

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จิรทีปณ์ แสนรัก (2547) ได้คัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารไพรีน เพื่อพิสูจน์ว่าจุลินทรีย์บนใบไม้มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลาย PAHs พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จากใบจามจุรีมีประสิทธิภาพสูงสุดโดยสามารถย่อยสลายไพรีนได้หมดภายใน 14 วัน อย่างไรก็ตามการวิจัยเบื้องต้นได้ทดลองเติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ลงในดินที่ปนเปื้อนสารประกอบ PAHs โดยตรงพบว่าจะทำให้กลุ่มแบคทีเรียมีอัตราการตายสูง ซึ่งจะทำให้การบำบัดสารพิษไม่มีประสิทธิภาพ การทำให้กลุ่มแบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ในดินที่ปนเปื้อนและไม่สูญเสียความสามารถในการย่อยสลายสารพิษจะทำให้กลุ่มแบคทีเรียนั้นมีประโยชน์ในการบำบัดสารพิษ (Rhee และคณะ, 1996) มีรายงานการศึกษาชี้ว่า แบคทีเรียที่เตรียมในวัสดุทางการเกษตรบางชนิดจะมีอัตราการตายที่น้อยกว่าและคงความสามารถในการย่อยสลายสารพิษได้ Pattanasupong และคณะ (2004) รายงานว่าการใช้ใบบวบให้กลุ่มแบคทีเรียจับเกาะช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายสาร carbendazim และ 2,4-dichlorophenoxyacetic ได้ดีกว่าการเติมกลุ่มแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว Van Veen และคณะ (1997) รายงานว่าจุลินทรีย์สามารถใช้วัสดุทางการเกษตรบางชนิดเป็นแหล่งที่อยู่ โดยเกาะติดอยู่กับวัสดุนั้นและสามารถใช้สารอินทรีย์จากวัสดุทางการเกษตรเหล่านั้นเพื่อการเจริญได้ Scelza และคณะ (2006) รายงานว่าการเติมปุ๋ยหมักจากวัสดุทางการเกษตรสามารถช่วยเพิ่มการหมุนเวียนอากาศในดิน ทำเชื้อแบคทีเรียที่เติมลงไปดินมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นมากกว่าการเติมเชื้อเพียงอย่างเดียว และดินที่เติมปุ๋ยหมักจะกระตุ้นการย่อยสลาย PAHs ได้มากกว่าดินที่ไม่เติมปุ๋ยหมัก เพราะในปุ๋ยหมักมีสารอินทรีย์และจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs อยู่ จึงทำให้เกิดการย่อยสลาย PAHs แบบโคเมตาบอลิซึมได้ (Kastner และ Mahro, 1996) จากงานวิจัยต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีและตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและพีแนทรีนในดินที่ปนเปื้อนโดยใช้ใบจามจุรีที่มีกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จับเกาะอยู่

จากการทดลองได้เลี้ยงเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนใบจามจุรี เพื่อประเมินการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนใบจามจุรี (ข้อที่ 4.3) พบว่าตั้งแต่วันที่ 0-14 ของการทดลอง กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี มีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก 7.9 log CFU ต่อกรัม จนถึงสูงสุด

ที่ 9.54 log CFU ต่อกรัมในวันที่ 3 ของการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวิริญญา ขวเจริญพันธ์ (2549) ที่รายงานว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในเปลือกถั่วและเศษใบไม้ชนิดต่างๆ มีการเจริญสูงสุดมีค่าประมาณ 10 log CFU ต่อกรัมในวันที่ 14 ของการทดลอง ดังนั้นการทดลองต่อไปจะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนใบจามจุรีเป็นเวลา 3 วัน เพื่อสร้างเป็นหัวเชื้อแบคทีเรียก่อนนำไปบำบัดดินที่ปนเปื้อนไพรีนและพีแนนทริน

จากการศึกษาการย่อยสลายไพรีนและพีแนนทรินในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมโดยวิธีต่างๆ พบว่าในชุดควบคุมที่ใช้ดินปลอดเชื้อผสมไพรีนและพีแนนทริน เพื่อตรวจสอบการสลายของ PAHs เมื่อปราศจากปัจจัยทางชีวภาพจากดิน พบว่าตลอดระยะเวลาของการทดลอง ไพรีนและพีแนนทรินสามารถสลายไปจากดินได้เพียงเล็กน้อยคือเพียง 27.5% และ 24.3% ตามลำดับ การสลายตัวของ PAHs อาจเกิดขึ้นจากปัจจัยทางกายภาพต่างๆ เช่น การกลายเป็นไอ (volatilization) สารประกอบ PAHs จะสลายตัวได้อย่างรวดเร็วในช่วง 7 วันแรก แต่เมื่อระยะเวลาขึ้นการจับกันของสารกับอนุภาคของดินจะยิ่งแน่นมากขึ้น การสลายไปโดยปัจจัยทางกายภาพจึงเกิดได้ยากขึ้นตามไปด้วย (Wiessenfels และคณะ, 1992) เป็นผลให้ช่วงหลังของการทดลอง ปริมาณไพรีนและพีแนนทรินจึงไม่มีการลดลงมากนัก และไพรีนมีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนกว่าพีแนนทรินมีโอกาสที่จะจับเกาะกับโมเลกุลของดินได้แน่นกว่า โดยไพรีนจะจับกับอนุภาคดินและตะกอนดินด้วยแรงและปริมาณที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับสมบัติของชนิดและปริมาณอินทรีย์ของอนุภาคดิน (Chin และคณะ, 1997) ทำให้เกิดการสลายไปโดยปัจจัยทางกายภาพได้ยาก จึงควรจะพบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในดินมากกว่าพีแนนทริน อย่างไรก็ตามผลการทดลองไม่เป็นเช่นนั้น โดยพบว่าปริมาณพีแนนทรินที่เหลืออยู่ในดินมีเปอร์เซ็นต์สูงกว่าปริมาณไพรีนเล็กน้อย ซึ่งอธิบายได้ว่าเนื่องจากไพรีนมีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนกว่าพีแนนทริน จึงมีโอกาที่จะจับเกาะกับโมเลกุลของดินได้แน่นกว่า เป็นผลทำให้การสกัด PAHs ออกจากดินยากขึ้นตามไปด้วย

ในชุดการทดลองใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมไพรีนและพีแนนทริน เพื่อตรวจสอบการสลายของสารประกอบ PAHs เมื่อมีปัจจัยทางชีวภาพจากดิน พบว่ามีปริมาณไพรีนและพีแนนทรินที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองถึง 74.9 และ 75 เปอร์เซ็นต์หลังการบ่ม 35 วัน ซึ่งจะอยู่ในระดับเดียวกันกับในชุดการทดลองโดยใช้ดินปลอดเชื้อข้างต้น แสดงว่าจุลินทรีย์ในดินไม่ได้มีส่วนช่วยทำให้เกิดการสลายสารประกอบ PAHs ทั้งสองชนิด เมื่อพิจารณาการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในดิน พบว่าระดับการเจริญของแบคทีเรียในดินลดลงอย่างช้าๆ จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งการเจริญของแบคทีเรียในชุด

ทดลองน่าจะเกิดจากการใช้แหล่งคาร์บอนและพลังงานจากดินเอง เพราะผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดิน พบว่าในดินมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอยู่ และจากผลการทำ viable plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีผลึกไพรินและพีแนทรีนวางบนผาจานอาหารนั้น พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ อย่างไรก็ตามก็ตามไม่อาจสรุปได้ว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs เพราะวัฏจักรที่ใช้ในการเตรียมอาหารแข็ง CFMM เพื่อบันทึกจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพริน/พีแนทรีนไม่มีความบริสุทธิ์เพียงพอ จึงอาจมีแหล่งคาร์บอนและพลังงานบางชนิดในวัฏจักรให้แก่แบคทีเรียเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตได้ แสดงว่าปริมาณไพรินและพีแนทรีนที่ลดลงนั้นเกิดจากปัจจัยทางกายภาพเช่นเดียวกับในการทดลองใช้ดินปลอดเชื้อข้างต้น

ในชุดการทดลองใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับไพรินและพีแนทรีนและไบโຈามจุรีปลอดเชื้อ เพื่อศึกษาผลของไบโຈามจุรีต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในดินที่สามารถสลายสารประกอบ PAHs ได้ พบว่าปริมาณไพรินและพีแนทรีนที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองนี้ลดลงมากกว่าชุดการทดลองทั้ง 2 ชุดข้างต้น กล่าวคือเหลือเพียง 56.2 และ 60.7 เปอร์เซ็นต์หลังจากบ่ม 35 วัน และจากการนับจำนวนแบคทีเรียในดินพบว่า การเจริญของแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แสดงว่าไบโຈามจุรีที่เติมลงไปนั้นดินมีผลต่อจุลินทรีย์ในดิน ทำให้สามารถอยู่รอดและมีความสามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้ เนื่องจากในดินตามธรรมชาติย่อมมีแบคทีเรียหลายชนิดอยู่ร่วมกัน และผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของไบโຈามจุรีที่เติมลงไปนั้นชี้ว่า มีสารหลายชนิดที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อการเจริญเติบโตได้ ดังนั้นเมื่อเติมไบโຈามจุรีลงในดินของชุดการทดลอง จึงเป็นไปได้ว่ามีแบคทีเรียบางชนิดในดินสามารถนำไบโຈามจุรีไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อการเจริญเติบโตได้ และแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เจริญเพิ่มขึ้นนี้ อาจสร้างวิตามิน กรดอะมิโน หรือสารที่ช่วยให้มีการย่อยสลายสารตั้งต้นดีขึ้น เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ของแบคทีเรียชนิดอื่นต่อไป (Mueller และคณะ, 1989) และในวันที่ 3 ของการทดลองตรวจพบปริมาณไพรินและพีแนทรีนที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองมีค่ามากกว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง ซึ่งอธิบายได้เช่นเดียวกันว่า อาจเนื่องมาจากไบโຈามจุรีที่เติมลงไปมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่อาจสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งทำให้เกิดการละลายสารลดแรงตึงผิวที่มีอยู่ในดินนั่นเอง รายงานที่ผ่านมาชี้ว่า สารลดแรงตึงผิวซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มี 2 ส่วนสำคัญ คือ ส่วนที่มีประจุ(ขั้ว) กับส่วนที่ไม่มีประจุ(ไม่มีขั้ว) มีสมบัติชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ตามลำดับ สามารถเพิ่มการละลายของไพริน

และ PAHs อื่นได้มากขึ้นด้วย (Madsen และ Kristensen ,1997) จึงทำให้สามารถสกัด PAHs ออกมาจากดินได้มากกว่าในวันแรก ในขณะที่เดียวกัน PAHs ยังอยู่ในรูปที่ง่ายต่อการนำไปใช้ของ จุลินทรีย์ในดินอีกด้วย นอกจากนั้น รายงานของนาวิรัตน์ เจริญช่าง (2544) ชี้ว่าดินปนเปื้อนผสมไบโจามจุรีจะสามารถสกัด PAHs ออกมาได้มากกว่าในดินปนเปื้อนเพียงอย่างเดียว เพราะดินมีโครงสร้างที่ซับซ้อน มีรูพรุนขนาดเล็ก เมื่อ PAHs ติดอยู่จึงทำให้สกัดออกมาได้ยาก ในขณะที่ไบโจามจุรีมีรูพรุนน้อย PAHs ส่วนใหญ่จะติดอยู่ที่ผิวใบ จึงทำให้สกัดออกมาได้ง่ายกว่า รายงานชิ้นนี้จึงสนับสนุนผลการทดลองที่ว่า การลดลงของไพรีนและฟิแนนทรีนในชุดทดลองนั้น ไม่ได้เกิดจากไบโมาด์จับ PAHs ไว้ แต่เป็นผลมาจากการย่อยสลายของแบคทีเรียในดินที่เจริญขึ้นมาจากการได้รับสารบางอย่างจากไบโจามจุรีที่เติมลงไปนั่นเอง

ในการทดลองใช้ดินปลอดเชื้อผสมกับไพรีนและฟิแนนทรีน และผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนไบโจามจุรีปลอดเชื้อ เป็นชุดการทดลองเพื่อศึกษาความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนไบโจามจุรีต่อการย่อยสลายของสารประกอบ PAHs ในดิน พบว่าปริมาณไพรีนและฟิแนนทรีนที่เหลืออยู่ในดินลดลงอย่างมาก โดยปริมาณฟิแนนทรีนลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ที่วันที่ 21 ของการทดลอง และปริมาณไพรีนเหลืออยู่เพียง 3.6 เปอร์เซ็นต์เมื่อสิ้นสุดการทดลอง 35 วัน การลดลงของสารประกอบ PAHs ทั้งสองชนิดนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองข้างต้นซึ่งใช้ไบโจามจุรีปลอดเชื้อไปช่วยจุลินทรีย์ประจำถิ่นในดินเพื่อให้เกิดการสลายสารประกอบ PAHs จะเห็นว่า กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนไบโจามจุรีสามารถย่อยสลายไพรีนและฟิแนนทรีนในดินปนเปื้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่มีอยู่ในดิน ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับที่ จิรทีปย์ แสนรัก (2547) ได้รายงานการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จากไบโจามจุรีว่าสามารถย่อยสลายไพรีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้สาเหตุที่ไพรีนยังไม่หมดไปจากชุดการทดลอง อาจอธิบายได้เช่นเดียวกับที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นเกี่ยวกับการที่ไพรีนดูดซับติดกับอนุภาคของดินดีกว่าฟิแนนทรีน (Pignatello และ Xing, 1996 ; Luthy และคณะ, 1997) ในแง่การอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เติมลงไปนั้น พบว่ากลุ่มแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนขึ้นในช่วง 3 วันแรก หลังจากนั้นอาจลดลงเล็กน้อยแต่ก็อวยังอยู่ในปริมาณที่สูงอยู่ ส่วนหนึ่งอาจมาจากการที่กลุ่มแบคทีเรียใช้อาหารที่มีอยู่ในไบโจามจุรีเพื่อการอยู่รอด และนอกจากนั้นที่สำคัญกลุ่มแบคทีเรียยังใช้ไพรีนและฟิแนนทรีนในดินเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญได้อีกด้วย ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการตรวจสอบปริมาณสารประกอบ PAHs ที่ยังเหลืออยู่ในชุดการทดลอง กล่าวคือในวันที่ 3 ของการทดลอง เป็นวันที่มีจำนวนแบคทีเรียมากที่สุด ในขณะที่เดียวกันก็เป็นวันที่มี

เปอร์เซ็นต์ของสารประกอบ PAHs ทั้งสองชนิดลดลงมากที่สุดด้วย ในการทดลองจะเห็นว่าการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB มากกว่าใน CFMM นั้นเป็นเพราะแบคทีเรียแต่ละชนิดของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 อาจมีความสามารถในการนำไพรีนและฟิแนนทรีนไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อการเจริญได้ต่างกัน เมื่อเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM จึงทำให้มีแบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเจริญได้ จึงเป็นผลให้จำนวนแบคทีเรียได้น้อยกว่าใน LB

จากชุดการทดลองที่ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับไพรีนและฟิแนนทรีน และผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี เพื่อดูการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี และประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไพรีนและฟิแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อที่ปนเปื้อน โดยใช้ใบจามจุรีที่มีกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จับเกาะอยู่ พบว่าปริมาณไพรีนและฟิแนนทรีนที่เหลืออยู่ในดินลดลงอย่างมากและรวดเร็วว่าการทดลองที่ใช้ดินปลอดเชื้อ กล่าวคือไพรีนลดลงเหลือ 7.6 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 3 วัน และฟิแนนทรีนลดลงเหลือ 11.3 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 3 วัน แสดงว่านอกจากกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีแล้ว แบคทีเรียที่อยู่ในดินเองมีส่วนช่วยในการย่อยสลาย PAHs ในดินปนเปื้อนอีกทางหนึ่งด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเพื่อศึกษาผลของใบจามจุรีต่อจุลินทรีย์ในดินที่สามารถสลาย PAHs ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

นอกจากนี้ยังมีการเตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 อีก 2 วิธีด้วยกัน เพื่อเปรียบเทียบการรอดชีวิตและประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไพรีนและฟิแนนทรีนในดินที่ปนเปื้อน โดยใช้หัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมแบบต่างๆ ว่าแบบใดมีประสิทธิภาพมากน้อยกว่ากัน วิธีแรกจะเตรียมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในน้ำดิน เนื่องมาจากรายงานของ Deangrueng (2005) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำดิน แล้วนำไปเลี้ยงในดิน 2 แบบคือ ดินปลอดเชื้อ และดินไม่ปลอดเชื้อ พบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 มีการอยู่รอดและย่อยสลาย PAHs ได้ในดินทั้ง 2 ชุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยครั้งนี้คือ พบว่าไพรีนและฟิแนนทรีนลดลงเหลือเพียง 22.2 และ 12.1 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 และวันที่ 35 พบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ $8.3 \log \text{ CFU}$ ต่อกรัมและจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟิแนนทรีน มีค่าเท่ากับ $7.6 \log \text{ CFU}$ ต่อกรัม

การเตรียมหัวเชื้อวิธีที่สองคือเตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เพื่อเปรียบเทียบการอยู่รอดและประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและฟิแนนทรีนเมื่อเติมลงไป

ในดินกับการเตรียมหัวเชื้ออีก 2 วิธีที่ได้กล่าวไปแล้ว ผลการทดลองพบว่า ไพรินและพีแนนทรินลดลงเหลือ 57.3 และ 43.7 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3

จากผลการทดลองโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมในน้ำดิน และชุดทดลองโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM พบว่า ชุดทดลองโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมในน้ำดิน มีการอยู่รอดและมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไพรีนและพีแนนทรินในดินที่ปนเปื้อนได้ดีกว่าชุดทดลองโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมใน CFMM สาเหตุอาจจะมาจากกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในน้ำดินน่าจะมีการปรับตัว (acclimatization) ให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนเพื่อให้สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้เร็วกว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงใน CFMM (Wilson และ Jones, 1993) มีรายงานการศึกษาเบื้องต้นโดยใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เติบโตในดิน พบว่าแบคทีเรียไม่สามารถอยู่รอดได้ในดิน (ข้อมูลจากดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากผลการวิจัยในครั้งนี้ ที่เป็นเช่นนี้อาจเพราะดินที่ใช้ในการทดลองเป็นดินที่มาจากแหล่งต่างกัน มีปัจจัยทางกายภาพและทางชีวภาพที่ต่างกัน จึงส่งผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียที่เติมลงไป (Sims และคณะ, 1990)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและพีแนนทรินของการเตรียมหัวเชื้อทั้ง 3 วิธี พบว่า กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีมีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและพีแนนทรินในดินที่ปนเปื้อนได้ดีที่สุด คือเกิดการย่อยสลายได้เร็วที่สุด รองลงมาคือชุดทดลองโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมในน้ำดิน และชุดทดลองโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ตามลำดับ และผลประเมินการอยู่รอดของแบคทีเรียพบว่า กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีมีการเจริญสูงสุดตลอดการทดลอง ในขณะที่หัวเชื้อที่เตรียมในน้ำดินปลอดเชื้อและหัวเชื้อที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM มีระดับการเจริญใกล้เคียงกัน และหัวเชื้อทั้ง 3 วิธี มีระดับการเจริญของแบคทีเรียค่อนข้างสูง และมีการลดจำนวนลงเพียงเล็กน้อยตลอดการทดลอง

จากการทดลองโดยใช้หัวเชื้อทั้ง 3 ชนิด จะเห็นว่าหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี มีการอยู่รอดและมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไพรีนและพีแนนทรินในดินที่ปนเปื้อนได้ดีที่สุด เช่นเดียวกับ Kastner และ Mahro (1996) ที่รายงานว่า การเติมปุ๋ยหมักซึ่งเป็นวัสดุทางการเกษตรพวกใบไม้และกิ่งไม้ จะกระตุ้นการย่อยสลาย PAHs ได้มากกว่าดินที่ไม่เติม เพราะในปุ๋ยหมักมีสารอินทรีย์และจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs อยู่ จึงทำให้



เกิดการย่อยสลายสารประกอบ PAHs แบบโคเมตาบอไลซึมได้ ดังนั้นการเติมสารอินทรีย์เช่น ปุ๋ยหมักหรือวัสดุการเกษตรจึงเป็นการปรับปรุงดินในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนและช่วยกระตุ้นการทำงานของจุลินทรีย์ประจำถิ่นหรือจุลินทรีย์ที่เติมลงไปให้ดีขึ้น (Semple และคณะ, 2001) และวัสดุทางการเกษตรเป็นสารอินทรีย์ที่มีสมบัติในการช่วยเพิ่มการส่งผ่านออกซิเจนในดิน ช่วยให้ดินอุ้มน้ำได้ดีและควบคุมความเป็นกรดต่างในดินไม่ให้เปลี่ยนแปลง และยังเป็นแหล่งอาหารและแร่ธาตุที่สำคัญซึ่งปัจจัยที่กล่าวมานี้ล้วนช่วยส่งเสริมการทำงานของจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพ (Hupe และคณะ, 1996)

จากผลการติดตามพลวัตประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในช่วงเวลาของการทดลอง โดยใช้เทคนิค DGGE พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก มีแถบดีเอ็นเอที่เห็นเด่นชัด 3 แถบด้วยกัน ซึ่งต่างกับที่ จิรทีปส์ แสนรัก (2547) ได้รายงานการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จากใบจามจุรี ว่าประกอบด้วยแบคทีเรียอย่างน้อย 7 ชนิด เมื่อนำแบคทีเรียกลุ่มนี้ไปเลี้ยงบนใบจามจุรีเพื่อประเมินการอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 พบว่า กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถเจริญได้ดีเมื่อเลี้ยงบนใบจามจุรีดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น เมื่อติดตามพลวัตประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยอาศัย DGGE โปรไฟล์ของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวน 16S DNA พบว่า เมื่อนำกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มาเลี้ยงบนใบจามจุรีที่ปลอดเชื้อเป็นเวลานานขึ้น จะพบแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นมากกว่าชุดควบคุม คือกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM โดยพบว่าในวันเริ่มต้นการทดลอง มีแถบดีเอ็นเอเพียง 3 แถบ ซึ่งตรงกับแถบดีเอ็นเอของกลุ่มเชื้อที่ใช้เป็นชุดควบคุม แต่เริ่มมีแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น จนวันที่ 14 ของการทดลองซึ่งเป็นวันสุดท้าย พบแถบดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE ทั้งหมด 6 แถบ โดยความเข้มของแถบจะเพิ่มขึ้นในแต่ละวัน แสดงว่าโครงสร้างประชากรของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อเลี้ยงบนใบจามจุรีนานขึ้น (ดูจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอ) เหตุที่พบแถบดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE มากกว่าชุดควบคุม ทั้งที่เลี้ยงในสภาวะที่ใช้ใบจามจุรีปลอดเชื้อ เหตุผลในข้อนี้อาจอธิบายได้ว่า แบคทีเรีย 3 ชนิดนี้ คือกลุ่มประชากรหลัก ซึ่งน่าจะเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้ ส่วนแบคทีเรียบางชนิดที่พบในช่วงหลังนั้น อาจเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้จากการใช้สารอาหารที่มีในใบจามจุรีเพียงอย่างเดียว ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้อาจไม่มีความสามารถในการใช้สารไพรีน/พีแนทรีนเพื่อการเจริญเลย ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM จึงไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดเหล่านี้ตลอดการทดลอง

การเตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนใบจามจุรี เพื่อนำไปใช้ในการบำบัดสารประกอบ PAHs ในการทดลองขั้นต่อไปนั้น ใช้เวลาบ่มเชื้อกับใบจามจุรีเป็นเวลา 3 วันก่อนจะนำไปผสมกับดินปนเปื้อน เนื่องจากวันที่ 3 มีจำนวนแบคทีเรียสูงที่สุด แต่จากผลของแถบดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE กลับชี้ว่า วันที่ 14 เป็นวันที่มีประชากรแบคทีเรียอยู่มากที่สุด (ดูจากจำนวนและความเข้มของแถบดีเอ็นเอ) ที่เป็นเช่นนี้อาจเพราะวัสดุทางการเกษตรอาจเปื้อน ทำให้แบคทีเรียสามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญได้ง่ายขึ้น หรือแบคทีเรียที่เจริญได้ในใบจามจุรีอาจยังไม่เจริญเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้นับจำนวนแบคทีเรียได้น้อย อย่างไรก็ตาม ความเข้มของแถบดีเอ็นเอในวันที่ 3 และ 14 ไม่ได้แตกต่างกันมาก และการทดลองนี้เพียงพอต่อการให้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถใช้ใบจามจุรีเป็นแหล่งที่อยู่โดยเกาะติดอยู่กับใบ และสามารถใช้อาหารจากวัสดุทางการเกษตรชนิดนี้เพื่อการเจริญได้เท่านั้น จึงไม่น่าจะมีผลต่อการทดลองขั้นต่อไปมากนัก และวันที่ 3 เป็นช่วงเวลาที่สั้น ช่วยประหยัดเวลาในการทดลอง เหมาะที่จะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไปมากกว่าวันที่ 14

ผลการติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรียที่อยู่ในดินไม่ปลอดเชื้อที่ปนเปื้อนสารไพรีนและฟิแนนทรีนในชุดการทดลองที่ 2 โดยใช้เทคนิค DGGE พบว่าโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในดินมีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE น้อย (รูปที่ 4.15) จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าแบคทีเรียในดินอย่างเดียวย่อมจะไม่มีส่วนช่วยในการสลายสารประกอบ PAHs ที่ปนเปื้อนในดิน แถบดีเอ็นเอที่โดดเด่นขึ้นในช่วงแรกของการทดลองนั้นน่าเป็นผลมาจากแบคทีเรียใช้อาหารที่มีในดินเพื่อการเจริญ แต่วันถัดมาแถบดีเอ็นเออาจลง อาจเป็นเพราะอาหารในดินเริ่มลดลง และในช่วงกลางของการทดลองพบแถบดีเอ็นเอชนิดใหม่โดดเด่นขึ้นมาอีกครั้ง แสดงว่าอาจมีแบคทีเรียบางชนิดปรับตัวเพื่อให้เคยชินกับสารพิษในดินได้ บวกกับการสลายตัวตามธรรมชาติของสารประกอบ PAHs จนแตกออกเป็นโมเลกุลที่เล็กลงจนแบคทีเรียในดินสามารถนำไปใช้ได้ หรืออาจเป็นเพราะว่าดินที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นดินที่ไม่มีประวัติการปนเปื้อนสารประกอบ PAHs มาก่อน จึงทำให้แบคทีเรียในดินปรับตัวต่อสารไพรีนและฟิแนนทรีนที่เติมลงไปได้ช้า หรือแบคทีเรียบางชนิดอาจทนสารพิษไม่ได้จนตายไป

จากผลการทดลองตรวจสอบการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น พิสูจน์ให้เห็นว่า หัวเชื้อ RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี สามารถย่อยสลายสารไพรีนและฟิแนนทรีนที่ปนเปื้อนในดินของชุดการทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด และเมื่อติดตามพลวัตรประชากร

ของแบคทีเรียในดินที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนไบโຈามຈຸລິลงไปในช่วงเวลาของการบำบัดด้วยเทคนิค DGGE พบว่าโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในชุดการทดลองมีความหลากหลายมากขึ้น โดยพบทั้งแถบดีเอ็นเอจากกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เติมลงไปและแถบดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่มีอยู่ในดิน จากผลของ DGGE จะเห็นว่าวันที่ 3 ของการทดลองมีแถบดีเอ็นเอโดดเด่นที่สุด ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลตรวจสอบการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยพบว่าวันที่ 3 ของการทดลองมีอัตราการสลายสารไพรีนและฟิแนนทรีนเกิดขึ้นมากที่สุดด้วย หลังจากวันที่ 3 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs เกิดขึ้นช้าลง ความเข้มของแถบดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE ก็จางลงตามไปด้วย (รูปที่ 4.16) ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในดินและกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนไบโຈามຈຸລິมีส่วนช่วยให้เกิดการสลายของสารไพรีนและฟิแนนทรีนในดินปนเปื้อนโดยใช้สารเหล่านั้นเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อการเจริญ และโครงสร้างประชากรแบคทีเรียทั้งหมดในชุดการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นหรือลดลงตามปริมาณสารประกอบ PAHs ที่มีอยู่ในดิน ณ ช่วงเวลานั้น

จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า สามารถนำไบโຈามຈຸລິมาใช้เป็นแหล่งที่อยู่และแหล่งอาหารของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เพื่อให้เกิดสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการอยู่รอดและเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายของจุลินทรีย์ก่อนที่จะเติมลงไปที่ดินปนเปื้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนไบโຈามຈຸລິ สามารถอยู่รอดได้ในบริเวณดินที่ปนเปื้อนและไม่ทำให้สูญเสียความสามารถในการย่อยสลายสารพิษไป นอกจากนี้ไบโຈามຈຸລິยังมีส่วนช่วยส่งเสริมแบคทีเรียประจำถิ่นในดินให้เกิดความสามารถในการย่อยสลายสารปนเปื้อนในดินบริเวณนั้นได้อีกด้วย และการนำเทคนิค PCR-DGGE เข้ามาช่วย ทำให้ทราบถึงแนวโน้มจำนวนและความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารไพรีนและฟิแนนทรีนได้