บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของใบจามจุรีและดินที่ใช้ในการทดลอง

ใบจามจุรีที่นำมาใช้ในการทดลองนี้เก็บมาจากบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีลักษณะใบแห้งสีน้ำตาลที่ร่วงหล่นบนพื้นดิน ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของใบจามจุรีที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ได้มาจาก ฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของใบจามจุรีที่นำมาใช้ในการทดลอง

พารามิเตอร์	ผลการวิเคราะห์
ค่าความเป็นกรดด่าง	6.8*
ค่าความจุการอุ้มน้ำ (%)	377.14*
ปริมาณสารอินทรีย์ (%)	44.19*
ปริมาณคาร์บอน (%)	25.69**
ปริมาณไนโตรเจน (%)	2.38**
ปริมาณฟอสฟอรัส (%)	0.07**
ปริมาณโปแทสเซียม (%)	1.79**
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน	10.79**

หมายเหตุ * วิเคราะห์โดยฝ่ายวิจัยดิน กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

** วิเคราะห์โดย ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดินที่ใช้ในการทดลองเก็บมาจากบริเวณเนินเขาในป่าเขาใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา เป็นลักษณะดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ ตรวจสอบ PAHs ในดินโดยการสกัดและวิเคราะห์ด้วยวิธี GC แล้วไม่พบว่ามีการปนเปื้อนสารประกอบ PAHs

ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ ได้มาจาก ฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดิน

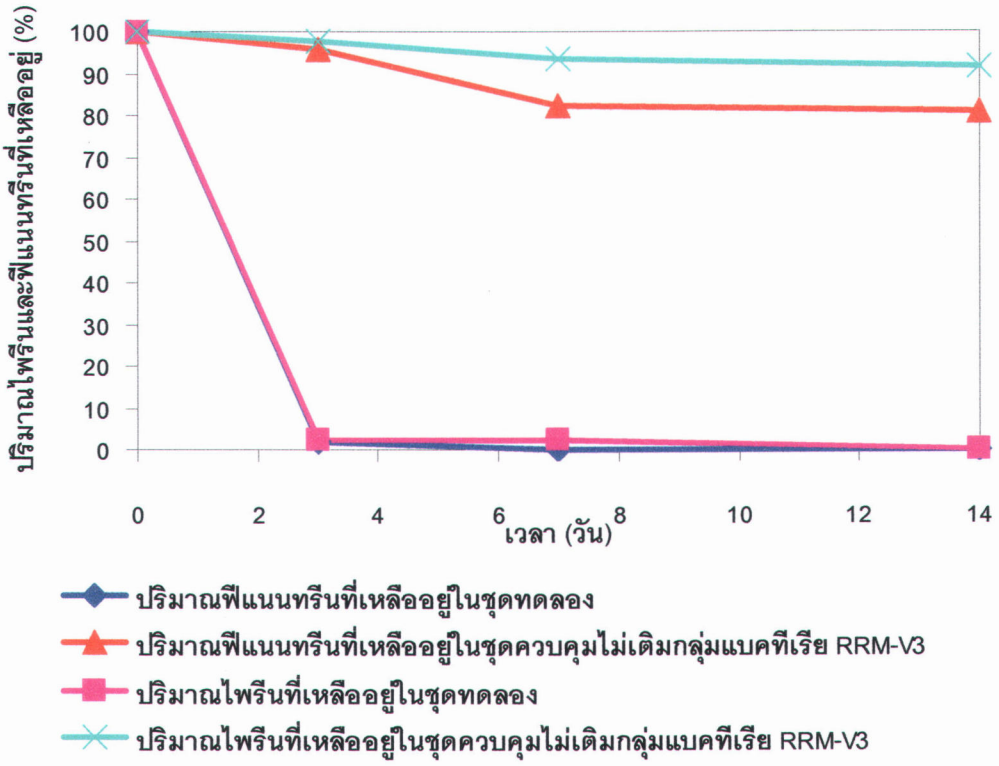
พารามิเตอร์	ผลการวิเคราะห์
ลักษณะดิน	ดินผสม *
ค่าความเป็นกรด ด่าง	5.5*
ค่าความจุการอุ้มน้ำ (%)	75.48*
ปริมาณสารอินทรีย์ (%)	13.10**
ปริมาณคาร์บอน (%)	7.62**
ปริมาณไนโตรเจน (%)	0.43**
ปริมาณฟอสฟอรัส (%)	0.12**
ปริมาณโพแตสเซียม (%)	0.87**
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน	17.72**

หมายเหตุ * วิเคราะห์โดยฝ่ายวิจัยดิน กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

** วิเคราะห์โดย ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2 การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM

กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ซึ่งใช้เตรียมเป็นหัวเชื้อในการทดลอง หลังจากนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมฟีแนนทรีนและไพรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้จนไม่สามารถตรวจสอบได้ภายในเวลา 14 วัน (รูปที่ 4.1)

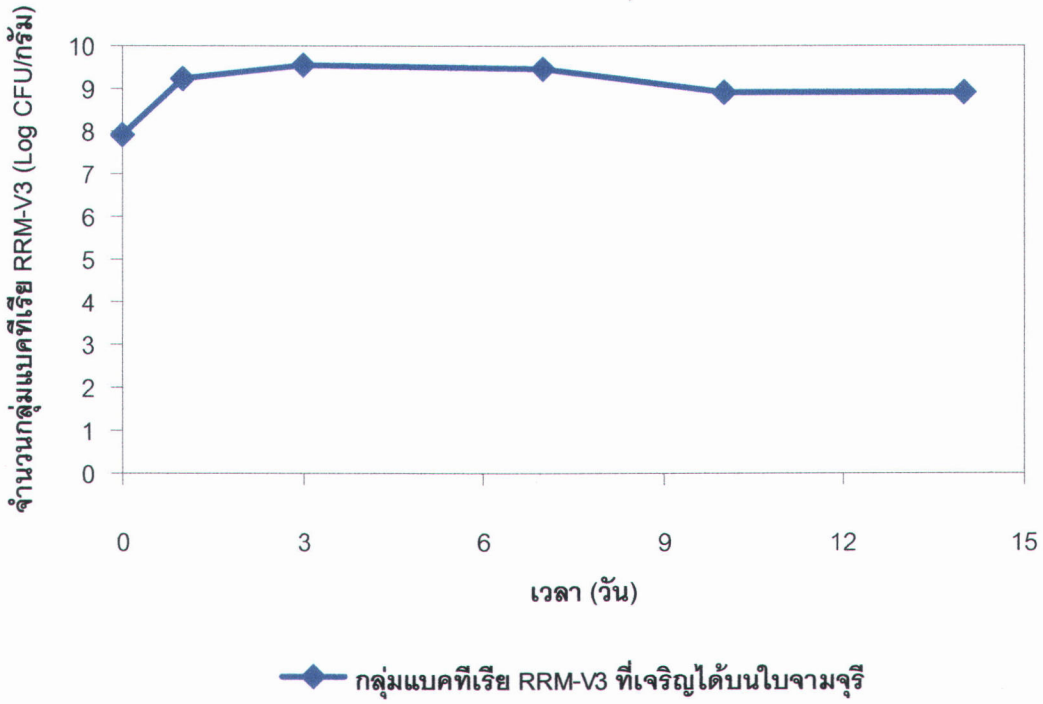


รูปที่ 4.1 การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM

4.3 การเตรียมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนใบจามจุรีปลอดเชื้อ

นำใบจามจุรีปลอดเชื้อที่ปรับความชื้นและความเป็นกรดด่างแล้วมาผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 8 log CFU ต่อกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างที่วันที่ 0, 1, 3, 7, 10, และ 14 เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่อยู่รอดได้ในใบจามจุรี บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB

จากการทดลอง พบว่า วันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี มีค่าเริ่มต้น เท่ากับ 7.91 log CFU ต่อกรัม หลังจากนั้น พบว่า กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีจำนวนเพิ่มขึ้นสูงสุดจนถึง 9.54 log CFU ต่อกรัม ในวันที่ 3 และเริ่มลดลงในวันที่ 10 ของการทดลอง แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้เมื่อเลี้ยงบนใบจามจุรี ดังนั้นจะใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีเป็นเวลา 3 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อบำบัดดินปนเปื้อนต่อไป (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนใบจามจุรี

4.4 เปรียบเทียบการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมโดยวิธีต่าง ๆ

การเตรียมหัวเชื้อที่ใช้ในการทดลอง มี 3 ชนิด ดังนี้

ก. หัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนใบจามจุรี

ข. หัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในน้ำดิน

ค. หัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM

เปรียบเทียบการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมโดยวิธีต่างๆ โดยแบ่งออกเป็น 7 ชุด ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 ดินปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน เป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาการสลายของ PAHs เมื่อปราศจากปัจจัยทางชีวภาพจากดิน

ชุดการทดลองที่ 2 ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน เป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาการสลายของ PAHs เมื่อมีปัจจัยทางชีวภาพจากดิน

ชุดการทดลองที่ 3 ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน และใบจามจุรีปลอดเชื้อ เป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาผลของใบจามจุรีต่อจุลชีพในดินที่สามารถสลาย PAHs ได้

ชุดการทดลองที่ 4 ดินปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน และผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนใบจามจุรีปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาเฉพาะความสามารถของกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนใบจามจุรีต่อการย่อยสลายของ PAHs

ชุดการทดลองที่ 5 ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน และหัวเชื้อที่เตรียมบนใบจามจุรีตามข้อ ก.

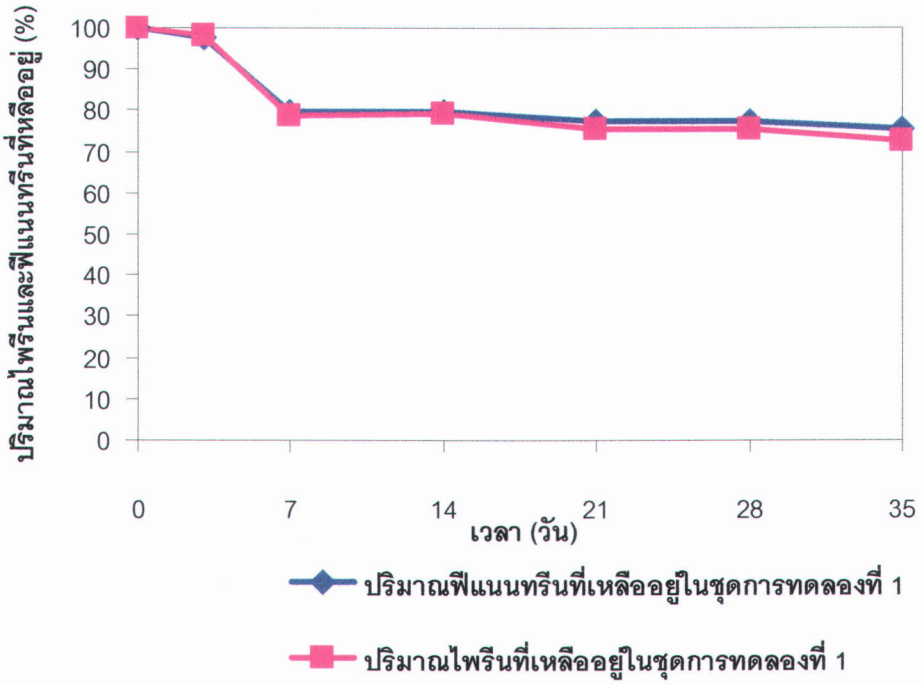
ชุดการทดลองที่ 6 ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน และหัวเชื้อที่เตรียมในน้ำดินตามข้อ ข.

ชุดการทดลองที่ 7 ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน และหัวเชื้อที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ตามข้อ ค.

4.4.1 การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินปลอดเชื้อในชุดการทดลองที่ 1

ชุดการทดลองที่ 1 ใช้ดินปลอดเชื้อผสมไพรีนและฟีแนนทรีนเพื่อตรวจสอบการสลายของสารประกอบ PAHs เมื่อปราศจากปัจจัยทางชีวภาพจากดิน ทำการทดลองโดยใช้ดินปลอดเชื้อที่ปรับความชื้นและความเป็นกรดด่างแล้วมาผสมกับสารละลายไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 0, 3, 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน

ผลการทดลองพบว่า ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนลดลงจากวันแรกจนในวันที่ 35 ของการทดลองตรวจพบปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองเท่ากับ 72.51 และ 75.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.3) และตลอดการทดลองไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB



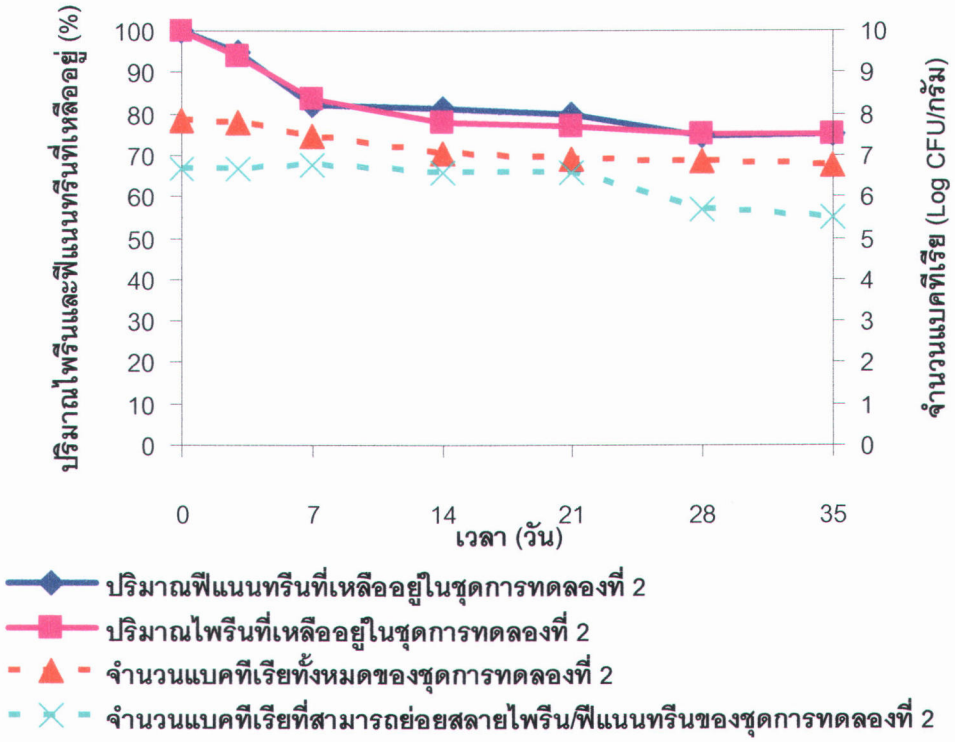
รูปที่ 4.3 ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในดินปลอดเชื้อของชุดการทดลองที่ 1

4.4.2 การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อในชุดการทดลองที่ 2

ชุดการทดลองที่ 2 ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมไพรีนและฟีแนนทรีนเพื่อตรวจสอบการสลายของสารประกอบ PAHs เมื่อมีปัจจัยทางชีวภาพจากดิน ทำการทดลองโดยใช้ดินไม่ปลอดเชื้อที่ปรับความชื้นและความเป็นกรดด่างแล้วมาผสมกับสารละลายไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 0, 3, 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน

ผลการทดลองพบว่า ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนลดลงจนในวันที่ 35 ของการทดลองตรวจพบปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองเท่ากับ 74.97 และ 74.99 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในดิน วันที่ 0 มีค่าเท่ากับ 7.83 log CFU ต่อกรัม และจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน มีค่าเท่ากับ 6.69 log CFU ต่อกรัม จำนวนแบคทีเรียลดลงเรื่อยๆ จนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 35 จะมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 6.76 และจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน มีค่าเท่ากับ 5.5 log CFU ต่อกรัม (รูปที่ 4.3)

จะเห็นว่าปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่ลดลงนี้ไม่มีความแตกต่างกับชุดการทดลองในดินปลอดเชื้อ แสดงว่าปัจจัยทางชีวภาพในดินที่ใช้ในการทดลองน่าจะไม่มีผลต่อการสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนที่ปนเปื้อนในดิน



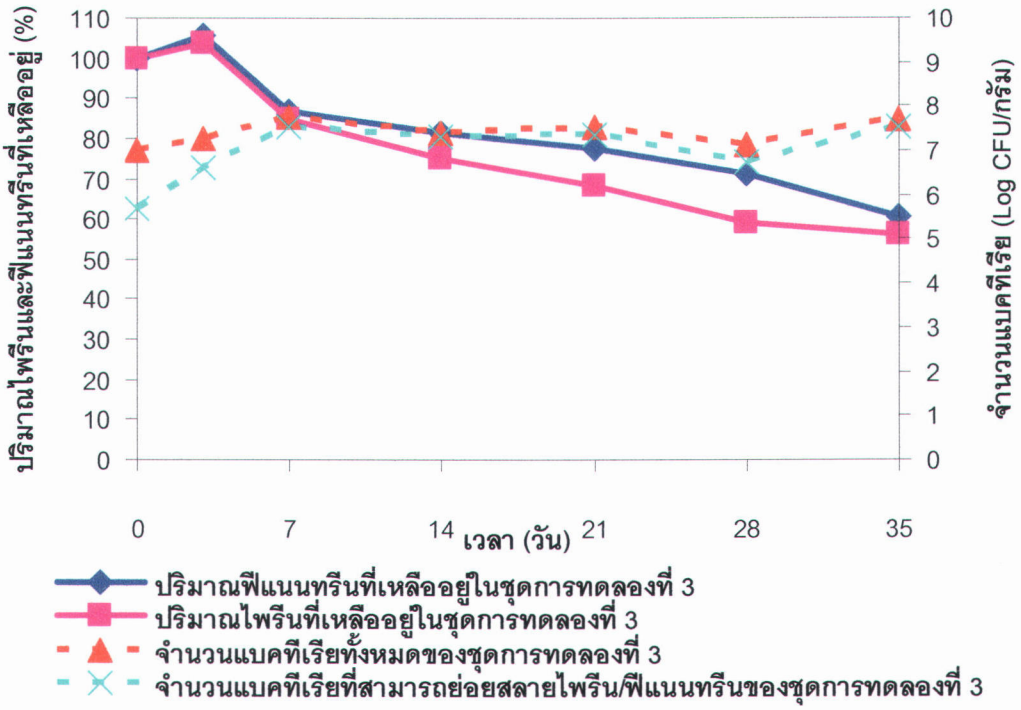
รูปที่ 4.4 ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในดินไม่ปลอดเชื้อของชุดการทดลองที่ 2

4.4.3 การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อที่เติมใบจามจุรีปลอดเชื้อในชุดการทดลองที่ 3

ชุดการทดลองที่ 3 ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน และใบจามจุรีปลอดเชื้อ เพื่อศึกษาผลของใบจามจุรีต่อจุลชีพในดินที่สามารถสลายสารประกอบ PAHs ได้ ทำการทดลองโดยผสมดินไม่ปลอดเชื้อกับใบจามจุรีปลอดเชื้อที่ปรับความชื้นและความเป็นกรดด่างแล้ว จากนั้นนำไปผสมกับสารละลายไพรีนและฟีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 0, 3, 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน

ผลการทดลอง พบว่า ไพรีนและฟีแนนทรีนลดลงมากกว่าชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ที่ไม่ได้เติมใบจามจุรี โดยในวันที่ 35 มีปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนเหลืออยู่ 56.24 และ 60.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และผลการนับจำนวนแบคทีเรีย พบว่า ที่วันที่ 0 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในดิน มีค่าเท่ากับ 7.0 log CFU ต่อกรัม และจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน มีค่าเท่ากับ 5.7 log CFU ต่อกรัม และพบว่า แบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งมีค่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 7.76 log CFU ต่อกรัม และแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน มีค่าเท่ากับ 7.54 log CFU ต่อกรัม จนถึงวันที่ 35 พบจำนวนแบคทีเรียในดินทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 7.70 log CFU ต่อกรัม และจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน มีค่าเท่ากับ 7.50 log CFU ต่อกรัม (รูปที่ 4.5)

แสดงว่าใบจามจุรีที่เติมลงไปน่าจะมีผลให้แบคทีเรียในดินรวมทั้งแบคทีเรียในดินที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน สามารถเจริญและใช้สารประกอบ PAHs ทั้ง 2 ชนิดได้ และใบจามจุรีทำให้ไพรีนและฟีแนนทรีนถูกปล่อยออกมาจากดินมากขึ้นในวันที่ 3 ดังจะเห็นได้จากปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนเหลืออยู่ มีมากกว่าในวันแรกของการทดลอง



รูปที่ 4.5 ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในดินไม่ปลอดเชื้อที่เติมใบจามจุรีปลอดเชื้อของชุดการทดลองที่ 3

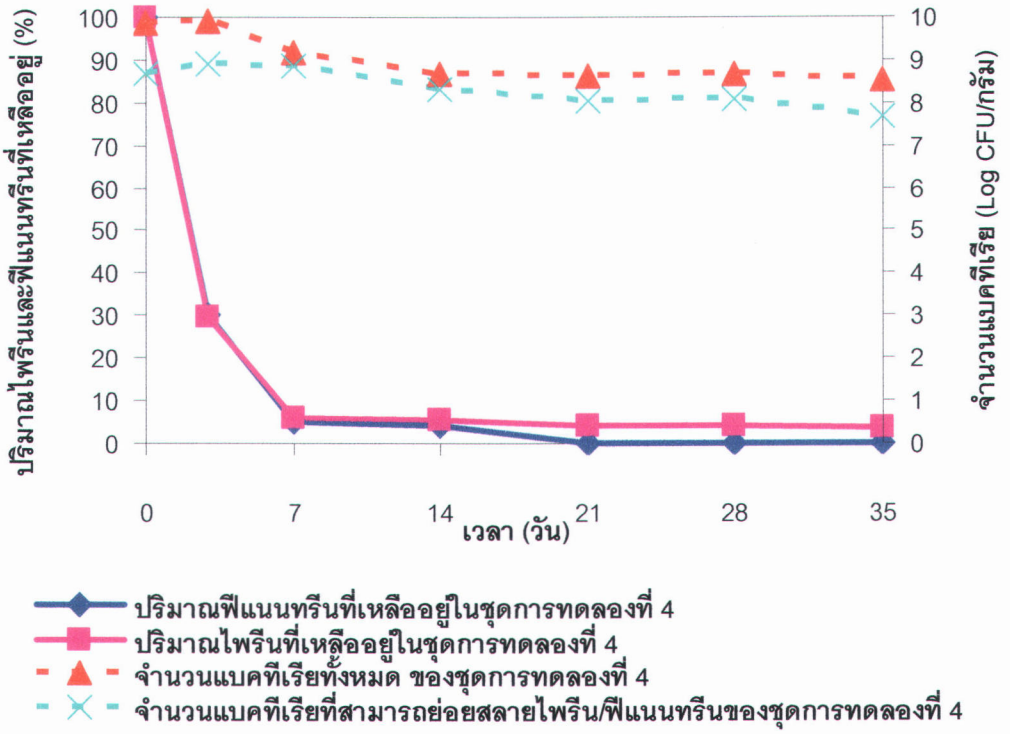
4.4.4 การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อ (ชุดการทดลองที่ 4)

ชุดการทดลองที่ 4 ใช้ดินปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน และผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีเป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาเฉพาะความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนใบจามจุรีต่อการย่อยสลายของสารประกอบ PAHs ในดิน ทำการทดลองโดยใช้ดินปลอดเชื้อที่ปรับความชื้นและความเป็นกรดด่างแล้ว ผสมกับสารละลายไพรีนและฟีแนนทรีน ความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. และผสมกับกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อมาแล้ว 3 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 0, 3, 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน

ผลการทดลอง พบว่า ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 3 ของการทดลองมีปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่เท่ากับ 29.59 และ 29.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และลดลงจนไพรีนเหลือเพียง 3.61 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 35 ในขณะที่ปริมาณฟีแนนทรีนลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ในวันที่ 21 ของการทดลอง

เนื่องจากในชุดการทดลองที่ 4 ใช้ดินปลอดเชื้อ ดังนั้นจึงมีเฉพาะจำนวนแบคทีเรียของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เท่านั้น ผลการนับจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 พบว่าวันที่ 0 มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 9.86 log CFU ต่อกรัม และจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน มีค่าเท่ากับ 8.69 log CFU ต่อกรัม และกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีจำนวนเพิ่มขึ้นสูงที่สุดที่วันที่ 3 ของการทดลอง ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 9.92 log CFU ต่อกรัม และจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน มีค่าเท่ากับ 8.90 log CFU ต่อกรัม หลังจากนั้นจำนวนแบคทีเรียมีแนวโน้มลดลงอย่างช้าๆ จนถึงวันที่ 35 พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 8.69 log CFU ต่อกรัม และจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน เท่ากับ 8.09 log CFU ต่อกรัม (รูปที่ 4.6)

แสดงว่าหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมในใบจามจุรีเมื่อเติมในลงดินปนเปื้อนแล้ว จะรอดชีวิตได้และย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 4.6 ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในดินปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อ (ชุดการทดลองที่ 4)

4.4.5 การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อ (ชุดการทดลองที่ 5)

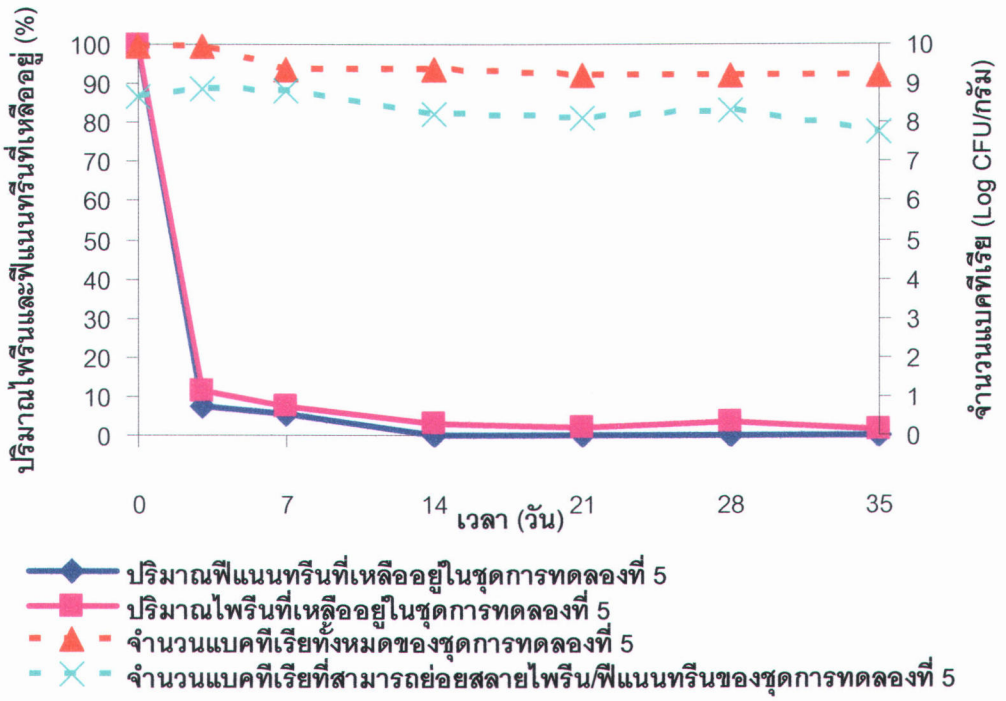
ชุดการทดลองที่ 5 ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน และผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี เพื่อศึกษาการรอดชีวิตและความสามารถในการย่อยสลายสารพิษของหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนใบจามจุรีเมื่อเติมลงในดินตามธรรมชาติที่สารพิษที่ปนเปื้อนอยู่ ทำการทดลองโดยใช้ดินไม่ปลอดเชื้อที่ปรับความชื้นและความเป็นกรดด่างแล้วผสมกับสารละลายไพรีนและฟีแนนทรีน ความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. และผสมกับกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อมาแล้ว 3 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 0, 3, 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน

ผลการทดลองพบว่า ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนลดลงอย่างรวดเร็วมาก ในวันที่ 3 ของการทดลองตรวจพบปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่เพียง 11.25 และ 7.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในวันที่ 14 ปริมาณฟีแนนทรีนลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ ส่วนปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ เพียง 1.68 เปอร์เซ็นต์ ที่วันที่ 35

การนับจำนวนแบคทีเรีย จะนับทั้งแบคทีเรียในดินและกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เติมลงไป พบว่าวันที่ 0 ของการทดลองมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 9.93 log CFU ต่อกรัม และจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน มีค่าเท่ากับ 8.68 log CFU ต่อกรัม และแบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในวันที่ 3 ของการทดลองโดยมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 9.95 log CFU ต่อกรัม และจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน มีค่าเท่ากับ 8.84 log CFU ต่อกรัม จากนั้นจำนวนแบคทีเรียเริ่มลดลงเล็กน้อย โดยที่วันที่ 35 ของการทดลองมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 9.19 log CFU ต่อกรัม และจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน มีค่าเท่ากับ 7.75 log CFU ต่อกรัม (รูปที่ 4.7)

จะเห็นว่าการเติมหัวเชื้อ RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีลงไปในดินไม่ปลอดเชื้อ ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนในดินลดลงอย่างมากและรวดเร็วกว่าในชุดการทดลองที่ 4 ซึ่งใช้ดินปลอดเชื้อ แสดงว่าเชื้อในดินก็มีส่วนช่วยย่อยสลายสารประกอบ PAHs เช่นกัน นอกจากใบจามจุรีจะช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีนและเป็นแหล่งอาหารให้แก่กลุ่มเชื้อแบคทีเรีย RRM-

V3 แล้ว ยังอาจมีส่วนช่วยส่งเสริมความสามารถของแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีอยู่ในดินได้อีกทางหนึ่งด้วย



รูปที่ 4.7 ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อ (ชุดการทดลองที่ 5)

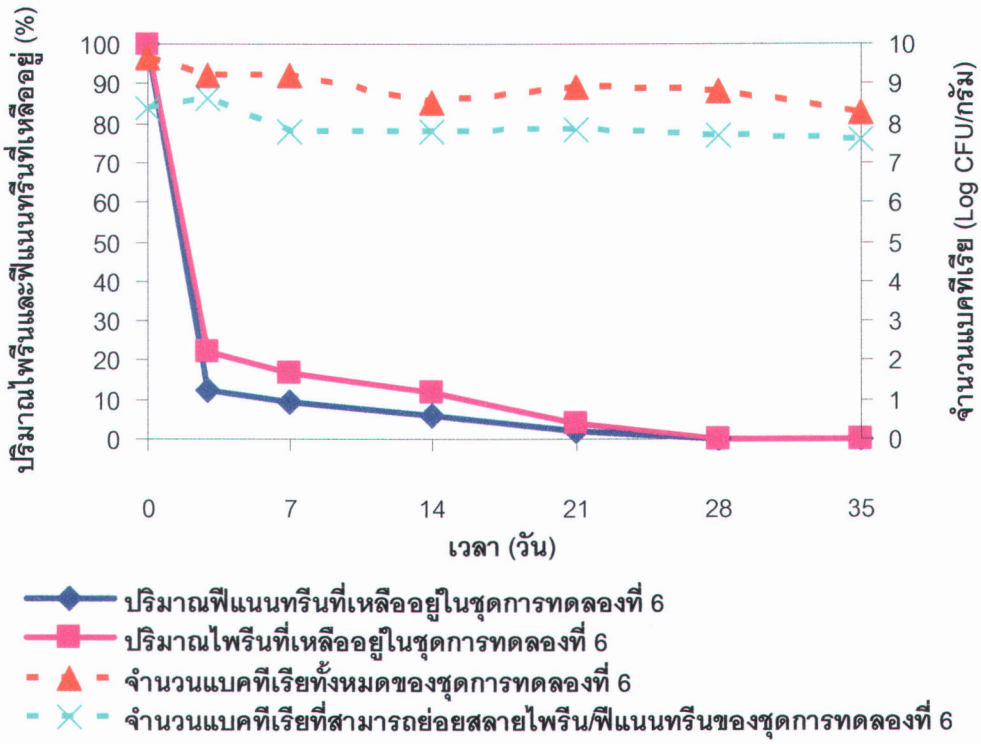
4.4.6 การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในน้ำดินปลอดเชื้อ (ชุดการทดลองที่ 6)

ชุดการทดลองที่ 6 ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน และผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในน้ำดินปลอดเชื้อ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ของหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมในแบบต่างๆ ว่ามีความแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด ทำการทดลองโดยใช้ดินไม่ปลอดเชื้อที่ปรับความชื้นและความเป็นกรดด่างแล้ว ผสมกับสารละลายไพรีนและฟีแนนทรีน ความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. และผสมกับกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในน้ำดินปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 0, 3, 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน

ผลการทดลองพบว่า การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยวันที่ 3 ของการทดลองตรวจพบปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่เท่ากับ 22.21 และ 12.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้น PAHs ปริมาณฟีแนนทรีนลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ในวันที่ 28 ในขณะที่วันที่ 35 ของการทดลองพบว่ามีปริมาณไพรีนเหลืออยู่เพียง 0.03 เปอร์เซ็นต์

ผลการนับจำนวนแบคทีเรีย พบว่าวันที่ 0 ของการทดลองมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 9.65 และจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน มีค่าเท่ากับ 8.38 log CFU ต่อกรัม และหลังจากนั้นจำนวนแบคทีเรียมีแนวโน้มลดลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งหลังจาก 7 วัน ในวันที่ 35 พบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 8.30 log CFU ต่อกรัม และจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน มีค่าเท่ากับ 7.59 log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ (รูปที่ 4.8)

แสดงว่าการเตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยการเลี้ยงในน้ำดินมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไพรีนและฟีแนนทรีนได้น้อยกว่าหัวเชื้อที่เตรียมบนใบจามจุรีในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งดูจากความเร็วในการย่อยสลาย จะเห็นว่าหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนใบจามจุรี ทำให้ไพรีนและฟีแนนทรีนลดลงได้เร็วกว่า



รูปที่ 4.8 **ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย** RRM-V3 **ที่เลี้ยงในน้ำดินปลอดเชื้อ (ชุดการทดลองที่** 6)

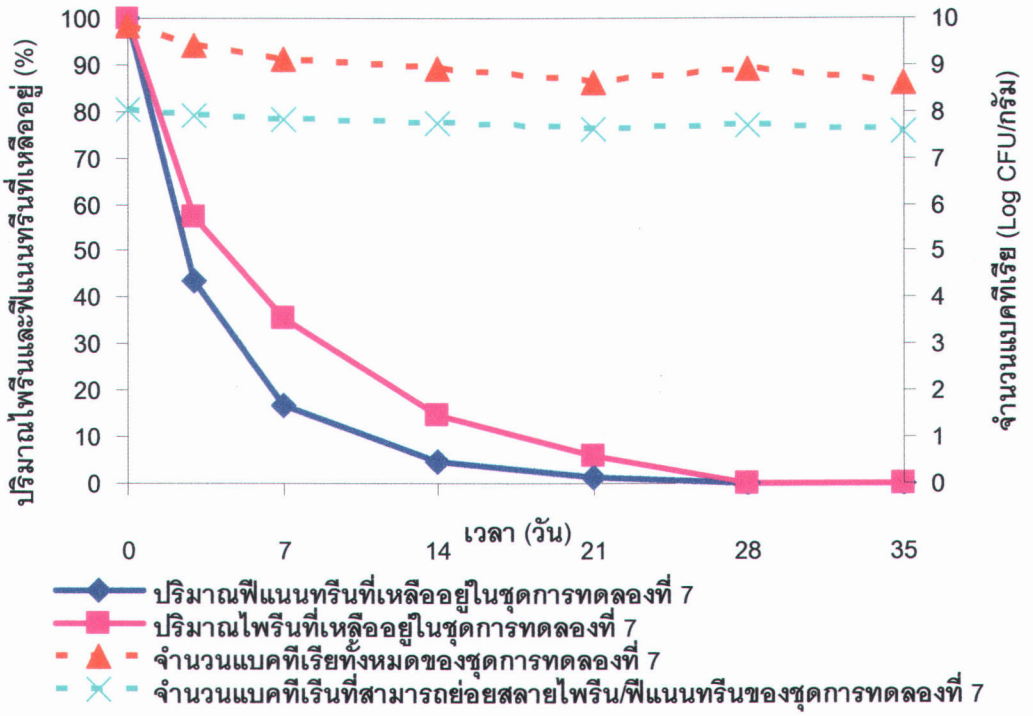
4.4.7 การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM (ชุดการทดลองที่ 7)

ชุดการทดลองที่ 7 ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน และผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ของหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมในแบบต่างๆ ว่ามีความแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด ทำการทดลองโดยใช้ดินไม่ปลอดเชื้อที่ปรับความชื้นและความเป็นกรดด่างแล้ว ผสมกับสารละลายไพรีนและฟีแนนทรีน ความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. และผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM มาแล้ว 3 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 0, 3, 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน

ผลการทดลองพบว่า การสลายไพรีนและฟีแนนทรีนเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง วันที่ 3 ของการทดลองตรวจพบปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่เท่ากับ 57.31 และ 43.71 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และวันที่ 35 ของการทดลอง ปริมาณฟีแนนทรีนลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ ขณะที่ตรวจพบว่ามีปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองเท่ากับ 0.03 เปอร์เซ็นต์

ผลการนับจำนวนแบคทีเรีย พบว่าวันที่ 0 ของการทดลองมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 9.84 log CFU ต่อกรัม และจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีน 8.04 log CFU ต่อกรัม จากนั้นจำนวนแบคทีเรียมีแนวโน้มลดลง เมื่อถึงวันที่ 35 ของการทดลอง พบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 8.6 log CFU ต่อกรัม และจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีนเท่ากับ 7.59 log CFU ต่อกรัม (รูปที่ 4.9)

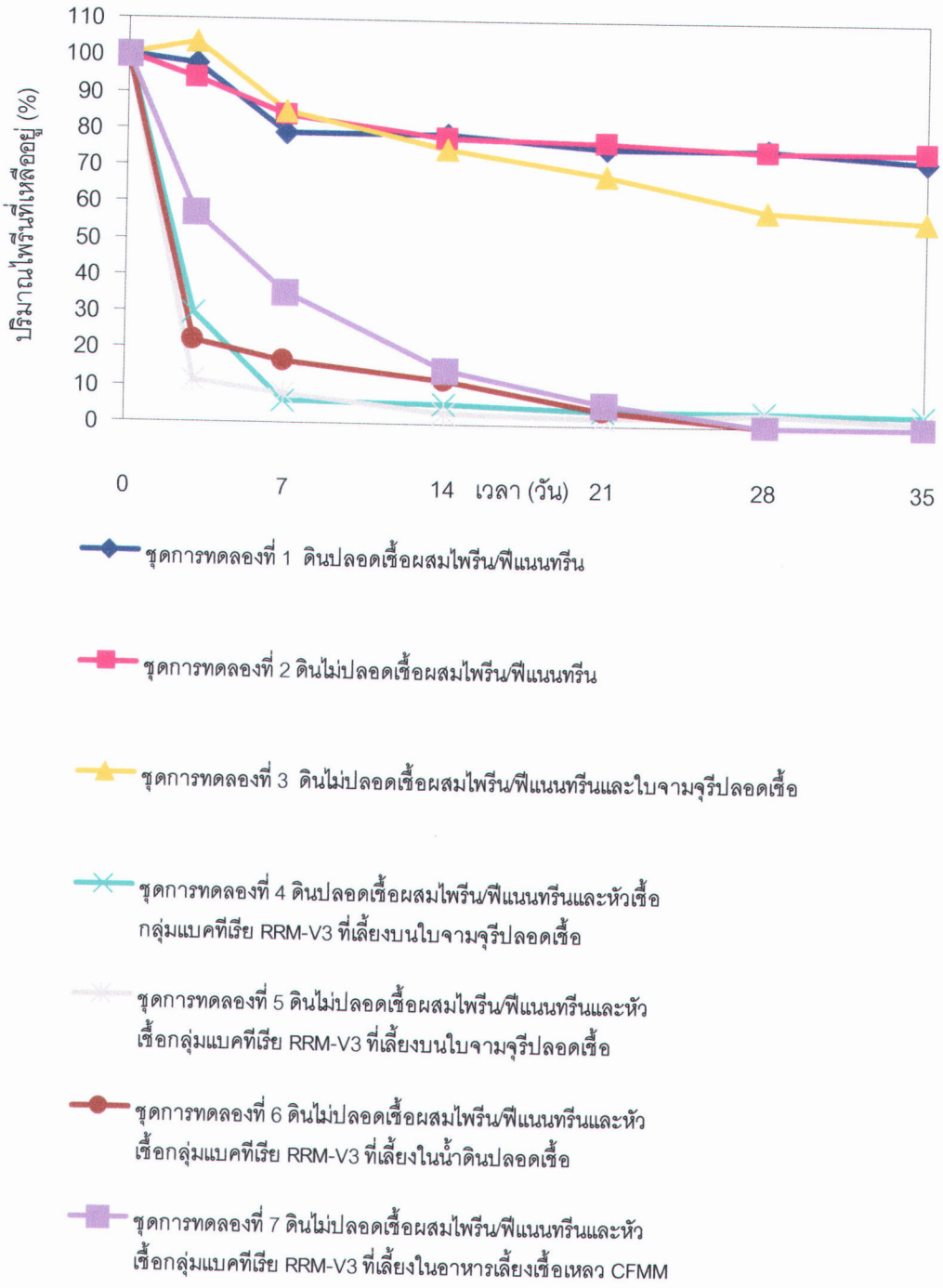
จะเห็นได้ว่าการเตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้น้อยที่สุด รองลงมาคือหัวเชื้อที่เตรียมในน้ำดินจากชุดการทดลองที่ 6 และการเตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในใบจามจุรีจากชุดการทดลองที่ 5 มีประสิทธิภาพและความเร็วในการย่อยสลายสูงที่สุด



รูปที่ 4.9 **ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย** RRM-V3 **ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** CFMM **(ชุดการทดลองที่** 7)

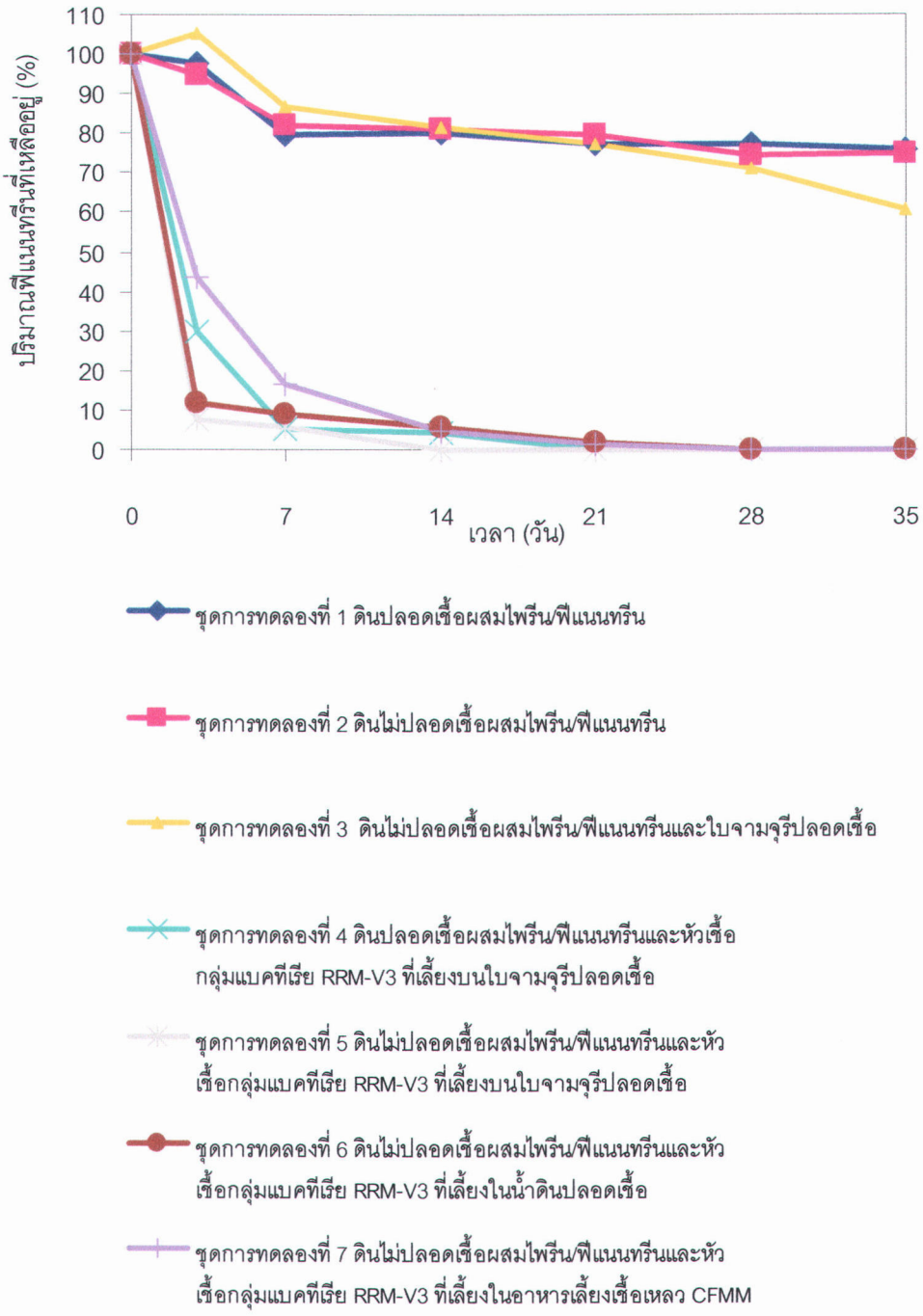
4.5 เปรียบเทียบผลจากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7

4.5.1 เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7



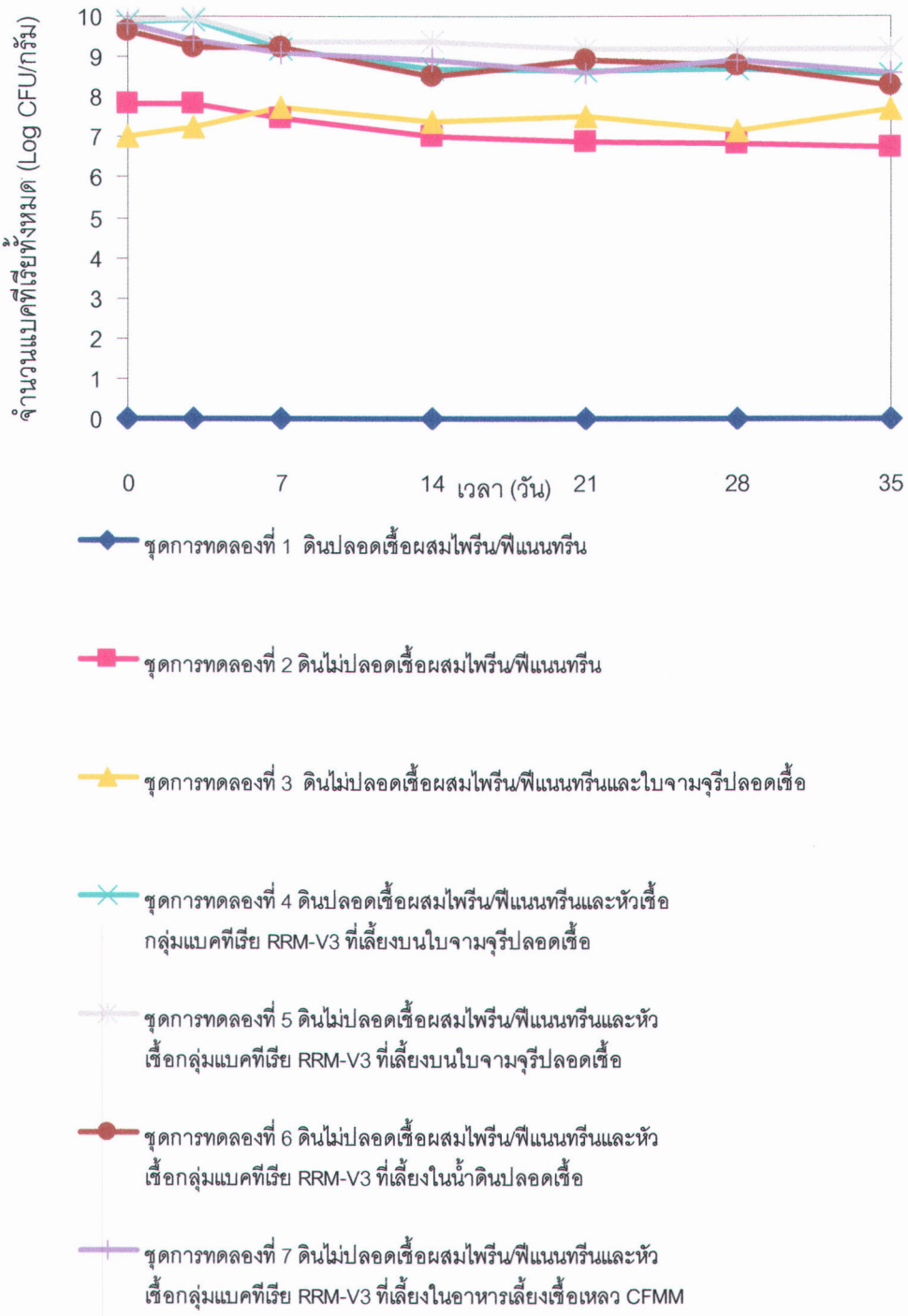
รูปที่ 4.10 เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7

4.5.2 เปรียบเทียบปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7



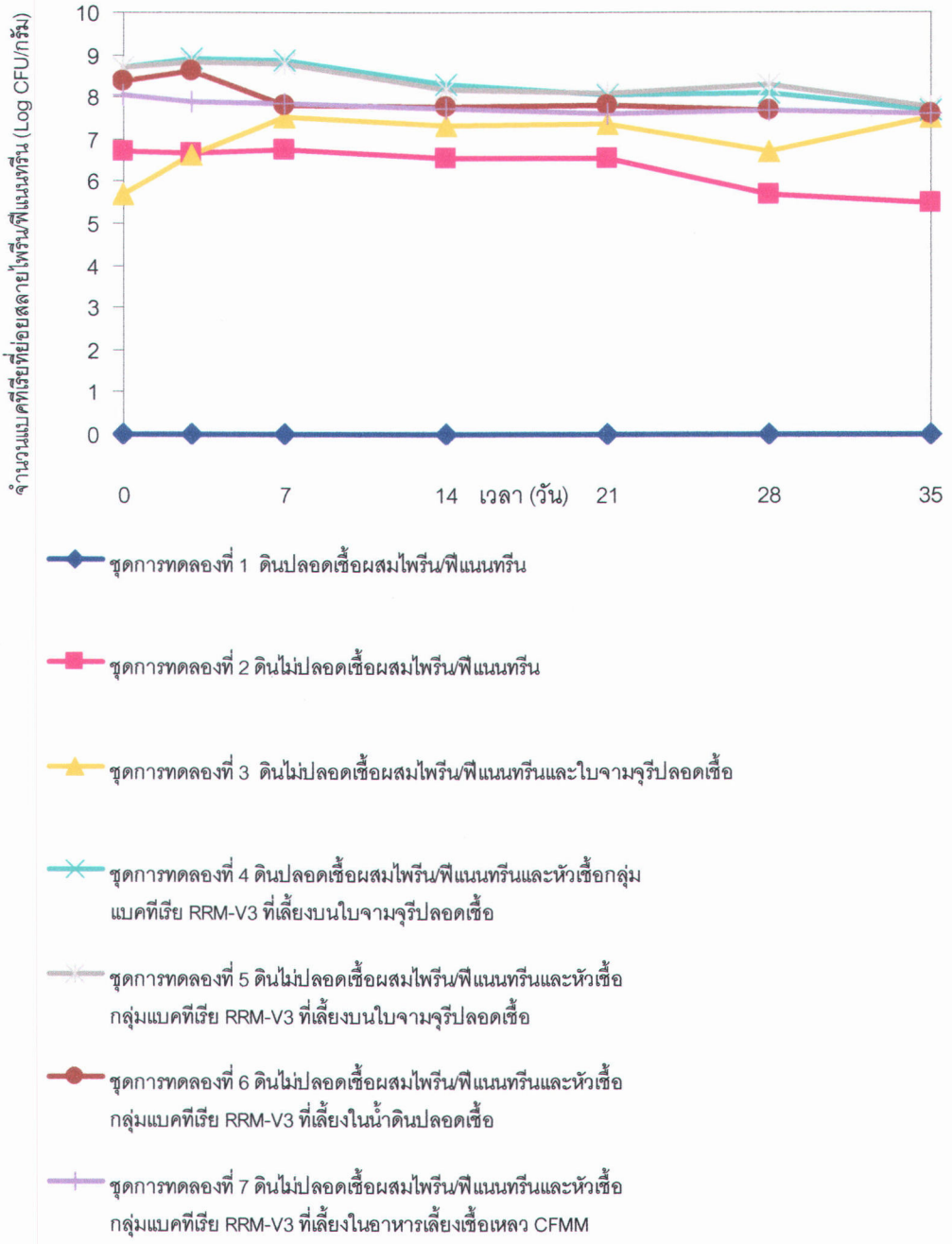
รูปที่ 4.11 เปรียบเทียบปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7

4.5.3 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7



รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7

4.5.4. เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีนจากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7



รูปที่ 4.13 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีนจากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7

4.6 พลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในช่วงเวลาของการบำบัด

การติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในช่วงเวลาของการบำบัด ทำการศึกษาใน 4 ชุดการทดลองดังนี้

1. การเตรียมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนใบจามจุรีปลอดเชื้อ เพื่อติดตามพลวัตรประชากรของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีในช่วงเวลา 14 วันของการทดลอง
2. การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อในชุดการทดลองที่ 2 เพื่อติดตามพลวัตรประชากรของแบคทีเรียในดินเพียงอย่างเดียวในช่วงเวลาของการบำบัด
3. การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อในชุดการทดลองที่ 5 ที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อ เพื่อดูพลวัตรประชากรของแบคทีเรียในดินที่มีกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนใบจามจุรีอยู่ด้วยในช่วงเวลาของการบำบัด
4. กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมเปรียบเทียบตำแหน่งของแบคทีเรียแต่ละชนิดของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนพอลิอะคริลาไมด์เจล

การติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในช่วงเวลาของการบำบัด ทำได้โดยการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอแม่แบบให้เท่ากัน จากนั้นเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ซึ่งมีขนาดประมาณ 500 bp ไปวิเคราะห์ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

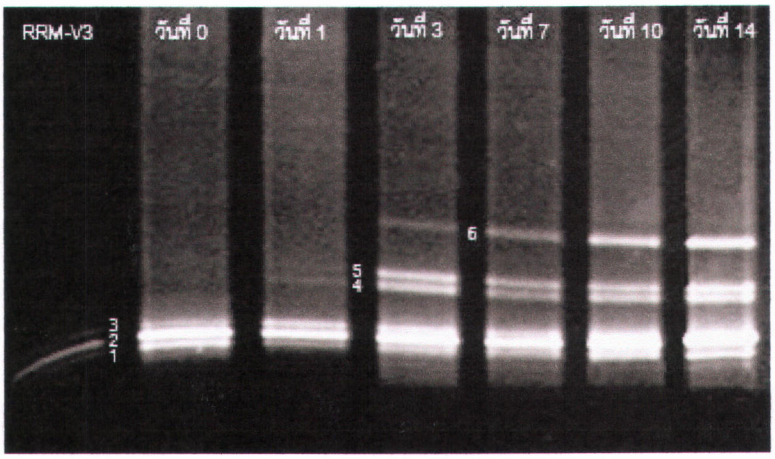
4.6.1 พลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อ

ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40 - 70% denaturant พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี มีแถบดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE ในวันที่ 0 ของการทดลอง 3 แถบด้านล่างชัดเจน ซึ่งตรงกับแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก โดยแถบที่ 2 จะมีความเข้มมากที่สุด วันที่ 1 ของการทดลองมีแถบดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE แถบที่ 4 และ 5 เพิ่มขึ้น รวมแล้วมีแถบดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE ทั้งหมด 5 แถบ และวันที่ 3 ของการทดลองพบดีเอ็นเอแถบที่ 6 เกิดขึ้น รวมแถบดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE ทั้งหมดมี 6 แถบ และพบว่าแถบดีเอ็นเอทั้ง 6 แถบในโปรไฟล์ของ DGGE ยังคงมีอยู่ไปจนตลอดช่วง

การทดลอง โดยความเข้มของแถบดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป และพบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบล่างเป็นแถบดีเอ็นเอที่โดดเด่นที่สุดตั้งแต่เริ่มต้น จนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง หลังจากวันที่ 3 ของการทดลองจะมีแถบดีเอ็นเอ ที่ 4 – 6 เด่นชัดขึ้นมาตามไปด้วย (รูปที่ 4.14)

ผลที่ได้แสดงว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาการเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการบ่มนานขึ้น และประชากรแบคทีเรียที่มีความโด่นเด่นในวันแรกยังคงความโดดเด่นนั้นไว้ตลอดการทดลอง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



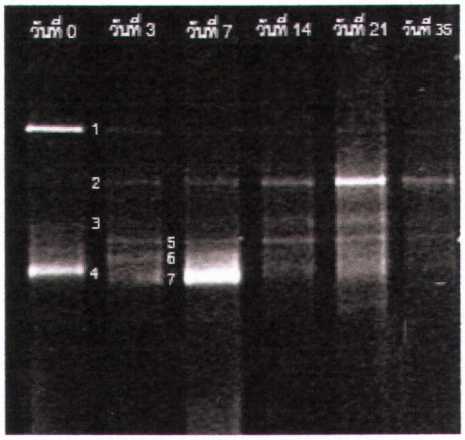
รูปที่ 4.14 **แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ** 16S rDNA **แสดงพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย** RRM-V3 **ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อที่เวลาต่างๆ โดยวิธี** DGGE **ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี** 40 – 70% denaturant

4.6.2 พลวัตรประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองที่ 2 การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อ

การติดตามพลวัตรประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองที่ 2 ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียในดินในช่วงเวลาของการบำบัด ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40 - 70% denaturant พบว่า มีแถบดีเอ็นเอที่เด่นชัดจำนวน 7 แถบในโปรไฟล์ของ DGGE ในวันที่ 0 ของการทดลองพบแถบดีเอ็นเอที่เด่นชัด 2 แถบ คือ 1 และ 4 ตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง ความเข้มของแถบดีเอ็นเอแถบที่ 1 จางลงเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 35 ของการทดลองพบว่ายังคงมีอยู่ในโปรไฟล์ของ DGGE แต่จางมาก ในขณะที่ดีเอ็นเอแถบที่ 2 จะมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และเห็นเด่นชัดที่สุดในวันที่ 21 ของการทดลอง และในแถบดีเอ็นเอแถบที่ 3 ในโปรไฟล์ของ DGGE พบเป็นแถบจางมาก แต่ยังคงอยู่จนถึงช่วงท้ายของการทดลอง แถบดีเอ็นเอที่ 5 6 และ 7 ปรากฏขึ้นมาในวันที่ 3 และยังคงมีอยู่จนเกือบสิ้นสุดการทดลอง

จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่โดดเด่นมีการเปลี่ยนแปลงตลอดช่วงเวลาของการทดลองดังนี้ ในวันที่ 0 ของการทดลองพบว่า ดีเอ็นเอในในโปรไฟล์ของ DGGE แถบที่ 1 มีความโดดเด่นที่สุดและเริ่งจางลงในวันต่อมา ในวันที่ 7 ของการทดลองพบดีเอ็นเอแถบที่ 7 โดดเด่นขึ้นมาแทน และวันที่ 21 พบดีเอ็นเอแถบที่ 2 โดดเด่นขึ้นมา (รูปที่ 4.17)

เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรที่ได้กับผลการสลายตัวของของไพรีนและฟีแนนทรีนจะเห็นว่าวันที่ 7 ปริมาณสารประกอบ PAHs มีอัตราการลดลงสูงสุด และประชากรแบคทีเรียชนิดที่ 7 โดดเด่นขึ้น แต่ความโดดเด่นนั้นกลับหายไปหลังจากวันนี้ และประชากรแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่พบว่ามีความสอดคล้องกับการสลายตัวของของไพรีนและฟีแนนทรีน (รูปที่ 4.4)

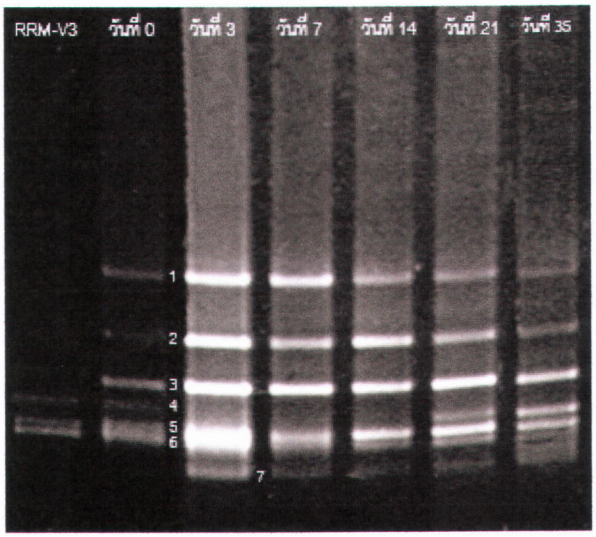


รูปที่ 4.15 **แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ** 16S rDNA **แสดงพลวัตรประชากรแบคทีเรียในชุดการทดลองที่** 2 **ได้แก่ ดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมไพรีน/ฟีแนนทรีนที่เวลาต่างๆ โดยวิธี** DGGE **ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี** 40 – 70% denaturant

4.6.3 การติดตามพลวัตรประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองที่ 5 การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อ ที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อ

การติดตามพลวัตรประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองที่ 5 ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและฟีแนนทรีน และหัวเชื้อที่เตรียมบนใบจามจุรี เพื่อดูพลวัตรประชากรของแบคทีเรียทั้งหมดที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาของการบำบัด ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40 - 70% denaturant เมื่อเริ่มต้นการทดลองพบว่า มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 6 แถบ โดย 3 แถบด้านล่าง คือ แถบที่ 4 – 6 พบว่ามีตำแหน่งตรงกับแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก วันที่ 3 ของการทดลองพบว่า แถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่จากวันแรกเด่นชัดขึ้นมาและมีแถบที่ 7 เพิ่มขึ้นมาอีก 1 แถบ ยกเว้นดีเอ็นเอแถบที่ 4 หายไปแต่จะปรากฏอีกครั้งในวันที่ 21 และเข้มมากขึ้นในวันสุดท้ายของการทดลอง หลังจากวันที่ 3 ของการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE แถบที่ 1 และ 2 เริ่มจางลง แต่ยังคงอยู่ตลอดช่วงเวลาของการทดลอง เช่นเดียวกับดีเอ็นเอแถบที่ 3 ซึ่งความเข้มของแถบดีเอ็นเอลดลงจากวันที่ 3 แต่ยังมีความเข้มมากกว่าแถบที่ 1 และ 2

เมื่อเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่อยู่ในดินมีความโด่นเด่นที่สุดในวันที่ 3 ของการทดลอง และยังคงพบเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในดินตลอดช่วงเวลาของการทดลอง และพบว่าเชื้อแบคทีเรียในดินเองก็โดดเด่นที่สุดในวันที่ 3 ของการทดลองเช่นเดียวกัน (รูปที่ 4.16) ซึ่งสอดคล้องกับการสลายตัวของของไพรีนและฟีแนนทรีนที่พบว่า วันที่ 3 เป็นวันที่ปริมาณสารประกอบ PAHs มีอัตราการลดลงสูงสุดเช่นเดียวกัน (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.16 **แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ** 16S rDNA **แสดงพลวัตรประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองที่** 5 **ได้แก่ การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อ ที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย** RRM-V3 **ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อที่เวลาต่างๆ โดยวิธี** DGGE **ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี** 40 – 70% denaturant