การตรึง *Pseudomonas* sp. J801 ในกาบมะพร้าว
เพื่อใช้กำจัดฟีแนนทรีนในดิน

นางสาวสุพรรณิการ์ จันทร์ทับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IMMOBILIZATION OF *Pseudomonas* sp. J801 IN COCONUT HUSK FOR PHENANTHRENE REMOVAL IN SOIL

Miss Supannika Jantab

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial Technology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรึง *Pseudomonas* sp. J801 ในกาบมะพร้าวเพื่อใช้กำจัดฟีแนนทรีนในดิน
โดย	นางสาวสุพรรณิการ์ จันทร์ทับ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. เบญจภรณ์ ประภักดี)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สุพรรณิการ์ จันทร์ทับ : การตรึง *Pseudomonas* sp. J801 ในกาบมะพร้าวเพื่อใช้กำจัดฟีแนนทรีนในดิน (IMMOBILIZATION OF *Pseudomonas* sp. J801 IN COCONUT HUSK FOR PHENANTHRENE REMOVAL IN SOIL) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. อรฤทัย ภิญญาคง, 84 หน้า.

ฟีแนนทรีนเป็นหนึ่งในสารประกอบแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) ซึ่งมักพบได้ในดินที่มีการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน การบำบัดดินที่ปนเปื้อนฟีแนนทรีนด้วยแบคทีเรียตรึงเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถช่วยกำจัดฟีแนนทรีนในดินได้อย่างสมบูรณ์และรวดเร็วยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อผลิตแบคทีเรียตรึง *Pseudomonas* sp. J801 ให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดฟีแนนทรีนในดินและสามารถเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงในรูปแบบแห้งได้ โดยใช้กาบมะพร้าวเป็นวัสดุตรึงแบคทีเรีย เนื่องจากกาบมะพร้าวเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีราคาถูกและมีความสามารถในการดูดซับ PAHs ผลการตรึงแบคทีเรียพบว่าสามารถใช้ปริมาณกาบมะพร้าว 8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้งกาบมะพร้าว/ปริมาตรสารแขวนลอยแบคทีเรีย) ผสมกับสารแขวนลอยแบคทีเรีย บ่มเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียตรึงที่มีปริมาณแบคทีเรีย 1.59×10^{9} CFU/กรัมกาบมะพร้าว และแบคทีเรียตรึงที่ผลิตได้สามารถกำจัดฟีแนนทรีนในอาหารเหลวชุดการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่องที่เติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วัน เป็นเวลา 24 วัน ได้มากกว่า 74.36 เปอร์เซ็นต์ และสามารถตรวจพบการคงอยู่ของ *Pseudomonas* sp. J801 ในแบคทีเรียตรึง ในวันที่ 24 ของการทดลองด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction Denaturing gradient gel electrophoresis ในขณะที่ไม่สามารถตรวจพบการคงอยู่ *Pseudomonas* sp. J801 ในชุดทดลองแบคทีเรียอิสระตั้งแต่ในที่ 15 ของการทดลอง แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียตรึงสามารถทนต่อความเป็นพิษของฟีแนนทรีนได้มากกว่าแบคทีเรียอิสระ ในการทดสอบการบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้แบคทีเรียตรึง 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เปรียบเทียบกับชุดที่ใช้กาบมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) บ่มเป็นเวลา 28 วัน พบว่า เปอร์เซ็นต์ฟีแนนทรีนคงเหลือมีปริมาณใกล้เคียงกัน คือ 2.33 และ 6.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าในวันที่ 14 พบเปอร์เซ็นต์ฟีแนนทรีนคงเหลือในดินในชุดทดลองแบคทีเรียตรึงเพียง 15.23 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ชุดกาบมะพร้าวมีฟีแนนทรีนคงเหลือ 73.09 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการเติมแบคทีเรียตรึงมีส่วนช่วยในการเร่งการกำจัดฟีแนนทรีนให้เร็วยิ่งขึ้น สำหรับการพัฒนาเป็นแบคทีเรียตรึงพร้อมใช้ที่สามารถใช้กระบวนการทำแห้งแบบผึ่งลม (air-drying) และเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงในอุณหภูมิห้องเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตแบคทีเรียตรึง โดยเตรียม *Pseudomonas* sp. J801 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani เจือจาง 4 เท่า ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เพื่อเป็นการกระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างสารป้องกันตัวเองและสะสมภายในเซลล์ แล้วแขวนลอยเซลล์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เติมซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทำให้ *Pseudomonas* sp. J801 มีชีวิตรอดได้อย่างน้อย 7 วัน เมื่อนำแบคทีเรียตรึงที่ผลิตจากการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวทำให้แห้งและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็น 14 วัน พบว่าแบคทีเรียตรึงยังคงมีประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่เติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ถึง 74.19 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนทั้งก่อนและหลังการเก็บรักษาของแบคทีเรียตรึงแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียตรึง *Pseudomonas* sp. J801 บนกาบมะพร้าวมีความสามารถในการบำบัดดินที่มีการปนเปื้อนฟีแนนทรีนและสามารถพัฒนาเป็นแบคทีเรียตรึงพร้อมใช้ต่อไปได้

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2559

5672239523 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY
KEYWORDS: IMMOBILIZATION / COCONUT HUSK / AIR-DRIEND / PHENANTHRENE

SUPANNIKA JANTAB: IMMOBILIZATION OF *Pseudomonas* sp. J801 IN COCONUT HUSK FOR PHENANTHRENE REMOVAL IN SOIL. ADVISOR: ASSOC. PROF. ONRUTHAI PINYAKONG, Ph.D., 84 pp.

Phenanthrene is classified as a priority PAH pollutant which is normally found in petroleum contaminated soil. To remediate phenanthrene-contaminated soil, the immobilization of bacteria that has ability for phenanthrene degradation was investigated. This study aims to produce immobilized *Pseudomonas* sp. J801 for phenanthrene removal from contaminated soil and storage the immobilized bacteria in dried condition. Coconut husk is an agricultural-waste was used as immobilized material which could also absorb PAHs. The study found that 8% (w/v) of coconut husk mixed with cell suspension for 12 hours achieved the bacterial attachment on immobilized material about 1.59×10^{9} CFU/g coconut husk. Moreover, the immobilized bacteria could remove phenanthrene over 74.36% from liquid semi-continuous experiment that added 200 ppm of phenanthrene every 3 days for 24 days. Polymerase Chain Reaction-Denaturing gradient gel electrophoresis also showed that *Pseudomonas* sp. J801 existed after the immobilized material was used for 24 days; however, free cell did not exist since day 15 of the experiment. Then, it revealed that immobilized bacteria could tolerate to the toxicity of phenanthrene more than free cell. The 150 ppm of phenanthrene-contaminated soil was remediated with 5% (w/v) immobilized bacteria compared to 5% (w/v) immobilized material for 28 days. The result found that the remaining phenanthrene concentrations in the experiments of immobilized bacteria and immobilization material were 2.33% and 6.98%, respectively. However, the phenanthrene removal was clearly differentiate in day 14 that the phenanthrene remaining concentrations in the experiment of immobilized bacteria and immobilized material were 15.23% and 73.09%, respectively. These could be concluded that the immobilized bacteria could improve the efficiency for phenanthrene removal. The ready-to-use immobilized bacteria was also performed by air-drying technique for bacteria storage at room temperature. Preparation of *Pseudomonas* sp. J801 in 25% (v/v) Luria-Bertani added with 0.5 M sodium chloride then suspended the bacterial cell in 5% (w/v) sucrose phosphate buffer could improve bacteria alive at least 7 days. The immobilized bacteria after storage at room temperature for 14 days showed the efficiency to remove phenanthrene in liquid cultivation about 74.19%. In conclusion, the immobilized bacteria before and after storage showed the phenanthrene removal efficacy indicating that immobilized bacteria have potential to be applied for remediation of phenanthrene-contaminated soil and can be further developed as ready to use bacteria.

Department:	Microbiology	Student's Signature	.....
Field of Study:	Microbiology and Microbial Technology	Advisor's Signature	.....
Academic Year:	2016		

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.อรฤทัย ภิญญาคง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วนสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย และรองศาสตราจารย์ ดร.เบญจภรณ์ ประภักดี เป็นอย่างสูงที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณนางสาวดวงพร พลฤทธิ์ ที่คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการรย่อยสลายฟีแนนทรีน

ขอขอบคุณสมาชิกห้อง 1704/15, 1704/14 และ 1704/13 ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำตลอดจนความช่วยเหลือต่างๆ ในการดำเนินงานวิจัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญรูป ..... ฎ

บทที่ 1 1

บทนำ 1

บทที่ 2 4

ปริทัศน์วรรณกรรม 4

2.1 ฟีแนนทรีน (Phenanthrene) 4

2.2 การปนเปื้อนฟีแนนทรีนในดิน 5

2.3 ผลของฟีแนนทรีนที่ปนเปื้อนในดิน 6

2.4 การบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนโดยวิธีทางชีวภาพ 7

2.4.1 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน 10

2.4.2 การเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนในดินด้วยแบคทีเรียตรึง 14

2.5 การเก็บรักษาแบคทีเรียตรึง 18

2.5.1 สารป้องกันแบคทีเรีย 18

2.5.2 การกระตุ้นให้แบคทีเรียผลิตสารป้องกันเซลล์ 21

บทที่ 3 22

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย 22

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 22

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย 23

วิธีการดำเนินงานวิจัย 26

3.1 ตรึง *Pseudomonas* sp. J801 ในกาบมะพร้าว.....26

3.1.1 เตรียมกาบมะพร้าว 26

3.1.2 เตรียมสารแขวนลอย *Pseudomonas* sp. J801.....26

3.1.3 ตรึง *Pseudomonas* sp. J801 ในกาบมะพร้าวโดยแปรผันปริมาณวัสดุตรึง 26

3.1.4 ตรึง *Pseudomonas* sp. J801 กาบมะพร้าวโดยแปรผันระยะเวลาในการตรึง.....27

3.1.5 ตรวจนับการคงอยู่ของ *Pseudomonas* sp. J801 บนกาบมะพร้าว 27

3.1.6 ศึกษาการเกาะติดของแบคทีเรียในกาบมะพร้าวด้วย 28

3.2 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีน 28

3.2.1 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM แบบกึ่งต่อเนื่อง 28

3.2.2 สกัดฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและกาบมะพร้าวด้วยเอทิลอะซิเตท 28

3.2.3 วิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในอาหารเหลว แบคทีเรียตรึงและกาบมะพร้าวด้วย HPLC.....29

3.2.4 สกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในกาบมะพร้าวในชุดทดลองแบคทีเรียตรึงและชุดกาบมะพร้าว 30

3.2.5 ตรวจประชาคมแบคทีเรียในแบคทีเรียตรึงด้วยวิธี PCR-DGGE.....30

3.3 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนในดิน.....32

3.3.1 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดิน.....32

3.3.2 ตรวจนำแบคทีเรียประจำถิ่นในดินที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน 32

3.3.3 สร้างระบบนิเวศจำลองดิน (microcosm) 33

3.3.4 สกัดฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในดิน 33

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

3.4 พัฒนาวิธีการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีแนนทรีน หลังการเก็บหลังแบคทีเรียตรึง 34
3.4.1 คัดเลือกสารป้องกัน *Pseudomonas* sp. J801 34
3.4.2 แปรผันความเข้มข้นของสารป้องกันแบคทีเรียที่เลือก 34
3.4.3 แปรผันความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 34
3.4.4 ตรวจสอบการคงอยู่ของ *Pseudomonas* sp. J801 แบบเซลล์อิสระเมื่อใช้กระบวนการทำให้แห้งแบบผึ่งลม 35
3.4.5 ทำแห้งและเก็บรักษาแบคทีเรียตรึง 35
3.4.6 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM 35
บทที่ 4 37
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง 37
4.1 การตรึง *Pseudomonas* sp. J801 ในกาบมะพร้าว 37
4.1.1 ปริมาณกาบมะพร้าวที่ใช้ในการตรึงแบคทีเรีย 37
4.1.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงแบคทีเรียบนกาบมะพร้าว 38
4.1.3 การศึกษาการเกาะติดของแบคทีเรียในกาบมะพร้าวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) 40
4.2 ประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนของแบคทีเรียตรึง 41
4.2.1 การกำจัดฟีแนนทรีนของแบคทีเรียตรึงและแบคทีเรียอิสระในการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่อง 41
4.2.2 การบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนด้วยแบคทีเรียตรึง 46
4.3 การพัฒนาวิธีการเตรียมหัวเชื้อสำหรับแบคทีเรียตรึงเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาแบคทีเรีย 50
4.3.1 การคัดเลือกสารป้องกันแบคทีเรียในสภาวะแห้ง 51
4.3.2 การแปรผันความเข้มข้นของสารป้องกันแบคทีเรียในสภาวะแห้ง 51
4.3.3 แปรผันความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.25XLB 53

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

4.3.4 การกำจัดฟีแนนทรีนของแบคทีเรียตรึงหลังการเก็บรักษาระยะสั้น.....54
บทที่ 5.....57
บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....57
รายการอ้างอิง.....60
ภาคผนวก.....67
ภาคผนวก ก.....68
ภาคผนวก ข.....70
ภาคผนวก ค.....75
ภาคผนวก ง.....76
ภาคผนวก จ.....81
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....84

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 สมบัติทางเคมีและกายภาพของฟีแนนทรีน 4
ตารางที่ 2.2 วิธีการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ด้วยชีววิธี 9
ตารางที่ 2.3 อิทธิพลของสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อปัจจัยในการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ด้วยชีววิธี 10
ตารางที่ 2.4 แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีแนนทรีน 13
ตารางที่ 2.5 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน 14
ตารางที่ 2.6 วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่นำมาเป็นวัสดุตรึงเพื่อบำบัดดินปนเปื้อนสารมลพิษ 16
ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย 25
ตารางที่ 3.2 แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย 25
ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบของสารในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (ปริมาตรสุดท้าย 30 ไมโครลิตร) 31
ตารางที่ 3.4 องค์ประกอบของพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี denaturant 50%-80% 32
ตารางที่ 3.5 ระบบนิเวศจำลองดินสำหรับการบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนด้วยแบคทีเรียตรึง 33
ตารางที่ 4.1 ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/กรัมแห้งวัสดุตรึง) ที่สามารถเกาะติดบนกาบมะพร้าวเมื่อแปรผันปริมาณกาบมะพร้าวโดยใช้ระยะเวลาตรึง 24 ชั่วโมง 38
ตารางที่ 4.2 ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/กรัมแห้งวัสดุตรึง) ที่สามารถเกาะติดบนกาบมะพร้าวเมื่อแปรผันระยะเวลาตรึงโดยใช้ปริมาณกาบมะพร้าว 8 เปอร์เซ็นต์ 39
ตารางที่ 4.3 ปริมาณ *Pseudomonas* sp. J801 (CFU/มิลลิลิตร) ในการทดสอบการกำจัด ฟีแนนทรีนแบบกึ่งต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยเติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วัน ในชุดทดลองแบคทีเรียอิสระ 43
ตารางที่ 4.4 ลักษณะและธาตุอาหารในดินตัวอย่าง 46
ตารางที่ 4.5 การกำจัดฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ในระยะเวลา 3 วัน ของแบคทีเรียตรึงหลังการเก็บรักษา 55

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของฟีแนนทรีน 4

รูปที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงไปภายในเซลล์ปลายรากต้นมะเขือเทศโดยฟีแนนทรีน (a) : ปลายรากต้นมะเขือเทศในชุดควบคุม ,(b) : ปลายรากต้นมะเขือเทศที่ถูกแช่ในสารละลายฟีแนนทรีนความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 21 วัน (Willer และ Leddy, 2016) 7

รูปที่ 2.3 การเข้าถึง PAHs ที่ถูกกักเก็บหรือดูดซับโดยดินของแบคทีเรีย 8

รูปที่ 2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ด้วยชีววิธี 8

รูปที่ 2.5 วิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนแบบใช้อากาศของแบคทีเรีย 12

รูปที่ 2.6 วิธีการตรึงแบคทีเรีย (Dzionek และคณะ, 2016) 16

รูปที่ 2.7 โครงสร้างของฟอสโฟลิพิดในเยื่อหุ้มเซลล์ A ฟอสโฟลิพิดในสภาวะปกติ; B ฟอสโฟลิพิดที่เกิดพันธะโควาเลนต์กันเอง; C ฟอสโฟลิพิดที่มีน้ำตาลแทรกที่ส่วนหัวของฟอสโฟลิพิด (Santivarangkna และคณะ, 2008) 20

รูปที่ 2.8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (Water Activity: Aw) กับระยะเวลาในการเก็บรักษา มี 3 ระยะ ระยะที่ 1 คือกระบวนการทำให้แห้ง ระยะที่ 2 คือการเก็บรักษา และระยะที่ 3 คือการนำมาใช้งานอีกครั้ง โดยในแต่ละระยะจะมีความเครียดที่เกิดที่อาจทำให้แบคทีเรียตาย (Vriezen และคณะ, 2007) 20

รูปที่ 3.1 กาบมะพร้าวสับละเอียดที่ซื้อจากตลาดในชุมชน 26

รูปที่ 3.2 การทำแบคทีเรียตรึงให้แห้งด้วยการผึ่งลม 35

รูปที่ 4.1 รูปจาก SEM (A (1,000x) และ B (5,500x)) แสดงพื้นที่ผิวของกาบมะพร้าว (C (5,500x) และ D (9,500x)) แสดงการเกาะติดของ *Pseudomonas* sp. J801 บนกาบมะพร้าว และ (E (5,500x) และ F (9,500x)) แสดงพื้นที่ผิวของกาบมะพร้าวในชุดแบคทีเรียตรึงหลังการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่อง 41

รูปที่ 4.2 ความเข้มข้นฟีแนนทรีนที่เหลือในการทดสอบการกำจัดฟีแนนทรีนแบบกึ่งต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยเติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วัน 43

รูปที่ 4.3 ความเข้มข้นฟีแนนทรีนที่ถูกกาบมะพร้าวในชุดทดลองกาบมะพร้าวและแบคทีเรียตรึงดูดซับ ในการทดสอบการกำจัดฟีแนนทรีนแบบกึ่งต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยเติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วัน 44

รูปที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การกำจัดฟีแนนทรีนในการการทดสอบการกำจัดฟีแนนทรีนแบบกึ่งต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยเติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วัน เป็นเวลา 24 วัน ของแบคทีเรียตรึง 45

รูปที่ 4.5 แผนภาพ PCR-DGGE ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย 45

รูปที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์ฟีแนนทรีนคงเหลือในดินในการทดสอบการบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดินแห้ง.....48

รูปที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์ฟีแนนทรีนคงเหลือในดินในการทดสอบการแปรผันปริมาณแบคทีเรียตรึงเพื่อบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดินแห้ง.....49

รูปที่ 4.8 การบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนด้วยแบคทีเรียตรึง (1) คือชุดควบคุมปราศจากเชื้อ (2) คือชุดแบคทีเรียตรึง 1 เปอร์เซ็นต์ (3) คือชุดแบคทีเรียตรึง 5 เปอร์เซ็นต์ (4) คือชุดแบคทีเรียตรึง 10 เปอร์เซ็นต์ 49

รูปที่ 4.9 จำนวน *Pseudomonas* sp. J801 ที่รอดชีวิตหลังจากทำให้แห้งด้วยการผึ่งลมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อเติมไกลซีนบีเทนและซูโครสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารแขวนลอยแบคทีเรีย.....52

รูปที่ 4.10 จำนวน *Pseudomonas* sp. J801 ที่รอดชีวิตหลังจากทำให้แห้งด้วยการผึ่งลมเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อแปรผันความเข้มข้นซูโครส (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารแขวนลอยแบคทีเรีย.....53

รูปที่ 4.11 จำนวนแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. J801 ที่รอดชีวิตหลังจากทำให้แห้งด้วยการผึ่งลมและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.25XLB.....54

บทที่ 1

บทนำ

ฟีแนนทรีนเป็นหนึ่งในสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs) ซึ่งองค์การพิทักษ์สิ่งแวดล้อมในสหรัฐอเมริกากำหนดให้ PAHs เป็นสารมลพิษอันตรายที่ควรให้ความสำคัญและกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างเร่งด่วน เนื่องจากมีความเป็นพิษ มีสมบัติเป็นสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และก่อมะเร็งต่อมนุษย์ และมีความคงทนในสิ่งแวดล้อมสูง การปนเปื้อนฟีแนนทรีนในดินมักมีสาเหตุจากการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม และการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์ (Boonyatumanond และคณะ, 2006; Chen และคณะ, 2012) โดยดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมมักพบฟีแนนทรีนในสัดส่วนที่สูงกว่า PAHs ชนิดอื่น (Guo และคณะ, 2016; Nunal และคณะ, 2014) นอกจากนี้ยังพบว่าดินที่ปนเปื้อนฟีแนนทรีนส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชด้วย (Chouychai และคณะ, 2007)

การกำจัดฟีแนนทรีนด้วยวิธีการบำบัดทางชีวภาพเป็นวิธีที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีค่าใช้จ่ายถูกกว่าการบำบัดด้วยเคมี และทำให้ฟีแนนทรีนในดินลดลงได้ (Chen และคณะ, 2014) การเติมแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีนจะช่วยทำให้การกำจัดฟีแนนทรีนมีประสิทธิและเร็วยิ่งขึ้น (Lin และคณะ, 2014) อย่างไรก็ตามการเติมแบคทีเรียอิสระลงไปในดินโดยตรงอาจทำให้ประสิทธิในการกำจัดฟีแนนทรีนลดลง เนื่องจากสมบัติความไม่ชอบน้ำของฟีแนนทรีน การดูดซับฟีแนนทรีนของดิน การแข่งขันกับแบคทีเรียประจำถิ่นในดิน และยังมีปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ เช่น pH อุณหภูมิ และสารอาหาร เป็นต้น จึงทำให้มีการประยุกต์ใช้แบคทีเรียในรูปแบบแบคทีเรียตรึงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีน ซึ่งการเลือกวัสดุตรึงควรเลือกวัสดุที่สามารถป้องกันแบคทีเรียจากความเป็นพิษของฟีแนนทรีนได้ ทำให้แบคทีเรียคงอยู่ในการบำบัดได้นานขึ้น และวัสดุตรึงต้องสามารถดูดซับฟีแนนทรีนได้ ซึ่งมีรายงานการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรอีกหลายชนิดเป็นวัสดุตรึง เช่น แกลบ ขุยมะพร้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด เปลือกเมล็ดทานตะวัน เป็นต้น (Basak และคณะ, 2014; Cubitto และ Gentili, 2015; Nunal และคณะ 2014; Rivelli และคณะ, 2013)

กาบมะพร้าวเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีลักษณะเป็นเส้นใยพอลิเมอร์ตามธรรมชาติประกอบด้วย ลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส กาบมะพร้าวมีน้ำหนักเบา สามารถดูดซับน้ำได้ (Justiz-Smith และคณะ, 2008) มีรายงานการใช้กาบมะพร้าวเป็นวัสดุดูดซับแนฟทาลีนและไพรีน (Owabor และ Agarry, 2014) แต่ยังไม่มีรายงานการใช้กาบมะพร้าวเป็นวัสดุตรึงเพื่อผลิตแบคทีเรียตรึงและนำไปสารมลพิษในดิน จึงทำให้มีความสนใจที่ใช้กาบมะพร้าวเป็นวัสดุตรึงในงานวิจัยนี้

ในการพัฒนาการเก็บรักษาแบคทีเรียตรึง การเก็บรักษาในรูปแบบแห้งจะทำให้แบคทีเรียตรึงมีน้ำหนักเบา ขนย้ายได้สะดวก ซึ่งกระบวนการทำให้แห้งที่ง่าย สะดวก และมีค่าใช้จ่ายน้อยคือ การผึ่งลม (air-drying) แต่อย่างไรก็ตาม ในระหว่างกระบวนการทำให้แห้งตลอดจนการเก็บรักษาแบคทีเรีย อาจทำให้เกิดการสูญเสียแบคทีเรียได้ เนื่องจากแบคทีเรียได้รับความเครียดจากความแห้ง ความเครียดออสโมติก และความเครียดออกซิเดชัน (Bora และคณะ, 2004; Iaconelli และคณะ, 2015) การเติมสารป้องกันแบคทีเรียจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดการสูญเสียแบคทีเรียได้ มีรายงานการใช้สารป้องกันแรงดันออสโมติกอย่างกลูโคส แมนโนส แรฟฟิโนส แรมโนส ฟรุกโตส แลกโทส ซูโครส และไกลซีนบีเทนที่สามารถป้องกันแบคทีเรียได้เมื่อมีการเก็บรักษาแบคทีเรียในสภาวะแห้ง (Champagne และ Gardner, 2001; Dreux และคณะ, 2008; Schisler และคณะ, 2016) ซึ่งสารป้องกันแรงดันออสโมติกจะทำหน้าที่สร้างพันธะไฮโดรเจนกับไขมันแทนที่น้ำและคงสภาพผลึกเหลว (liquid crystal phase) เมื่อแบคทีเรียต้องทนต่อความแห้ง (Ramos และคณะ, 2001) นอกจากนี้การเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเกลือสูงจะทำให้แบคทีเรียสร้างสารป้องกันเองไว้ภายในเซลล์ และช่วยให้แบคทีเรียมีโอกาสรอดเมื่อต้องทนต่อความแห้งได้นานขึ้น (Bonaterra และคณะ, 2005) จึงทำให้มีความสนใจในการทดสอบการใช้ไกลซีนและซูโครสเป็นสารป้องกันแบคทีเรียในสภาวะแห้ง

Pseudomonas sp. J801 เป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ คัดแยกได้จากดินตะกอนแม่น้ำท่าจีน จังหวัดสมุทรสาคร โดยนางสาวดวงพร พลฤทธิ์ (ข้อมูลไม่เผยแพร่) *Pseudomonas* sp. J801 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีแนนทรีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 98 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 3 วัน และยังสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบและน้ำมันดีเซลได้ด้วย

งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อผลิตแบคทีเรียตรึงสำหรับกำจัดฟีแนนทรีนในดิน โดยใช้ *Pseudomonas* sp. J801 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน หาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงแบคทีเรียในกาบมะพร้าว แล้วทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนในดินของแบคทีเรียตรึง ตลอดจนทดสอบระยะเวลาการเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงในรูปแบบแห้งที่มีการเติมสารป้องกันแบคทีเรียเพื่อลดการสูญเสียแบคทีเรียในขณะเก็บรักษาหรือขณะอยู่ในดิน

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึง *Pseudomonas* sp. J801 บนกาบมะพร้าว
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนของแบคทีเรียตรึง
3. เพื่อศึกษาการพัฒนาการเตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียให้มีการรอดชีวิตของ *Pseudomonas* sp. J801 ในสภาวะแห้งได้นานขึ้น

ความคาดหวังของงานวิจัย

ได้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียตรึง *Pseudomonas* sp. J801 ที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนได้ และสามารถเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงในรูปแบบแบคทีเรียตรึงแห้งที่อุณหภูมิห้อง

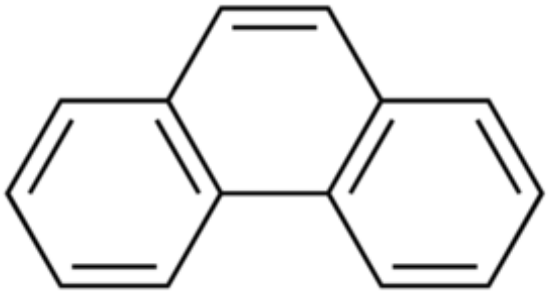
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 ฟีแนนทรีน (Phenanthrene)

ฟีแนนทรีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ประกอบไปด้วยวงเบนซีนสามวงต่อกันในลักษณะมุมงอ ดังที่แสดงในรูปที่ 2.1 สารบริสุทธิ์ของฟีแนนทรีนมีลักษณะเป็นผงสีขาวและเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพแสดงในตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของฟีแนนทรีน

ตารางที่ 2.1 สมบัติทางเคมีและกายภาพของฟีแนนทรีน

สมบัติ	**ลักษณะ**
ชื่อสามัญ	ฟีแนนเทรน (Phenanthrene) ฟีแนนทริน (Phenantrin)
สูตรโมเลกุล	$C_{14}H_{10}$
น้ำหนักโมเลกุล	178.23 กรัม/โมล
ความถ่วงจำเพาะ	1.025
อุณหภูมิหลอมเหลว	101 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิกลายเป็นไอ	340 องศาเซลเซียส
ความหนาแน่น	1.18 กรัม/ลูกบาศก์เมตร (ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)
สมบัติ	ลักษณะ
ความดันไอ	1 มิลลิเมตรปรอท (ที่อุณหภูมิ 118.2 องศาเซลเซียส)
การละลายน้ำ	ละลายได้น้อย (1.15 มิลลิกรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)

ที่มา : National Center for Biotechnology Information (2016)

2.2 การปนเปื้อนฟีแนนทรีนในดิน

ฟีแนนทรีนเป็นหนึ่งในสารมลพิษอินทรีย์ตกค้างยาวนาน (persistent organic pollutants) จึงมักพบปนเปื้อนอยู่ในดินบริเวณโรงงานอุตสาหกรรมมากกว่าดินบริเวณเขตชุมชน เนื่องจากฟีแนนทรีนเป็นองค์ประกอบในปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนซึ่งถูกใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงและยังเป็นสารตั้งต้นของผลิตภัณฑ์อีกหลายชนิด นอกจากนี้การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ที่ของเชื้อเพลิงและสารอินทรีย์สามารถก่อให้เกิดฟีแนนทรีนได้ด้วย (Lau และคณะ, 2014)

Morillo และคณะ (2007) ศึกษาการปนเปื้อน PAHs จากดินตัวอย่างในเขตชุมชน 3 แห่ง คือ ดินจากดินจากเมืองกลาสโกว์ ประเทศอังกฤษ เมืองโทริโน ประเทศอิตาลี และเมืองลูบลิยานา ประเทศสโลวีเนีย พบว่าเมืองกลาสโกว์มีการปนเปื้อน PAHs อยู่ในช่วง 1,487-51,822 ไมโครกรัม/กิโลกรัมดิน ซึ่งสูงกว่าเมืองโทริโนและเมืองลูบลิยานา 10 เท่า โดย PAHs เด่นที่พบคือ ฟีแนนทรีน ฟลูออแรนทรีน และไพรีน คิดเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณ PAHs ทั้งหมด ซึ่งการปนเปื้อนในนี้ถูกพิจารณาให้เป็นการปนเปื้อน PAHs ที่เกิดจากการเผาไหม้ โดยเฉพาะไอเสียจากยานพาหนะ

Sanchez-Trujillo และคณะ (2013) ศึกษาดินตัวอย่างจากเขตอุตสาหกรรมที่เคยปนเปื้อนน้ำมันเชื้อเพลิงที่รั่วไหลในช่วงปี ค.ศ. 1991-1995 ในประเทศสเปนพบว่า ดินบริเวณนั่นยังคงมีปริมาณ PAHs ตกค้างอยู่ถึง 1,068±100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดิน โดยมีฟีแนนทรีนปนเปื้อน 271±30 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดิน

Barnier และคณะ (2014) ศึกษาการปนเปื้อนของ PAHs จากดินตัวอย่างที่เคยเป็นที่ตั้งโรงงานถ่านโค้ก (ค.ศ. 1922-1980) ตัวอย่างดินที่เคยเป็นที่ตั้งโรงงานถ่านโค้กและโรงงานผลิตแร่ (ค.ศ. 1900-1983) และตัวอย่างดินที่เคยเป็นที่ตั้งโรงงานผลิตก๊าซ (ค.ศ. 1903-1965) ในประเทศฝรั่งเศสพบว่า ดินทั้งสามแห่งยังคงมีการปนเปื้อน PAHs สูงถึง 1670, 668 และ 773 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดิน ตามลำดับ โดยการปนเปื้อน PAHs ชนิด 3 วงแอโรแมติก (ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน อะซีแนฟทีน อะซีแนฟทิลีน แอนทราซีน) น้อยกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ของ PAHs ทั้งหมด ซึ่งเป็นผลมาจาก PAHs มวลโมเลกุลต่ำจะถูกกำจัดไปโดยการย่อยสลายทางชีวภาพและการระเหย

Guo และคณะ (2016) ศึกษาปริมาณ PAHs ในดินจากตัวอย่างบริเวณโรงงานแยกก๊าซในปักกิ่งประเทศจีน และดินบริเวณเขตชลประทานน้ำเสียในเขตชานเมืองเซี่ยงไฮ้พบว่า ตัวอย่างดินบริเวณโรงงานแยกก๊าซมีการปนเปื้อน PAHs ทั้งหมด 178.2 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดิน ซึ่งเป็นฟีแนนทรีน 59.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ดินบริเวณเขตชลประทานน้ำเสียมีการปนเปื้อน PAHs ทั้งหมด 7.8 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดิน เป็น PAHs ชนิด 4 วงแอโรแมติกถึง 62.5 เปอร์เซ็นต์

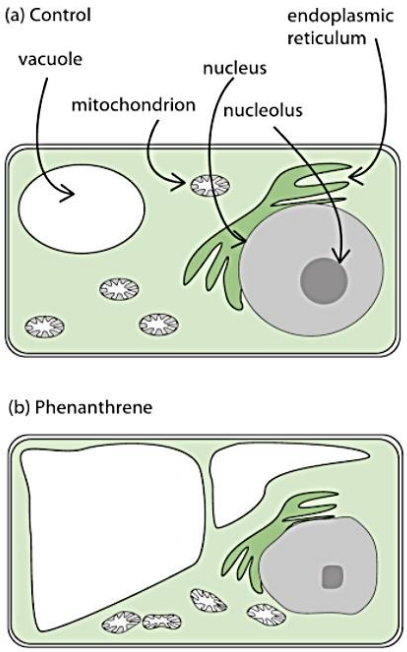
2.3 ผลของฟีแนนทรีนที่ปนเปื้อนในดิน

ดินเป็นองค์ประกอบสำคัญในการเพาะปลูกพืช เนื่องจากดินเป็นแหล่งของธาตุอาหารที่จำเป็นในการเจริญเติบโตอย่างเช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแตสเซียม เป็นต้น โดยรากจะทำหน้าที่ในการดูดธาตุอาหารไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืช (คณาจารย์ภาควิชาพืชศาสตร์, 2543) ซึ่งการนำดินที่ปนเปื้อนฟีแนนทรีนไปปลูกพืช อาจทำให้พืชได้รับผลกระทบจากความเป็นพิษของฟีแนนทรีนได้ นอกจากนี้สัตว์ที่อาศัยอยู่ในดินอย่างไส้เดือนที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ทำให้ดินมีการระบายน้ำและอากาศได้ดีขึ้น และยังมีส่วนช่วยในการแพร่กระจายของจุลินทรีย์ในดินด้วย (อานัฐ ตันโช, 2549)

ขนิษฐา สมตระกูล (2554) ศึกษาความเป็นพิษร่วมของแอนทราซีนและฟีแนนทรีนในดินที่ปนเปื้อนฟลูออรีนและฟลูออแรนทีนต่อการเจริญของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าวโพด ข้าวเหนียว และข้าวฟ่างในระยะต้นกล้าพบว่า การปนเปื้อนฟีแนนทรีนร่วมนั้นจะทำให้พืชมีน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความยาวยอด และรากของพืชทั้ง 3 ชนิด

Amorim และคณะ (2011) ศึกษาความเป็นพิษและการสะสมฟีแนนทรีนในไส้เดือน (*Enchytraeus albidus*) พบว่า ที่ความเข้มข้นแนนทรีน 135 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดิน ส่งผลต่อการรอดชีวิตของไส้เดือน และที่ความเข้มข้นกลางฟีแนนทรีน 33 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดิน ส่งผลต่อการแพร่พันธุ์ และเมื่อทดสอบการสะสมฟีแนนทรีนในไส้เดือน โดยเลี้ยงไส้เดือนในดินที่ปนเปื้อนฟีแนนทรีนความเข้มข้น 8 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดิน ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อไส้เดือน เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายไส้เดือนไปไว้ในภาชนะที่สะอาดอีก 1 สัปดาห์ เพื่อให้ไส้เดือนมีการขจัดฟีแนนทรีนและมีการแพร่พันธุ์ พบว่าไส้เดือดมีการดูดซึมฟีแนนทรีนมากกว่าการขจัดฟีแนนทรีนออกจากร่างกาย แสดงให้เห็นว่าฟีแนนทรีนสามารถถูกสะสมได้ในไส้เดือน จึงทำให้มีการคาดการณ์ว่าหากมีสัตว์อื่นกินไส้เดือนที่มีการปนเปื้อนฟีแนนทรีนอาจทำให้ฟีแนนทรีนปนเปื้อนในวงจรห่วงโซ่อาหารได้

Ahammed และคณะ (2012) ศึกษาการใช้ Brassinoteroids เพื่อชักนำให้ต้นมะเขือเทศทนทานต่อความเป็นพิษของฟีแนนทรีน พบว่า ต้นมะเขือเทศที่แช่ในสารละลายฟีแนนทรีนความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ มีน้ำหนักลดลง การดูดซึมคาร์บอนไดออกไซด์ลดลง และถูกชักนำให้มีการยับยั้งการสังเคราะห์แสงด้วย และเมื่อตรวจสอบปลายรากของต้นมะเขือเทศพบว่าภายในเซลล์ของปลายรากมีโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไปดังในรูปที่ 2.2

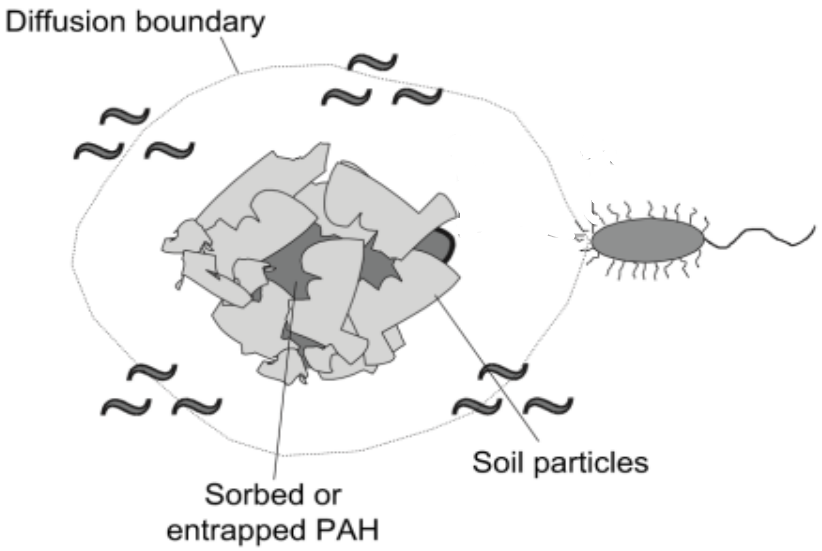


รูปที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงไปภายในเซลล์ปลายรากต้นมะเขือเทศโดยฟีแนนทรีน (a) : ปลายรากต้นมะเขือเทศในชุดควบคุม ,(b) : ปลายรากต้นมะเขือเทศที่ถูกแช่ในสารละลายฟีแนนทรีนความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 21 วัน (Willer และ Leddy, 2016)

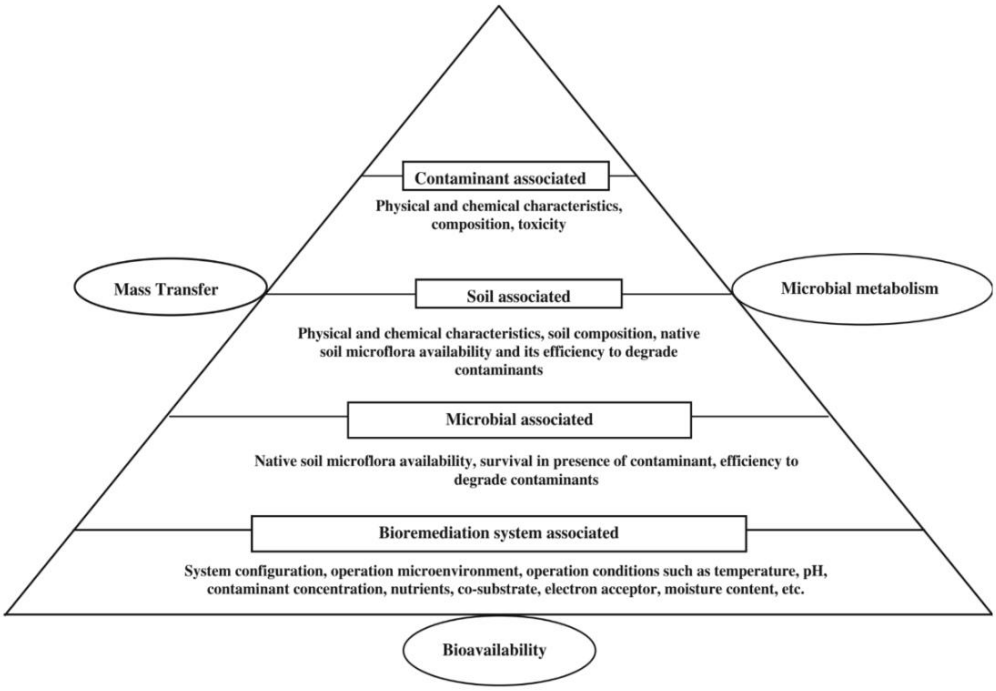
2.4 การบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนโดยวิธีทางชีวภาพ

การใช้วิธีการทางชีววิธีเพื่อบำบัดดินที่ปนเปื้อนฟีแนนทรีนและ PAHs ชนิดอื่น ๆ เป็นวิธีที่กำลังได้รับความสนใจ เนื่องจากมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีค่าใช้จ่ายถูกกว่าการบำบัดด้วยเคมี และสามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนหรือทำให้ความเป็นพิษลดลง (Chen และคณะ, 2014) มีรายงานการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ด้วยชีววิธีหลายวิธีการ ดังในตารางที่ 2.2 ซึ่งในงานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะใช้วิธี bioaugmentation ซึ่งเป็นการเติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพลงไปในดินเพื่อทำให้การบำบัดเป็นไปอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องด้วย PAHs มีสมบัติเป็นสารที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) และสามารถจับกับดินได้ดีจึงทำให้การเข้าถึง PAHs (bioavailability) เป็นไปได้ยาก ดังในภาพที่ 2.3 อนุภาคของดินจะล้อม PAHs ไว้ ส่งผลให้จุลินทรีย์เข้าถึง PAHs ได้ยาก และอาจทำให้การบำบัดดินที่ปนเปื้อน PAHs ไม่มีประสิทธิภาพ นอกจากการเข้าถึง PAHs ของจุลินทรีย์แล้ว การถ่ายโอนมวลสาร (mass transfer) และการเผาผลาญของจุลินทรีย์ (microbial metabolism) ยังเป็นปัจจัยที่สำคัญและส่งผลต่อการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs โดยตรง ดังที่แสดงในรูปที่ 2.4 และนอกจากนี้อิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมสามารถส่งผลกระทบกับปัจจัยในการบำบัด PAHs

ด้วย เช่น pH อุณหภูมิ สารอาหาร และอนุภาคดิน (Mohan และคณะ, 2006) เป็นต้น ดังที่แสดงในตารางที่ 2.3



รูปที่ 2.3 การเข้าถึง PAHs ที่ถูกกักเก็บหรือดูดซับโดยดินของแบคทีเรีย (Johnsen และคณะ, 2005)



รูปที่ 2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ด้วยชีววิธี (Mohan และคณะ 2006)

ตารางที่ 2.2 วิธีการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ด้วยชีววิธี

วิธีการ	ข้อดี	ข้อจำกัด
Rhizoremediation associatade phytoremediation	ต้นทุนและค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่ำ มีประสิทธิภาพ	ต้องมีพื้นที่ดำเนินการที่กว้างขวาง
Biostimulation	ต้นทุนต่ำ สามารถดำเนินการได้ในพื้นที่ปนเปื้อนและนำไปบำบัดที่อื่น มีประสิทธิภาพ	ต้นทุนสูงกว่าเมื่อเทียบกับการใช้จุลินทรีย์ประจำถิ่น ต้องมีพื้นที่ดำเนินการที่กว้างขวาง
Bioaugmentation	สามารถดำเนินการได้ในพื้นที่ปนเปื้อนและนำไปบำบัดที่อื่น มีประสิทธิภาพและรวดเร็ว	ไม่สามารถคาดการณ์ได้
Other process integration with bioremediation	สามารถดำเนินการได้ในพื้นที่ปนเปื้อนและนำไปบำบัดที่อื่น มีประสิทธิภาพและรวดเร็ว	ต้นทุนค่อนข้างสูง ค่าใช้จ่ายในการบำรุงรักษาสูง
Adaptation	สามารถดำเนินการได้ในพื้นที่ปนเปื้อนและนำไปบำบัดที่อื่น ต้นทุนและค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่ำ	การบำบัดค่อนข้างช้า
Addition of surfactants	ช่วยในการเข้าถึง PAHs สามารถดำเนินการได้ในพื้นที่ปนเปื้อนและนำไปบำบัดที่อื่น	การบำบัดค่อนข้างช้า
Bacterial chemotaxins	ต้นทุนต่ำ สามารถดำเนินการได้ในพื้นที่ปนเปื้อนและนำไปบำบัดที่อื่น	ไม่สามารถคาดการณ์ได้

ตารางที่ 2.3 อิทธิพลของสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อปัจจัยในการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ด้วยชีววิธี

อิทธิพลของสิ่งแวดล้อม	ปัจจัย
pH	การเข้าถึง, การถ่ายโอนมวลสาร, การเผาผลาญของจุลินทรีย์
อุณหภูมิ	การเข้าถึง, การถ่ายโอนมวลสาร, การเผาผลาญของจุลินทรีย์
จุลินทรีย์	การเข้าถึง, การเผาผลาญของจุลินทรีย์
ผู้รับอิเล็กตรอน	การเข้าถึง, การเผาผลาญของจุลินทรีย์
จุลินทรีย์ประจำถิ่น	การเผาผลาญของจุลินทรีย์
ธาตุอาหาร	การเผาผลาญของจุลินทรีย์
สารอื่น ๆ	การเผาผลาญของจุลินทรีย์
ลักษณะของดิน	การเข้าถึง, การถ่ายโอนมวลสาร
ลักษณะของสารปนเปื้อน	การเข้าถึง, การถ่ายโอนมวลสาร, การเผาผลาญของจุลินทรีย์

ที่มา : Mohan และคณะ (2006)

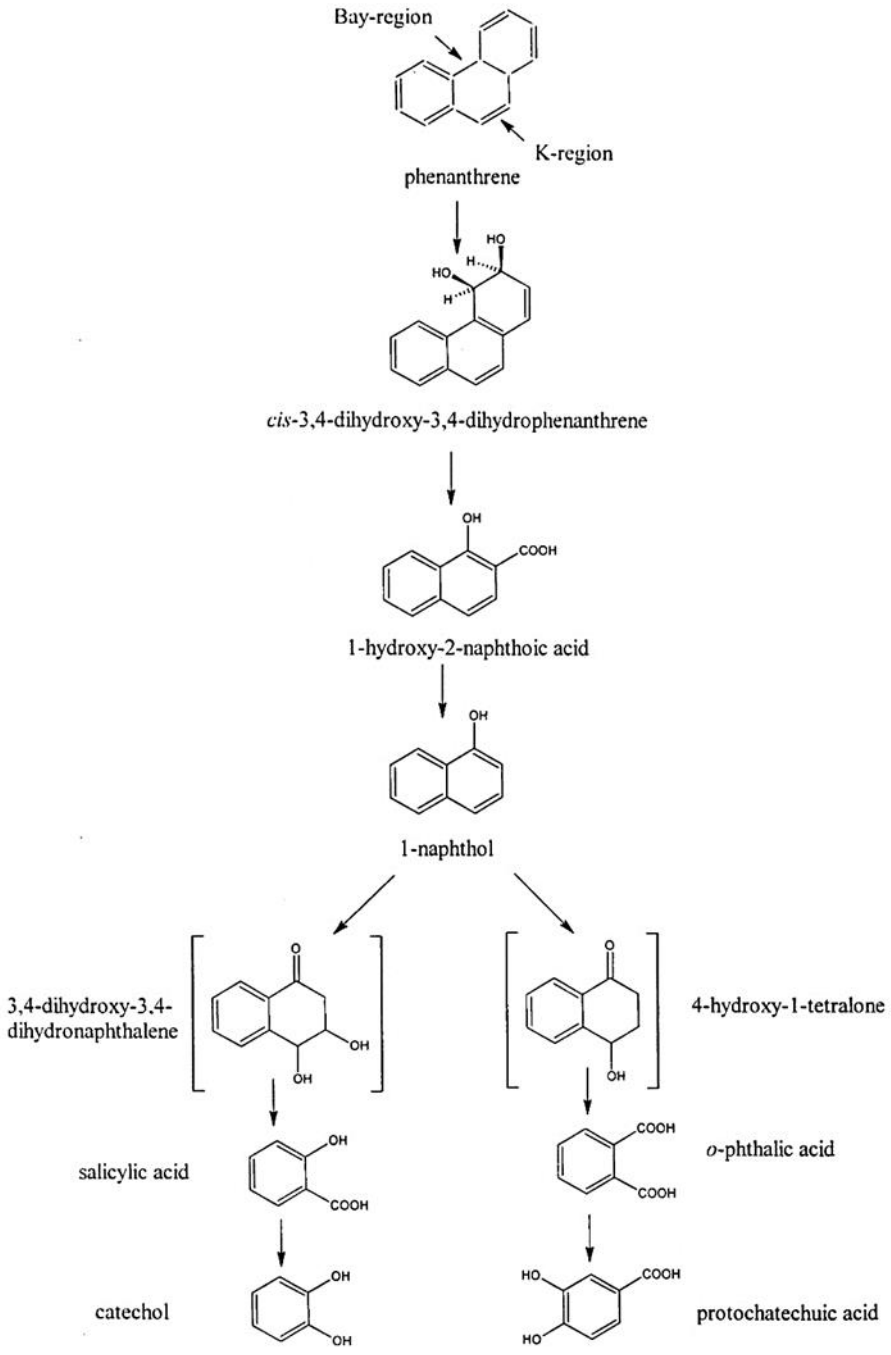
2.4.1 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน

แบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนสามารถคัดแยกได้จากบริเวณดินและน้ำที่มีการปนเปื้อน เช่น Zhao และคณะ (2008) คัดแยกแบคทีเรียจากดินที่ปนเปื้อนของเสียจากบริเวณโรงงานเก็บน้ำมันในเมืองเซี่ยงไฮ้ ประเทศจีน ได้แบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. ZP1 และ *Tistrella* sp. ZP5 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีแนนทรีนความเข้มข้น 250 มิลลิกรัม/ลิตร ได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 7 วัน Zhao และคณะ (2009) สามารถคัดแยกแบคทีเรีย *Pseudomonas stutzeri* ZP2 จากดินที่ปนเปื้อนของเสียจากบริเวณโรงงานเก็บน้ำมันในเมืองเซี่ยงไฮ้ ประเทศจีน โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ ZP2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีแนนทรีน 250 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 96 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 6 วัน เป็นต้น และวิธีเอนริชเมนท์ (enrichment) เช่น Gaskin และ Bentham (2005) ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียโดยวิธีเอนริชเมนท์ด้วยไพรีนและน้ำมันดีเซล ไพรีนและซาลิไซเลท ไพรีนและฟีแนนทรีน และไพรีน พบว่าในชุดการทดลองที่เติมไพรีนและน้ำมันดีเซลคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ได้ 6 สายพันธุ์ ชุดการทดลองที่เติมไพรีนและซาลิไซเลทคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ได้ 5 สายพันธุ์ ชุดการทดลองที่เติมไพรีนและฟีแนนทรีนคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ได้ 4 สายพันธุ์ ชุดการทดลองที่เติมไพรีนคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ได้ 4 สายพันธุ์ และชุดควบคุมคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ได้ 2 สายพันธุ์ ซึ่งแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีหลายสายพันธุ์ เช่น *Micrococcus* sp., *Bacillus megaterium, Bacillus mycoides,*

Corynebacterium sp., *Alcaligenes* sp. และ *Alcaligenes* sp. เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียอีกหลายสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ ดังในตารางที่ 2.4

การย่อยสลายฟีแนนทรีนสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในกระบวนการที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ แต่ในกระบวนการที่ใช้อากาศจะทำให้การย่อยสลายเป็นไปอย่างสมบูรณ์และรวดเร็วยิ่งขึ้น ซึ่งในกระบวนการที่ใช้อากาศ ฟีแนนทรีนจะถูกย่อยสลายโดยระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (aromatic ring hydroxylating dioxygenase; ARHD or RHD) โดยเอนไซม์จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน 2 อะตอม (รูปที่ 2.5) ให้กับโมเลกุลคาร์บอนที่เป็นพันธะคู่ในวงแอโรแมติกจนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และชีวมวลของแบคทีเรีย (Baboshin และ Golovleva, 2012) ตัวอย่างงานวิจัยบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนและ PAHs เช่น Amellal และคณะ (2001) ศึกษาการกำจัด PAHs ผสม ความเข้มข้น 1 กรัม/กิโลกรัมดินแห้ง ในดินทราย ดินทรายแป้ง และดินเหนียว โดยใช้แบคทีเรียประจำถิ่น บ่มเป็นเวลา 1 ปี พบว่า แบคทีเรียประจำถิ่นสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียประจำถิ่นในดินเหนียวพบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้มากกว่า 1×10^8 CFU/กรัมดินแห้ง ซึ่งมากกว่าในดินทรายและดินทรายแป้ง แต่เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ด้วย GC-MS พบว่า ในดินเหนียวมีปริมาณความเข้มข้นของ PAHs สูงกว่าในดินทรายและดินทรายแป้ง เนื่องจากดินเหนียวมีเนื้อดินที่ละเอียด จึงทำให้เป็นข้อกำจัดในการเข้าถึง PAHs ของแบคทีเรียรวมทั้งสารอาหารและออกซิเจนด้วย และนอกจากนี้ดินเหนียวสามารถดูดซับ PAHs ได้แข็งแรงกว่าดินทรายและดินทรายแป้ง จึงทำให้การกำจัด PAHs ในดินเหนียวด้วยแบคทีเรียอิสระจึงมีข้อจำกัดมากกว่าการกำจัด PAHs ในดินทรายและดินทรายแป้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 2.5 วิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนแบบใช้อากาศของแบคทีเรีย (Mrozik และคณะ, 2003)

ตารางที่ 2.4 แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีแนนทรีน

แบคทีเรีย	**ความเข้มข้นฟีแนนทรีน (มก./ล.)**	**ประสิทธิภาพ (เปอร์เซ็นต์)**	**ระยะเวลา (วัน)**	**อ้างอิง**
Sphingomonas sp. GY2B	100	99.8	7	Tao และคณะ (2007)
Brevibacillus sp. PDM-3	250	93	6	Reddy และคณะ (2010)
Pseudoxanthomonas sp. DMVP2	300	100	5	Patel และคณะ (2012)
Pseudomonas xanthomarina PX	1	99.8	7	Sopeña Vázquez และคณะ (2013)
กลุ่มแบคทีเรียจากแอคติเวตเตดสลัดจ์	750	41.3	7	Partovinia และ Naeimpoor (2013)
Pseudomonas mendocina NR802	100	87	15	Mangwani และคณะ (2014)
Massilia sp. WF1	100	100	2	Gu และคณะ (2016)
Achromogenes sp. NY4	25	52	5	Nie และคณะ (2016)
Pseudomonas sp. JPN2	100	98.52	10	Jin และคณะ (2016)
Acinetobacter sp. P3d *Bacillus* sp. P4a *Pseudomonas* sp. P6	300	56.97 53.05 58.71	20	Fazilah และคณะ (2016)
Rhizobium petrolearium SL-1	100	100	3	Huang และคณะ (2016)
Stenotrophomonas sp. P1 *Pseudomonas* sp. P3	100	83 81.6	5	Zhu และคณะ (2016)

Pseudomonas sp. J801 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกด้วยวิธีเอนริชเมนท์จากดินตะกอนแม่น้ำท่าจีน จังหวัดสมุทรสาคร โคโลนีมีลักษณะกลม สีขาวขุ่น ผิวมันวาว ดังในรูปที่ 2.5 เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rDNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Pseudomonas plecoglossicida* FPC951 ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่มีรายงานการก่อโรค นอกจากนี้ *Pseudomonas* sp. J801 สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนได้หลายชนิดดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน

แบคทีเรีย	สารตั้งต้น	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย(เปอร์เซ็นต์)	อ้างอิง
Pseudomonas sp. J801	ฟีแนนทรีน 100 มิลลิกรัม/ลิตร ฟลูออรีน 100 มิลลิกรัม/ลิตร เตตระเดกเคน 500 มิลลิกรัม/ลิตร โดโคเซน 100 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำมันดิบ 2000 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำมันดีเซล 2000 มิลลิกรัม/ลิตร	98.33±1.57 (3 วัน) 99.63±2.57 (3 วัน) 59.59±7.07 (14 วัน) 32.69±8.06 (14 วัน) 42.96±0.34 (14 วัน) 38.91±0.36 (14 วัน)	ดวงพร พลฤทธิ์, ข้อมูลไม่เผยแพร่

2.4.2 การเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนในดินด้วยแบคทีเรียตรึง

การใช้แบคทีเรียตรึงมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในการบำบัดน้ำปนเปื้อนสารมลพิษ เนื่องจากวัสดุตรึงจะทำหน้าที่เป็นที่เกาะให้กับแบคทีเรียและเป็นแหล่งของแบคทีเรีย ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรียเพื่อนำมาใช้ซ้ำได้ (Nopcharoenkul และคณะ, 2013) แต่อย่างไรก็ตามการบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนไม่มีความจำเป็นที่จะต้องคัดแยกแบคทีเรียตรึงออกจากพื้นที่บำบัดหากใช้วัสดุตรึงที่เป็นวัสดุทางธรรมชาติและสามารถย่อยสลายเองได้ (Chen และคณะ 2012)

วิธีการตรึงแบคทีเรียสามารถใช้ได้หลายวิธีดังในรูปที่ 2.6 ซึ่งการเลือกวิธีที่จะใช้ตรึงแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุตรึงและแบคทีเรีย นอกจากนี้วัสดุตรึงยังมีบทบาทสำคัญสำหรับการบำบัดสิ่งแวดล้อมด้วยวิธี bioaugmentation โดยวัสดุตรึงที่ใช้ในการบำบัดดินควรจะเป็นวัสดุตรึงที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม สามารถป้องกันแบคทีเรียจากจุลินทรีย์ประจำถิ่นและควรจะย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ

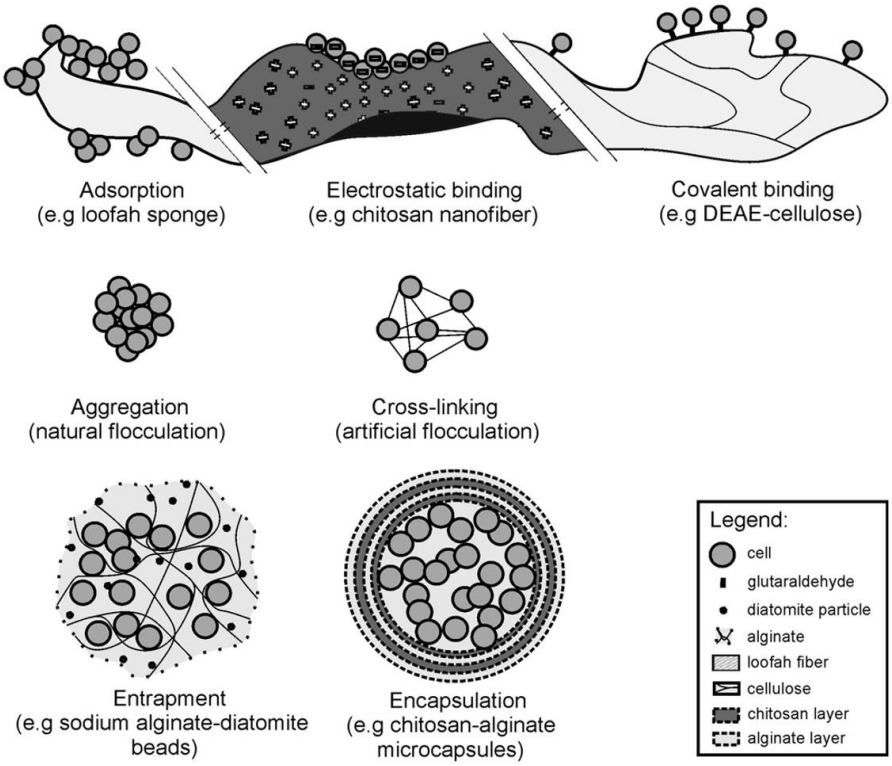
ตัวอย่างงานศึกษาที่ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs เช่น Chen และคณะ (2012) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัด PAHs ในดินเป็นระยะเวลา 90 วัน โดยใช้แบคทีเรียตรึงในอัลจิเนตที่ผสมด้วยเศษวัสดุจากพืชพบว่า แบคทีเรียตรึงมีประสิทธิภาพการกำจัด PAHs ได้ดีกว่าแบคทีเรียอิสระ

เนื่องจากแบคทีเรียตรึงมีส่วนผสมของเศษพืช ซึ่งเศษพืชเหล่านั้นสามารถดูดซับ PAHs ได้ จึงทำให้แบคทีเรียสามารถเข้าถึง PAHs ได้ถึงแม้ว่าจะถูกตรึงอยู่ในอัลจิเนต นอกจากนี้วัสดุตรึงสามารถช่วยป้องกันแบคทีเรียที่เติมลงไปจากความเป็นพิษของ PAHs ช่วยป้องกันแบคทีเรียจากการแข่งขันกับแบคทีเรียประจำถิ่น และยังช่วยเพิ่มการถ่ายโอนมวลสารในดินด้วย แต่อย่างไรก็ตามผลการกำจัด PAHs ของแบคทีเรียตรึงและวัสดุตรึงที่มีส่วนผสมของเศษพืชไม่แตกต่างกันมากนัก เนื่องจากแบคทีเรียที่ใช้ ไม่ค่อยมีประสิทธิในย่อยสลายการ PAHs

Guo และคณะ (2016) ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ด้วย *Mycobacterium gilvum* ที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซังโพดเพื่อตรึงแบคทีเรีย โดยใช้ตัวอย่างดินจากบริเวณโรงงานแยกแก๊ส (MGP) ซึ่งมีลักษณะดินเป็นดินเหนียว 65.8 เปอร์เซ็นต์ ดินทรายแป้ง 14.9 เปอร์เซ็นต์ และดินทราย 19.3 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบกับดินบริเวณคลองส่งน้ำเสียจากชุมชนซึ่งมีลักษณะดินเป็นดินเหนียว 61.4เปอร์เซ็นต์ ดินทรายแป้ง 28.5 เปอร์เซ็นต์ และดินทราย 10.1 เปอร์เซ็นต์ พบการตรวจสอบการปนเปื้อน PAHs ในดินเบื้องต้นพบว่า ดิน MGP มีการปนเปื้อน PAHs 178.2 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดิน และดินจากชุมชนปนเปื้อน PAHs 7.8 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดิน และเมื่อเติมแบคทีเรียตรึงเป็นปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และปรับความจุน้ำในดินเป็น 55 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) บ่มในที่มืดเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่า แบคทีเรียสามารถย่อยสลาย PAHs ในดิน MGP และดินจากชุมชนได้ถึง 71 เปอร์เซ็นต์ และ 72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับวัสดุตรึงจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

งานวิจัยในปัจจุบันกำลังให้ความสนใจกับการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นวัสดุตรึง เนื่องจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมีราคาถูกจึงทำให้ลดต้นทุนในการดำเนินงานได้ นอกจากนี้โครงสร้างที่เป็นเส้นใยพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน (Justiz-Smith และคณะ 2008) นั้นยังเอื้อต่อการยึดเกาะและการไหลผ่านเข้าออกของน้ำและอากาศให้กับแบคทีเรียได้ด้วย (Yu และคณะ, 2007) มีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหลายชนิดที่ถูกนำมาใช้เป็นวัสดุตรึงเพื่อบำบัดสารมลพิษที่ปนเปื้อนในดิน ดังที่แสดงในตารางที่ 2.6

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นวัสดุตรึง เช่น Yu และคณะ (2007) ศึกษาการตรึง *Saccharomyces cerevisiae* บนซังข้าวฟ่างเพื่อผลิตเอทานอล ซึ่งซังข้าวฟ่างสามารถดูดซับน้ำได้มาก พื้นผิวของซังข้าวฟ่างมีลักษณะเป็นรูพรุนมากมายซึ่งทำให้การผ่านเข้า-ออกของสารต่าง ๆ ระหว่างวัสดุตรึงกับอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นไปได้ดี และนอกจากนี้ข้าวฟ่างยังมีการปลูกเป็นอย่างมากในทวีปเอเชียซึ่งทำให้มีซังข้าวโพดปริมาณมากและราคาถูก ในกระบวนการตรึงแบคทีเรีย นำซังข้าวโพดที่บดละเอียดและแห้ง 25 กรัม ผสมกับยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งยีสต์จะเกาะติดกับซังข้าวฟ่างด้วยวิธีการดูดซับที่ผิวของซังข้าวฟ่าง



รูปที่ 2.6 วิธีการตรึงแบคทีเรีย (Dzionek และคณะ, 2016)

ตารางที่ 2.6 วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่นำมาเป็นวัสดุตรึงเพื่อบำบัดดินปนเปื้อนสารมลพิษ

วัสดุตรึง	**จุลินทรีย์**	**สารมลพิษ**	**ประสิทธิภาพ (เปอร์เซ็นต์)**	**อ้างอิง**
เปลือกเมล็ดทานตะวัน	*Rhodococcus* sp. QBTo	น้ำมันดิบ (25 ก./กก.)	66 210 วัน	Cubitto และ Gentili (2015)
ชานอ้อย	*Bacillus pumilus* HZ-2	Mesotrione (10.7 มก./กก)	52 (เซลล์อิสระ) 75 (เซลล์ตรึง) 14 วัน	Liu และคณะ (2015)

ตารางที่ 2.6 (ต่อ) วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่นำมาเป็นวัสดุตรึงเพื่อบำบัดดินปนเปื้อนสารมลพิษ

วัสดุตรึง	จุลินทรีย์	สารมลพิษ	ประสิทธิภาพ	อ้างอิง
ซังข้าวโพด	*Pseudomonas* sp.	อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (6,000 มก./กก)	19-48 (เซลล์อิสระ) 45-55 (เซลล์ตรึง)	Rivelli และคณะ (2013)
	Rhodococcus sp.		21-44 (เซลล์อิสระ) 12-42 (เซลล์ตรึง) 15 วัน	
ซังข้าวโพด	*Sphingobium indicum* B90A	เฮกซะคลอโรไซโคลเฮกเซน (60.7 มก./กก.)	76 (เซลล์ตรึง) 8 วัน	Raina และคณะ (2008)

Nunal และคณะ (2014) ใช้แกลบและขุยมะพร้าวตรึงกลุ่มแบคทีเรียเพื่อย่อยสลายน้ำมันดิบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากวัสดุตรึงทั้งสองเป็นวัสดุที่สามารถย่อยสลายเองได้ตามธรรมชาติและมีราคาถูก ในกระบวนการตรึงแบคทีเรีย นำแกลบและขุยมะพร้าวบดละเอียดจนมีขนาด 1 มิลลิเมตร ผสมกับกลุ่มแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเป็นระยะเวลา 4 วัน ทำให้ได้แบคทีเรียตรึงที่มีปริมาณแบคทีเรียประมาณ 10^9 CFU/กรัมวัสดุตรึง

นอกจากวัสดุตรึงข้างต้นแล้ว กาบมะพร้าวเป็นหนึ่งในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในประเทศไทยที่สามารถหาได้ง่าย และมีราคาถูก ในรายงานวิจัยของ Crisafully และคณะ (2008) ศึกษาการกำจัด PAHs โดยใช้วัสดุจากธรรมชาติที่มีราคาถูกได้แก่ ชานอ้อย กาบมะพร้าว ไคติด และไคโตซาน จากน้ำเสียที่ผสมอะซิโตน พบว่า กาบมะพร้าวมีประสิทธิภาพในการดูดซับ PAHs สูงสุด ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณลิกนินที่เป็นองค์ประกอบ และในรายงานวิจัย Owabor และ Agarry (2013) ศึกษาการดูดซับแนฟทาลีนและไพรีนโดยกาบมะพร้าว พบว่า ความสามารถในการดูดซับ PAH จะลดลงเมื่อมีกาบมะพร้าวมีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากกาบมะพร้าวมีพื้นที่ผิวลดลง และกาบมะพร้าวสามารถดูดซับ PAH ได้เพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของกาบมะพร้าว นอกจากนี้กาบมะพร้าวยังสามารถดูดซับสารอื่น ๆ ได้ เช่น Congo red, Methylene blue, Crystal violet, Phenol, 2,4,6-

trichlorophenol เป็นต้น (Bhatnagar และคณะ, 2010) จากสมบัติของกาบมะพร้าวที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะใช้กาบมะพร้าวเป็นวัสดุตรึงเพื่อตรึงแบคทีเรีย

2.5 การเก็บรักษาแบคทีเรียตรึง

เนื่องจากแบคทีเรียตรึงที่ได้จากการผลิตเป็นแบคทีเรียตรึงที่ชุ่มไปด้วยน้ำ ทำให้ไม่สะดวกต่อการขนย้ายและการจัดเก็บ จนทำให้ต้องมีการเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงในรูปแบบแห้ง ซึ่งจะทำให้มีน้ำหนักเบาและสามารถขนย้ายสะดวก โดยกระบวนการในการทำให้แห้งที่นิยมใช้คือกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง การผึ่งลม และการอบลมร้อน (Iaconelli และคณะ 2015) ซึ่งกระบวนการทำให้แห้งเยือกแข็งและการอบลมร้อนมีต้นทุน เครื่องมือและค่าใช้จ่ายที่สูง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจในกระบวนการทำให้แห้งแบบผึ่งลม

ในกระบวนการในการทำให้แห้งจะทำให้แบคทีเรียเกิดความเครียดขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการขาดน้ำของแบคทีเรีย และยังมีความเครียดอื่น ๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.7 โดยความเครียดของแบคทีเรียที่เกิดขึ้นจะเริ่มต้นตั้งแต่กระบวนการทำให้แห้ง การเก็บรักษา และการนำมาใช้งานอีกครั้ง (Vriezen และคณะ, 2007) มีรายงานวิจัยที่ศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียตรึงหลังการเก็บรักษาแบคทีเรียตรึง เช่น Gentili และคณะ (2006) ศึกษาการเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงบนไคโตซาน ซึ่งหลังจากการตรึงแบคทีเรียได้ใช้กระบวนการผึ่งลมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทำให้แบคทีเรียตรึงแห้ง จากนั้นทดสอบการเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงในถุงพอลิเอทิลีนที่อุณหภูมิห้อง (25±2) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่าแบคทีเรียตรึงที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียส มีจำนวนแบคทีเรียลดลง 1 log CFU/กรัมวัสดุตรึง ในขณะที่แบคทีเรียตรึงที่เก็บที่อุณหภูมิห้องมีปริมาณแบคทีเรียลดลง 2 log CFU/กรัมวัสดุตรึง หรือมีแบคทีเรียที่รอดชีวิตอยู่ประมาณ 7 log CFU/กรัมวัสดุตรึง

Nunal และคณะ (2014) ศึกษาการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงบนแกลบและขุยมะพร้าว จากนั้นทดสอบการเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 180 วัน พบว่าแบคทีเรียสามารถรอดถึง 10^5-10^6 CFU/กรัมแบคทีเรียตรึง หลังจากนั้นนำแบคทีเรียตรึงที่เก็บรักษาไปทดสอบการกำจัดน้ำมันดิบ พบว่าแบคทีเรียตรึงยังคงสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

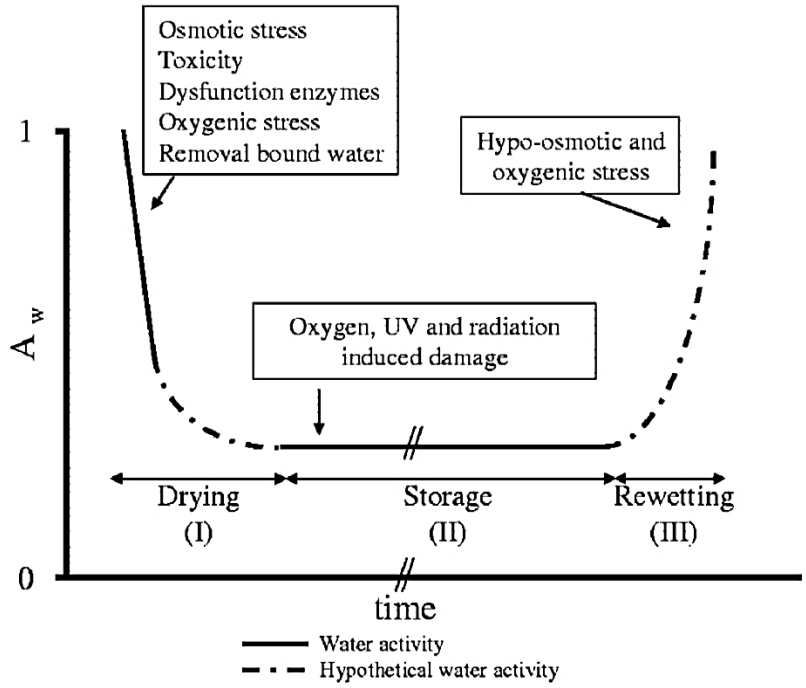
2.5.1 สารป้องกันแบคทีเรีย

สาเหตุที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้แบคทีเรียมีปริมาณลดลงหลายสาเหตุคือ การขาดน้ำ เมื่อแบคทีเรียถูกกำจัดน้ำออกไป ส่งผลให้เกิดความเครียดโดยเฉพาะที่เยื่อหุ้มเซลล์ เพราะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียรูปโดยเฉพาะที่ฟอสโฟลิพิด (phospholipid) คือเมื่อเซลล์ขาดน้ำจะทำให้ฟอสโฟลิพิดสร้าง

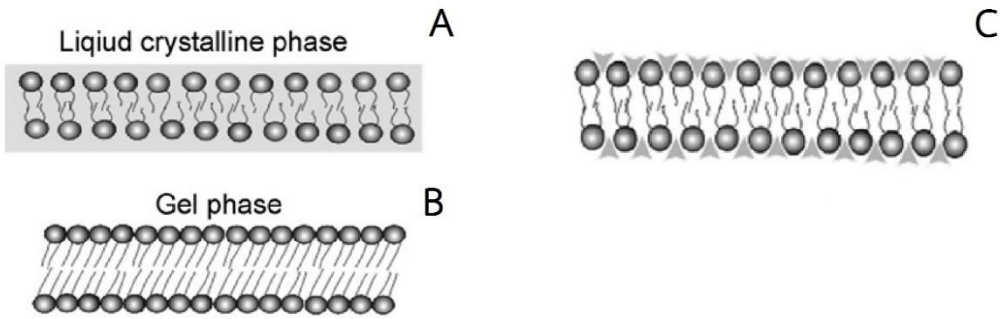
พันธะโควาเลนต์กันเองที่สายโซ่คาร์บอน จนทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงสถานะจาก liquid crystal phase ไปเป็น gel phase (รูปที่ 2.8A) และทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด (Iaconelli และคณะ , 2015 ;Santivarangkna และคณะ, 2008) การเติมสารป้องกันเซลล์จะสามารถช่วยให้แบคทีเรียสามารถปรับตัวกับการขาดน้ำได้ เช่น น้ำตาลโมเลกุลคู่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เป็นต้น (Ramos และคณะ, 2001 ; Schisler และคณะ, 2016 ; Bonaterra และคณะ, 2005) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Oldenhof และคณะ (2005) ได้ศึกษาผลของซูโครสและมอลโตเดกตรินต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus bulgaricus* หลังจากการทำแห้งด้วยวิธีผึ่งลม โดยใช้ Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) พบว่า ซูโครสมีส่วนช่วยในการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์จาก liquid crystal phase ไปเป็น gel phase

ตัวอย่างงานวิจัยที่เติมสารป้องกันเซลล์ในกระบวนการทำให้เซลล์แห้ง Dreux และคณะ (2008) ศึกษาการรอดชีวิตของ *Listeria monocytogen* โดยการเติมไกลซีบีเทนให้มีความเข้มข้น 1, 2.5, 5, 25 และ 250 มิลลิโมล/ลิตร ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นดูดสารแขวนลอยแบคทีเรีย 15 ไมโครลิตรในลงไมโครเพลทชนิด 96 หลุม ผึ่งลมให้แห้งเป็นเวลา 15 ชั่วโมง และเก็บรักษาในเรือนเพาะพันธุ์พืช เป็นเวลา 4 วัน พบว่า ที่ไกลซีบีเทนมากกว่า 2.5 มิลลิโมล/ลิตร สามารถช่วยให้ *Listeria monocytogen* รอดชีวิตได้เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารใดๆ

Nocker และคณะ (2012) ศึกษาผลของการทำแห้งด้วยวิธีผึ่งลมของ *Escherichia coli* โดยก่อนทำให้แห้งได้แขวนลอยแบคทีเรียในสารละลายฟอสเฟตที่เติม NaCl, KCl, $MgCl_2$, ซูโครส และทรีฮาโลส ความเข้มข้นอย่างละ 150, 400 หรือ 1000 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นผึ่งลมให้แบคทีเรียแห้ง เก็บตัวอย่างแบคทีเรียในชั่วโมงที่ 2 หลังจากที่แบคทีเรียแห้งแล้ว เพื่อดูการรอดชีวิตของแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียที่แขวนลอยในสารละลายที่เติมซูโครส และ ทรีฮาโลส มีการรอดชีวิตมากกว่าการเติม NaCl, KCl และ $MgCl_2$ ในทุกความเข้มข้น



รูปที่ 2.8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (Water Activity: Aw) กับระยะเวลาในการเก็บรักษา มี 3 ระยะ ระยะที่ 1 คือกระบวนการทำให้แห้ง ระยะที่ 2 คือการเก็บรักษา และระยะที่ 3 คือการนำมาใช้งานอีกครั้ง โดยในแต่ละระยะจะมีความเครียดที่เกิดที่อาจทำให้แบคทีเรียตาย (Vriezen และคณะ, 2007)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของฟอสโฟลิพิดในเยื่อหุ้มเซลล์ A ฟอสโฟลิพิดในสภาวะปกติ; B ฟอสโฟลิพิดที่เกิดพันธะโควาเลนต์กันเอง; C ฟอสโฟลิพิดที่มีน้ำตาลแทรกที่ส่วนหัวของฟอสโฟลิพิด (Santivarangkna และคณะ, 2008)

Schisler และคณะ (2016) ศึกษาการรอดชีวิตของ *Pseudomonas fluorescens* S11P12, P22Y05 และ S22T04 โดยการเติม กลูโคส ฟรุกโตส ทรีฮาโลส แรฟฟิโนส และสแตคีโอตความเข้มข้น 0, 20 และ 100 กรัม/ลิตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นดูดสารแขวนลอยแบคทีเรีย 1 ไมโครลิตรในลงไมโครเพลทชนิด 96 หลุม ผึ่งลมให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 1 และ 168 ตรวจสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียโดยเติมอาหารเลี้ยงปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 770 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นสังเกตุการเจริญของแบคทีเรียที่รอดชีวิตด้วยในชั่วโมงที่ 6, 8, 24, 30 และ 48 ที่ OD_{620} ผลการทดลองพบว่าในชุดการทดลองที่เติมฟรุกโตสและทรีฮาโลสความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร ค่า OD_{620} ที่วัดได้สูงกว่าชุดควบคุมไม่ใส่สารป้องกันเซลล์ใดๆ

2.5.2 การกระตุ้นให้แบคทีเรียผลิตสารป้องกันเซลล์

นอกจากการเติมสารป้องกันเซลล์ในสารแขวนลอยแบคทีเรียก่อนกระบวนการทำให้แห้งจะช่วยทำให้แบคทีเรียสามารถทนต่อความแห้งได้แล้ว แบคทีเรียเองก็สามารถผลิตสารป้องกันตัวเองจากความแห้งได้ด้วย เช่น น้ำตาล พอลิออลล์ กรดอะมิโน เป็นต้น มีรายงานวิจัยหลายงานที่พบว่าแบคทีเรียที่เจริญในอาหารที่มีความแรงดันออสโมติกสูงจะสามารถผลิตสารป้องกันแรงดันออสโมติกได้ (osmoprotectants) และเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลาหนึ่ง พบว่าแบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้มากกว่าแบคทีเรียที่เจริญในอาหารที่มีความแรงดันออสโมติกปกติ ดังในงานวิจัยของ Bonaterra และคณะ (2005) ศึกษาการสะสมสารป้องกันแรงดันออสโมติกในแบคทีเรียแกรมลบ *Pantoea agglomerans* EPS125 โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ และเติมไกลซีนบีเทนให้มีความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 มิลลิโมลาร์ พบว่า *P. agglomerans* EPS125 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ มีการสะสมทรีฮาโรสและไกลซีนบีเทนในเยื่อหุ้มเพิ่มขึ้น มากกว่า *P. agglomerans* EPS125 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.1 และ 0.3 โมลาร์ และเมื่อเก็บรักษาในสภาวะแห้งเป็นเวลา 100 วัน พบว่า *P. agglomerans* EPS125 ที่เลี้ยงในชุดการลดลองที่เติมไกลซีนบีเทนให้มีความเข้มข้น 0.1 และ 1 มิลลิโมลาร์ มีการรอดชีวิตใกล้เคียงกันคือ 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารป้องกันที่แบคทีเรียผลิตได้เองจะถูกสะสมอยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเฉพาะไกลซีนบีเทนและทรีฮาโลส มักจะถูกตรวจพบได้ในแบคทีเรียแกรมลบเพื่อช่วยป้องกันแบคทีเรียจากความแห้งและความเครียดอื่น ๆ ได้ (Welsh และคณะ, 1999: Vriezen และคณะ, 2007)

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระบอกฉีดยาพลาสติก (syringe) ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร บริษัท Nipro จำกัด, Thailand
2. กระดาษไนลอนเมมเบรน Biodyne® B ขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร บริษัท Pall Corporation, USA
3. ขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 300 มิลลิลิตร สำหรับ microcosm
4. ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 250 และ 500 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, USA
5. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) ประกอบด้วย
    5.1 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลว (liquid chromatography) รุ่น LC-A3 บริษัท Shimadzu, Japan
    5.2 เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-2A บริษัท Shimadzu, Japan
    5.3 เครื่องบันทึกและประมวลผล (chromatopac) รุ่น C-R1A บริษัท Shimadzu, Japan
    5.4 คอลัมน์ (column) ชนิด Senshu Pak Pegasil ODS บริษัท Senshu Scientific, Japan
    5.5 กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-R50 บริษัท Exmire, USA
6. เครื่องชั่ง P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
7. เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพ (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2909TM บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
8. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Kakusa, Japan
9. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Mikro20 บริษัท Hettich zentrifuge, Germany
12. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA – Thermal Cycle) รุ่น UV-160 บริษัท Shimadzu, Japan
13. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 บริษัท Corning, USA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

14. เครื่องวัดดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu, Japan

15. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate; CA) ขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร บริษัท Chrom Tech, USA

16. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (polytetrafluoroethylene; PTFE) ขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร บริษัท Chrom Tech, USA

17. ชุดเครื่องเจลอิเล็คโทรโฟเรซิส Mini Gel migration through รุ่น i-mupid บริษัท COSMO BIO, Japan

18. ชุด DCode^{TM} System บริษัท Bio-Rad, USA

19. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO laminar flow รุ่น HT-122.5 บริษัท International Scientific Supply, Japan

20. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U332 บริษัท Sanyo Electric, Japan

21. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand

22. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) และ ไมโครปิเปตต์ทิป (micropipette tip) ขนาด 2, 10, 20, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France

23. ไมโครเพลท ชนิด 96 หลุม (96-well microplate) บริษัท Corning, USA

24. หลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube) ขนาด 50 และ 250 มิลลิลิตร

25. หลอดทดลองขนาด 20 และ 50 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, USA

26. หลอดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR tube) ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

27. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 และ 2 มิลลิลิตร

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia
2. ไกลซีนบีเทน บริษัทจันทร์เจ้า ลองจีวิตี้ จำกัด, Thailand
3. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) บริษัท Merck, Germany
4. ซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) บริษัท Merck, Germany
5. เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB) บริษัท Bio Basic, Canada
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
7. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) บริษัท Merck, Germany

8. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) บริษัท Nacalai Tesque, Japan
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
10. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) บริษัท Merck, Germany
11. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
12. ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide) บริษัท BioBasic, Japan
13. เตตระเมทิลีนไดอะมีน (N,N,N',N'-tetramethylenediamine; TEMED) บริษัท Bio-Rad, USA
14. ทริปโตน (tryptone) บริษัท Difco, USA
15. ทริส[ไฮดรอกซีเมทิล]อะมิโนมีเทน (Tris) บริษัท Sigma, USA
16. แบคโตอะการ์ (bacto agar) บริษัท Difco, USA
17. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco, USA
18. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH2PO4) บริษัท Merck, Germany
19. ฟีนอล (phenol) บริษัท Merck, Germany
20. ฟีแนนทรีน (phenanthrene) บริษัท Sigma, USA
21. เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) บริษัท Merck, Germany
22. ฟอร์มาไมด์ (formamide) 40 เปอร์เซ็นต์ บริษัท Bio-Rad, USA
23. ฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) บริษัท Kanto Chemical, Japan
24. เมทานอล (methanol) บริษัท Merck, Germany
25. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) บริษัท Merck, Germany
26. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) บริษัท Carlo Erba, France
27. ยูเรีย (CH_4N_2O) บริษัท Bio-Rad, USA
28. สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder บริษัท Bio-Rad, USA
29. อะกาโรส (agarose) บริษัท IUAI, Japan
30. อะคริลาไมด์:บิส (acrylamide:bis) (37:1) 40 เปอร์เซ็นต์ บริษัท Bio-Rad, USA
31. อะซิโตน (acetone) บริษัท Merck, Germany
32. เอทานอล (ethanol) 99 เปอร์เซ็นต์ บริษัท Merck, Germany
33. เอทิลอะซิเตท (ethylacetate) บริษัท Merck, Germany
34. เอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิด (EDTA) บริษัท Sigma, USA
35. เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) บริษัท Promega, USA
36. เอนไซม์โปรติเนสเค (proteinase K) บริษัท United States Biological, USA
37. เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) บริษัท Bio Basic, Canada

38. เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (taq DNA polymerase) บริษัท N

39. ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol) บริษัท Merck, Germany

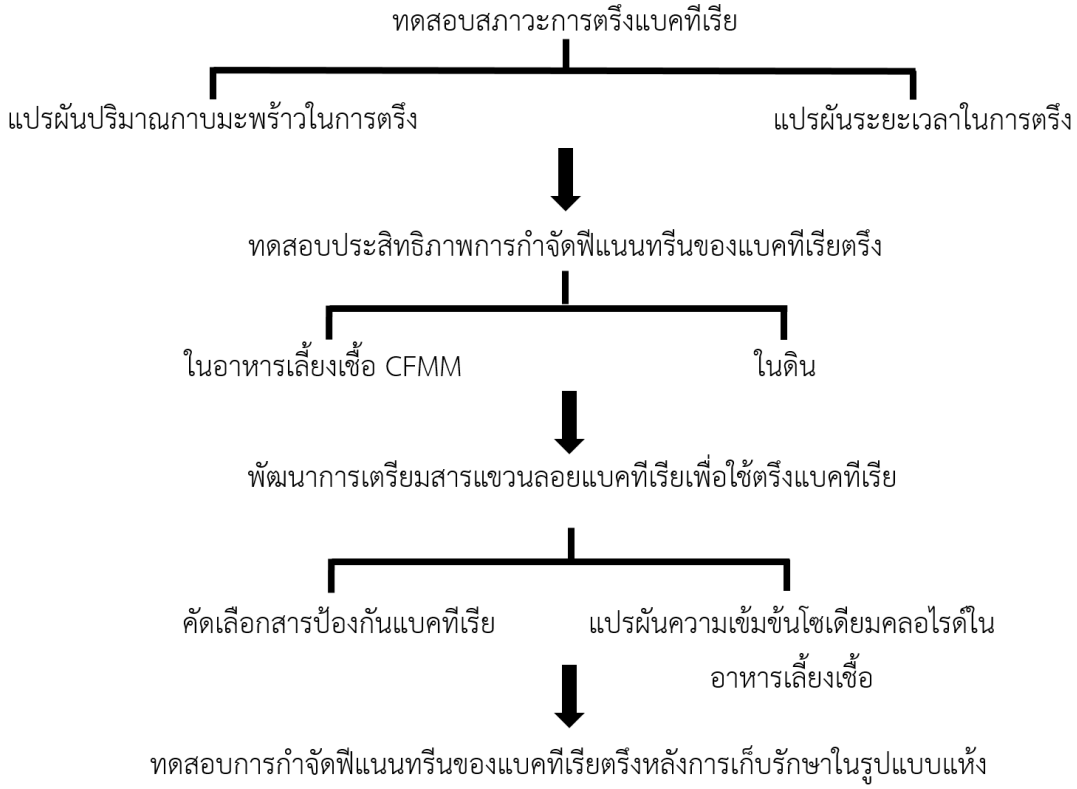
ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR (bp)	อ้างอิง
341F-GC clamp 520R	CCTACGGGAGGCAGCAG-GC clamp ACCGCGGCTGCTGGC	179	Muyzer และคณะ, 1993

ตารางที่ 3.2 แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

แบคทีเรีย	รหัสเชื้อฝากเก็บ	แหล่งที่มา	สารตั้งต้น	ผู้คัดแยก
Pseudomonas sp. J801	MSCU 0802	ดินตะกอนแม่น้ำท่าจีน สมุทรสาคร ประเทศไทย	100 มิลลิกรัม/ลิตร ฟีแนนทรีน	ดวงพร พลฤทธิ์, ข้อมูลไม่เผยแพร่

ภาพรวมของงานวิจัย



วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตรึง *Pseudomonas* sp. J801 ในกาบมะพร้าว

3.1.1 เตรียมกาบมะพร้าว

ซื้อกาบมะพร้าวสับละเอียดจากตลาดในชุมชน จากนั้นนำกาบมะพร้าวไปตากให้แห้ง แล้วจึงตัดให้มีขนาด 4 มิลลิเมตร × 4 มิลลิเมตร × 4 มิลลิเมตร นำกาบมะพร้าวที่ได้แช่ในน้ำสะอาดเป็นเวลา 3 วัน โดยเปลี่ยนน้ำใหม่ทุกวัน จากนั้นนำไปตากแดดให้แห้งเป็นเวลา 3-4 วัน นำส่วนหนึ่งไปนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งเว้นระยะห่าง 1 วัน

รูปที่ 3.1 กาบมะพร้าวสับละเอียดที่ซื้อจากตลาดในชุมชน

3.1.2 เตรียมสารแขวนลอย *Pseudomonas* sp. J801

เลี้ยง *Pseudomonas* sp. J801 ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.25 เท่า Luria-Bertani (0.25X LB) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร บ่มด้วยเครื่องเขย่า 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 8000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง แขวนลอยเซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์และปรับให้หัวเชื้อแบคทีเรียมีค่า OD_{600}= 1 เพื่อใช้เป็นสารแขวนลอยแบคทีเรีย มีแบคทีเรียปริมาณ 10^9 CFU/มิลลิลิตร

3.1.3 ตรึง *Pseudomonas* sp. J801 ในกาบมะพร้าวโดยแปรผันปริมาณวัสดุตรึง

นำกาบมะพร้าวที่มีจุลินทรีย์ประจำถิ่น (ที่ได้จากการข้อ 3.1.1) ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาณ 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 กรัม และในชุดควบคุมใช้กาบมะพร้าวปราศจากจุลินทรีย์ประจำถิ่นปริมาณ 1 กรัม จากนั้นเติมสารแขวนลอยแบคทีเรีย (ที่ได้จากข้อ 3.1.2) ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำให้ในขวดรูปชมพู่มีปริมาณกาบมะพร้าวคิดเป็น 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักกาบมะพร้าว/ปริมาตรสารแขวนลอยแบคทีเรีย) นำไปวางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา

24 ชั่วโมง จากนั้นเทสารแขวนลอยแบคทีเรียออก ล้างแบคทีเรียส่วนเกินด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที นาน 20 นาที แล้วเทสารละลายโซเดียมคลอไรด์ทิ้ง แล้วล้างซ้ำอีก 1 ครั้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำแบคทีเรียตรึงไปตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดบนกาบมะพร้าว

3.1.4 ตรึง *Pseudomonas* sp. J801 กาบมะพร้าวโดยแปรผันระยะเวลาในการตรึง

นำกาบมะพร้าวที่มีจุลินทรีย์ประจำถิ่นใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาณตามที่เลือกในข้อ 3.1.3 จากนั้นเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย (ที่ได้จากข้อ 3.1.2) ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปตรึงด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3, 6, 9, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นเทหัวเชื้อแบคทีเรียออก ล้างแบคทีเรียส่วนเกินด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที นาน 20 นาที แล้วเทสารละลายโซเดียมคลอไรด์ทิ้ง แล้วล้างซ้ำอีก 1 ครั้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำแบคทีเรียตรึงไปตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดบนกาบมะพร้าว

3.1.5 ตรวจนับการคงอยู่ของ *Pseudomonas* sp. J801 บนกาบมะพร้าว

นำแบคทีเรียตรึงที่ได้ใส่หลอดทดลองพลาสติกฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 25 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีแบคทีเรียตรึงและกาบมะพร้าว (สำหรับชุดควบคุมกาบมะพร้าวปราศจากจุลินทรีย์ประจำถิ่น) นำไปวางในเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่ 35 KHz เป็นเวลา 3 นาที และปั่นผสม 5 นาที ดูดตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ อย่างเป็นลำดับ แล้วใช้วิธี drop plate สารแขวนลอยเซลล์ที่เจือจางแล้วบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งปราศจากแหล่งคาร์บอน (carbon-free mineral medium; CFMM) (ภาคผนวก ก) ที่ผสมฟีแนนทรีน ในรูปสารละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (ภาคผนวก ข) ให้มีความเข้มข้น สุดท้าย 100 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน บ่มเป็นระยะเวลา 2-3 วัน นับ *Pseudomonas* sp. J801 ที่เกาะติดบนวัสดุตรึงที่ปราศจากจุลินทรีย์ประจำถิ่น และเทียบเคียงกับการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ยังมีจุลินทรีย์ประจำถิ่น และคำนวณจำนวนแบคทีเรียต่อกรัมของวัสดุตรึง (CFU/กรัมแห้ง) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยชุดทดลองควบคุมของการตรวจนับ *Pseudomonas* sp. J801 คือกาบมะพร้าวไม่ได้ตรึงแบคทีเรีย เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรียบนกาบมะพร้าวที่มีและไม่มีจุลินทรีย์ประจำถิ่น และเลือกปริมาณวัสดุตรึงที่ให้การยึดเกาะของแบคทีเรียสูงและสามารถผลิตแบคทีเรียตรึงได้สูงสุด สำหรับการตรึง *Pseudomonas* sp. J801 ใน 1 ครั้ง

3.1.6 ศึกษาการเกาะติดของแบคทีเรียในกาบมะพร้าวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

นำแบคทีเรียตรึงที่ผลิตได้ศึกษาการเกาะติดของแบคทีเรียในกาบมะพร้าว โดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำตัวอย่างแช่ในน้ำยากลูตาราลดีไฮด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.2 นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างน้ำยาออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง แล้วตามด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที ทำให้แห้งด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้น 30, 50, 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นละ 10-15 นาที แล้วตามด้วยความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที 3 ครั้ง จากนั้นนำไปทำแห้ง ณ จุดวิกฤตด้วยเครื่อง critical point dryer (Quorum model K850, UK) แล้วนำไปวางบนแท่นวางด้วยเทปกาวสองหน้า นำไปฉาบทอง (sputter coater, Balzers model SCD 040, Germany) แล้วส่องดูด้วยกล้อง SEM (JEOL, model JSM-6610LV, Japan)

3.2 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีน

3.2.1 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM แบบกึ่งต่อเนื่อง

ชั่งแบคทีเรียตรึงที่ผลิตได้ปริมาณ 0.05 กรัมน้ำหนักแห้ง (ที่ได้จากข้อ 3.1) ใส่หลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วัน เป็นระยะเวลา 24 วัน เปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนของแบคทีเรียตรึงกับแบคทีเรียอิสระ *Pseudomonas* sp. J801 ที่มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 10^7 CFU/มิลลิลิตร บ่มด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/ นาที เก็บตัวอย่างทุก3 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีชุดควบคุม 2 ชุด คือชุดควบคุมกาบมะพร้าว และชุดควบคุมปราศจากเชื้อ เพื่อเปรียบเทียบการกำจัดฟีแนนทรีนระหว่างแบคทีเรียอิสระและแบคทีเรียตรึง และฟีแนนทรีนที่คงเหลือในแบคทีเรียตรึงและกาบมะพร้าว

3.2.2 สกัดฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและกาบมะพร้าวด้วยเอทิลอะซิเตท

ในชุดการทดลองแบคทีเรียตรึงและชุดกาบมะพร้าว แยกส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากกาบมะพร้าวทั้งในชุดการทดลองแบคทีเรียตรึงและชุดกาบมะพร้าว สำหรับส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเอทิลอะซิเตทปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปั่นผสม 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นจากนั้นดูดของเหลวส่วนบนใส่หลอดทดลองใหม่ แล้วเติมเอทิลอะซิเตทปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองเดิม สกัดฟีแนนทรีนซ้ำอีก 1 ครั้ง สำหรับแบคทีเรียตรึงและกาบมะพร้าว นำแบคทีเรียตรึงและกาบมะพร้าวใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติมเอทิลอะซิเตทปริมาตร 5 มิลลิลิตร วางในเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่ 35 KHz เป็น

เวลา 30 นาที และปั่นผสมนาน 2 นาที ดูดของเหลวส่วนบนใส่หลอดทดลองใหม่ เติมเอทิลอะซิเตท ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองเดิมและสกัดฟีแนนทรีนซ้ำอีก 1 ครั้ง จากนั้นใส่โซเดียมซัลเฟตที่ผ่านการอบ ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปั่นผสมเพื่อให้โซเดียมซัลเฟตกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ในส่วนเอทิลอะซิเตท จากนั้นย้ายเอทิลอะซิเตทที่ผ่านการกำจัดน้ำใส่ในหลอดทดลองใหม่ ระเหยเอทิลอะซิเตทด้วยความร้อนจากน้ำ จากนั้นเติมเมทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นผสมเป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร ลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ HPLC เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์

3.2.3 วิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในอาหารเหลว แบคทีเรียตรึงและกาบมะพร้าวด้วย HPLC

วิเคราะห์ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ กาบมะพร้าวในชุดทดลองแบคทีเรียตรึงและกาบมะพร้าวด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูง (HPLC) ตามวิธีที่อธิบายไว้ในของ Klankeo และคณะ (2009) ซึ่งมีสภาวะต่างๆในระบบดังนี้

คอลัมน์ inertsill® ODS	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิลิตร ยาว 150 มิลลิลิตร
อุณหภูมิคอลัมน์	40 องศาเซลเซียส
เฟสเคลื่อนที่	เมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์
อัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่	1 มิลลิลิตร/นาที
ความยาวคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตที่ใช้ตรวจวิเคราะห์	275 นาโนเมตร
ปริมาณสารที่ฉีดวิเคราะห์	10 ไมโครลิตร

นำพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกำจัดฟีแนนทรีนและการดูดซับฟีแนนทรีน ดังสมการด้านล่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์การกำจัด PAHs} = \frac{(\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุมเริ่มต้น} - \text{พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง})}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุมเริ่มต้น}} \times 100$$

$$\text{ความเข้มข้นฟีแนนทรีนคงเหลือ} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง} \times \text{ความเข้มข้นฟีแนนทรีนเริ่มต้น}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุม}}$$

3.2.4 สกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในกาบมะพร้าวในชุดทดลองแบคทีเรียตรึงและชุดกาบมะพร้าว

สกัดดีเอ็นเอแบคทีเรียตามวิธีที่อธิบายไว้ใน Ausubel และคณะ (1999) เริ่มต้นจากนำแบคทีเรียแบคทีเรียปริมาณ 0.05 กรัม ใส่หลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 85 เปอร์เซ็นต์ นำไปวางในเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่ 35 KHz เป็นเวลา 2 นาที และปั่นผสมนาน 5 นาที ดูดของเหลว 1 มิลลิลิตรใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งสกัดและทำซ้ำอีก 4 ครั้ง กระจายตะกอนเซลล์ที่ได้ในสารละลาย Tris-EDTA (TE) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 517 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลายไลโซไซม์เข้มข้น 60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และสารละลายโปรตีนเนสเค ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 120 ไมโครลิตร และสารละลายเซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ในโซเดียมคลอไรด์ (CTAB/NaCl) (ภาคผนวก ข) ที่มีอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 220 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 550 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาประมาณ 5 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ย้ายสารละลายชั้นบนลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ แล้วเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาประมาณ 5 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิมแล้วย้ายสารละลายชั้นบนลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ เติมไอโซโพรพานอล 0.6 เท่าของปริมาตรสุดท้าย กลับหลอดไปมาให้สารละลายเข้ากันจนปรากฏสายดีเอ็นเอ สีขาว ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิมและเทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิมและเทส่วนใส ทิ้ง ระเหยเอทานอลจนแห้ง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยสารละลาย TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมอาร์เอ็นเอสเอความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.5 ตรวจประชาคมแบคทีเรียในแบคทีเรียตรึงด้วยวิธี PCR-DGGE

เพิ่มจำนวนยีน 16s rDNA ด้วยไพร์เมอร์ 341F, 520R (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์แสดงในตารางที่ 3.1) จาก cDNA ที่สังเคราะห์ได้ ด้วยวิธี PCR เกิดผลิตภัณฑ์ขนาด 179 bp องค์ประกอบ

ของสารต่าง ๆ ในตารางที่ 3.2 จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA ตามสภาวะที่เหมาะสมกับคู่ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rDNA (341F และ 520R) ดังนี้

1. initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที
2. denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที
3. annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 1 นาที
4. extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ
6. final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบของสารในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (ปริมาตรสุดท้าย 30 ไมโครลิตร)

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้ายของสาร
น้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ	24.8	-
10 เท่า บัฟเฟอร์ (thermos buffer)	3	1 เท่า
10 มิลลิโมลาร์ dNTP	0.6	0.2 มิลลิโมลาร์
20 ไมโครโมลาร์ ไพร์เมอร์	0.15 (ชนิดละ)	0.1 ไมโครโมลาร์ (ชนิดละ)
DNA แม่แบบ	1	100 นาโนกรัม
เอนไซม์ taq DNA polymerase	0.3	2.5 หน่วย

ตรวจประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี DGGE (Muangchinda และคณะ, 2013) โดยใช้ชุด DCode™ System เริ่มจากเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ที่มีความเข้มข้นของ denaturant ได้แก่ ยูเรียและฟอร์มาไมด์ เป็นเกรเดียนท์เท่ากับ 50-80 เปอร์เซ็นต์ (องค์ประกอบของสารที่ใช้ในการเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลปริมาตร 32 มิลลิลิตร แสดงในตารางที่ 3.3) ทำพอลิอะคริ ลาไมด์เจลในชุดแซนวิชเตรียมเจล เสียบหวีลงไประหว่างกระจกแซนวิชระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ทิ้งให้พอลิอะคริลาไมด์เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาข้ามคืน (หรืออย่างน้อย 2 ชั่วโมง) วางชุดเจลแซนวิชที่ได้ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ 1XTAE ปริมาตร 7 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หยอดผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ที่ผสมกับสีติดตามปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลง ในช่องวิ่ง ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ 130 โวลต์ เป็นเวลา 270 นาที แล้วนำพอลิอะคริลาไมด์เจลมาย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 20 นาที ตรวจดู และถ่ายภาพแถบ DNA ด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาว คลื่น 312 นาโนเมตร

ตารางที่ 3.4 องค์ประกอบของพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี denaturant 50%-80%

สาร	ปริมาตรของสาร (มิลลิลิตร)		ความเข้มข้นสุดท้าย
	denaturant 30%	denaturant 80%	
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	8.25	3.5	-
40% อะคริลาไมด์ : บิส (37:1)	3.25	3.0	8%
50 เท่า TAE*	0.3	0.3	1 เท่า
7 โมลาร์ ยูเรีย*	1.9	4.9	แปรผัน
40% ฟอร์มาไมด์*	1.8	4.8	แปรผัน
กลีเซอรอล	0.3	0.3	2%
10% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS)*	81 ไมโครลิตร	81 ไมโครลิตร	0.5 กรัม/ลิตร
เตตระเมทิลีนไดอะมีน (TEMED)	5 ไมโครลิตร	5 ไมโครลิตร	-

*วิธีเตรียมสารตามที่ระบุไว้ในภาคผนวก ข

3.3 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนในดิน

3.3.1 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดิน

ส่งวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดินที่ห้องปฏิบัติการอัยย์แลป เลขที่ 94/1 ม.8 ต.ตระคร้ำเอน อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี โดยวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ได้แก่ ลักษณะเนื้อดิน และสมบัติทางเคมี ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) สารอินทรีย์ (organic matter; OM) อินทรีย์คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส

3.3.2 ตรวจนำแบคทีเรียประจำถิ่นในดินที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน

นำดิน 1 กรัม ใส่หลอดทดลองพลาสติกฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 9 มิลลิลิตร นำไปวางในเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่ 35 KHz เป็นเวลา 3 นาที และปั่นผสม 5 นาที ดูดตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ อย่างเป็นลำดับ แล้วเกลี่ยสารแขวนลอยเซลล์ที่เจือจางแล้ว 100 ไมโครลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งปราศจากแหล่งคาร์บอน (carbon-free mineral medium; CFMM) (ภาคผนวก ก) ที่ผสมฟีแนนทรีนให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 150 มิลลิกรัม/ลิตร และเติมสารกันรา (ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก)) เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน บ่มในที่มืดเป็นระยะเวลา 3-4 วัน นับ *Pseudomonas* sp. J801 ที่เกาะติดบนวัสดุตรึงที่

ปราศจากจุลินทรีย์ประจำถิ่น และเทียบเคียงกับการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ยังมีจุลินทรีย์ประจำถิ่น และคำนวณจำนวนแบคทีเรียต่อกรัมของวัสดุตรึง (CFU/กรัมแห้ง) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.3 สร้างระบบนิเวศจำลองดิน (microcosm)

ชั่งตัวอย่างดิน 20 กรัม ใส่ขวดแก้วฝาเกลียว จำนวน 15 ขวด แบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดละ 3 ซ้ำ ดังตารางที่ 3.4 นึ่งฆ่าเชื้อดินในชุดการทดลอง 1 ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 30 นาที จำนวน 1 ครั้ง/วัน เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเติมฟีแนนทรีนที่ละลายในอะซิโตนความเข้มข้นสุดท้าย 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของดินแห้ง ตั้งทิ้งไว้ให้อะซิโตนระเหยเป็นเวลา 1 วัน ปรับปริมาณสารอาหารให้มี อัตราส่วนคาร์บอน:ไนโตรเจน:ฟอสฟอรัสเท่ากับ 100:10:1 โดยเติมปุ๋ยยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนและเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัส และปรับค่าความชื้นในดินด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ กวนผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน ชั่งน้ำหนักเริ่มต้นของทุกขวดการทดลองไว้ บ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 28 วัน รักษาความชื้นของแต่ละขวดทดลองทุก 7 วัน โดย การปรับจากน้ำหนักที่หายไปเมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้นด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 14 และ 28 มาวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนที่ลดลงด้วย HPLC

ตารางที่ 3.5 ระบบนิเวศจำลองดินสำหรับการบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนด้วยแบคทีเรียตรึง

ชุดทดลอง	ดิน	วัสดุตรึง	แบคทีเรียตรึง J801
ชุดควบคุม ปราศจากเชื้อ	ไม่มีแบคทีเรียประจำถิ่น	-	-
ชุดกาบมะพร้าว	มีแบคทีเรียประจำถิ่น	มีแบคทีเรียประจำถิ่น (5 เปอร์เซ็นต์)	-
ชุดแบคทีเรียตรึง 1	มีแบคทีเรียประจำถิ่น	มีแบคทีเรียประจำถิ่น	1 เปอร์เซ็นต์
ชุดแบคทีเรียตรึง 2	มีแบคทีเรียประจำถิ่น	มีแบคทีเรียประจำถิ่น	5 เปอร์เซ็นต์
ชุดแบคทีเรียตรึง 3	มีแบคทีเรียประจำถิ่น	มีแบคทีเรียประจำถิ่น	10 เปอร์เซ็นต์

3.3.4 สกัดฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในดิน

สกัดฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในดินดัดแปลงจากวิธีที่อธิบายไว้ใน Guo และคณะ (2016) เริ่มจากย้ายดินจากขวดแก้วฝาเกลียวใส่ในกระบอกเซนตริฟิวจ์ เติมน้ำกลั่น อะซิโตนและไดคลอโรมีเทนในสัดส่วน 1:1:2 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 5 นาที วางในเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่ 35 KHz เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 10 นาที ย้ายส่วนที่

เป็นของเหลวใสในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ดูดส่วนที่เป็นอะซิโตนและไดคลอโรมีเทนซึ่งอยู่ชั้นล่างใส่ขวดรูปชมพู่ใบใหม่ เทน้ำใสในกระบอกเซนตริฟิวจ์เดิม สกัดฟีแนนทรีนซ้ำอีก 1 ครั้ง จากนั้นใส่โซเดียมซัลเฟตที่ผ่านการอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปั่นผสมเพื่อให้โซเดียมซัลเฟตกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ในส่วนอะซิโตนและไดคลอโรมีเทน จากนั้นย้ายอะซิโตนและไดคลอโรมีเทนที่ผ่านการกำจัดน้ำใส่ในขวดรูปชมพู่ใบใหม่ ระเหยอะซิโตนและไดคลอโรมีเทนด้วยความร้อนจากน้ำ จากนั้นเติมเมทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร วางในเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่ 35 KHz เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายที่ได้ 1 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร ลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ HPLC เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4 พัฒนาวิธีการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีแนนทรีนหลังการเก็บหลังแบคทีเรียตรึง

3.4.1 คัดเลือกสารป้องกัน *Pseudomonas* sp. J801

เลี้ยง *Pseudomonas* sp. J801 ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.25X LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มด้วยเครื่องเขย่า 24 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 8000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 (ภาคผนวก ข) 2 ครั้ง แขวนลอยเซลล์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปรับหัวเชื้อแบคทีเรียให้มีค่า OD_{620}= 1 จากนั้นเติมซูโครสและไกลซีนบีเทน (ภาคผนวก ข) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 เปอร์เซ็นต์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารใดๆ

3.4.2 แปรผันความเข้มข้นของสารป้องกันแบคทีเรียที่เลือก

เลี้ยงแบคทีเรียตามข้อ 3.3.1 จากนั้นแปรผันความเข้มข้นของสารป้องกันแบคทีเรียที่เลือกให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1, 2, 3.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบการคงอยู่ของแบคทีเรียตามข้อดังกล่าว

3.4.3 แปรผันความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

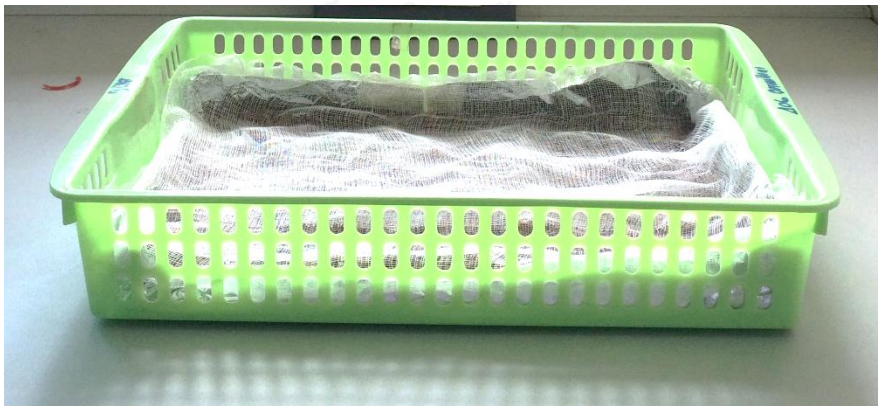
เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.25X LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.3 0.5 และ 0.7 โมลาร์ (ภาคผนวก ก) บ่ม *Pseudomonas* sp. J801 ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 8000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 (ภาคผนวก ข) 2 ครั้ง แขวนลอยเซลล์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และปรับให้หัวเชื้อแบคทีเรียมีค่า OD_{600} = 1 และเติมสารป้องกันแบคทีเรียตามที่เลือกในข้อ 3.3.2 ตรวจสอบการคงอยู่ของ *Pseudomonas* sp. J801 เพื่อเลือกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ส่งผลให้แบคทีเรียอยู่รอดได้นาน

3.4.4 ตรวจสอบการคงอยู่ของ *Pseudomonas* sp. J801 แบบเซลล์อิสระเมื่อใช้กระบวนการทำให้แห้งแบบผึ่งลม

ตรวจสอบการคงอยู่ของแบคทีเรียตามวิธีที่อธิบายไว้ใน Schisler และคณะ (2016) ดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม ผึ่งลมให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง เก็บไมโครเพลทที่แห้งแล้วที่อุณหภูมิห้องและมืดเป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 3 และ 7 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ลงในไมโครเพลทหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วเจือจางแบคทีเรียอย่างเป็นลำดับ บ่มด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นใช้วิธี drop plate สารแขวนลอยเซลล์ที่เจือจางแล้วบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (ภาคผนวก ก) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อเลือกสารป้องกันแบคทีเรียที่ทำให้แบคทีเรียอยู่รอดได้นาน

3.4.5 ทำแห้งและเก็บรักษาแบคทีเรียตรึง

นำสารแขวนลอยแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.4.3 ตรึงบนกาบมะพร้าวดังสภาวะในข้อ 3.1 จากนั้นทำแบคทีเรียตรึงให้แห้ง เริ่มจากนำตะกร้าพลาสติกรองก้นด้วยแผ่นฟอยล์อะลูมิเนียม จากนั้นวางแบคทีเรียตรึงที่ยังเปียกลงบนแผ่นฟอยล์อะลูมิเนียม เกลี่ยให้กระจาย ปิดทับด้วยผ้าก๊อซ นำตะกร้าไปผึ่งลมในที่ร่มจนแบคทีเรียตรึงแห้งเป็นเวลา 3 วัน (มีค่าความชื้นน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักน้ำ/น้ำหนักกาบมะพร้าว)) ย้ายแบคทีเรียตรึงใส่ขวดแก้วฝาเกลียวและเก็บรักษาไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 28 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 7, 14 และ 21



รูปที่ 3.2 การทำแบคทีเรียตรึงให้แห้งด้วยการผึ่งลม

3.4.6 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM

ชั่งแบคทีเรียตรึง 0.05 กรัมน้ำหนักแห้ง (ที่ได้จากข้อ 3.4.1) ใส่หลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมฟีแนนทรีนให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร บ่ม

ด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และชุดควบคุมไม่เติมเชื้อใดๆ เปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนกับแบคทีเรียตรึงที่ไม่ได้พัฒนาวิธีการเตรียมหัวเชื้อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การตรึง *Pseudomonas* sp. J801 ในกาบมะพร้าว

4.1.1 ปริมาณกาบมะพร้าวที่ใช้ในการตรึงแบคทีเรีย

การบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนด้วยวิธี bioaugmentation โดยการเติมแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพลงไปในดินเพื่อช่วยเร่งการย่อยสลายฟีแนนทรีนในดิน แต่เนื่องจากในดินมีความผันผวนของอุณหภูมิ pH และแบคทีเรียจะต้องแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นในดิน ซึ่งทำให้แบคทีเรียที่เติมลงไปอาจตายได้ จึงทำให้มีแนวคิดการใช้แบคทีเรียตรึงเพื่อช่วยให้แบคทีเรียที่เติมลงไปมีชีวิตที่นานขึ้นและสามารถบำบัดฟีแนนทรีนออกจากดินได้ โดยในงานวิจัยนี้สนใจการตรึงแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนได้แก่ *Pseudomonas* sp. J801 บนวัสดุตรึงชนิดกาบมะพร้าว ทั้งนี้กาบมะพร้าวเป็นวัสดุหรือใช้ทางการเกษตรและมักใช้เป็นส่วนผสมในการเตรียมดินสำหรับเพาะปลูกพืช การตรึงแบคทีเรียบนกาบมะพร้าวหรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดอื่น ๆ มักใช้วิธีการดูดซับหรือการเกาะติดของแบคทีเรียเนื่องจากเป็นวิธีที่อาศัยความสามารถในการดูดซับของวัสดุตรึงเพื่อทำให้แบคทีเรียสามารถเกาะติดได้ และยังเป็นวิธีการที่ง่าย มีขั้นตอนการเตรียมการไม่ยาก (Basak และคณะ, 2014; Yu และคณะ, 2007) และเนื่องจากในขั้นตอนการตรึงแบคทีเรียใช้วิธีการดูดซับ ดังนั้นเมื่อถึงจุดสูดสุดของการดูดซับของวัสดุตรึง จะมีแบคทีเรียบางส่วนที่ไม่สามารถเกาะติดบนวัสดุตรึงได้ (Basak และคณะ 2014; Lin และคณะ, 2015; Yu และคณะ 2007) ดังนั้นการทดสอบปริมาณวัสดุตรึงที่เหมาะสมจะช่วยลดการสูญเสียแบคทีเรียที่ไม่สามารถเกาะติดได้ และยังได้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียตรึงเพิ่มขึ้น ในงานวิจัยนี้แปรผันปริมาณกาบมะพร้าวตั้งแต่ 2-10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารแขวนลอยแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นแบคทีเรีย 10^9 CFU/มิลลิลิตร บ่มด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจนับปริมาณโคโลนีของ *Pseudomonas* sp. J801 ที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ในช่วงระยะเวลา 3 – 4 วัน การนับจำนวนโคโลนีของ *Pseudomonas* sp. J801 ที่เกาะติดบนกาบมะพร้าวจะนับเฉพาะโคโลนีที่มีลักษณะและระยะเวลาในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เติมฟีแนนทรีนลักษณะเดียวกับโคโลนีของ *Pseudomonas* sp. J801 สายพันธุ์บริสุทธิ์ และไม่เหมือนกับโคโลนีจุลินทรีย์ประจำถิ่นบนกาบมะพร้าว จากการทดลองพบว่า แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เติมฟีแนนทรีนภายในระยะเวลา 3 วัน มีลักษณะโคโลนีแบบเดียวกันกับ *Pseudomonas* sp. J801 ในขณะที่แบคทีเรียประจำถิ่นในกาบมะพร้าวใช้ระยะเวลามากกว่า 7 วัน ในการเจริญบนอาหารเลี้ย

เชื้อแข็ง CFMM ที่เติมฟีแนนทรีน ซึ่งเมื่อนับจำนวนและคำนวณปริมาณแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงขึ้นแล้ว พบว่า มีแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดบนกาบมะพร้าวได้มากกว่า 10^8 CFU/กรัมวัสดุตรึงแห้ง ในวัสดุตรึงปริมาณต่างๆ ที่ทดสอบ (ตารางที่ 4.1) และสามารถเกาะติดได้สูงถึง 1.00×10^9 CFU/กรัมวัสดุตรึงแห้ง ในปริมาณวัสดุตรึง 8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในขณะที่ปริมาณวัสดุตรึง 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) มีปริมาณแบคทีเรียที่พบน้อยลง เนื่องจากในขณะการตรึงมีกาบมะพร้าวบางส่วนที่ไม่สัมผัสกับสารแขวนลอยแบคทีเรีย และแบคทีเรียประจำถิ่นในกาบมะพร้าวใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เติมฟีแนนทรีนมากกว่า 7 วัน และมีจำนวนแบคทีเรีย 3.97×10^8 CFU/กรัมกาบมะพร้าวแห้ง ในวันที่ 10 วัน ในขณะที่กาบมะพร้าวที่ปลอดแบคทีเรียประจำถิ่นมี *Pseudomonas* sp. J801 เป็นจำนวน 3.00×10^9 CFU/กรัมกาบมะพร้าวแห้ง ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงการลดค่าใช้จ่ายในการผลิตและความคุ้มค่าในการผลิตแบคทีเรียตรึงปริมาณกาบมะพร้าว 8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) จึงเป็นปริมาณวัสดุตรึงที่เหมาะสมและจะใช้ปริมาณกาบมะพร้าว 8 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.1 ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/กรัมแห้งวัสดุตรึง) ที่สามารถเกาะติดบนกาบมะพร้าวเมื่อแปรผันปริมาณกาบมะพร้าวโดยใช้ระยะเวลาตรึง 24 ชั่วโมง

ปริมาณกาบมะพร้าว (เปอร์เซ็นต์) (น้ำหนัก/ปริมาตร)	**แบคทีเรีย (CFU/กรัมกาบมะพร้าวแห้ง)**
2	$8.53\times10^8 \pm 2.70$
4	$6.42\times10^8 \pm 0.52$
6	$9.27\times10^8 \pm 0.42$
8	$1.00\times10^9 \pm 0.02$
10	$3.05\times10^8 \pm 0.70$

4.1.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงแบคทีเรียบนกาบมะพร้าว

เนื่องจากการตรึง *Pseudomonas* sp. J801 บนกาบมะพร้าวใช้วิธีการดูดซับของวัสดุตรึงและการเกาะติดเองของแบคทีเรีย ประกอบกับกาบมะพร้าวมีลักษณะเป็นรูพรุนและซอกหลืบที่ซับซ้อน (รูป 1A และ 1B) อาจทำให้แบคทีเรียต้องใช้เวลาเพื่อที่จะสามารถถูกดูดซับเข้าไปในซอกหลืบ และการหาระยะเวลาตรึงที่สั้นที่ให้ปริมาณการเกาะติดของแบคทีเรียสูงจะด้วยลดต้นทุนในการผลิตแบคทีเรียตรึงได้ด้วย (Basak และคณะ 2014) ในงานวิจัยนี้ทดสอบระยะเวลาในการตรึงแบคทีเรียเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า *Pseudomonas* sp. J801 สามารถเกาะติดบนกาบมะพร้าวได้

ถึง 7.40×10^{8} CFU/กรัมวัสดุตรึง ภายในระยะเวลา 3 ชั่วโมงแรก (ตารางที่ 4.2) และมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 12 คือ 1.59×10^{9} CFU/กรัมวัสดุตรึงแห้ง หลังจากนั้นมีปริมาณแบคทีเรียลดลงจนเหลือ 3.60×10^{8} CFU/กรัมวัสดุตรึงแห้ง ในชั่วโมงที่ 72 โดยจำนวนแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดได้มีความคล้ายคลึงกันงานวิจัยของ Basak และคณะ (2014) และ Santos และคณะ (2008) ซึ่งพบว่า แบคทีเรียจะถูกดูดซับโดยวัสดุตรึงเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาตรึงนานขึ้น และเมื่อถึงจุดอิ่มตัวของการดูดซับปริมาณแบคทีเรียจะคงที่และลดลง

แม้ว่าแบคทีเรียจะสามารถเกาะติดกาบมะพร้าวได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 ของการตรึงแบคทีเรีย แต่การเพิ่มระยะเวลาในการตรึง อาจทำให้แบคทีเรียผลิตสารเมือกบางอย่างที่ทำให้แบคทีเรียสามารถเกาะกันได้แข็งแรงขึ้น (Santos และคณะ, 2008) ดังนั้นแล้วระยะเวลาในการตรึงแบคทีเรีย 12 ชั่วโมง จึงเป็นระยะที่เหมาะสมและนำไปใช้ในเพื่อการตรึง *Pseudomonas* sp. J801 บนกาบมะพร้าว

ตารางที่ 4.2 ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/กรัมแห้งวัสดุตรึง) ที่สามารถเกาะติดบนกาบมะพร้าวเมื่อแปรผันระยะเวลาตรึงโดยใช้ปริมาณกาบมะพร้าว 8 เปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาในการตรึง (ชั่วโมง)	แบคทีเรีย (CFU/กรัมกาบมะพร้าวแห้ง)
0	0
3	$7.40\times10^{8} \pm 0.54$
6	$7.13\times10^{8} \pm 0.56$
9	$8.73\times10^{8} \pm 0.66$
12	$1.59\times10^{9} \pm 0.90$
24	$1.00\times10^{9} \pm 0.18$
48	$6.83\times10^{8} \pm 0.73$
72	$3.60\times10^{8} \pm 0.16$

จากการทดลองข้างต้น การตรึง *Pseudomonas* sp. J801 บนกาบมะพร้าว สามารถใช้ปริมาณวัสดุตรึงได้สูงสุดถึง 8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) และใช้ระยะเวลาในการตรึงเพียง 12 ชั่วโมง ซึ่งทำให้มีแบคทีเรียเกาะติดบนกาบมะพร้าวได้สูงถึง 1.59×10^{9} CFU/กรัมกาบมะพร้าวแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดอื่น ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดอื่น ๆ เช่น Yu และคณะ (2007) ตรึง *Saccharomyces cerevisiae* บนซังข้าวฟ่างที่

บดละเอียด โดยใช้ระยะเวลาในการตรึง 48 ชั่วโมง ได้แบคทีเรียตรึงที่มี *S. Cerevisiae* เกาะติด 0.6±0.2 กรัมแห้งเซลล์/กรัมซังข้าวฟ่าง

Basak และคณะ (2014) ตรึง *Candida tropicalis* PHB5 ในชานอ้อย โดยใช้ชานอ้อยปริมาณ 50 กรัม บ่มเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ได้แบคทีเรียตรึงที่มี *C. tropicalis* PHB5 เกาะติดประมาณ 10^5 CFU/กรัมชานอ้อย แบคทีเรียตรึงที่ได้สามารถย่อยสลายฟีนอลความเข้มข้น 2400 มิลลิกรัม/ลิตรได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 50 ชั่วโมง

Nunal และคณะ (2014) ตรึงกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนบนแกลบและขุยมะพร้าวบดระเอียด โดยใช้ระยะเวลาในการตรึง 24 ชั่วโมง มีกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดบนวัสดุตรึงได้ถึง 10^9 CFU/กรัมวัสดุตรึง แบคทีเรียตรึงที่ในขุยมะพร้าวสามารถย่อยสลายน้ำมันชนิดหนัก (heavy oil) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 86.6 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 60 วัน

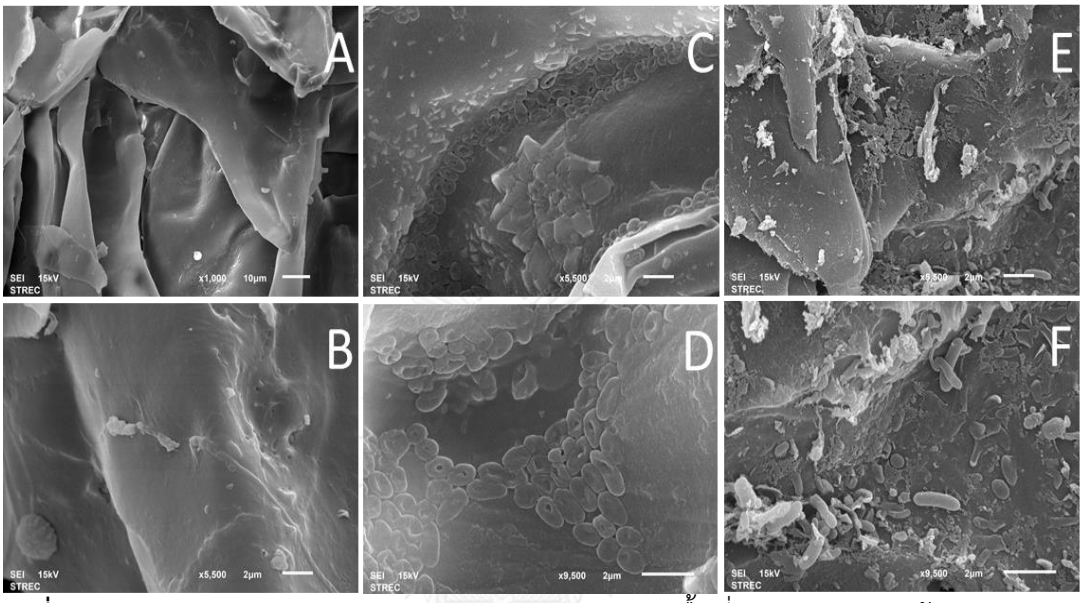
Cubitto และ Gentili (2015) ตรึง *Rhodococcus* sp. QBTo บนเปลือกเมล็ดทานตะวัน โดยใช้ปริมาณเปลือกเมล็ดทานตะวัน 100 กรัม ตรึงในถังหมักที่มีอาหารเลี้ยง 3 ลิตร บ่มเป็นเวลา 5 วัน ได้แบคทีเรียตรึงที่มี *R.* QBTo เกาะติดประมาณ 10^8 CFU/กรัมเปลือกเมล็ดทานตะวัน แบคทีเรียตรึงที่ได้สามารถกำจัดน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนในดินความเข้มข้น 25 กรัมน้ำมันดิบ/กิโลกรัมดินแห้งได้ 66 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 210 วัน

Chen และคณะ (2016) ตรึง *Acinetobacter venetianus* บนถ่านไม้ไผ่ โดยใช้ปริมาณถ่านไม้ไผ่ 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ระยะเวลาในการตรึง 24 ชั่วโมง และแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายน้ำดีเซลความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 90 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 90 ชั่วโมง และสามารถใช้ซ้ำได้มากกว่า 10 ครั้ง

4.1.3 การศึกษาการเกาะติดของแบคทีเรียในกาบมะพร้าวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

พื้นผิวของกาบมะพร้าวก่อนการตรึง (รูป1A และ 1B) มีลักษณะเป็นซอกหลืบที่ซับซ้อน ที่บริเวณพื้นผิวไม่ค่อยมีจุลินทรีย์ประจำถิ่น จึงทำให้มีพื้นที่ผิวมาก และเมื่อตรึง *Pseudomonas* sp. J801 พบว่า แบคทีเรียสามารถเกาะติดบนและในกาบมะพร้าวได้ ดังในรูป 4.1C และ รูป 4.1 D *Pseudomonas* sp. J801 สามารถเกาะติดบนพื้นผิว ในรูพรุนและซอกหลืบของกาบมะพร้าวโดยวิธีการเกาะติดหรือการดูดซับ (attachment or adsorption) และวิธีกักเก็บ (entrapment) เนื่องจากพันธะโควาเลนท์และการดึงดูดกันด้วยแรงทางไฟฟ้าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Basak และคณะ (2014) ที่ศึกษาการเกาะติดของยีสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบการเกาะติดของยีสต์บนชานอ้อย โดยยีสต์สามารถเกาะติดได้บนพื้นผิวและสามารถเกาะติดในรูพรุนของ

ชานอ้อยได้ด้วยโดยอาศัยยึดติดด้วยพันธะโควาเลนท์ และในงานวิจัยของ Yu และคณะ (2007) พบว่าในตรึง จุลินทรีย์จะสามารถเกาะติดกับวัสดุตรึงโดยอาศัย 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกคือการยึดเกาะระหว่างจุลินทรีย์และผิวหน้าของวัสดุตรึง และอีกขั้นตอนคือการเกาะติดเองด้วยจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะสร้างสารเมือกบางอย่างออกมา ทำให้จุลินทรีย์มีการยึดเกาะกันแข็งแรงมากยิ่งขึ้น



รูปที่ 4.1 รูปจาก SEM (A (1,000x) และ B (5,500x)) แสดงพื้นที่ผิวของกาบมะพร้าว (C (5,500x) และ D (9,500x)) แสดงการเกาะติดของ *Pseudomonas* sp. J801 บนกาบมะพร้าว และ (E (5,500x) และ F (9,500x)) แสดงพื้นที่ผิวของกาบมะพร้าวในชุดแบคทีเรียตรึงหลังการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่อง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

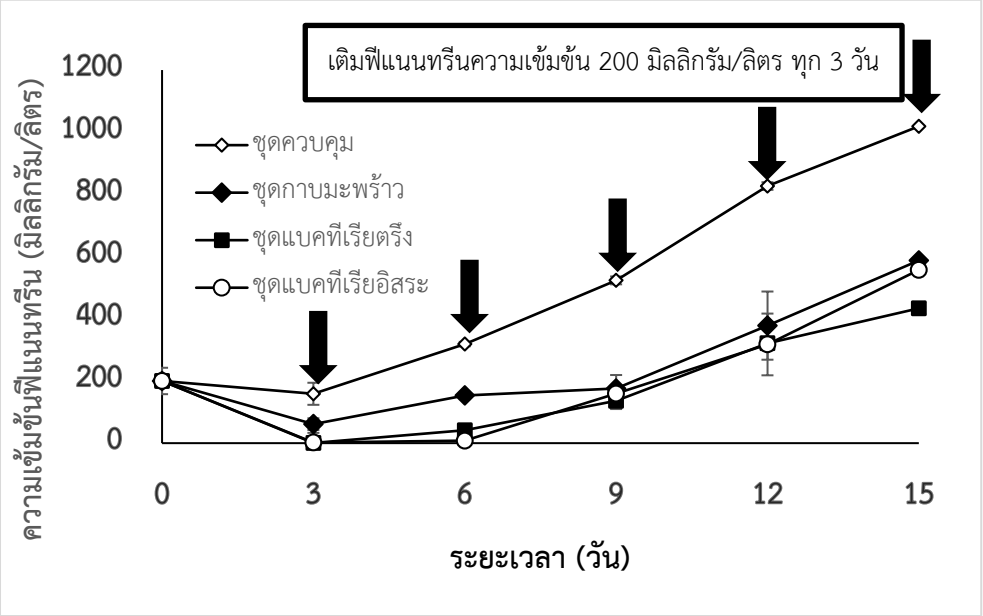
4.2 ประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนของแบคทีเรียตรึง

4.2.1 การกำจัดฟีแนนทรีนของแบคทีเรียตรึงและแบคทีเรียอิสระในการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่อง

หลังจากได้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียตรึงในการทดลองก่อนหน้านี้แล้ว จึงนำแบคทีเรียตรึงทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนแบบกึ่งต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยเติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วัน เป็นระยะเวลา 24 วัน เปรียบเทียบกับแบคทีเรียอิสระและทดสอบสมบัติการป้องกันแบคทีเรียจากความเป็นพิษของฟีแนนทรีนของกาบมะพร้าว โดยในการทดลองนี้มี *Pseudomonas* sp. J801 ความเข้มข้นประมาณ 10^7 CFU/การทดลอง ทั้งในชุดการทดลองแบคทีเรียตรึงและแบคทีเรียอิสระ จากการทดลองพบว่า แบคทีเรียอิสระและแบคทีเรียตรึงมีประสิทธิภาพในการกำจัดฟีแนนทรีนที่ใกล้เคียงกันในช่วงแรกของการทดลอง โดยในวันที่ 3 และวันที่

6 ทั้งชุดการทดลองแบคทีเรียตรึงและแบคทีเรียอิสระมีความเข้มข้นฟีแนนทรีนคงเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM น้อยมาก แต่ในวันที่ 9 ของการทดลองเป็นต้นไปทั้ง 2 ชุดทดลอง มีความเข้มข้นฟีแนนทรีนคงเหลือเพิ่มขึ้นดังในรูปที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนลดลงจึงทำให้ความเข้มข้นฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียในชุดแบคทีเรียอิสระที่มีปริมาณลดลง โดยพบว่า *Pseudomonas* sp. J801 ในชุดทดลองแบคทีเรียอิสระมีปริมาณลดลงตั้งแต่วันที่ 9 จนกระทั่งในวันที่ 15 ของการทดลองไม่ตรวจพบ *Pseudomonas* sp. J801 ในชุดทดลองอยู่เลย ดังตารางที่ 4.3 เนื่องจากความเป็นพิษของฟีแนนทรีนที่เหลือเพิ่มขึ้น และอาจเป็นเพราะแบคทีเรียสัมผัสสารมลพิษโดยตรงในระยะเวลานานจึงทำให้ปริมาณแบคทีเรียลดลง (Liao และคณะ, 2015) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียอิสระไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการกำจัดฟีแนนทรีนที่ต้องสัมผัสกับฟีแนนทรีนเป็นระยะเวลานาน

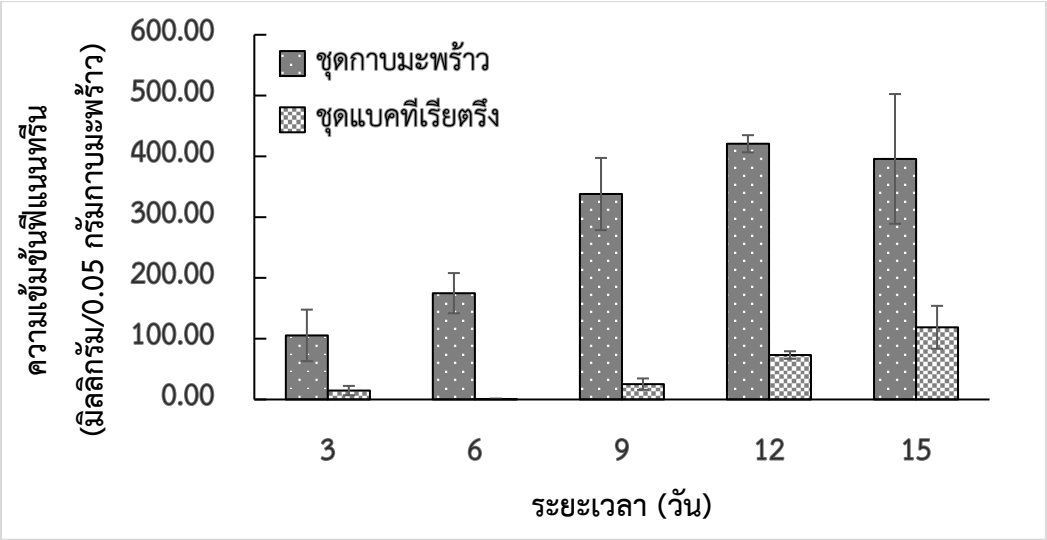
เนื่องจากกาบมะพร้าวมีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลสและลิกนินที่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการดูดซับ PAHs (Owabor และ Agarry, 2014) การกำจัดฟีแนนทรีนที่เกิดขึ้นจึงอาจเป็นผลการดูดซับของกาบมะพร้าว และการใช้กาบมะพร้าวที่ยังมีจุลินทรีย์ประจำถิ่นซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่น 3.97×10^{8} ±0.3 CFU/กรัม ที่สามารถโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่ผสมฟีแนนทรีน อาจมีส่วนร่วมในการย่อยสลายฟีแนนทรีนด้วย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องสกัดฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในกาบมะพร้าวในชุดกาบมะพร้าวและชุดแบคทีเรียตรึง ดังในรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าในชุดแบคทีเรียตรึงมีความเข้มข้นฟีแนนทรีนคงเหลืออยู่น้อย ในขณะที่ในชุดกาบมะพร้าวมีความเข้มข้นของฟีแนนทรีนคงเหลืออยู่มาก เนื่องมาจาก *Pseudomonas* sp. J801 ที่เกาะติดอยู่ในแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ และนอกจากนี้เมื่อรวมกับความเข้มข้นของฟีแนนทรีนในกาบมะพร้าวและในอาหารเลี้ยงเชื้อของชุดกาบมะพร้าว พบว่าความเข้มข้นที่เหลือมีปริมาณใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อใดๆ แสดงให้เป็นว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่นในกาบมะพร้าวไม่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีนและการหายไปของฟีแนนทรีนในกาบมะพร้าวน่าจะเป็นเป็นผลมาจากการย่อยสลายของ *Pseudomonas* sp. J801 ภายในแบคทีเรียตรึง



รูปที่ 4.2 ความเข้มข้นฟีแนนทรีนที่เหลือในการทดสอบการกำจัดฟีแนนทรีนแบบกึ่งต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยเติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วัน

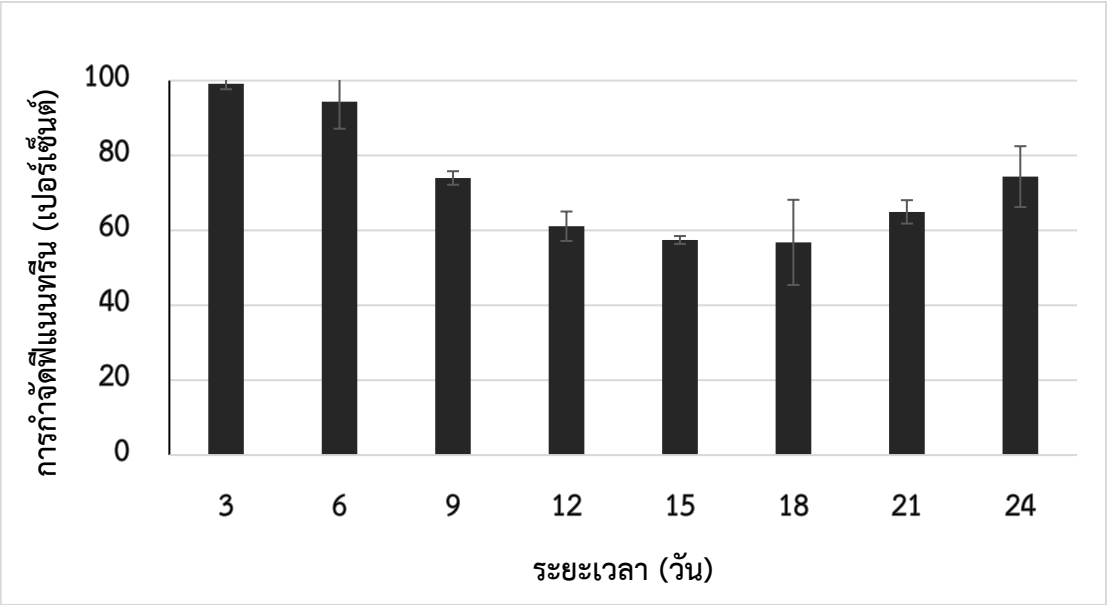
ตารางที่ 4.3 ปริมาณ *Pseudomonas* sp. J801 (CFU/มิลลิลิตร) ในการทดสอบการกำจัดฟีแนนทรีนแบบกึ่งต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยเติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วัน ในชุดทดลองแบคทีเรียอิสระ

วันที่ในการทดสอบการกำจัดฟีแนนทรีนแบบกึ่งต่อเนื่อง	***Pseudomonas* sp. J801 (CFU/มิลลิลิตร)**
0	$2.17\times10^{7} \pm 5.77$
3	$3.71\times10^{7} \pm 7.03$
6	$1.74\times10^{7} \pm 5.10$
9	$1.72\times10^{7} \pm 4.76$
12	$1.60\times10^{6} \pm 5.52$
15	0

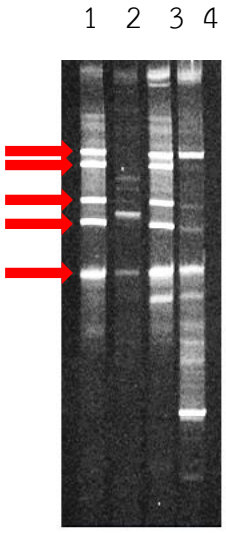


รูปที่ 4.3 ความเข้มข้นฟีแนนทรีนที่ถูกกากบมะพร้าวในชุดทดลองกากบมะพร้าวและแบคทีเรียตรึงดูดซับ ในการทดสอบการกำจัดฟีแนนทรีนแบบกึ่งต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยเติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วัน

ในวันที่ 15 ของการทดสอบการย่อยสลายฟีแนนทรีนแบบกึ่งต่อเนื่อง (รูปที่ 4.3) ความเข้มข้นของฟีแนนทรีนในกากบมะพร้าวในชุดแบคทีเรียตรึงมีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นอาจจะเป็นเพราะ *Pseudomonas* sp. J801 ที่เคยเกาะติดในมะพร้าวมีบางส่วนที่หลุดออกไป เนื่องจากมีการใช้เป็นระยะเวลานานซึ่งสอดคล้องกับ Basak และคณะ (2014) และเมื่อทดสอบการกำจัดฟีแนนทรีนแบบกึ่งต่อเนื่องของแบคทีเรียตรึงโดยเติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 ทุก 3 วัน จนครบ 24 วัน พบว่าแบคทีเรียตรึงยังคงมีประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนกว่า 78 เปอร์เซ็นต์ รูปที่ 4.4 และเมื่อตรวจสอบการคงอยู่ของ *Pseudomonas* sp. J801 ในกากบมะพร้าวในชุดแบคทีเรียตรึงโดยวิธี PCR-DGGE (รูปที่ 4.5) พบว่ารูปแบบดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. J801 ยังคงตรวจพบในกากบมะพร้าวในชุดแบคทีเรียตรึงจากหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 24 วัน และแม้ว่ายังมีการคงอยู่ของ *Pseudomonas* sp. J801 ในวันที่ 24 แต่เมื่อนำแบคทีเรียตรึงไปตรวจสอบพื้นผิวโดย SEM พบว่า ที่ผิวหน้าของแบคทีเรียตรึงมีการเปลี่ยนไปมาก มีการหลุดออกของ *Pseudomonas* sp. J801 จากการแบคทีเรียตรึง (รูป 4.1E และ 4.1F) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Basak และคณะ (2014)



รูปที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การกำจัดฟีแนนทรีนในการการทดสอบการกำจัดฟีแนนทรีนแบบกึ่งต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยเติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วัน เป็นเวลา 24 วัน ของแบคทีเรียตรึง



รูปที่ 4.5 แผนภาพ PCR-DGGE ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย

ช่องวิ่งที่ 1	ยีน 16S rRNA ของ *Pseudomonas* sp. J801 (ลูกศรสีแดง)
ช่วงวิ่งที่ 2	แบคทีเรียประจำถิ่นในกาบมะพร้าว
ช่วงวิ่งที่ 3	แบคทีเรียในแบคทีเรียตรึงก่อนทดสอบการกำจัดฟีแนนทรีนแบบกึ่งต่อเนื่อง
ช่วงวิ่งที่ 4	แบคทีเรียในแบคทีเรียตรึงหลังทดสอบการกำจัดฟีแนนทรีนแบบกึ่งต่อเนื่องเป็นเวลา 24 วัน

4.2.2 การบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนด้วยแบคทีเรียตรึง

เนื่องจากฟีแนนทรีนเป็นสารมลพิษอินทรีย์ตกค้างยาวนาน ซึ่งสามารถตกค้างอยู่ในดินได้นานด้วย ประกอบกับความเป็นพิษของฟีแนนทรีนที่สามารถส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตในดินได้ ดังนั้นดินที่ได้รับการปนเปื้อนฟีแนนทรีนทรีนจึงควรได้รับการบำบัดอย่างเร่งด่วน ในการทดลองนี้ใช้ดินตัวอย่างที่มีองค์ประกอบในดินดังตารางที่ 4.4 ซึ่งดินที่ใช้เป็นดินร่วนเหนียวปนทราย มีไนโตรเจนน้อย จึงปรับปริมาณสารอาหารในดินให้มีคาร์บอน:ไนโตรเจน:ฟอสฟอรัส เป็น 100:10:1 โดยใช้ปุ๋ยยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน และใส่ฟีแนนทรีนลงไปในดินให้มีความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/กรัมดินแห้ง แล้วปรับค่าความชื้นในดินเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/น้ำหนัก) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนในดินระหว่างดินที่ใส่กาบมะพร้าวเพื่อเพิ่มการถ่ายเทอากาศภายในดินกับแบคทีเรียตรึงที่มีแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. J801 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีน

ตารางที่ 4.4 ลักษณะและธาตุอาหารในดินตัวอย่าง

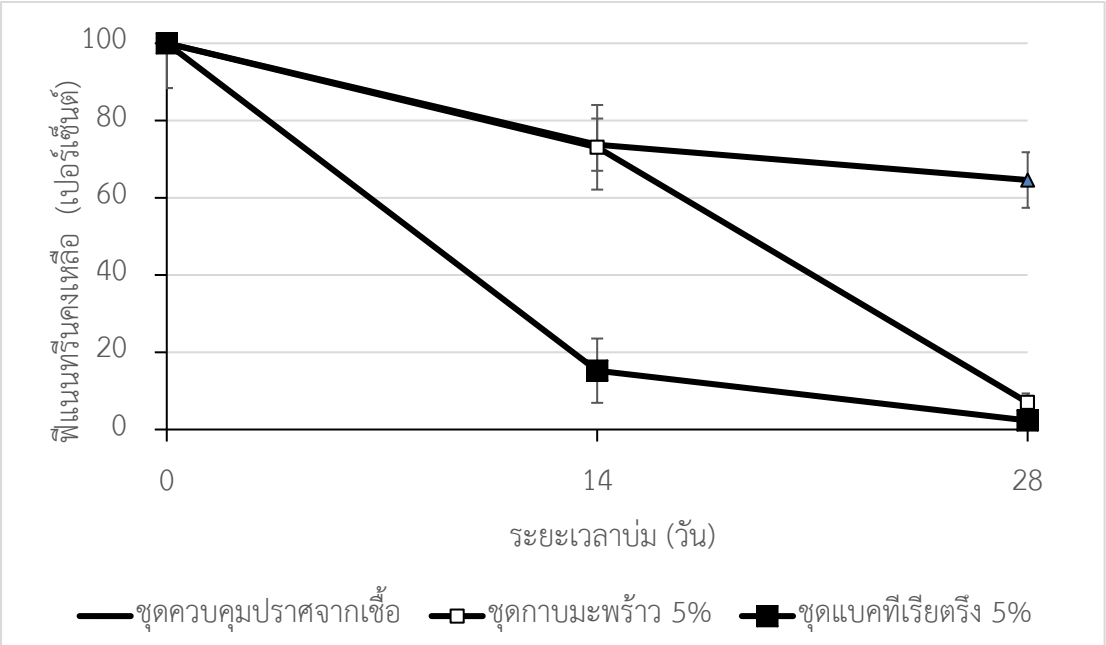
ลักษณะของเนื้อดิน	ทราย (60 เปอร์เซ็นต์) ทรายแป้ง (10 เปอร์เซ็นต์) เหนียว (30 เปอร์เซ็นต์)
ความเป็นกรด-ด่าง	7.1
ไนโตรเจน	0.59 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดิน
ฟอสฟอรัส	474.88 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดิน
คาร์บอน : ไนโตรเจน	3.51
อินทรียวัตถุ	3.54 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก)

เนื่องด้วยดินตัวอย่างที่ใช้มีลักษณะเนื้อดินเป็นดินร่วนเหนียวปนทราย (ตารางที่ 4.4) ซึ่งลักษณะดินนั้นส่งผลกับปัจจัยการเข้าถึงและการถ่ายมวลสาร (Mohan และคณะ 2006) ดังในงานวิจัยของ Amellal และคณะ (2001) ศึกษาการย่อยสลายฟีแนนทรีนในดินโดยแยกดินเป็นดินที่มีเนื้อดินแตกต่างกันคือ ดินทรายและดินเหนียว เติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/กรัมดิน แล้วเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ NAH1 ลง บ่มเป็นระยะเวลา 1 เดือน ใช้ชุดควบคุมเป็นดินที่ไม่เติมแบคทีเรียสายพันธุ์ NAH1 พบว่า การทดลองการละลายน้ำของฟีแนนทรีนในชุดควบคุมของดินทรายและดินเหนียวเป็น 3.3 และ 2.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความเข้มข้นของฟีแนนทรีนที่ละลายน้ำในดินทรายที่มากกว่าดินเหนียวแสดงให้เห็นว่าดินเหนียวสามารถดูดซับฟีแนนทรีนไว้ได้มากกว่าดินทราย และในดินที่เติมแบคทีเรียสายพันธุ์ NAH1 การละลายน้ำของฟีแนนทรีนในชุดควบคุมของดิน

ทรายและดินเหนียวเป็น 2.1 และ 1.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าลักษณะของดินมีบทบาทสำคัญต่อการเข้าถึงและย่อยสลายฟีแนนทรีน

การบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนโดยใช้แบคทีเรียมีปัจจัยที่เกี่ยวด้วยกัน 3 ประการ คือการเข้าถึงฟีแนนทรีน การถ่ายโอนมวลสาร และการเผาผลาญด้วยแบคทีเรีย ดังนั้นแล้วการทดสอบการบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนด้วยแบคทีเรียตรึง 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) จึงต้องมีชุดควบคุมเป็นชุดกาบมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เพื่อเป็นการทำให้ปัจจัยการเข้าถึงฟีแนนทรีนและการถ่ายโอนมวลสารมีความเหมือนกัน แต่การเผาผลาญด้วยแบคทีเรียมีความแตกต่างกัน

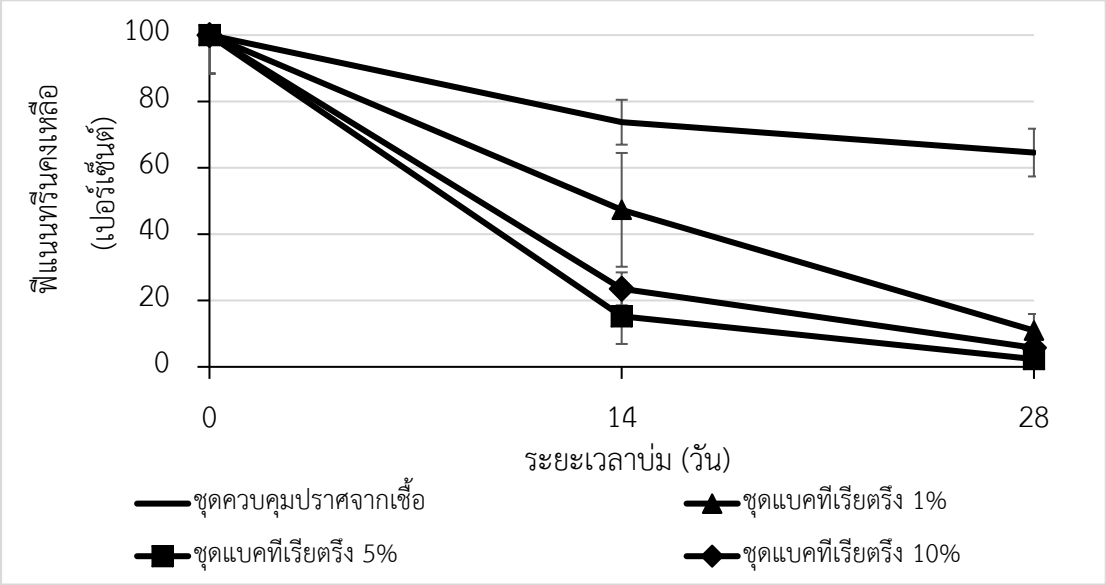
จากการทดสอบการบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนด้วยชุดการทดลองแบคทีเรียตรึงและกาบมะพร้าวปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าชุดแบคทีเรียตรึงและชุดกาบมะพร้าวมีเปอร์เซ็นต์ฟีแนนทรีนคงเหลือที่ใกล้เคียงกัน ดังในรูปที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่นในดินในชุดกาบมะพร้าวน่าจะมีความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีน (แบคทีเรียจากกาบมะพร้าวไม่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้จากข้อ 4.2.1) แต่เมื่อพิจารณาในวันที่ 14 ของการทดลองพบว่า ในชุดแบคทีเรียตรึงมีเปอร์เซ็นต์ฟีแนนทรีนคงเหลือเพียง 15.23±8.23 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดกาบมะพร้าวมีเปอร์เซ็นต์ฟีแนนทรีนคงเหลือ 73.06±10.96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับชุดควบคุมปราศจากเชื้อ และยังสอดคล้องกับการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในดินที่พบว่าแบคทีเรียประจำถิ่นในดินตัวอย่างไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีฟีแนนทรีน 150 มิลลิกรัม/ลิตรภายในระยะเวลา 7 วัน แสดงให้เห็นว่าในช่วงระยะเวลา 14 วันแรก จุลินทรีย์ประจำถิ่นในดินยังไม่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนภายในดินได้ แต่จะสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้หลังจากนั้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และคณะ (2009) ศึกษาการย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลต่ำในดินด้วยกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพและจุลินทรีย์ประจำถิ่นในดิน โดยการเริ่มทดลองได้ปรับค่าความจุน้ำในดินเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ และบ่มในที่ดิน อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 64 วัน พบว่าความเข้มข้น PAHs คงเหลือ ใกล้เคียงกัน และเมื่อตรวจนับปริมาณแบคทีเรียในดิน พบว่าชุดทดลองจุลินทรีย์ประจำถิ่นในดินมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากภายในระยะเวลา 8 วัน หลังจากนั้นจะคงที่ที่ 4.9×10^{6} CFU/กรัมดิน ส่วนกลุ่มแบคทีเรียที่เติมลงไปมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มในช่วงแรก และหลังจากนั้นลดลงจาก 1.7×10^{7} เป็น 3.4×10^{6} CFU/กรัม ซึ่งสาเหตุที่จำนวนแบคทีเรียปริมาณเพิ่มขึ้นเนื่องจากการส่งเสริมระหว่างจุลินทรีย์ประจำถิ่นและกลุ่มแบคทีเรียที่เติมลงไปและยังสอดคล้องกับในช่วงเวลานั้น PAHs มีการลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจากการเปรียบเทียบการบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนด้วยการเติมกาบมะพร้าวและแบคทีเรียตรึงแสดงให้เห็นว่าการเติมแบคทีเรียตรึงมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดฟีแนทรีน โดยช่วยเร่งการกำจัดฟีแนนทรีนในดินให้เร็วยิ่งขึ้น



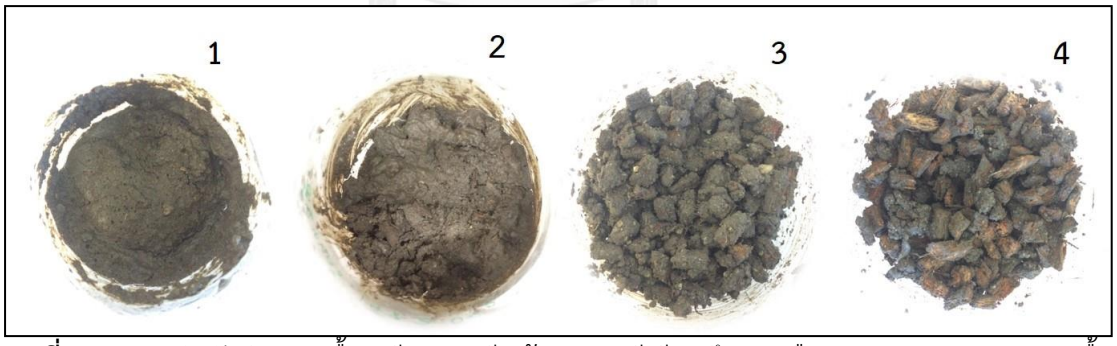
รูปที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์ฟีแนนทรีนคงเหลือในดินในการทดสอบการบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีน ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดินแห้ง

ในการหาปริมาณแบคทีเรียตรึงที่เพียงพอต่อการบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีน การแปรผันปริมาณแบคทีเรียตรึงที่เติมลงดินเป็น 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) จึงเป็นปริมาณแบคทีเรียตรึงที่ต้องการทดสอบ จากการแปรผันปริมาณแบคทีเรียตรึงเพื่อบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าชุดแบคทีเรียตรึง 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) มีเปอร์เซ็นต์ฟีแนนทรีนคงเหลือคือ 10.94, 1.17 และ 3.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียตรึง 1-10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) สามารถช่วยลดความเข้มข้นฟีแนนทรีนในดินได้ และในวันที่ 14 ของการทดลอง เปอร์เซ็นต์ฟีแนนทรีนคงเหลือในชุดแบคทีเรียตรึง 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) มีความแตกต่างกันดังรูปที่ 4.7 ชุดแบคทีเรียตรึง 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) มีเปอร์เซ็นต์ฟีแนนทรีนความเข้มข้นสูงกว่าชุดแบคทีเรียตรึง 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) อยู่มากซึ่งสอดคล้องกับปัจจัยการเข้าถึงฟีแนนทรีน การถ่ายมวลสาร และการเผาผลาญของแบคทีเรีย (Mohan และคณะ, 2006) ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ยิ่งปริมาณแบคทีเรียตรึงเพิ่มขึ้นจะยิ่งเพิ่มปัจจัยการเข้าถึงฟีแนนทรีน การถ่ายมวลสาร และการเผาผลาญของแบคทีเรีย ในการทดลองนี้ชุดแบคทีเรียตรึง 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) มีเปอร์เซ็นต์ฟีแนนทรีนคงเหลือ

ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าปริมาณแบคทีเรียตรึง 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เป็นปริมาณที่เพียงพอแล้วสำหรับการบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดิน



รูปที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์ฟีแนนทรีนคงเหลือในดินในการทดสอบการแปรผันปริมาณแบคทีเรียตรึงเพื่อบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดินแห้ง



รูปที่ 4.8 การบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนด้วยแบคทีเรียตรึง (1) คือชุดควบคุมปราศจากเชื้อ (2) คือชุดแบคทีเรียตรึง 1 เปอร์เซ็นต์ (3) คือชุดแบคทีเรียตรึง 5 เปอร์เซ็นต์ (4) คือชุดแบคทีเรียตรึง 10 เปอร์เซ็นต์

ในการทดสอบการกำจัดฟีแนนทรีนในดินไม่มีชุดทดลองของแบคทีเรียอิสระ เนื่องจากมีหลายงานวิจัยที่ศึกษาแล้วพบว่าการใช้แบคทีเรียอิสระที่เติมลงไปมีประสิทธิภาพการในการกำจัดฟีแนนทรีนได้ลดลง อาจเป็นสาเหตุมากจากการเข้าฟีแนนทรีนและการแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น

เป็น (Chen และคณะ 2012) ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้แบคทีเรียอิสระกำจัดฟีแนนทรีนในดิน Chavez-Gomez และคณะ (2003) ศึกษาการย่อยสลายฟีแนนนทรีนที่ปนเปื้อนในดินมีความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยใช้ *Pseudomonas aeruginosa* B1, *Ralstonia pickettii* B2, *Pseudomonas* sp. B3 และ *Pseudomonas cepacea* B4 บ่มในที่มืดเป็นระยะเวลา 18 วัน พบว่า แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์

Chen และคณะ (2012) ศึกษาการกำจัด PAHs ในดินด้วยการใช้แบคทีเรียอิสระ *Pseudomonas* sp. B1 และแบคทีเรียไม่ทราบสายพันธุ์ B2 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียตรึงในโซเดียมอัลจิเนต โดยมี PAHs ปนเปื้อนในดินความเข้มข้น 8.76 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดิน ปรับค่าความจุน้ำเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ บ่มในที่มืดเป็นเวลา 90 วัน พบว่า ในการทดลอง แบคทีเรียอิสระ *Pseudomonas* sp. B1 ปริมาณ PAHs ลดงลงไปเมื่อเทียบกับชุดควบคุมเป็น 9.5 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียอิสระสายพันธุ์ B2 ปริมาณ PAHs ลดงลงไปเมื่อเทียบกับชุดควบคุมเป็น 11.75 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แบคทีเรียตรึงสายพันธุ์ B1 และ B2 ปริมาณ PAHs ลดงลงไปเมื่อเทียบกับชุดควบคุมเป็น 14.25 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การลดลงของฟีแนนทรีนในชุดควบคุมปราศจากเชื้อมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์เนื่องจากเมื่อนำดินผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจำทำให้ดินมีอินทรีย์วัตถุในดินเพิ่มขึ้น ซึ่งอินทรียวัตถุนั้นสามารถดูดซับฟีแนนทรีนและทำให้การสกัดฟีแนนทรีนออกจากดินได้ยากยิ่งขึ้น (Amellal และคณะ 2001) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และคณะ (2009) ถึงแม้ว่าในการทดลองนี้จะไม่ได้ตรวจสอบการคงอยู่ของ *Pseudomonas* sp. J801 หรือ ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนในดินของแบคทีเรียอิสระประกอบการทดลอง แต่จากผลการทดลอง ในระยะเวลา 14 วัน สามารถเห็นความแตกต่างของฟีแนนทรีนที่คงเหลือในดินระหว่างชุดแบคทีเรียตรึง 5 เปอร์เซ็นต์ และชุดกาบมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ และจากการแปรผันปริมาณแบคทีเรียตรึง 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) พบว่า ปริมาณแบคทีเรียตรึง 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ช่วยเร่งการกำจัดฟีแนนทรีนออกได้ดินได้ทำให้พบฟีแนนทรีนคงเหลือในดินเพียง 15.23±8.32 และ 23.52±4.95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ แบคทีเรีย 1 เปอร์เซ็นต์ พบฟีแนนทรีนคงเหลือในดิน 47.33±17.15 ดังนั้นแล้วปริมาณแบคทีเรียตรึง 5 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นปริมาณที่เพียงพบแล้วสำหรับการบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีน

4.3 การพัฒนาวิธีการเตรียมหัวเชื้อสำหรับแบคทีเรียตรึงเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาแบคทีเรีย

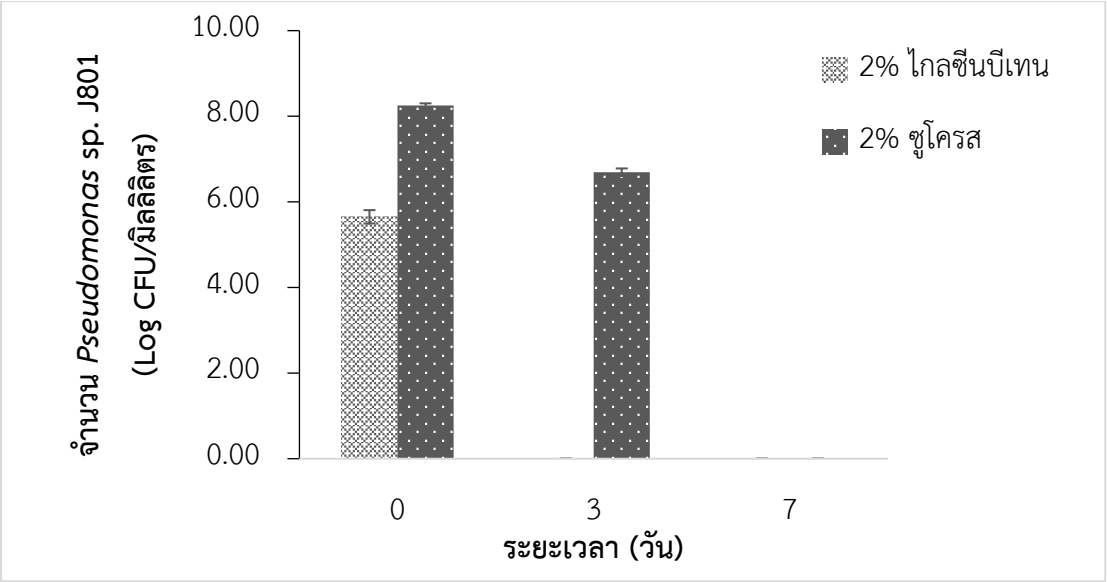
เพื่อเป็นการพัฒนาและต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์แบคทีเรียตรึงพร้อมใช้ การยืดอายุของแบคทีเรียให้สามารถเก็บรักษาได้นานจึงเป็นหลักสำคัญของการทดลองต่อไปนี้

4.3.1 การคัดเลือกสารป้องกันแบคทีเรียในสภาวะแห้ง

เพื่อให้แบคทีเรียสามารถทนต่อความแห้งในขณะที่เก็บรักษาได้ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องใส่สารป้องกันเซลล์ก่อนการทำให้แห้ง สารป้องกันเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ ไกลซีนบีเทนและซูโครส เนื่องจากมีรายงานว่าสารทั้งสองเป็นสารป้องกันความแห้งได้ (Cayley และ Record, 2003; Nocker และคณะ, 2012; Oldenhof และคณะ, 2005) จึงใช้ไกลซีนบีเทนและซูโครส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) เติมลงให้สารแขวนลอยแบคทีเรียที่มีปริมาณ *Pseudomonas* sp. J801 9.29±0.14 log CFU/มิลลิลิตร จากการทดลอง ไม่ตรวจพบ *Pseudomonas* sp. J801 ที่ถูกทำให้แห้งโดยไม่ใส่สารป้องกันเซลล์แม้จะใช้เวลาในการผึ่งลมเพียง 2 ชั่วโมง ในขณะที่สารแขวนลอยแบคทีเรียที่เติมไกลซีนบีเทนและซูโครสพบ *Pseudomonas* sp. J801 รอดถึง 5.78±0.16 และ 8.25±0.05 Log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าไกลซีนบีเทนและซูโครสสามารถช่วยให้ *Pseudomonas* sp. J801 รอดชีวิตจากกระบวนการทำแห้งแบบผึ่งลมได้ แต่เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 และ 7 วัน ในที่อุณหภูมิห้อง พบว่าสารแขวนลอย *Pseudomonas* sp. J801 ที่เติมไกลซีนบีเทนเป็นสารป้องกันเซลล์ไม่สามารถรอดจากความแห้งในขณะเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้ แต่สามารถพบ *Pseudomonas* sp. J801 รอดได้ถึง 6.69±0.09 Log CFU/มิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการทดลองในสารแขวนลอย *Pseudomonas* sp. J801 ที่เติมซูโครสเป็นสารป้องกันเซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม *Pseudomonas* sp. J801 ไม่สามารถอยู่รอดได้จนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง (รูปที่ 4.9) แสดงให้เห็นว่าซูโครสสามารถช่วยป้องกันแบคทีเรียจากความแห้งเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้ดีกว่าไกลซีนบีเทน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ramos และคณะ (2001) พบว่าซูโครสจะทำหน้าที่สร้างพันธะไฮโดรเจนแทนน้ำที่ระเหยไปเพื่อให้เซลล์ยังคงรูปร่างได้ นอกจากนี้ยังมีการรายงานการใช้น้ำตาลและคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นๆ ทรีฮาโลส กลูโคส แรมโนส มอลโทเดกซ์ทริน เป็นต้น เพื่อเป็นสารป้องกันแบคทีเรียจากกะบวนการทำแห้งแบบผึ่งลมและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (Oldenhof และคณะ 2005; Schisler และคณะ 2016)

4.3.2 การแปรผันความเข้มข้นของสารป้องกันแบคทีเรียในสภาวะแห้ง

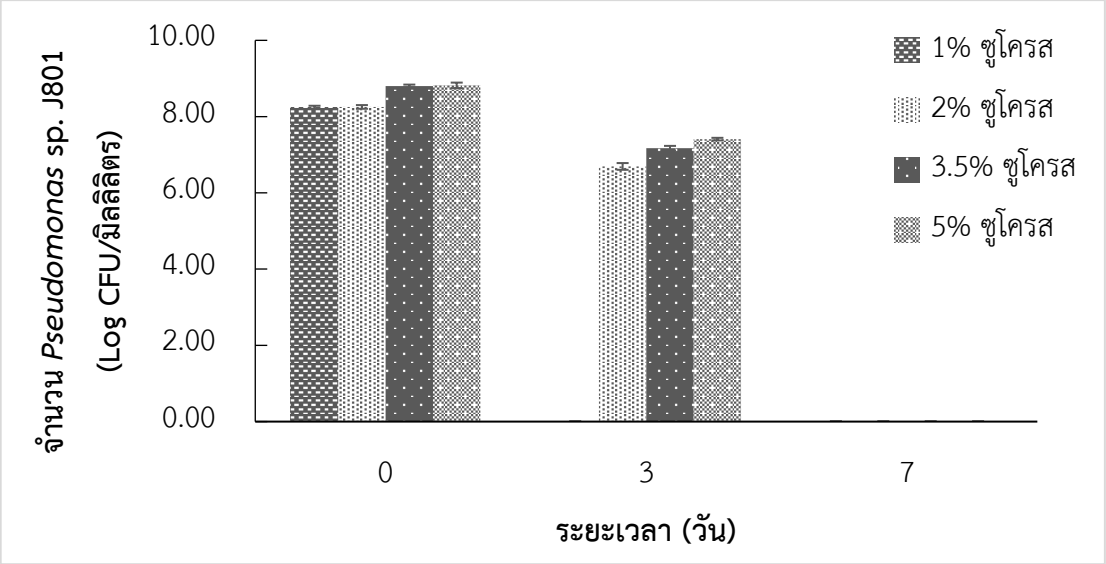
เนื่องจากการทดลองก่อนหน้าใช้ความเข้มข้นซูโครสเพียง 1 ความเข้มข้น เพื่อจะคัดเลือกสารป้องกันเซลล์ ในการทดลองนี้การแปรผันความเข้มข้นที่จะทำให้แบคทีเรียมีโอกาสรอดได้เพิ่มขึ้น การใช้ความเข้มข้นที่สูงเกินไปอาจทำให้ใช้ระยะเวลาในการทำให้แห้งนานขึ้น ความเข้มข้นสุดท้ายของซูโครสที่ปรับในสารแขวนลอยแบคทีเรียใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 1-5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากถ้าใช้ความเข้มข้นซูโครสที่มากกว่านี้จะทำให้ใช้ระยะเวลาในการผึ่งลมมากกว่า 3 ชั่วโมง กว่าแบคทีเรียจะแห้ง



หมายเหตุ ไม่ตรวจพบการรอดชีวิตของ *Pseudomonas* sp. J801 ในชุดควบคุมหลังจากทำให้แห้งด้วยการผึ่งลมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

รูปที่ 4.9 จำนวน *Pseudomonas* sp. J801 ที่รอดชีวิตหลังจากทำให้แห้งด้วยการผึ่งลมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อเติมไกลซีนบีเทนและซูโครสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารแขวนลอยแบคทีเรีย

ผลการทดลองแปรผันความเข้มข้นซูโครสในสารแขวนลอยแบคทีเรียก่อนการทำให้แห้งแสดงในรูปที่ 4.10 ที่ความเข้มข้นซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ไม่พบการรอดชีวิตของ *Pseudomonas* sp. J801 ในวันที่ 3 และ 7 เมื่อเก็บรักษาในที่อุณหภูมิห้อง แต่ชุดที่ใช้ความเข้มข้นซูโครสในสารแขวนลอย 2, 3.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบ *Pseudomonas* sp. J801 รอดถึง 6.69, 7.17 และ 7.41 Log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับในวันที่ 3 แต่อย่างไรก็ตาม *Pseudomonas* sp. J801 ไม่สามารถอยู่รอดได้จนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นซูโครสที่เพิ่มขึ้นในสารแขวนลอยแบคทีเรียส่งผลให้ *Pseudomonas* sp. J801 มีปริมาณในการรอดที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Schisler และคณะ (2016) ที่เมื่อเติมความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้นปริมาณแบคทีเรียที่สามารถรอดชีวิตหลังจากทำให้แห้งด้วยการผึ่งลมและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องมีปริมาณเพิ่มขึ้น



หมายเหตุ ไม่ตรวจพบการรอชีวิตของ *Pseudomonas* sp. J801 ในชุดควบคุมหลังจากทำให้แห้งด้วยการผึ่งลมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

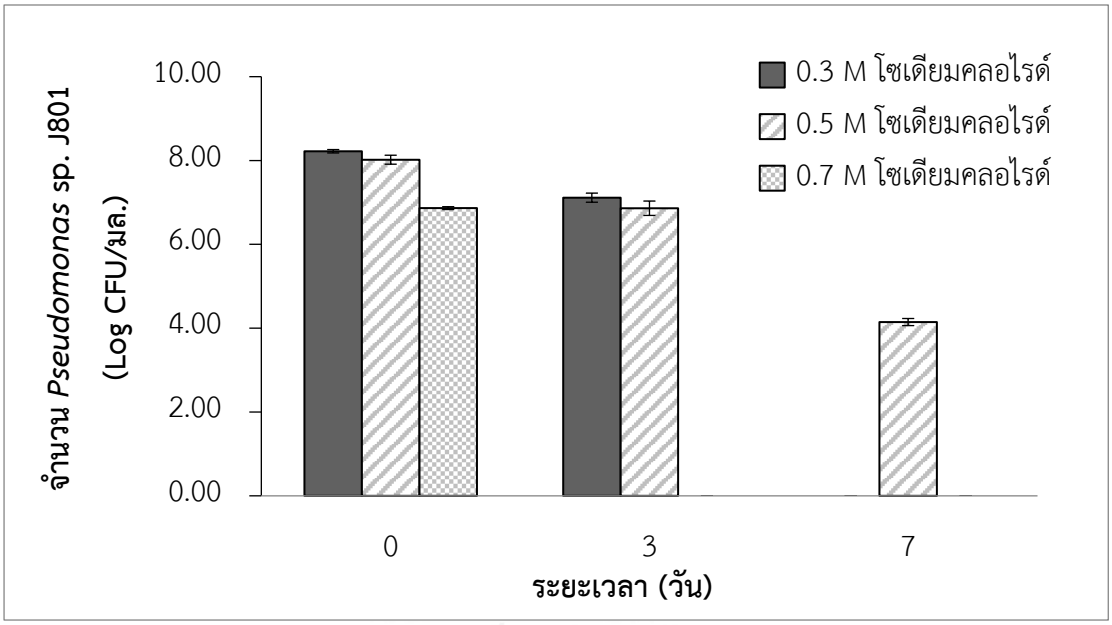
รูปที่ 4.10 จำนวน *Pseudomonas* sp. J801 ที่รอดชีวิตหลังจากทำให้แห้งด้วยการผึ่งลมเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อแปรผันความเข้มข้นซูโครส (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารแขวนลอยแบคทีเรีย

4.3.3 แปรผันความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.25XLB

จากรายงานวิจัยของ Bonaterra และคณะ (2005) ที่ได้รายงานการเพิ่มแรงดันออกโมติกด้วยโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อในขณะเพิ่มปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย มีผลทำให้แบคทีเรียสามารถรอดชีวิตให้การทำแห้งแบบผึ่งลมและสามารถเก็บรักษาแบคทีเรียได้นานขึ้น ในการทดลองนี้จึงแปรผันความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์เพื่อเพิ่มแรงดันออกโมติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อกระตุ้นให้แบคทีเรียผลิตสารป้องกันแรงดันออสโมติกด้วยตัวเอง ผลการทดลองการทำแห้งแบบผึ่งลมและสามารถเก็บรักษาแบคทีเรียที่อุณหภูมิห้องแสดงดังในรูปที่ 4.11 *Pseudomonas* sp. J801 สามารถรอดจากความแห้งได้จนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง ในชุดทดลองที่ใช้เติมความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.5 โมลาร์ ซึ่งทำให้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ทั้งหมด 0.53 โมลาร์ มีโดยมีปริมาณแบคทีเรียเป็น 4.1 Log CFU/มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่า *Pseudomonas* sp. J801 สามารถปรับตัวให้สามารถทนต่อความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์และยังสามารถทนต่อความแห้งเมื่อต้องเก็บรักษาแบคทีเรียที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วันได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bonaterra และคณะ (2005) ที่พบว่าแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของโซเดียม

คลอไรด์ 0.5 โมลาร์ มีปริมาณแบคทีเรียที่รอดชีวิตได้มากกว่าความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0.3 และ 0.7 โมลาร์

แต่อย่างไรก็ตาม ชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ ในวันที่ 0 และ 3 จะมีปริมาณแบคทีเรียรอดชีวิตใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ แต่ก็ไม่สามารถอยู่รอดได้จนถึงวันที่ 7 ขณะที่ในชุดการทดลองที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0.7 โมลาร์ และไม่พบการรอดในวันที่ 3 และ 7



รูปที่ 4.11 จำนวนแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. J801 ที่รอดชีวิตหลังจากทำให้แห้งด้วยการผึ่งลมและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.25XLB

จากการทดลองข้างต้น การนำแบคทีเรียแขวนลอยในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เติมซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำให้แห้งด้วยการผึ่งลมแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องสามารถทำให้แบคทีเรียมีชีวิตรอดได้ 3 วัน และเมื่อพัฒนาการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียโดยเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.25XLB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ สามารถทำให้แบคทีเรียมีชีวิตรอดได้ 7 วัน

4.3.4 การกำจัดฟีแนนทรีนของแบคทีเรียตรึงหลังการเก็บรักษาระยะสั้น

หลังการทำแบคทีเรียตรึงให้แห้งและเก็บรักษาในอุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 21 วัน และนำแบคทีเรียตรึงมาทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่เติม

ฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร บ่มเป็นเวลา 3 วัน พบว่า เปอร์เซ็นต์การกำจัดฟีแนนทรีนลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นดังตารางที่ 4.5 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Deng และคณะ (2016) ที่ศึกษาการเก็บรักษา *Mycobacterium gilvum* CP13 ที่ตรึงบนเปลือกถั่วลิสงบดละเอียดในอุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ การทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรียด้วยวิธี fluorescein diacetate hydrolysis (FDA) แสดงให้เห็นว่าเมื่อระยะการเก็บรักษานานขึ้นทำให้กิจกรรมของแบคทีเรียลดลงและยังสอดคล้องกับงานวิจัย Xu และ Lu (2010) ศึกษาการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรียบนเปลือกถั่วลิสงบดละเอียดในอุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ด้วย

ตารางที่ 4.5 การกำจัดฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ในระยะเวลา 3 วัน ของแบคทีเรียตรึงหลังการเก็บรักษา

ระยะเวลาเก็บรักษาแบคทีเรียตรึง (วัน)	การกำจัดฟีแนนทรีน (เปอร์เซ็นต์)	ความเข้มข้นฟีแนนทรีนคงเหลือในกาบมะพร้าว (มิลลิกรัม/กาบมะพร้าว 0.05 กรัม)
0	99.18±1.43	14.63±7.64
7	81.17±2.91	32.10±6.60
14	74.19±2.55	66.78±10.88
21	60.85±3.16	121.28±13.96

หมายเหตุ กาบมะพร้าบสามารถกำจัดฟีแนนทรีนได้ 61.46±21.34 เปอร์เซ็นต์ และมีความเข้มข้นฟีแนนทรีนคงเหลือในกาบมะพร้าว 105.38±42.41 มิลลิกรัม/กาบมะพร้าว 0.05 กรัม

วัลย์วสันต์ ว่องวงศ์ศรี (2013) ศึกษาการเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ด *Novosphingobium* sp. PCY พบว่าแบคทีเรียอัดเม็ดที่เก็บรักษาในอุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 14 วัน แบคทีเรียอัดเม็ดมีประสิทธิภาพในการกำจัดไพรีนมากกว่า 87.49 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 28 วัน ประสิทธิภาพในการกำจัดไพรีนคงเหลือเพียง 56.23 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองข้างต้นแบคทีเรียตรึงที่ถูกเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 14 วัน มีประสิทธิภาพในการกำจัดฟีแนนทรีนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียตรึงที่ไม่ได้ผ่านการเก็บรักษา (ข้อที่ 4.2) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ถูกเก็บรักษามีการย่อยสลายฟีแนนทรีนช้าลงแต่หากเพิ่มระยะเวลาในการบ่มให้นานขึ้นอาจทำให้เปอร์เซ็นต์การกำจัด ฟีแนนทรีนเพิ่มมากขึ้น

จากประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนทรีนของแบคทีเรียตรึงที่ถูกเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 14 วัน แสดงให้เห็นว่า งานวิจัยนี้ได้แนวทางการพัฒนาการเตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียเพื่อยืดอายุแบคทีเรียให้ทนต่อกระบวนการทำแห้งแบบผึ่งลมและยังคงรักษาประสิทธิภาพในการกำจัดฟีแนนทรีนเมื่อต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้ ซึ่งการทำแห้งแบบผึ่งลมเป็นวิธีที่มีต้นทุนต่ำและมีการเตรียมการที่ง่าย นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังเป็นงานวิจัยแรกที่ใช้วิธีการกระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างสารป้องกันตัวเองเพื่อใช้เป็นแบคทีเรียตรึงเพื่อเพิ่มโอกาสรอดของแบคทีเรียต่อการเก็บรักษาในสภาวะแห้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

บทสรุป

ในการบำบัดดินที่ปนเปื้อนฟีแนนทรีนควรใช้วัสดุตรึงที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรม และมีราคาถูก กาบมะพร้าวเป็นหนึ่งในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดหนึ่ง มีราคาถูก หาซื้อได้ง่าย และยังเป็นส่วนผสมในดินสำหรับการเพาะปลูกพืช ดังนั้นการตรึงแบคทีเรียบนกาบมะพร้าวจึงมีความน่าสนใจที่จะศึกษา สำหรับแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาคือ *Pseudomonas* sp. J801 เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีน

ในการตรึงแบคทีเรียใช้วิธีดูดซับเป็นวิธีตรึงแบคทีเรีย ดังนั้นแล้วการแปรผันปริมาณกาบมะพร้าวในการตรึงแบคทีเรียจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียที่สูงสุดในการตรึงแต่ละครั้ง ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ปริมาณกาบมะพร้าว 2-10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักกาบมะพร้าว/ปริมาตรสารแขวนลอยแบคทีเรีย) จากการทดลองพบว่า ที่ปริมาณกาบมะพร้าว 8 เปอร์เซ็นต์เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรึงแบคทีเรีย และเพื่อให้จำนวนแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดมีปริมาณมากที่สุด จึงทดสอบแปรผันระยะเวลาในการตรึงแบคทีเรียโดยใช้ระยะเวลา ตั้งแต่ 3-72 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด

การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ใช้การทดลองแบบกึ่งต่อเนื่องโดยเติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วัน เป็นเวลา 24 วัน เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียตรึงและแบคทีเรียอิสระ *Pseudomonas* sp. J801 จากการทดลองพบว่า *Pseudomonas* sp. J801 ไม่สามารถทนต่อความเป็นพิษของฟีแนนทรีนโดยไม่ตรวจพบ *Pseudomonas* sp. J801 ตั้งแต่วันที่ 15 ของการทดลอง ในขณะที่แบคทีเรียตรึงยังคงมีประสิทธิภาพในการกำจัดฟีแนนทรีนถึง 78 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 24 ของการทดลอง

เมื่อนำแบคทีเรียตรึงที่ได้ทดสอบการบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดิน เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าในวันที่ 14 ของการทดลอง การเติมแบคทีเรียตรึงเป็นปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักกาบมะพร้าว/น้ำหนักดิน) ทำให้มีปริมาณฟีแนนทรีนในดินคงเหลือเพียง 15.23 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเติมกาบมะพร้าวเป็นปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้มีปริมาณฟีแนนทรีนในดินคงเหลือ 73.03 เปอร์เซ็นต์ และในวันที่ 28 มีปริมาณฟีแนนทรีนคงเหลือในดิน 6.98 และ 2.33 เปอร์เซ็นต์ ในชุดทดลองที่เติมแบคทีเรียตรึง 5 เปอร์เซ็นต์ และกาบมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมแบคทีเรียตรึงปริมาณมีส่วนช่วยในการเร่งการ

กำจัดฟีแนนทรีนออกจากดิน และการเติมแบคทีเรียตรึง 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นปริมาณที่เพียงพอแล้วสำหรับการบำบัดดินปนเปื้อนฟีแนนทรีน

สำหรับการพัฒนาเป็นแบคทีเรียตรึงพร้อมใช้ การผลิตแบคทีเรียตรึงแล้วเก็บรักษาแบคทีเรียตรึงในรูปแบบแบคทีเรียตรึงแห้งจะทำให้แบคทีเรียตรึงมีน้ำหนักน้อยและสะดวกในการขนส่ง แต่การทำแบคทีเรียตรึงให้แห้งโดยใช้การผึ่งลมตลอดจนการเก็บรักษาในอุณหภูมิห้องอาจทำให้ *Pseudomonas* sp. J801 ไม่สามารถทนต่อความเครียดที่เกิดขึ้นได้โดยเฉพาะความเครียดที่เกิดจากการขาดน้ำ การเติมสารป้องกันเซลล์ในสารแขวนลอยแบคทีเรียก่อนการทำให้แห้งจะสามารถช่วยให้แบคทีเรียอยู่รอดได้นานขึ้น จึงทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียให้รูปแบบแห้งเมื่อไกลซีนบีเทนและซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในสารแขวนลอยแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่า การเติมซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในสารแขวนลอยแบคทีเรีย ทำให้ *Pseudomonas* sp. J801 มีชีวิตรอดได้ถึง 3 วัน นอกจากนี้การกระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างสารป้องกันแรงดันออสโมติกสะสมภาพในเซลล์เอง มีความช่วยทำให้แบคทีเรียอยู่รอดได้นานขึ้น จึงทดสอบการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.3, 0.5 และ 0.7 โมลาร์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.25xLB เพื่อเพิ่มแรงดันออสโมติก จากนั้นเก็บเซลล์แล้วแขวนลอยในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เติมซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำให้แห้ง พบว่า การเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ทำให้ *Pseudomonas* sp. J801 มีชีวิตรอดได้ถึง 7 วัน

จากการปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.25XLB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ทำให้มีความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 0.58 โมลาร์ แล้วนำเซลล์ที่ได้แขวนลอยในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เติมซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับกาบมะพร้าวปริมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ บ่มเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ทำให้ได้แบคทีเรียตรึงที่มี *Pseudomonas* sp. J801 ที่สามารถทนต่อความแห้งได้นานขึ้น นำแบคทีเรียตรึงที่ได้ผึ่งลมให้แห้งเป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นเก็บรักษาในขวดพลาสติกสีขุ่นฝาเกลียวเป็นระยะ 14 วัน แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดฟีแนนทรีนในอาหารเหลว CFMM ที่เติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร บ่มด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 วัน พบว่า แบคทีเรียยังคงมีประสิทธิภาพในการกำจัดฟีแนนรีน และมีเปอร์เซ็นต์ฟีแนนทรีนคงเหลือในอาหารเหลว CFMM 25.81 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองที่กล่าวมา แบคทีเรียตรึงที่ผลิตจากการใช้กาบมะพร้าวเป็นวัสดุตรึงและ *Pseudomonas* sp. J801 ซึ่งเป็นแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน ทำให้ได้แบคทีเรียตรึงที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดฟีแนนทรีน สามารถช่วยเร่งการกำจัดฟีแนนทรีนในดิน อย่างไรก็ตามแม้จะพบว่าสามารถเก็บรักษาได้ในระยะสั้นแต่ยังคงมีประสิทธิภาพในการกำจัดฟีแนนทรีน งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่นำเสนอแนวทางการกระตุ้นให้แบคทีเรียผลิตสารป้องกันตัวเองก่อนนำมาตรึงแบคทีเรียเพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียในกระบวนการทำแห้งแบบผึ่งลม และลดต้นทุนในการทำให้แบคทีเรียตรึงแห้ง

ข้อเสนอแนะ

1. การนำแบคทีเรียตรึงไปใช้ในการเกษตร

1.1 เพื่อบำบัดดินที่มีการปนเปื้อนฟีแนนทรีนก่อนการเพาะปลูก สามารถนำแบคทีเรียตรึงผสมกับดินในกระบวนการเตรียมดินก่อนเพาะปลูกพืช

1.2 เพื่อลดการปนเปื้อนฟีแนนนทรีนจากน้ำที่ใช้รดต้นพืช สามารถนำแบคทีเรียตรึงเป็นวัสดุคลุมดินเพื่อให้กาบมะพร้าวดูดซับน้ำและฟีแนนทรีนก่อนที่จะปนเปื้อนในดิน

2. จากรายงานวิจัยของ Andreolli และคณะ (2015) ที่พบการตกค้าง PAHs ในดินเนื่องจากการเผาป่าหรือไฟป่า สามารถนำแบคทีเรียตรึงที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้ไปบำบัดดินที่มีการปนเปื้อนของฟีแนนทรีนได้

3. การเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดกาบมะพร้าวให้เพิ่มขึ้น สามารถพัฒนาได้อย่างเช่นในงานวิจัยของ Deng และคณะ (2016) ที่นำเปลือกถั่วลิสงแช่ในกลูตารัลดีไฮด์เพื่อฆ่าจุลินทรีย์ประจำถิ่นบนเปลือกถั่วลิสง และแช่ในอะซิโตนเพื่อกำจัดอินทรียวัตถุบนเปลือกถั่วลิสงทำให้มีพื้นที่ผิวเพิ่มมากขึ้น

4. เนื่องจากกาบมะพร้าวที่ใช้ไม่ได้ผ่านการฆ่าจุลินทรีย์ประจำถิ่น และเมื่อกาบมะพร้าวมีความชื้นจะทำให้ราสามารถเจริญเติบโตได้ การใส่สารป้องกันราไม่ให้ขึ้นบนแบคทีเรียตรึงและยืดอายุการเก็บรักษาแบคทีเรียตรึง

5. การเก็บรักษาระยะยาว ควรใช้ถุงบรรจุภัณฑ์ที่มีสมบัติป้องกันหรือควบคุมความชื้น เนื่องจากความชื้นส่งผลให้มีจำนวนแบคทีเรียมีจำนวนลดลง (Valdez และคณะ, 1985)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ขนิษฐา สมตระกูล. 2554. ความเป็นพิษร่วมของแอนทราซีนและฟีแนนทรีนในดินทปิ่นเปื้อนฟลูออรีนและฟลูออแรนทีนต่อการเจริญในระยะต้นกล้าของพืชเศรษฐกิจวงศ์หญ้า. วารสารวิทยาศาสตร์ ม. อุบลฯ ฉบับพิเศษ. 31-42 หน้า.

คณาจารย์ภาควิชาพืชศาสตร์. 2543. หลักการกสิกรรม. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

วัลย์วสันต์ ว่องวงศ์ศรี. ลักษณะสมบัติของ *Novosphingobium* sp. PCY ที่คัดแยกใหม่เพื่อพัฒนาเป็นแบคทีเรียอัดเม็ดสำหรับบำบัดดินปนเปื้อนไพรีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2556.

อานัฐ ตันโช. 2549. ไส้เดือนดิน. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

ภาษาอังกฤษ

Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G. and Struhl, K. Current protocols in molecular biology 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1999.

Ahammed, G. J., Yuan, H. L., Ogweno, J. O., Zhou, Y. H., Xia, X. J., Mao, W. H., Shi, K., Yu, J. Q. (2012). Brassinosteroid alleviates phenanthrene and pyrene phytotoxicity by increasing detoxification activity and photosynthesis in tomato. *Chemosphere, 86*(5), 546-555.

Amellal, N., Portal, J. M., Berthelin, J. (2001). Effect of soil structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil. *Applied Geochemistry, 16*(14), 1611-1619.

Amorim, M. J. B., Oliveira, E., Teixeira, A. S., Gravato, C. S., Loureiro, S., Guilhermino, L. C., Van Gestel, C. A. M., Soares, A. M. V. M. (2011). Toxicity and bioaccumulation of phenanthrene in *Enchytraeus Albidus* (Oligochaeta: Enchytraeidae). *Environmental Toxicology and Chemistry, 30*(4), 967-972.

Andreolli, M., Lampis, S., Brignoli, P., Vallini, G. (2015). Bioaugmentation and biostimulation as strategies for the bioremediation of a burned woodland soil contaminated by toxic hydrocarbons: A comparative study. *Journal of Environmental Management, 153*, 121-131.

Baboshin, M. A. and Golovleva, L. A. (2012). Aerobic bacterial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and its kinetic aspects. *Microbiology, 81*(6), 639-650.

Barnier, C., Ouvrard, S., Robin, C., Morel, J. L. (2014). Desorption kinetics of PAHs from aged industrial soils for availability assessment. *Science of the Total Environment, 470*, 639-645.

Basak, B., Bhunia, B., Dey, A. (2014). Studies on the potential use of sugarcane bagasse as carrier matrix for immobilization of *Candida tropicalis* PHB5 for phenol biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation, 93*, 107-117.

Bhatnagar, A., Vilar, V. J. P., Botelho, C. M. S., Boaventura, R. A. R. (2010). Coconut-based biosorbents for water treatment - A review of the recent literature. *Advances in Colloid and Interface Science, 160*(1-2), 1-15.

Bonaterra, A., Camps, J., Montesinos, E. (2005). Osmotically induced trehalose and glycine betaine accumulation improves tolerance to desiccation, survival and efficacy of the postharvest biocontrol agent *Pantoea agglomerans* EPS125. *Fems Microbiology Letters, 250*(1), 1-8.

Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Togo, A., Takada, H. (2006). Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediments in Thailand. *Marine Pollution Bulletin, 52*(8), 942-956.

Bora, T., Ozaktan, H., Gore, E., Aslan, E. (2004). Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp *melonis* by wettable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*. *Journal of Phytopathology, 152*(8-9), 471-475.

Cayley, S. and Record, M. T. (2003). Roles of cytoplasmic osmolytes, water, and crowding in the response of *Escherichia coli* to osmotic stress: Biophysical basis of osmoprotection by glycine betaine. *Biochemistry, 42*(43), 12596-12609.

Champagne, C. P. and Gardner, N. J. (2001). The effect of protective ingredients on the survival of immobilized cells of *Streptococcus thermophilus* to air and freeze-drying. *Electronic Journal of Biotechnology, 4*(3), 7-8.

Chavez-Gomez, B., Quintero, R., Esparza-Garcia, F., Mesta-Howard, A. M., de la Serna, F. J. Z. D., Hernandez-Rodriguez, C. H., Gillen, T., Poggi-Varaldo, H. M., Barrera-Cortes, J., Rodriguez-Vazquez, R. (2003). Removal of phenanthrene from soil by co-cultures of bacteria and fungi pregrown on sugarcane bagasse pith. *Bioresource Technology, 89*(2), 177-183.

Chen, B. L., Yuan, M. X., Qian, L. B. (2012). Enhanced bioremediation of PAH-contaminated soil by immobilized bacteria with plant residue and biochar as carriers. *Journal of Soils and Sediments, 12*(9), 1350-1359.

Chen, C. W., Binh, N. T., Chen, C. F., Hung, C. M., Dong, C. D. (2014). Feasibility of using chemical oxidation for remediation of PAHs contaminated sediments. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 248*.

Chen, H., Tian, G. L., Wu, Z. H., Fei, B. H. (2016). Microfibril aggregates in pretreated bamboo fibers analyzed with atomic force microscopy. *Wood and Fiber Science, 48*(2), 104-116.

Chen, Y., Cao, J. J., Zhao, J., Xu, H. M., Arimoto, R., Wang, G. H., Han, Y. M., Shen, Z. X., Li, G. H. (2014). n-Alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in total suspended particulates from the southeastern Tibetan Plateau: Concentrations, seasonal variations, and sources. *Science of the Total Environment, 470*, 9-18.

Chouychai, W., Thongkukiatkul, A., Upatham, S., Lee, H., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M. (2007). Phytotoxicity assay of crop plants to phenanthrene and pyrene contaminants in acidic soil. *Environmental Toxicology, 22*(6), 597-604.

Cubitto, M. A. and Gentili, A. R. (2015). Bioremediation of crude oil-contaminated soil by immobilized bacteria on an agroindustrial waste-sunflower seed husks. *Bioremediation Journal, 19*(4), 277-286.

Deng, F. C., Liao, C. J., Yang, C., Guo, C. L., Dang, Z. (2016). Enhanced biodegradation of pyrene by immobilized bacteria on modified biomass materials. *International Biodeterioration & Biodegradation, 110*, 46-52.

Dreux, N., Albagnac, C., Sleator, R. D., Hill, C., Carlin, F., Morris, C. E., Nguyen-The, C. (2008). Glycine betaine improves *Listeria monocytogenes* tolerance to desiccation on parsley leaves independent of the osmolyte transporters BetL, Gbu and OpuC. *Journal of Applied Microbiology, 104*(4), 1221-1227.

Dzionek, A., Wojcieszynska, D., Guzik, U. (2016). Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology, 23*, 28-36.

Gaskin, S. and Bentham, R. (2005). Comparison of enrichment methods for the isolation of pyrene-degrading bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation, 56*(2), 80-85.

Gentili, A. R., Cubitto, M. A., Ferrero, M., Rodriguez, M. S. (2006). Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *International Biodeterioration & Biodegradation, 57*(4), 222-228.

Guo, M. X., Gong, Z. Q., Allinson, G., Tai, P. D., Miao, R. H., Li, X. J., Jia, C. Y., Zhuang, J. (2016). Variations in the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial and agricultural soils after bioremediation. *Chemosphere, 144*, 1513-1520.

Iaconelli, C., Lemetais, G., Kechaouc, N., Chain, F., Bermudez-Humaran, L. G., Langella, P., Gervais, P., Beney, L. (2015). Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. *Journal of Biotechnology, 214*, 17-26.

Johnsen, A. R., Wick, L. Y., Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution, 133*(1), 71-84.

Justiz-Smith, N. G., Virgo, G. J., Buchanan, V. E. (2008). Potential of Jamaican banana, coconut coir and bagasse fibres as composite materials. *Materials Characterization, 59*(9), 1273-1278.

Klankeo, P., Nopcharoenkul, W., Pinyakong, O. (2009). Two novel pyrene-degrading *Diaphorobacter* sp. and *Pseudoxanthomonas* sp. isolated from soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 108*(6), 488-495.

Lau, E. V., Gan, S. Y., Ng, H. K., Poh, P. E. (2014). Extraction agents for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil in soil washing technologies. *Environmental Pollution, 184*, 640-649.

Li, X. J., Lin, X., Li, P. J., Liu, W., Wang, L., Ma, F., Chukwuka, K. S. (2009). Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. *Journal of Hazardous Materials, 172*(2-3), 601-605.

Liao, C. J., Liang, X. J., Lu, G. N., Thai, T., Xu, W. D., Dang, Z. (2015). Effect of surfactant amendment to PAHs-contaminated soil for phytoremediation by maize (Zea mays L). *Ecotoxicology and Environmental Safety, 112*, 1-6.

Lin, C., Gan, L., Chen, Z. L., Megharaj, M., Naidu, R. (2014). Biodegradation of naphthalene using a functional biomaterial based on immobilized *Bacillus fusiformis* (BFN). *Biochemical Engineering Journal, 90*, 1-7.

Lin, J. J., Gan, L., Chen, Z. L., Naidu, R. (2015). Biodegradation of tetradecane using *Acinetobacter venetianus* immobilized on bagasse. *Biochemical Engineering Journal, 100*, 76-82.

Liu, J., Chen, S. H., Ding, J., Xiao, Y., Han, H. T., Zhong, G. H. (2015). Sugarcane bagasse as support for immobilization of *Bacillus pumilus* HZ-2 and its use in bioremediation of mesotrione-contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology, 99*(24), 10839-10851.

Mohan, S. V., Kisa, T., Ohkuma, T., Kanaly, R. A., Shimizu, Y. (2006). Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 5*(4), 347-374.

Morillo, E., Romero, A. S., Maqueda, C., Madrid, L., Ajmone-Marsan, F., Grcman, H., Davidson, C. M., Hursthouse, A. S., Villaverde, J. (2007). Soil pollution by PAHs in urban soils: a comparison of three European cities. *Journal of Environmental Monitoring, 9*(9), 1001-1008.

Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., Labuzek, S. (2003). Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies, 12*(1), 15-25.

Nocker, A., Fernandez, P. S., Montijn, R., Schuren, F. (2012). Effect of air drying on bacterial viability: A multiparameter viability assessment. *Journal of Microbiological Methods, 90*(2), 86-95.

Nopcharoenkul, W., Netsakulnee, P., Pinyakong, O. (2013). Diesel oil removal by immobilized *Pseudoxanthomonas* sp. RN402. *Biodegradation, 24*(3), 387-397.

Nunal, S. N., Santander-De Leon, S. M. S., Bacolod, E., Koyama, J., Uno, S., Hidaka, M., Yoshikawa, T., Maeda, H. (2014). Bioremediation of heavily oil-polluted seawater by a bacterial consortium immobilized in cocopeat and rice hull powder. *Biocontrol Science, 19*(1), 11-22.

Oldenhof, H., Wolkers, W. F., Fonseca, F., Passot, S. P., Marin, M. (2005). Effect of sucrose and maltodextrin on the physical properties and survival of air-dried *Lactobacillus bulgaricus*: An in situ fourier transform infrared spectroscopy study. *Biotechnology Progress, 21*(3), 885-892.

Owabor, C. N. and Agarry, S. E. (2014). Batch equilibrium and kinetic studies of naphthalene and pyrene adsorption onto coconut shell as low-cost adsorbent. *Desalination and Water Treatment, 52*(16-18), 3338-3346.

Raina, V., Suar, M., Singh, A., Prakash, O., Dadhwal, M., Gupta, S. K., Dogra, C., Lawlor, K., Lal, S., van der Meer, J. R., Holliger, C., Lal, R. (2008). Enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) in contaminated soils via inoculation with Sphingobium indicum B90A. *Biodegradation, 19*(1), 27-40.

Ramos, J. L., Gallegos, M. T., Marques, S., Ramos-Gonzalez, M. I., Espinosa-Urgel, M., Segura, A. (2001). Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Current Opinion in Microbiology, 4*(2), 166-171.

Rivelli, V., Franzetti, A., Gandolfi, I., Cordoni, S., Bestetti, G. (2013). Persistence and degrading activity of free and immobilised allochthonous bacteria during bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. *Biodegradation, 24*(1), 1-11.

Sanchez-Trujillo, M. A., Morillo, E., Villaverde, J., Lacorte, S. (2013). Comparative effects of several cyclodextrins on the extraction of PAHs from an aged contaminated soil. *Environmental Pollution, 178*, 52-58.

Santos, D. T., Sarrouh, B. F., Rivaldi, J. D., Converti, A., Silva, S. S. (2008). Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xylitol production. *Journal of Food Engineering, 86*(4), 542-548.

Schisler, D. A., Slininger, P. J., Olsen, N. L. (2016). Appraisal of selected osmoprotectants and carriers for formulating Gram-negative biocontrol agents active against Fusarium dry rot on potatoes in storage. *Biological Control, 98*, 1-10.

Vriezen, J. A. C., de Bruijn, F. J., Nusslein, K. (2007). Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology, 73*(11), 3451-3459.

Willer, B. S. and Leddy, J. J. (2016). Time to change from a symptom-based concussion assessment to a structured physical examination. *Academic Emergency Medicine, 23*(4), 495-496.

Xu, Y. H. and Lu, M. (2010). Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials, 183*(1-3), 395-401.

Yu, J. L., Zhang, X., Tan, T. W. (2007). An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. *Journal of Biotechnology, 129*(3), 415-420.

Zhao, H. P., Wu, Q. S., Wang, L., Zhao, X. T., Gao, H. W. (2009). Degradation of phenanthrene by bacterial strain isolated from soil in oil refinery fields in Shanghai China. *Journal of Hazardous Materials, 164*(2-3), 863-869.

Zhao, J. M., Li, Y. M., Zhang, C. J., Zeng, Q. L., Zhou, Q. (2008). Sorption and degradation of bisphenol a by aerobic activated sludge. *Journal of Hazardous Materials, 155*(1-2), 305-311.

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากแหล่งคาร์บอน (Carbon Free Mineral Medium; CFMM)

สารละลายส่วนที่ 1

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.2 กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	0.8 กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์ จนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เตรียมโดยละลายแบคโตอะการ์ 15 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

สารละลายส่วนที่ 2

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.1 กรัม/มิลลิลิตร
เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$)	0.05 กรัม/มิลลิลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	0.05 กรัม/มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายแต่ละชนิดผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตท (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร แล้วเติมสารละลายส่วนที่ 2 ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายส่วนที่ 1 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เตรียมโดยละลายผงวุ้น 15 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

ทริปโตน (Tryptone)	10 กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5 กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์ จนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เตรียมโดยละลายผงวุ้น 15 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani เจือจาง 4 เท่า (0.25X LB)

ผสมอาหารเหลว LB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 750 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ 0.25X LB ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ ให้เติมโซเดียมคลอไรด์ 17.53 กรัม ลงในอาหารเหลว 0.25X LB ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ 0.25X LB ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ให้เติมโซเดียมคลอไรด์ 29.22 กรัม ลงในอาหารเหลว 0.25X LB ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ 0.25X LB ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ให้เติมโซเดียมคลอไรด์ 40.91 กรัม ลงในอาหารเหลว 0.25X LB ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ภาคผนวก ข

สูตรและวิธีการเตรียมสารเคมี

สารละลายฟีแนนทรีน เข้มข้น 10,000 มิลลิกรัม/ลิตร (สำหรับเติมในอาหารเหลว CFMM)

ฟีแนนทรีน	500 มิลลิกรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (Dimethylformamide)	50 มิลลิลิตร

ละลายฟีแนนทรีนในไดเมทิลฟอร์มาไมด์จนสมบูรณ์ กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรอง สำเร็จรูปพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (PTFE) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายฟีแนนทรีน เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร (สำหรับเติมในดิน)

ฟีแนนทรีน	250 มิลลิกรัม
อะซิโตน (Acetone)	250 มิลลิลิตร

ละลายฟีแนนทรีนในอะซิโตนจนสมบูรณ์ กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (PTFE) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	20 กรัม
น้ำปลอดประจุ	100 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 70 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ รอให้เย็นลง แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.5 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายซูโครส เข้มข้น 500 กรัม/ลิตร

ซูโครส (Sucrose)	50 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 1 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

สารละลายไกลซีนบีเทน เข้มข้น 500 กรัม/ลิตร

ไกลซีนบีเทน (Glycine betaine)	50 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายแต่ละชนิดผ่านชุดกรองสำเร็จรูป เซลลูโลสอะซีเตท (CA) ขนาด รูกรอง 0.22 ไมโครเมตร

สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)	10 กรัม
น้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ	100 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารละลาย Tris เข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0

Tris (tris[hydroxymethyl]aminomethane)	12.11 กรัม
น้ำปลอดประจุ	100 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 70 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริดจนมีค่าเท่ากับ 8 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0

EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt)	16.81 กรัม
น้ำปลอดประจุ	100 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 50 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนมีค่าเท่ากับ 8 กวนจนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายไลโซไซม์ เข้มข้น 0.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ไลโซไซม์ (lysozyme)	60 มิลลิกรัม
สารละลาย TE	1 มิลลิลิตร

สารละลายโปรตีนเนสเค เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

โปรตีนเนสเค (proteinase K)	10 มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ	1 มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 5 โมลาร์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	29.22 กรัม
น้ำปลอดประจุ	100 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารละลายเซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ในโซเดียมคลอไรด์ (CTAB/NaCl)

เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB)	10 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	4.1 กรัม
น้ำปลอดประจุ	100 มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุ 70 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก ให้ความร้อนพออุ่น แล้วค่อยๆละลาย CTAB ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์ อัตราส่วน 24:1

คลอโรฟอร์ม	96 มิลลิลิตร
ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์	4 มิลลิลิตร

ฟีนอล:คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 1:1

ฟีนอล	50 มิลลิลิตร
คลอโรฟอร์ม	50 มิลลิลิตร

เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์	70 มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	30 มิลลิลิตร

บัฟเฟอร์ Tris-acetate-EDTA เข้มข้น 50 เท่า (50X TAE)

Tris (tris[hydroxymethyl]aminomethane)	242 กรัม
กรดอะซิติก (glacial acetic acid)	57.1 มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100 มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	1,000 มิลลิลิตร

ละลาย Tris ในน้ำปลอดประจุ 600 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ เติมกรดอะซิติกและสารละลาย EDTA ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

บัฟเฟอร์ Tris-acetate-EDTA เข้มข้น 1 เท่า (1X TAE)

บัฟเฟอร์ 50X TAE	20 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	980 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

เอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	10 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	200 มิลลิลิตร

บัฟเฟอร์ฟอสเฟต pH 7.2

สารละลาย A

ไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	7.80 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

สารละลาย B

โมโนเบสิกโซเดียมฟอสเฟต ($NaH_2PO_4.2H_2O$)	8.90 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ปริมาตร 36 มิลลิลิตร และ 14 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อะกาโรสเจลเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

อะกาโรสเจล	2 กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	100 มิลลิลิตร
หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ค

ข้อมูลดิบต่างๆ ในการตรึงแบคทีเรีย

ตารางที่ ค-1 ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/กรัมแห้งวัสดุตรึง) ที่สามารถเกาะติดบนกาบมะพร้าวเมื่อแปรผันปริมาณกาบมะพร้าวโดยใช้ระยะเวลาตรึง 24 ชั่วโมง

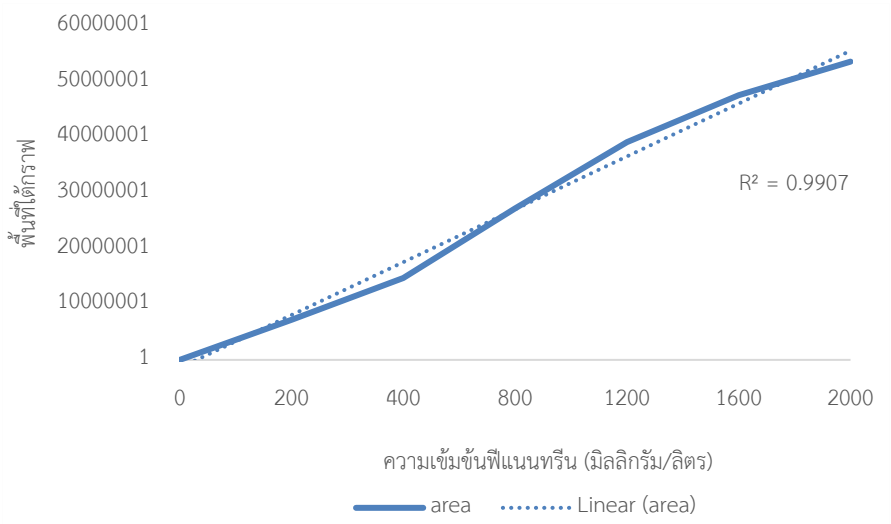
ปริมาณกาบมะพร้าว (เปอร์เซ็นต์) (น้ำหนัก/ปริมาตร)	แบคทีเรีย (CFU/กรัมกาบมะพร้าวแห้ง)			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อน
2	6.40×10^{8}	7.60×10^{8}	1.160×10^{9}	$8.53\times10^{8} \pm 2.70$
4	6.00×10^{8}	6.25×10^{8}	7.01×10^{8}	$6.42\times10^{8} \pm 0.52$
6	9.30×10^{8}	9.60×10^{8}	9.60×10^{8}	$9.27\times10^{8} \pm 0.42$
8	1.06×10^{9}	1.01×10^{9}	9.30×10^{8}	$1.00\times10^{9} \pm 0.02$
10	2.28×10^{8}	3.62×10^{8}	3.25×10^{8}	$3.05\times10^{8} \pm 0.70$

ตารางที่ ค-2 ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/กรัมแห้งวัสดุตรึง) ที่สามารถเกาะติดบนกาบมะพร้าวเมื่อแปรผันระยะเวลาตรึงโดยใช้ปริมาณกาบมะพร้าว 8 เปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาในการตรึง (ชั่วโมง)	แบคทีเรีย(CFU/กรัมกาบมะพร้าวแห้ง)			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อน
0	0	0	0	0
3	8.20×10^{8}	1.06×10^{9}	8.40×10^{8}	$7.40\times10^{8} \pm 0.54$
6	7.20×10^{8}	8.60×10^{8}	5.60×10^{8}	$7.13\times10^{8} \pm 0.56$
9	8.8×10^{8}	9.40×10^{8}	8.00×10^{8}	$8.73\times10^{8} \pm 0.66$
12	1.69×10^{9}	1.54×10^{9}	1.54×10^{9}	$1.59\times10^{9} \pm 0.90$
24	1.06×10^{9}	1.01×10^{9}	9.39×10^{8}	$1.00\times10^{9} \pm 0.18$
48	5.75×10^{8}	8.13×10^{8}	6.63×10^{8}	$6.83\times10^{8} \pm 0.73$
72	3.58×10^{8}	3.73×10^{8}	3.50×10^{8}	$3.60\times10^{8} \pm 0.16$

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ง
ข้อมูลดิบต่าง ๆ ในการทดลองกำจัดฟีแนนทรีน



รูปที่ ง-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายฟีแนนทรีน

ตารางที่ ง-1 การคำนวณการนำกลับของฟีแนนทรีนจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM วิเคราะห์โดย HPLC

ความเข้มข้นฟีแนนทรีน เริ่มต้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	**ความเข้มข้นที่นำกลับ**	**เปอร์เซ็นต์ การนำกลับของสาร**
200	206.35 196.35 190.19	98.83±4.05

ตารางที่ ง-2 ข้อมูลดิบของความเข้มข้นฟีแนนทรีนที่เหลือในการทดสอบการกำจัดฟีแนนทรีนแบบกึ่งต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยเติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วัน เป็นระยะเวลา 15 วัน

วันที่	ชุดทดลอง	ความเข้มข้นฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM (มิลลิกรัม/ลิตร)			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อน
0	ชุดควบคุม	206.17	206.47	197.68	203.43±4.90
3	ชุดควบคุม	163.50	158.30	154.60	158.80±5.63
	ชุดกาบมะพร้าว	61.20	82.29	22.30	61.20±42.48
	ชุดแบคทีเรียตรึง	0.00	0.00	3.92	0.64±2.85
	ชุดแบคทีเรียอิสระ	2.02	1.92	2.59	2.02±0.65
6	ชุดควบคุม	366.22	284.55	369.23	318.71±35.50
	ชุดกาบมะพร้าว	153.30	212.49	163.92	153.30±18.85
	ชุดแบคทีเรียตรึง	49.54	0.51	10.59	41.41±32.50
	ชุดแบคทีเรียอิสระ	8.08	7.85	3.04	8.08±3.66
9	ชุดควบคุม	502.37	505.75	514.00	523.47±7.07
	ชุดกาบมะพร้าว	175.89	159.66	179.61	175.89±11.56
	ชุดแบคทีเรียตรึง	141.22	124.92	142.35	136.16±11.18
	ชุดแบคทีเรียอิสระ	159.22	148.21	163.52	159.22±11.01
12	ชุดควบคุม	790.83	766.63	783.00	826.95±12.66
	ชุดกาบมะพร้าว	378.07	348.32	320.22	378.07±43.27
	ชุดแบคทีเรียตรึง	297.04	350.83	316.01	321.29±26.39
	ชุดแบคทีเรียอิสระ	317.50	328.75	316.01	317.50±10.24
15	ชุดควบคุม	940.19	947.55	925.04	1019.00±12.24
	ชุดกาบมะพร้าว	587.50	464.55	682.78	587.50±109.63
	ชุดแบคทีเรียตรึง	428.64	432.14	440.05	433.61±5.73
	ชุดแบคทีเรียอิสระ	557.08	641.97	614.77	557.08±99.27

ตารางที่ ง-3 ข้อมูลดิบของความเข้มข้นฟีแนนทรีนในกาบมะพร้าวและแบคทีเรียในการทดสอบการกำจัดฟีแนนทรีนแบบกึ่งต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยเติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วัน เป็นระยะเวลา 15 วัน

วันที่	**ชุดทดลอง**	**ความเข้มข้นฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในกาบมะพร้าว (มิลลิกรัม/0.05 กรัมกาบมะพร้าว)**			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อน
3	ชุดกาบมะพร้าว	124.83	134.58	56.73	105.38±42.41
	ชุดแบคทีเรียตรึง	23.39	9.07	11.43	14.63±7.67
6	ชุดกาบมะพร้าว	158.48	212.93	153.14	174.85±33.09
	ชุดแบคทีเรียตรึง	1.60	0.17	0.17	0.64±0.83
9	ชุดกาบมะพร้าว	345.02	275.42	393.59	338.01±59.39
	ชุดแบคทีเรียตรึง	35.46	17.09	23.01	25.19±9.38
12	ชุดกาบมะพร้าว	407.82	418.49	435.82	421.82±14.13
	ชุดแบคทีเรียตรึง	77.39	75.96	65.98	73.11±6.22
15	ชุดกาบมะพร้าว	382.42	508.53	296.38	395.78±106.70
	ชุดแบคทีเรียตรึง	95.95	100.92	159.40	118.76±35.29

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ง-4 ข้อมูลดิบของการกำจัดฟีแนนทรีนในการการทดสอบการกำจัดฟีแนนทรีนแบบกึ่งต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM โดยเติมฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 3 วัน เป็นเวลา 24 วัน ของแบคทีเรียตรึง

วันที่	เปอร์เซ็นต์การกำจัดฟีแนนทรีน			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อน
3	100.00	100.00	97.53	99.15±1.42
6	84.46	99.84	96.68	94.36±7.20
9	73.02	76.14	72.81	73.99±1.80
12	64.08	57.58	61.79	61.11±3.93
15	57.93	57.59	56.82	57.44±1.05
18	70.42	51.29	48.32	56.80±11.37
21	63.38	64.54	62.23	64.94±3.13
24	68.88	65.32	72.43	74.36±8.12

ตารางที่ ง-5 การคำนวณการนำกลับของฟีแนนทรีนจากดิน วิเคราะห์โดย HPLC

ความเข้มข้นฟีแนนทรีนเริ่มต้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	ความเข้มข้นที่นำกลับ	เปอร์เซ็นต์การนำกลับของสาร
150	133.20 136.29 131.80	89.18±1.53

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ง-6 ข้อมูลดิบของฟีแนนทรีนคงเหลือในการทดลองกำจัดฟีแนนทรีนในดินปนเปื้อนฟีแนนทรีนความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมดินแห้ง เป็นเวลา 28 วัน

เวลา (วัน)	ชุดทดลอง	เปอร์เซ็นต์ฟีแนนทรีนคงเหลือ			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อน
0	ชุดควบคุมปราศจากเชื้อ	109.11	84.34	106.54	100±11.59
14	ชุดควบคุมปราศจากเชื้อ	78.53	68.96	-	71.74±6.76
	ชุดกาบมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์	65.32	80.81	-	73.09±10.96
	ชุดแบคทีเรียตรึง 1 เปอร์เซ็นต์	35.20	59.46	-	47.33±17.15
	ชุดแบคทีเรียตรึง 5 เปอร์เซ็นต์	20.16	19.91	-	15.23±8.32
	ชุดแบคทีเรียตรึง 10 เปอร์เซ็นต์	21.76	29.11	19.68	23.52±4.95
28	ชุดควบคุมปราศจากเชื้อ	62.96	72.46	58.35	64.59±7.20
	ชุดกาบมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์	8.86	7.73	4.34	6.98±2.36
	ชุดแบคทีเรียตรึง 1 เปอร์เซ็นต์	10.55	4.34	6.16	10.95±4.99
	ชุดแบคทีเรียตรึง 5 เปอร์เซ็นต์	1.50	3.67	1.82	2.33±1.17
	ชุดแบคทีเรียตรึง 10 เปอร์เซ็นต์	5.54	2.29	9.39	5.74±3.55

หมายเหตุ – คือค่าที่มีความคลาดเคลื่อนที่มาก จึงไม่อาจนำมาคำนวณ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก จ
ข้อมูลดิบต่างๆ ในการการพัฒนาวิธีการเตรียมหัวเชื้อสำหรับแบคทีเรียตรึง เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาแบคทีเรีย

ตารางที่ จ-1 จำนวน *Pseudomonas* sp. J801 ที่รอดชีวิตหลังจากทำให้แห้งด้วยการผึ่งลมและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเติมสารป้องกันแบคทีเรียความเข้มข้นชนิดละ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารแขวนลอยแบคทีเรีย

เวลา (วัน)	สารป้องกันแบคทีเรีย	จำนวน *Pseudomonas* sp. J801 (Log CFU/ มิลลิลิตร)			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อน
0	ไกลซีนบีเทน	5.48	5.70	5.78	5.65±0.16
	ซูโครส	8.26	8.30	8.20	8.25±0.05
3	ไกลซีนบีเทน	0	0	0	0
	ซูโครส	6.70	6.78	6.60	7.41±0.03
7	ไกลซีนบีเทน	0	0	0	0
	ซูโครส	0	0	0	0

ตารางที่ จ-2 จำนวน *Pseudomonas* sp. J801 ที่รอดชีวิตหลังจากทำให้แห้งด้วยการผึ่งลมและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแปรผันความเข้มข้นซูโครส (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารแขวนลอยแบคทีเรีย

เวลา (วัน)	ความเข้มข้นซูโครส (น้ำหนัก/ปริมาตร)	จำนวน *Pseudomonas* sp. J801 (Log CFU/ มิลลิลิตร)			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อน
0	1 เปอร์เซ็นต์	8.26	8.20	8.28	5.65±0.16
	2 เปอร์เซ็นต์	8.26	8.30	8.20	8.25±0.05
	3.5 เปอร์เซ็นต์	8.85	8.78	8.78	8.80±0.04
	5 เปอร์เซ็นต์	8.78	8.78	8.90	8.82±0.07
3	1 เปอร์เซ็นต์	0	0	0	0
	2 เปอร์เซ็นต์	6.70	6.78	6.60	6.69±0.09
	3.5 เปอร์เซ็นต์	7.11	7.18	7.23	7.17±0.06
	5 เปอร์เซ็นต์	7.38	7.40	7.45	7.41±0.03

ตารางที่ จ-2 (ต่อ) จำนวน *Pseudomonas* sp. J801 ที่รอดชีวิตหลังจากทำให้แห้งด้วยการผึ่งลมและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแปรผันความเข้มข้นซูโครส (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารแขวนลอยแบคทีเรีย

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นซูโครส (น้ำหนัก/ปริมาตร)**	**จำนวน *Pseudomonas* sp. J801 (Log CFU/ มิลลิลิตร)**			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อน
7	1 เปอร์เซ็นต์	0	0	0	0
	2 เปอร์เซ็นต์	0	0	0	0
	3.5 เปอร์เซ็นต์	0	0	0	0
	5 เปอร์เซ็นต์	0	0	0	0

ตารางที่ จ-3 จำนวนแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. J801 ที่รอดชีวิตหลังจากทำให้แห้งด้วยการผึ่งลมและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.25xLB

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์**	**จำนวน *Pseudomonas* sp. J801 (Log CFU/ มิลลิลิตร)**			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อน
0	0.3 โมลาร์	8.18	8.23	8.26	8.22±0.04
	0.5 โมลาร์	8.04	8.11	7.90	8.22.±0.11
	0.7 โมลาร์	6.85	6.90	6.86	6.86.±0.03
3	0.3 โมลาร์	7.04	7.26	7.11	7.14.±0.11
	0.5 โมลาร์	6.85	6.70	7.04	6.86.±0.17
	0.7 โมลาร์	0	0	0	0
7	0.3 โมลาร์	0	0	0	0
	0.5 โมลาร์	4.15	4.00	4.15	4.15±0.08
	0.7 โมลาร์	0	0	0	0

ตารางที่ จ-4 การกำจัดฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ในระยะเวลา 3 วัน ของแบคทีเรียตรึงหลังการเก็บรักษา

ระยะเวลาเก็บรักษาแบคทีเรียตรึง (วัน)	การกำจัดฟีแนนทรีน (เปอร์เซ็นต์)			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อน
0	100	100	97.52	99.18±1.42
7	77.97	81.84	83.70	81.17±91
14	73.38	75.99	-	74.18±2.55
21	63.06	62.26	57.23	60.85±3.16

หมายเหตุ – คือค่าที่มีความคลาดเคลื่อนที่ จึงไม่อาจนำมาคำนวณ

ตารางที่ จ-4 การกำจัดฟีแนนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ในระยะเวลา 3 วัน ของแบคทีเรียตรึงหลังการเก็บรักษา

ระยะเวลาเก็บรักษาแบคทีเรียตรึง (วัน)	ความเข้มข้นฟีแนนทรีนคงเหลือในกาบมะพร้าว (มิลลิกรัม/กาบมะพร้าว 0.05 กรัม)			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อน
0	23.39	9.07	11.43	14.63±7.64
7	26.06	33.40	20.21	32.10±6.60
14	59.09	74.47	-	66.78±10.88
21	114.26	137.36	112.22	121.28±13.96

หมายเหตุ – คือค่าที่มีความคลาดเคลื่อนที่ จึงไม่อาจนำมาคำนวณ

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุพรรณิการ์ จันทร์ทับ เกิดเมื่อวันที่ 22 พฤศจิกายน พ.ศ. 2533 ที่จังหวัดชุมพร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา (พันธุ์ศาสตร์) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2555 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2556

ส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์นี้ได้รับการตอบรับ Proceeding ให้นำเสนอต่อที่ประชุมวิชาการในงาน "The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB2016)" และมีรายงานการประชุมฉบับสมบูรณ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University