมแบบโคเนติกส์นั้นไม่ขึ้นกับปริมาณไขมันด้วย ซึ่งบางครั้งพืชไม่สะสมสารในชั้นไขมันที่ถูกสกัดออกมา แต่เก็บไว้ส่วนที่ไม่ถูกสกัดออกมา เช่น คิวติน ใน *Plantago* มีไขมัน 0.03 มก.ต่อลบ.ซม. จาก 1 กกต่อลิตร ให้ใบไม้มีปริมาณ 30 ไมโครลบ.ซม.ต่อลบ.ซม.ของใบไม้

- ส่วนประกอบของไขมัน เช่น ต้น yarrow และทานตะวัน มีสารที่เข้มข้นสูงกว่าพืชอื่นที่ทดลอง ซึ่งมาจากส่วนประกอบไขมันที่ต่างกัน อาทิ monoterpenes ที่สัมพันธ์กับสารที่ระเหยได้ในพืช ส่วนประกอบของไขมันของ *Plantago major* มี linear alkanes กับ triterpene acid ใน *Lactuca sativa* มี long chain alcohol กับ alkanes

- อายุของพืช มีรายงานว่าไลเคนสะสมสาร PCBs มากกว่าในใบสน เพราะอากาศในทศวรรษที่ผ่านมาที่มีการสะสมสูงกว่า(นอร์เวย์)

- โครงสร้างของพืช แยกเป็น พื้นที่ผิวที่ซึ่งสัมผัสแล้วสะสมในทุกบริเวณของพืช ดังนั้นพื้นที่ผิวทั้งหมดจึงมีผลต่ออัตราการสะสมสาร PAHs พื้นที่ผิวของพื้นที่ผิวที่สัมผัสอากาศ ผิวหยาบช่วยเพิ่มให้ turbulence สูงขึ้น ทำให้พืชรับแล้วสะสมสารได้มากขึ้น การเรียงตัวของใบ ใบที่แผ่ในแนวราบ สามารถรับสารได้มากกว่าแนวตั้ง และยังมีส่วนช่วยแล้วจะช่วยการสัมผัสเกาะติดสูงขึ้นอีก และใบที่เรียงซ้อนกันจะมีการสะสมน้อยกว่าใบที่ไม่เรียงซ้อนกัน

- สายพันธุ์ของพืช ซึ่งพืช *Plantago* 3 สายพันธุ์มีการสะสม PAHs ต่างกัน

4. ระยะห่างจากแหล่งกำเนิดสารพิษ พืชที่อยู่ห่างจากแหล่งปล่อยสารพิษจะมีการสะสมได้น้อยกว่าพืชในบริเวณเขตชุมชนเมือง แต่มีอัตราการสะสมสารแต่ละชนิดไม่คงที่ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของพืช

2. แบคทีเรียบนใบไม้ (Phyllosphere)

มีความพยายามศึกษาถึงจำนวนแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บนใบไม้(epiphytic microbes) เพื่อใช้ในการพยากรณ์สภาพอากาศ ความสมบูรณ์ของป่าไม้ในบริเวณนั้น ๆ โดยพบว่าแบคทีเรียประจำถิ่นบนใบไม้ได้แก่สกุล *Micrococcus* ซึ่งมีโคโลนีสีเหลืองหรือแดง และสกุล *Pseudomonas* ซึ่งส่วนมากมีสีเขียววาว โดยบางสายพันธุ์ของสกุลหลังเป็นแบคทีเรียที่ก่อปัญหาพืชผลเน่าเสีย เนื่องจากสามารถทำให้น้ำกลายเป็นน้ำแข็ง (Ice-nucleation active(INA) bacteria) ทำให้ผิวเกิดรอยแผลและเน่าเสียในภายหลัง แต่แบคทีเรียบางชนิดมีประโยชน์ต่อพืช อาทิ แบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้แล้วทำให้เกิดปมไนโตรเจนในพืชสกุล *Psychotria*

และ *Pavetta* ซึ่งเมื่อนำใบพืชที่มีปมนี้ใส่ในดินที่มีสารอาหารต่ำเป็นการปรับปรุงคุณภาพดินเพื่อการเพาะปลูกต่อไป แต่การแยกแบคทีเรียออกจากใบไม้ นั้นทำได้ยาก อาจเกิดจากมีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นมากเกินไปจนบดบังแบคทีเรียที่ต้องการและถูกยับยั้งการเจริญจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่อยู่บนใบได้ด้วยเช่นเดียวกัน (Hirano และ Upper, 1991 ; Microbiology factsheets for schools, 2004)

ใบไม้เป็นหนึ่งเดียวที่ทำตัวเป็นที่พักอาศัยของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บนผิวใบไม้ ซึ่งใบไม้ที่อยู่บนบกมีพื้นที่มากกว่า 500 ล้านตารางกิโลเมตร แต่เริ่มมีความสนใจศึกษาความสำคัญทางด้านระบบนิเวศและที่อาศัยของจุลินทรีย์เมื่อไม่นานมานี้ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะมีการเปลี่ยนแปลงบ่อยและรวดเร็วในระหว่างปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีสถานะและสภาวะแตกต่างกันอย่างมาก เช่น อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วลม รังสี ซึ่งไม่อย่างใดอย่างหนึ่ง อาจมีผลกดดันแบคทีเรียบางชนิดให้เกิดการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ประชากรของแบคทีเรียมีความแตกต่างกันมาก ขึ้นอยู่กับเวลาและพื้นที่ ในแต่ละแห่ง อาทิในต้นปี ค.ศ.1959 Crosse รายงานว่าใบของเชอร์รี่ 1 ใบมี *Pseudomonas syringae* pathovar *mors-prunorum* จำนวนตั้งแต่ตรวจไม่พบจนถึง 1.3×10^5 CFU ต่อใบ (จากตัวอย่าง 60 ใบ) ปริมาณที่ต่างกัน อาจเกิดจากวิธีการศึกษาจึงเป็นปัญหาที่จะให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องใกล้เคียงความจริง จึงทำให้เกิดแนวคิดที่จะประมาณขนาดประชากรแบคทีเรีย โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติของการกระจายข้อมูลมาช่วย โดย Hirano และคณะ (1982) ใช้การประมาณแบบ lognormal distribution อธิบายแบคทีเรียที่รากพืช แต่ไม่สามารถใช้กับแบคทีเรียที่ใบได้ ดังนั้นต่อมา Ishimaru และคณะ (1991) จึงใช้แบบ Weibull distribution แทน ในขณะที่ Limpert และคณะ (2001) แย้งว่าอย่างไรแล้วการกระจายตัวในธรรมชาติมักจะเป็นแบบแรกมากกว่า ซึ่งยังไม่สามารถหารูปแบบการประมาณที่เหมาะสมได้ ทำให้มีการพัฒนาศึกษาเปรียบเทียบการประมาณทางสถิติของการกระจายตัวของประชากรแบคทีเรียบนใบไม้ โดยใช้การทดสอบ Kolmogorov-Smirnov(K-S) ดูการกระจายตัว และใช้ Akaike information criterion (AIC) มาเปรียบเทียบรูปแบบทดสอบคือ lognormal, gamma และ Weibull distribution ซึ่งผลออกมาว่ารูปแบบการกระจายตัวที่เหมาะสมของประชากรแบคทีเรียของพืชที่เมดิเตอร์ราเนียนเป็นแบบ lognormal distribution สอดคล้องกับแบคทีเรียที่รากพืช (Yadav และคณะ, 2004)

จำนวนประชากรแบคทีเรียที่อยู่บนใบไม้มีมากน้อยต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของพืช แม้จะอยู่ในตระกูลเดียวกันก็ตาม ถ้าพิจารณาเฉพาะสกุลต้นโอ๊ก(Oak, *Quercus*) ซึ่งมีผู้ศึกษาไว้มากที่สุด พบว่าสายพันธุ์ *Q.coccifera* มีค่าเฉลี่ยตรงกลาง $4.44(2.8 \times 10^4)$ log CFUต่อกรัม น้ำหนักใบไม้เปียก (Yadav และคณะ, 2004) *Q.ilex* เฉลี่ย 3.13×10^4 CFU ต่อตารางเซนติเมตร ใบไม้ (Périsol และคณะ, 1993) *Q.virginiana* *Q.macrocarpa* และ *Q.rubra* เฉลี่ย

5.7(5.0×10^5), 3.8-6.4(6.3×10^3 - 2.5×10^6) และ 3.8-4.7(6.3×10^3 - 5.0×10^4) log CFU ต่อกรัมใบไม้ (Lindow และคณะ, 1978) และในพืชสกุลอื่นมีปริมาณดังตารางที่ ๑.1

ตารางที่ ๑.1 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บนใบไม้

| พืช | ปริมาณแบคทีเรียเฉลี่ย | อ้างอิง |
|------------------------------------|--|--------------------------|
| <i>Arbutus unda</i> L. | 1.3×10^4 CFU ต่อกรัม น้ำหนักใบไม้เปียก | Yadav และคณะ (2004) |
| <i>Pistacia lentiscus</i> L. | 5.1×10^4 CFU ต่อกรัม น้ำหนักใบไม้เปียก | Yadav และคณะ (2004) |
| <i>Myrtus communis</i> L. | 9.3×10^3 CFU ต่อกรัม น้ำหนักใบไม้เปียก | Yadav และคณะ (2004) |
| <i>Lavandula stoechas</i> L. | 1.3×10^4 CFU ต่อกรัม น้ำหนักใบไม้เปียก | Yadav และคณะ (2004) |
| <i>Calamintha nepeta</i> (L.) Savi | 1.3×10^5 CFU ต่อกรัม น้ำหนักใบไม้เปียก | Yadav และคณะ (2004) |
| <i>Melissa officinalis</i> L. | 1.3×10^5 CFU ต่อกรัม น้ำหนักใบไม้เปียก | Yadav และคณะ (2004) |
| <i>Cistus incanus</i> L. | 1.7×10^4 CFU ต่อกรัม น้ำหนักใบไม้เปียก | Ercolani (1991) |
| <i>Olea europaea</i> L. 'corotina' | 0.17 - 3.4×10^5 CFU ต่อตารางเซนติเมตร | |
| Mediterranean aromatic plants | 2.5×10^2 - 2.5×10^5 CFU ต่อกรัม น้ำหนักใบไม้ | Karamanoli และคณะ (2000) |

ในธรรมชาติพบว่าบนใบไม้ของพืชมีแบคทีเรียเฉลี่ย $10^6 - 10^7$ CFU ต่อตารางเซนติเมตร (อาจถึง 10^8 ได้) และเนื่องจากรายงานของ Lindow (1996) ที่พบว่าเกือบทั้งหมดของใบไม้ในป่าแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงที่อยู่ประมาณ 10^4 เซลล์ต่อเดือน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าพืชได้มีแบคทีเรียบนใบน้อยกว่า 10^4 CFU ต่อตารางเซนติเมตร พืชชนิดนั้นเป็นเจ้าบ้านชั่วคราว (incidental hosts) จำนวนแบคทีเรียที่พบได้จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยได้แก่ (Yadav และคณะ, 2004)

- วิธีการหรือเทคนิคในการแยกแบคทีเรียจากใบไม้
- ลักษณะ trichome ซึ่งจากการศึกษาหลายงานวิจัยถูกคาดว่าเป็นแบบที่แบคทีเรียชอบอาศัยเป็นที่เพิ่มจำนวน
- ลักษณะใบที่เป็นมันมาก มักมีจำนวนแบคทีเรียน้อยกว่าใบที่มีมันน้อยกว่า
- ความสูงจากพื้นดิน เพราะว่าดินเป็นแหล่งที่ให้แบคทีเรียแก่ใบพืชจากแรงกระเด็น เมื่อมีลมและน้ำแรง ๆ
- ลักษณะขนใบ ความขรุขระและปุ่มปบบนผิวใบ สามารถช่วยให้มีแบคทีเรียอยู่ได้

มากกว่าใบผิวเรียบและไร้ขนใบ

- พืชชนิดที่มีน้ำมันหอมระเหยสูงนั้นจะมีจำนวนแบคทีเรียมากกว่า แต่ยังไม่สามารถสรุปชัดเจนไปได้ว่าปริมาณน้ำมันหอมระเหยมีผลโดยตรงกับจำนวนแบคทีเรีย
- ฤดูกาล พบว่าในช่วงฤดูร้อนมีจำนวนน้อยที่สุดหรือไม่พบเลย ในขณะที่ฤดูอื่น ๆ มีปริมาณคงที่หรือเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายจิรทีปส์ แสนรัก เกิดเมื่อวันที่ 8 มิถุนายน พ.ศ. 2518 ที่จังหวัดลพบุรี สำเร็จ การศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2541 ทำงานในตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ที่ศูนย์วิจัย โรดเอตส์ สภากาชาดไทย กรุงเทพฯ ตั้งแต่เดือนมีนาคม พ.ศ. 2542 ถึง เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2544 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2544



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย