



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม)

ปริญญา

เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม

วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การฟื้นฟูดินปนเปื้อนสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยใช้ก้อนเชื้อเห็ด
ที่ใช้แล้ว

Remediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Contaminated Soil using
Spent Mushroom Compost

นามผู้วิจัย นางสาวสุพัตรา ศรีพลอย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์พัฒนา อนุรักษพงษ์ศร, D.Tech.Sc.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ประไพพิศ ชัยรัตนมโนกร, Doc.Eng.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จักรกฤษณ์ มหัจฉริยวงศ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สืบสิงห์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การฟื้นฟูดินปนเปื้อนสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน โดยใช้ก้อนเชื้อเห็ดที่ใช้แล้ว

Remediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Contaminated Soil using
Spent Mushroom Compost

โดย

นางสาวสุพัตรา ศรีพลอย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุพัตรา ศรีพลอย 2553: การฟื้นฟูดินปนเปื้อนสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยใช้ก้อนเชื้อเห็ดที่ไ้แล้ว ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม) สาขาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์พัฒนา อนุรักษ์พงศธร, D.Tech.Sc. 101 หน้า

ก้อนเชื้อเห็ดที่เก็บผลผลิตแล้วเป็นวัสดุเหลือใช้จากการเพาะเห็ดของฟาร์มเห็ด เชื้อเห็ดจัดเป็นเชื้อรากลุ่มราขาว ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติก มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ เพื่อนำไปเป็นแหล่งอาหาร เอนไซม์กลุ่มนี้สามารถทำลายโครงสร้างส่วนที่เป็นวงแหวนอะโรมาติก ที่เป็นโครงสร้างหลักของสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) ได้ งานวิจัยนี้ศึกษาการนำก้อนเชื้อเห็ดที่หมดระยะเวลาเก็บผลผลิตแล้ว 6 ชนิด คือ เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju*) เห็ดนางรมฮังการี (*Pleurotus ostreatus*) เห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) เห็ดหูหนู (*Auricularia* spp.) และ เห็ดหอม (*Lentinus edodes*) มาบำบัดสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดิน โดยการหมักในสภาพควบคุมความชื้น 40 – 60 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีให้ประสิทธิภาพสูงที่สุดในการลดปริมาณสาร PAHs 4 ชนิด คือ ไพรีน เบนโซเอไพรีน แอนทราซีน และแนฟทาลิน ที่อัตราการลดลง เท่ากับ 74.2 ± 0.29 79.49 ± 0.35 79.36 ± 0.72 และ 80.33 ± 0.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการียังสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส ได้ปริมาณที่สูงที่สุดที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส 114.8 U/kg เมื่อเปรียบเทียบกับก้อนเชื้อเห็ดชนิดอื่น เมื่อศึกษาประสิทธิภาพในการลดปริมาณสาร PAHs ทั้ง 4 ชนิด ด้วยก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการี โดยปรับอัตราส่วนการผสมดินต่อก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีแล้วหมักดินในสภาพควบคุมความชื้น 40 – 60 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าอัตราส่วนดินต่อก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการี 1:3 ส่วน มีอัตราการลดลงของ PAHs สูงที่สุด ที่ 74.9 ± 0.48 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 2:3 (67.8 ± 0.73 เปอร์เซ็นต์) 1:2 (53.0 ± 0.68 เปอร์เซ็นต์) และ 1:1 ส่วน (46.7 ± 0.86 เปอร์เซ็นต์) และอุณหภูมิในกองหมักจะเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วเมื่อมีการเพิ่มปริมาณก้อนเชื้อเห็ดซึ่งเกิดจากปริมาณจุลินทรีย์ในกองหมักที่เพิ่มขึ้น ผลจากการศึกษานี้แสดงถึงความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์จากก้อนเชื้อเห็ดที่เก็บผลผลิตแล้วมาลดปริมาณสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดินได้

Supatar Seeploy 2010: Remediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Contaminated Soil using Spent Mushroom Compost. Master of Science (Environmental Technology and Management), Major Field: Environmental Technology and Management, Department of Environmental Science. Thesis Advisor: Associate Professor Patana Anurakpongsatorn, D.Tech.Sc. 101 pages.

Spent mushroom compost (SMC) is a waste from mushroom growing farm. Mushroom is white rot fungi. Most of white rot fungi group produces ligninolytic enzyme. This enzyme has been used to degrade organic compound for fungi subsistence. More recently, ligninolytic enzyme can break down aromatic ring of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). This research studied using 6 types SMC of *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus cystidiosus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Lentinus edodes*, *Auricularia spp.* to remediate PAHs contaminated soil. SMC was mixed to contaminated soil and moisture content of mixed compost was kept for 40-60% through out 28 days. The *P. ostreatus* SMC showed a highest removal of all PAHs ($p < 0.05$). The percentage removal of pyrene, benzo[a]pyrene, anthracene and naphthalene from a treatment of *P. ostreatus* SMC were 74.2, 79.49, 79.36 and 80.33%, respectively. Furthermore, the total laccase enzyme activity from a treatment of *P. ostreatus* SMC was the highest laccase enzyme activity at 114.8 U/kg ($p < 0.05$) after compared with other SMC. MnP enzyme was very low in all treatments. That was not significant different in each fungi ($p > 0.05$). Laccase is an important enzyme for PAHs removed than MnP enzyme. The research studied on efficiency of PAHs removal using *P. ostreatus* SMC mixed with contaminated soil by adjustment ratio of contaminated soil with *P. ostreatus* SMC and moisture content of mixed compost was kept for 40-60% through out 28 days. The 1:3 ratio of soil contaminated with *P. ostreatus* SMC showed the highest percentage removal of PAHs $74.9 \pm 0.48\%$ follow 2:3 ($67.8 \pm 0.73\%$), 1:2 ($53.0 \pm 0.68\%$) and 1:1 ($46.7 \pm 0.86\%$), respectively. The temperature of compost increased when the compost systems was added more of *P. ostreatus* SMC. Within laboratory scale, the SMC had a potential to remediate the soil contaminated with PAHs.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พัฒนา อนุรักษพงษ์พร อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษา
แนะนำในทุก ๆ เรื่องและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องของงานวิจัยต่าง ๆ ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.
ประไพพิศ ชัยรัตนมโนกร กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำและตรวจแก้ไข
ข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบพระคุณ Professor. Dr.
Hiroaki Ozaki และเพื่อน ๆ นักวิจัยใน ศูนย์วิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมใหม่ (New Industrial
Research and Development Center) ของมหาวิทยาลัย Osaka Sangyo ประเทศญี่ปุ่น ที่คอยให้ความ
ช่วยเหลือ คำแนะนำและการดูแลเป็นอย่างดีตลอดที่ได้ไปทำวิจัยช่วงระยะเวลา 2 เดือน

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
โครงการส่งเสริมการวิจัยร่วมแบบทวิภาคี (Bilateral Research Cooperation, BRC) คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา (พ.ศ.2550)
และขอขอบพระคุณ อาจารย์สมเกียรติ ท้วมแสง และคุณศิริพร สิงห์ทอง จากสำนักโรคจากการ
ประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้กรุณาให้ความ
อนุเคราะห์ใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณสมาชิกร่วมห้องปฏิบัติการทุก ๆ คนที่ได้ให้ความช่วยเหลือทั้งในด้านกำลังใจ
กำลังใจ คำแนะนำต่าง ๆ และบรรยากาศในการทำงานที่ดีตลอดการทำวิจัย ขอขอบคุณเพื่อนร่วมรุ่น
ปริญญาโทรหัส 50 รวมไปถึงพี่ ๆ และน้อง ๆ ทุกคนในภาควิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ที่มีส่วน
ร่วมในความสำเร็จครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยเป็นกำลังใจ ให้ความสะดวกสบายในชีวิต จนทำให้มี
วันนี้ได้ และสุดท้ายขอขอบคุณกำลังใจและความอดทนจนทำให้การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ สำเร็จลุล่วง
ด้วยดี

สุพัตรา ศรีพลอย

มกราคม 2553

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	30
อุปกรณ์	30
วิธีการ	31
ผลและวิจารณ์	39
สรุปและข้อเสนอแนะ	59
สรุป	59
ข้อเสนอแนะ	60
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	61
ภาคผนวก	74
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี	75
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์ดินและก้อนเชื้อเห็ด	78
ภาคผนวก ค ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง	88
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	101

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 การแบ่งชนิดสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน	7
2 ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในดิน	11
3 ตัวอย่างชนิดของราขาวและชนิดของเอนไซม์ที่ผลิตได้	25
4 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของดิน	40
5 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของก้อนเชื้อเห็ด	41
6 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกองดินที่ผสมก้อนเชื้อเห็ดแล้ว	41
ตารางผนวกที่	
ก1 ปริมาณสารละลาย x และสารละลาย y ที่ใช้ผสมเพื่อปรับค่าความเป็นกรดต่าง ของสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ	77
ข1 ประเมินค่าการวิเคราะห์ของดิน	80
ค1 ผลการวิเคราะห์ดินเบื้องต้น	89
ค2 ค่าการวัดความชื้นของดินเริ่มต้น	89
ค3 ผลการวัดค่าจาก hydrometer	89
ค4 สรุปการวิเคราะห์เนื้อดิน	90
ค5 ผลการวิเคราะห์ความเป็นกรดต่างของดิน	90
ค6 ผลการวิเคราะห์ก้อนเชื้อเห็ดเบื้องต้น	90
ค7 ผลการทดลอง ณ วันแรกของการทดลอง สำหรับดินที่ปนเปื้อน PAHs	91
ค8 ผลการทดลอง ณ วันที่ 7 ของการทดลอง สำหรับดินที่ปนเปื้อน PAHs	92
ค9 ผลการทดลอง ณ วันที่ 14 ของการทดลอง สำหรับดินที่ปนเปื้อน PAHs	93
ค10 ผลการทดลอง ณ วันที่ 21 ของการทดลอง สำหรับดินที่ปนเปื้อน PAHs	94
ค11 ผลการทดลอง ณ วันที่ 28 ของการทดลอง สำหรับดินที่ปนเปื้อน PAHs	95
ค12 การเปลี่ยนแปลงระดับอุณหภูมิในกองหมัก สำหรับดินที่ปนเปื้อน PAHs ในแต่ละ ชุดการทดลอง	96

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค13 การเปลี่ยนแปลงระดับอุณหภูมิในกองหมัก สำหรับดินที่ปนเปื้อน PAHs ในแต่ละอัตราส่วนของก้อนเชื้อเห็ดนางรมสังกะสี	98
ค14 ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะของเอนไซม์ Lac MnP และ LiP ในก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดหลังเก็บผลผลิตแล้ว 75 วัน	100

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครงสร้างโมเลกุลของ 16 PAHs ที่ U.S. EPA ประกาศให้เป็นสารมลพิษ	5
2 ตัวอย่างเห็ดชนิดต่างๆ	21
3 กลไกการทำงานของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส	23
4 กลไกการทำงานของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	24
5 กลไกการทำงานของเอนไซม์แลคเคส	25
6 แผนการทดลองโดยรวม	37
7 ปริมาณการลดลงของ ไพรีน ในกองหมักก่อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 28 วัน	43
8 ปริมาณการลดลงของ เบนโซเอไพรีน ในกองหมักก่อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 28 วัน	43
9 ปริมาณการลดลงของแอนทราซีน ในกองหมักก่อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 28 วัน	44
10 ปริมาณการลดลงของแนฟทาลิน ในกองหมักก่อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 28 วัน	44
11 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสในกองหมักก่อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 28 วัน	45
12 ปริมาณสาร PAHs ที่ลดลงต่อเอนไซม์แลคเคส 1 หน่วย ที่ระยะเวลา 5 สัปดาห์	46
13 ปริมาณสาร PAHs ที่ลดลงต่อเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส 1 หน่วย ที่ระยะเวลา 5 สัปดาห์	46
14 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเฉลี่ยในกองหมักที่มีดินปนเปื้อนสาร PAHs	49
15 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่าง ในกองหมักที่มีดินปนเปื้อนสาร PAHs	50
16 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสในกองหมักก่อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 7 วัน	52
17 ปริมาณสาร PAHs ที่ลดลงต่อเอนไซม์แลคเคส 1 หน่วย ในกองหมักก่อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 7 วัน	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
18 ปริมาณสาร PAHs ที่ลดลงต่อเอนไซม์เมกานีสเพอร์ออกซิเดส 1 ยูนิต ในกองหมัก ก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 7 วัน	53
19 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เมกานีสเพอร์ออกซิเดสในกองหมักก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับ ดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 7 วัน	54
20 ปริมาณการลดลงของ PAHs ในขวดทดลองก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อน ที่ระยะเวลา 7 วัน	54
21 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเฉลี่ยในกองหมักที่มีดินปนเปื้อนสาร PAHs	56
22 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสในกองหมักก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีในแต่ละ อัตราส่วนกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์	56
23 ประสิทธิภาพการลดลงของสาร PAHs ในกองหมักก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีในแต่ ละอัตราส่วนกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 28 วัน	57
24 ค่าความเป็นกรดต่างในกองหมักก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีในแต่ละอัตราส่วนกับ ดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 28 วัน	58
ภาพผนวกที่	
ข1 ไคอะแกรมสามเหลี่ยมพิจารณาประเภทของเนื้อดิน	84
ข2 กราฟมาตรฐาน ของ แนฟทาลีน ที่ความเข้มข้น 0.25 0.5 1.0 5.0 และ 10 ppm.	86
ข3 กราฟมาตรฐานของ แอนทราซีน ที่ความเข้มข้น 0.25 0.5 1.0 5.0 และ 10 ppm.	86
ข4 กราฟมาตรฐานของ ไพรีน ที่ความเข้มข้น 0.25 0.5 1.0 5.0 และ 10 ppm.	87
ข5 กราฟมาตรฐานของ เบนโซเอไพรีน ที่ความเข้มข้น 0.25 0.5 1.0 5.0 และ 10 ppm.	87

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

PAHs	=	Polycyclic aromatic hydrocarbons
HPLC	=	High performance liquid chromatography
Nap	=	Naphthalene
Ant	=	Anthracene
Pyr	=	Pyrene
B[a]A	=	Benzo[a]anthracene
U/kg	=	unit of enzyme per kilogram
w/v	=	weight per volume
SD	=	Standard deviation
CV	=	Coefficient Variation
LOD	=	Limit of detection
ppm	=	Part per million
ABTS	=	2,2-Azino-bis(3-ethylbenz-triazoline-6-Sulfonic acid)
EDTA	=	Ethylene-diaminetetraacetic acid
M	=	Molar
mM	=	Milimolar
PDB	=	Potato dextrose agar
μl	=	Microlitter
ml	=	Millitter
%	=	เปอร์เซ็นต์
C	=	คาร์บอน
N	=	ไนโตรเจน
C/N ratio	=	สัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจน
pH	=	ความเป็นกรด-ด่าง
dry wt	=	น้ำหนักแห้ง
°C	=	องศาเซลเซียส

การฟื้นฟูดินปนเปื้อนสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน โดยใช้ก้อนเชื้อเห็ดที่ใช้แล้ว

Remediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Contaminated Soil using Spent Mushroom Compost

คำนำ

การพัฒนาของอุตสาหกรรมปิโตรเคมีและการคมนาคม นอกจากจะได้รับความก้าวหน้าและความสะดวกสบายจากอุตสาหกรรมดังกล่าวแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ทั้งทางอากาศ ทางน้ำ และทางดิน โดยเฉพาะทางดิน มักเกิดการตกค้างของสาร โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) (ไมตรี, 2532) ตัวอย่างของสาร PAHs ที่สำคัญได้แก่ แนฟทาลีน ฟรีแนนทรีน เบนโซเอไพรีน และเบนโซจีโอไพรีน มีรายงานการศึกษาจากสถาบันสุขภาพของประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า พิษของสารในกลุ่ม PAHs เป็นสาเหตุหลักในการก่อมะเร็ง (carcinogens) และสารก่อการกลายพันธุ์ (mutagens) สาร PAHs พบได้ในเขม่าควัน น้ำมันดิน ยางรถถนน ควันรถ และควันจากการเผาไหม้ เช่น จากการปล่อยควันเสียจากยานพาหนะ จากโรงงานอุตสาหกรรม และการปล่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วลงสู่แหล่งน้ำ แหล่งกำเนิดรองลงมาเกิดจากการปนเปื้อนจากน้ำมันที่รั่วออกมาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีหากปล่อยให้เกิดการปนเปื้อนสาร PAHs จะก่อให้เกิดพิษที่สะสมนานขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้คุณสมบัติของดินเปลี่ยนแปลงไปและอาจส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช ทำให้ทำการเกษตรกรรมไม่ได้ นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้น จึงจำเป็นต้องมีการฟื้นฟูเพื่อลดปริมาณสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดิน

ปัจจุบันวิธีการฟื้นฟูเพื่อลดปริมาณของ PAHs ในดินมีหลายวิธีทั้ง ทางกายภาพ ทางเคมี และ การฟื้นฟูสภาพแวดล้อมของดินโดยวิธีชีวภาพ (bioremediation) ตัวอย่างการใช้วิธีทางชีวภาพ เช่น การเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายประกอบแอนทราซีนที่ปนเปื้อนในดินของเชื้อ *Burkholderia cepacia* VUN1001 โดยใช้ซาลิไซเลตเป็นตัวย่นำการย่อยสลาย โดยงานวิจัยนี้พบว่า สามารถลดปริมาณของ PAHs จนอยู่ในระดับที่ไม่สามารถตรวจสอบได้เมื่อเดิมเชื้อลงไปเป็นเวลา 9 วัน (ชนิษฐา, 2547) นอกจากจุลินทรีย์ขนาดเล็กอย่างแบคทีเรียแล้วยังมีการใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อราและเห็ดที่เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ขนาดใหญ่ มาใช้ในการลดปริมาณ PAHs โดยวัสดุเหลือใช้จากการเพาะเห็ดนั้นยังมีเอนไซม์เหลืออยู่สามารถนำมาสกัดเอนไซม์ เป็นวิธีการบำบัดดินทาง

ชีวภาพ ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ลิกนินโกลิติก (ligninolytic enzymes) เอนไซม์กลุ่มนี้มีการทำงานแบบไม่จำเพาะ(non-specific enzyme) โดยเอนไซม์จะไปทำลายโครงสร้างส่วนที่เป็นวงอะโรมาติก (aromatic ring) ที่เป็นโครงสร้างหลักของสาร PAHs (EPA, 1996)

งานวิจัยนี้สนใจที่จะนำก้อนเชื้อเห็ด ที่เก็บผลผลิตแล้ว มาผสมลงไปดินที่ปนเปื้อน PAHs และศึกษาสถานะและปัจจัยที่เหมาะสมกับการทำงานของก้อนเชื้อเห็ดที่มีประสิทธิภาพเพื่อนำมาใช้ในการลดสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดิน ซึ่งการนำก้อนเชื้อเห็ดที่เก็บผลผลิตแล้วมาใช้ให้เกิดประโยชน์นั้นเป็นจุดเริ่มต้นในการพัฒนาไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม และประยุกต์ใช้กับมลพิษในแหล่งอื่น ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการฟื้นฟูดินปนเปื้อนสาร PAHs 4 ชนิด ได้แก่ ไพรีน (pyrene) แนฟทาลีน (naphthalene) เบนโซไพรีน (benzo [a] pyrene) แอนทราซีน (anthracene) โดยใช้ก้อนเชื้อเห็ดที่ใช้แล้ว
2. ศึกษาประสิทธิภาพของก้อนเชื้อเห็ดที่ดีที่สุดในการลดปริมาณสาร PAHs ในดิน โดยใช้ก้อนเชื้อเห็ด 6 ชนิด คือ เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju*) เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) เห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) เห็ดหูหนู (*Auricularia* spp.) และเห็ดหอม (*Lentinus edode*)
3. ศึกษาชนิดเอนไซม์ที่ก้อนเชื้อเห็ดผลิตได้และผลของเอนไซม์ต่อการบำบัดสาร PAHs ในดิน

การตรวจเอกสาร

1. สาร โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน(PAHs)

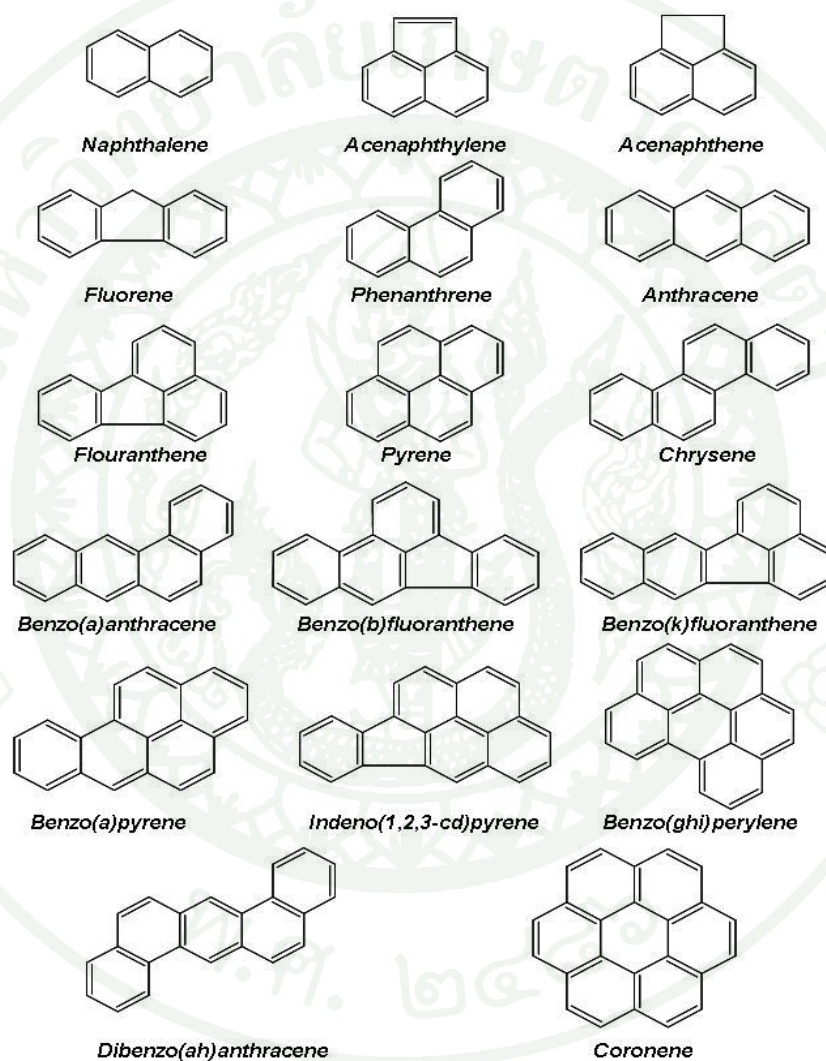
สารกลุ่ม PAHs เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างพื้นฐานที่มีรูปร่างเป็นวงอะโรมาติก ลักษณะของวงอะโรมาติก อาจเป็น 6 เหลี่ยมของวงอะโรมาติกเบนซีน ซึ่งอาจจะมีเพียง 1 วงจนถึงหลาย ๆ วงได้ สารตั้งต้นของการเกิด PAHs มักเป็น กรดอะมิโน เฮทเทอโรไซคลิกเอมีน โปรตีน กรดไขมัน และโคเรสเตอรอล ลักษณะเริ่มต้นของการเกิด PAHs เกิดจากการม้วนตัวของกรดไขมันที่มีสายโซ่ยาว ๆ ของกรดไขมันก็ได้ หรือการรวมตัวของกรดอะมิโนที่มีจำนวนมากกว่า 1 โมเลกุลก็ได้ PAHs เป็นสารพวกโมเลกุลไม่มีขั้ว (nonpolar) จึงละลายได้ดีมากในไขมัน แต่ละลายได้น้อยในน้ำ ดังนั้นจึงสะสมในชั้นไขมันของร่างกายได้นาน ปกติสาร PAHs ในเนื้อเยื่อไขมันจะไม่ทำให้เกิดพิษกับร่างกายจนกว่าจะเข้าไปอยู่ในเซลล์ PAHs อาจสะสมได้ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นฟอสโฟไลปิด (ไมตรี, 2532)

สาร PAHs เหล่านี้มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาที่ผิดปกติไปจากปกติไปจากเดิมของโมเลกุลขนาดใหญ่ในร่างกาย (macromolecule) เช่น สารที่ถ่ายทอดพันธุกรรมชนิดต่าง ๆ ได้แก่ DNA และ RNA ซึ่งสารประเภท PAHs นั้นเป็นได้ทั้ง procarcinogen หมายถึงสารที่เกิดก่อนสารก่อมะเร็ง และ potent carcinogen หมายถึงสารก่อมะเร็งชนิดที่มีความรุนแรง สาร PAHs ที่เป็นสารก่อมะเร็งชนิดที่มีความรุนแรงจะพบได้ในอาหารที่ผ่านขบวนการเผาไหม้ ดังนั้นจึงพบสารชนิดนี้ในส่วนที่ไหม้เกรียมของอาหาร ปิ้งย่าง อาหารทอดกรอบ อาหารรมควัน นอกจากอาหารแล้วส่วนสารอื่น ๆ ที่พบ สาร PAHs ได้แก่ ของเหลวและแก๊สที่เกิดจากการสันดาปผลิตภัณฑ์ที่ได้จากน้ำมัน เช่น น้ำมันดิบ และขบวนการปิโตรเคมี พบในเขม่าควันไฟ ไอเสียของเครื่องยนต์ น้ำมันดิบ การเผาไหม้ในเครื่องยนต์ บุหรี่ และเตาเผาต่าง ๆ น้ำมันที่รั่วซึมลงสู่ผิวดิน และจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์ เช่น ไขมันที่อยู่ในเนื้อสัตว์ น้ำมัน และไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น ๆ

อันตรายจากสาร PAHs ขึ้นอยู่กับปริมาณที่ร่างกายมนุษย์ได้รับ โดยสาร PAHs สามารถผ่านเข้าร่างกายได้ 3 ทาง คือทางผิวหนัง ทางจมูก และปาก ถ้าได้รับการสัมผัสทางผิวหนังมีโอกาสเป็นมะเร็งที่ผิวหนัง ถ้าได้รับการสูดดมเข้าไปก็จะเป็นมะเร็งที่ปอดซึ่งในปัจจุบันนี้พบว่าสาร PAHs มีการปนเปื้อนน้ำ พืชผักและผลิตภัณฑ์อาหารที่มนุษย์ใช้บริโภคในปริมาณที่มากขึ้นเรื่อย ๆ ถึงแม้ว่าสาร PAHs หลายชนิดจะเป็นสารก่อมะเร็งที่เป็น procarcinogen ซึ่งหมายความว่าตัวของสารเองไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมโดยตรงแต่หลังจากที่มนุษย์ได้รับสาร PAHs นี้เข้า

ไปแล้วในขบวนการกำจัดของร่างกายอาจจะเปลี่ยนแปลงให้เป็นสารที่มีลักษณะเป็นสารก่อมะเร็งที่รุนแรงได้ พบว่าสารเหล่านี้เป็นสารก่อมะเร็งที่ไม่ขึ้นอยู่กับปริมาณที่ได้รับและชนิดของเซลล์เป้าหมาย (dose and site independent)

ตัวอย่างของสาร PAHs แสดงใน ภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของ PAHs 16 ชนิด ที่ U.S. EPA ประกาศให้เป็นสารมลพิษลำดับที่ 2

ที่มา : U.S. EPA (1989)

1.1 สมบัติทางกายภาพ

สาร PAHs เป็นกลุ่มสารที่มีลักษณะเป็นของแข็ง สีขาว หรือสีเหลืองอ่อนปนเขียว ในธรรมชาติมักพบปะปนอยู่กับอนุภาคต่าง ๆ เช่น ฝุ่นละออง คาร์บอน หอมก ตะกอนดิน เป็นต้น PAHs เป็นสารไม่มีขั้ว (non-polar) ความสามารถในการละลายน้ำจึงน้อย เมื่ออยู่ในน้ำจึงอยู่ในรูปอนุภาค โดยถูกดูดซับและเกาะกับดินตะกอน หรือไม่ก็ละลายอยู่ในชั้นน้ำมันในน้ำซึ่งเป็นข้อจำกัดในการเข้าทำปฏิกิริยาและความสามารถในการดึงดูดของสิ่งมีชีวิต โดยทั่วไปแล้วความสามารถในการละลายของ PAHs จะลดลงตามน้ำหนักโมเลกุลหรือจำนวนเบนซีนเพิ่มขึ้น ปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่มีผลต่อความสามารถในการละลายของ PAHs คือ อุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเพียง 4 องศาเซลเซียส สามารถทำให้การละลายของ ฟรีแนทรีน เบนโซเอไพรีน และแอนทราซีน ในน้ำเพิ่มขึ้น

PAHs มีความไวต่อการออกซิไดซ์โดยแสง (photooxidation) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการสลายตัวโดยแสง (photodegradation) ของ PAHs คือ อุณหภูมิ (temperature) ความเค็ม (salinity) และชนิดของ PAHs ปฏิกิริยาการออกซิไดซ์โดยแสงของสาร PAHs ที่มีการแทนที่ของไนโตรเจน จะเกิดช้ากว่าในกรณีที่ไม่มีการแทนที่ของไนโตรเจน ผลที่ได้จากปฏิกิริยา photooxidation จะถูกอนุภาคของดินตะกอนดูดซับและเสถียรอยู่ในอนุภาค เมื่อจัดลำดับ PAHs ตามน้ำหนักโมเลกุล ตั้งแต่ แนฟทาไลน์ จนถึง ไดเบนโซเอไพรีน แล้วมาทำให้กลายเป็นไอ พบว่า แนฟทาไลน์ ระเหยได้ง่ายที่สุด ดังนั้นความสามารถในการกลายเป็นไอจะแปรผกผันกับน้ำหนักโมเลกุล

1.2 สมบัติทางเคมีของ PAHs

PAHs ส่วนใหญ่ไม่ละลายน้ำ ค่าลอการิทึมของค่าคงที่การละลายในน้ำ ออกทานอล ($\log K_{ow}$) มีค่าระหว่าง 3 - 7 จุดเดือดมีค่าระหว่าง 150 - 325 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลวมีค่าระหว่าง 101 - 438 องศาเซลเซียส ในสิ่งแวดล้อม PAHs มักเกาะกับอนุภาคอินทรีย์ในดิน หรือสะสมในสิ่งมีชีวิต (กองจัดการสารอันตรายและกากของเสีย, 2543) โมเลกุลของ PAHs ต้องมีวงเบนซีนอย่างน้อย 2 วง ซึ่งส่วนใหญ่จะมี 5 วง แต่ละชนิดมีลักษณะและน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน และมีการดูดซับ (adsorption) และการคาย (desorption) เป็นกลไกควบคุมปริมาณ PAHs ในดินตะกอน และในน้ำ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจาย PAHs ออกไปสู่สิ่งแวดล้อมอื่น การอธิบายหรือทำนายเกี่ยวกับการแพร่กระจายของสารเหล่านี้ จะใช้ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ โดยปกติแล้วค่าการดูดซับจะมีความสัมพันธ์กับกระบวนการแยกส่วนระหว่างน้ำกับดินตะกอน จากโครงสร้างทางเคมี

สามารถแบ่ง PAHs ตามสมบัติพิษวิทยาได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มก่อมะเร็ง (carcinogenic) และกลุ่มไม่ก่อมะเร็ง (non-carcinogenic) แสดงดังตารางที่ 1 โดยพบว่าสารที่มี วงเบนซินจำนวนเพิ่มขึ้นมีรายงานว่าเป็นสารก่อมะเร็งสูงกว่า สาร PAHs ที่มีวงเบนซินน้อยกว่า และสาร PAHs ที่มี ความสามารถละลายน้ำได้น้อยพบว่า ยิ่งเพิ่มความสามารถในการเป็นสารก่อมะเร็ง

ตารางที่ 1 การแบ่งชนิดสาร PAHs

กลุ่มสารก่อมะเร็ง	กลุ่มสารไม่ก่อมะเร็ง
Benzo(a)anthracene	Acenaphthene
Benzo(a)pyrene	Acenaphthylene
Benzo(b)fluoranthene	Anthracene
Benzo(k)fluoranthene	Benzo(ghi)perylene
Chrysene	Fluoranthene
Dibenz(a,h)anthracene	Flurene
Pyrene	Phenanthrene

ที่มา: ไมตรี (2532)

1.3 การปนเปื้อนของสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อม

กระบวนการผลิตที่เกิดขึ้นในโรงงานอุตสาหกรรมที่มีการใช้น้ำมันเตา น้ำมันดีเซล และก๊าซธรรมชาติ ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในดินและความอุดมสมบูรณ์ของดิน คือ ปริมาณ SO_2 NO_2 PAHs ซึ่งอาจจะปนเปื้อนมากับอากาศ น้ำฝน น้ำในอากาศ และสะสมอยู่ในดิน หรืออาจจะมาจากการไหลของน้ำมันลงสู่พื้นดินโดยตรงก็ได้ ทำให้คุณสมบัติของดินเปลี่ยนแปลงไปและอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในดิน พืชบริเวณนั้น รวมไปถึงประชากรที่อาศัยอยู่บริเวณที่มีการปนเปื้อนด้วย

จากรายงานการวิจัยฝุ่นในบริเวณจังหวัดเชียงใหม่ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ร่วมกับมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2543 (กองจัดการสารอันตรายและกากของเสีย, 2543) พบว่า ฝุ่นละอองที่เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ มี PAHs ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งปนเปื้อนอยู่ด้วย โดย ปริมาณสาร PAHs เฉลี่ยในช่วงฤดูแล้งจะมีมากกว่าในฤดูฝนประมาณ 1-2 เท่า ทั้งนี้ จากการ

วิเคราะห์แหล่งกำเนิดของฝุ่นละอองขนาดเล็ก พบว่า ในทุกพื้นที่ที่มีลักษณะที่คล้ายกัน โดยเป็นฝุ่นที่เกิดขึ้นจากการเผาวัสดุอินทรีย์ เช่น กิ่งไม้ ใบไม้ เป็นต้น และไอเสียจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเครื่องยนต์ดีเซล

จากการศึกษาของ จิราณีย์ (2544) เรื่อง การสะสมของสาร PAHs ในตะกอนบริเวณดินตะกอนปากแม่น้ำท่าจีนทำการเก็บตัวอย่างดินตะกอนผิวหน้าดินและดินตะกอนตามความลึก จากบริเวณดินตะกอนปากแม่น้ำท่าจีน เพื่อศึกษาการกระจายของสาร PAHs ในดินตะกอนผิวหน้าและการสะสมในตะกอนดินตามความลึก พบสาร PAHs ที่มีจำนวนวงแหวนตั้งแต่ 2-6 วง โดยมีการกระจายของชนิดและปริมาณแตกต่างกัน PAHs ที่พบได้มากได้แก่ แนนทาลีน ไบฟีนิลอะเซฟทีริน ฟรีแนทรีน ไชริซีน เบนโซเอแอนทราซีน ไพรีรีน แอนทราซีน ฟลูโอเรนทรีน และไพรีน โดยมีปริมาณ PAHs รวมของตัวอย่างตะกอนผิวหน้าตามลำน้ำท่าจีน 0.22 ถึง 1.52 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.62 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และการกระจายของสาร PAHs รวมในตะกอนดินผิวหน้าพบว่าบริเวณที่อยู่ใกล้แหล่งกำเนิดของสาร PAHs พบการสะสมได้มากกว่าบริเวณที่อยู่ไกลแหล่งกำเนิดออกไป การสะสมของสาร PAHs รวมในตะกอนตามความลึกแสดงแนวโน้มของ PAHs ลดลงเมื่อความลึกเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าในปัจจุบันมีการสะสมของสาร PAHs มากกว่าในอดีตและพบว่าแหล่งกำเนิดหลักของสาร PAHs ในดินตะกอนบริเวณปากแม่น้ำท่าจีน ส่วนใหญ่มาจากการเผาไหม้ เช่น จากการปล่อยควันเสียจากยานพาหนะ จากโรงงานอุตสาหกรรม และการปล่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วลงสู่แหล่งน้ำ แหล่งกำเนิดรองมาจากการปนเปื้อนจากน้ำมัน

1.3 ความเป็นพิษของสาร PAHs ในมนุษย์และสัตว์

พิษเฉียบพลันของ PAHs ในมนุษย์และสัตว์ทดลอง จากรายงานของ Jamison *et al.* (1992) พบว่าแอนทราซีน มีฤทธิ์ในการกระตุ้นให้ร่างกายมนุษย์มีความไวต่อแสงมากขึ้น (photosensitivity) มีผลทำให้เกิดอาการผดผื่นของผิวหนังคือ แสบร้อน คัน และมีอาการระคายเคืองของเยื่อตาและหลอดลมด้วย Iwata *et al.* (1981) รายงานว่า การป้าย Chrysene บนผิวหนังของหนู ในปริมาณ 0.0125 มิลลิกรัมต่อตารางเซนติเมตร 2 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 2 วัน ทำให้ผิวหนังมีเซลล์สีผิว(melanocyte) มีจำนวนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย US.EPA (1998) รายงานว่า แนนทาลีน ทำให้เกิดภาวะโลหิตจางเนื่องจากเม็ดเลือดแดงแตก (hemolytic anemia) และต้อกระจก (cataract) ความผิดปกติทั้ง 2 อย่างนี้เกิดได้ทั้งเฉียบพลันและเรื้อรัง มีรายงานการเสียชีวิตของคนที่ถูกลูกเหม็นในขนาด 5 กรัม ผลการชันสูตรร่างผู้ตายพบว่าปอดมีการคั่งของโลหิตและบวม น้ำที่ตับ มีการแทรกตัว

ของเม็ดเลือดขาวชนิด polymorphonuclear leucocytes และ lymphocytes พร้อมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงของไขมันในเซลล์ตับ นอกจากนี้ยังมีรายงานการเสียชีวิตของเด็กอายุ 6 ปีที่กิน naphthalene ในขนาด 2 กรัม จากการคำนวณพบว่า ปริมาณของที่ทำให้คนตายได้มีขนาด 71.4 ถึง 214.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยคิดจากคนที่มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 70 กิโลกรัม Kochevar *et al.* (1982) รายงานว่า ไพริน ทำให้ผิวหนังของหนูตะเภาเกิดอาการแพ้แสงอย่างรุนแรง โดยศึกษาการแพ้แสงจากสารประกอบ 8 ชนิด ที่มีอยู่ในน้ำมันดิบ ความเข้มข้นตั้งแต่ 5 มิลลิโมโครโมล ถึง 5 ไมโครโมล โดยการป้ายสารเหล่านั้นบนผิวหนังของหนูตะเภา แล้วฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลต พบว่า ไพริน ทำให้เกิดการอักเสบ บวมแดงของผิวหนังได้มากที่สุด Cottini and Mazzone (1939) รายงานว่า เบนโซไพรีนทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังและเยื่อทางเดินหายใจ โดยคนที่ได้รับ เบนโซไพรีนทางการหายใจ มีอาการไอ หอบหืดอักเสบ การได้รับ เบนโซไพรีน โดยการสัมผัสทางผิวหนัง ทำให้เกิดความผิดปกติของผิวหนังคือ เป็นหูด นอกจากนี้ ยังมีอาการแสบร้อน มีตุ่มหนองเกิดขึ้น และอาการเหล่านี้จะรุนแรงมากขึ้นเมื่อได้รับแสงอัลตราไวโอเลต Topping *et al.* (1978) พบว่า เบนโซแอนทราซีน ทำให้เกิดอาการระคายเคืองของเยื่อทางเดินหายใจในมนุษย์ สำหรับในสัตว์ทดลองพบว่า เบนโซแอนทราซีน ทำให้เกิดอาการระคายเคืองของเยื่อทางเดินหายใจ จากการตรวจทางพยาธิของเยื่อทางเดินหายใจพบว่า มีการบวม น้ำ การแทรกตัว (infiltration) ของเม็ดเลือดขาวชนิด granulocyte และ mononuclear cells เข้าไปในเยื่อทางเดินหายใจ และมีจำนวนเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) เพิ่มขึ้น ในระยะท้ายของการทดลองพบว่ามีภาวะการเกิดพังผืด (fibrosis) ของเยื่อทางเดินหายใจ Blanton *et al.* (1988) รวมทั้ง Zhao *et al.* (1990) ทำการศึกษาความเป็นพิษของ PAHs ต่อภูมิคุ้มกัน โดยศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่าการได้รับ เบนโซไพรีนทางผิวหนัง มีผลไปกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาของระบบภูมิคุ้มกันแบบ allergic contact hypersensitivity ทำให้การตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่มีต่อสารชนิดอื่นลดลง ยับยั้งการสร้างแอนติบอดีและสามารถเปลี่ยนแปลงการทำงานของ macrophages, T-cells และ B-cells PAHs มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่ำในสัตว์ทดลอง การได้รับ PAHs ในระยะเวลานาน มักไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของร่างกายอย่างเด่นชัดและรุนแรง LD₅₀ โดยการให้ทางปากในหนู มีค่ามากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ยกเว้น แนฟทาลิน ในหนู มีค่า LD₅₀ 354 ถึง 710 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว LD₅₀ ของ PAHs ในสัตว์ทดลอง และจากรายงานการวิจัยข้างต้น สามารถบ่งชี้ได้ว่าสาร PAHs มีผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการของมนุษย์

2. ดิน

2.1. ส่วนประกอบของดิน สมศักดิ์ (2528) ได้กล่าวรายละเอียดส่วนประกอบดิน แบ่งเป็น 5 ส่วนดังนี้

2.1.1 สารอนินทรีย์ (inorganic matter) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ และมีปริมาณมากที่สุด在地 คือ 45 % ประกอบด้วยหิน (rock) และแร่ธาตุ (mineral) ปะปนกัน ทั้งด้านปริมาณและขนาดขององค์ประกอบ ซึ่งมีผลต่อความหยาบหรือความละเอียดของเนื้อดิน การระบายอากาศการอุ้มน้ำของดิน และมีความสำคัญต่อปริมาณแร่ธาตุอาหารของพืชในดิน

2.1.2 น้ำในดิน (soil water) น้ำในดินจะมีอยู่ประมาณ 25 % ของปริมาตรในดิน และไม่อยู่ในรูปของน้ำบริสุทธิ์ แต่จะมีสารต่าง ๆ ละลายอยู่โดยเฉพาะธาตุอาหารต่าง ๆ ดังนั้นน้ำในดินจึงมักเรียกว่า soil solution ซึ่งจุลินทรีย์และพืชอาศัย soil solution สำหรับการเจริญเติบโต

2.1.3 อากาศในดิน (soil air) มีประมาณ 25 % ของปริมาตรดิน ปริมาณอากาศในดินมีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำในดิน เพราะต่างก็แทรกอยู่ตามช่องว่างในดิน (soil pores) กล่าวคือ ถ้าในดินมีอากาศมากก็จะมีน้ำน้อย แต่ถ้าในดินมีน้ำมากก็จะเข้าแทนที่อากาศในช่องว่างของดิน ทำให้อากาศถูกไล่ออกไป อากาศในดินประกอบด้วยแก๊สหลายชนิด แต่แก๊สที่มีความสำคัญต่อจุลินทรีย์ได้แก่ ออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์

2.1.4 สารอินทรีย์ (organic matter) มีมากมายหลายชนิด มีตั้งแต่ขนาดโมเลกุลใหญ่ เช่น ฮิวมัส ลิกนิน และเซลลูลูโลส จนถึงมีขนาดโมเลกุลเล็ก ๆ เช่น น้ำตาลบางชนิด กรดอะมิโน และกรดอินทรีย์ ปริมาณสารอินทรีย์ในดินมีค่าแปรผันในช่วง 1 % ถึงมากกว่า 30 % ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ไม่ว่าจะเป็นสภาพภูมิอากาศ ภูมิประเทศ และการกระทำ ของมนุษย์และสัตว์ต่อดิน

2.1.5 สิ่งมีชีวิตในดิน (soil organism) มีตั้งแต่ขนาดใหญ่ เช่น สัตว์เลื้อยคลาน หนอนแมลง ไปจนถึงขนาดเล็ก คือ พากจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า สิ่งมีชีวิตเหล่านี้ดำรงชีวิตในลักษณะที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับสิ่งมีชีวิตอื่น (symbiosis) และมีบทบาทสำคัญในการแปรสภาพก่อให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีขึ้นภายในดิน ทำให้เกิดสารอินทรีย์และสร้างความอุดมสมบูรณ์แก่ดิน จุลินทรีย์ในดินมีหลายกลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา สาหร่าย โปรโตซัว และไวรัส (หน้าของดินยิ่งลึกลงไปยิ่งมีจุลินทรีย์น้อยและในดินที่มีอากาศถ่ายเทได้ดีจุลินทรีย์จะมีมากกว่าในดินที่มีอากาศถ่ายเทน้อยกว่า) ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยทั่วไปจุลินทรีย์ในดินจะแตกต่างกันไปตามชนิด

ของดิน แร่ธาตุและอินทรีย์สารในดิน ความชื้นของดิน เป็นต้น ปัจจัยเหล่านี้อินทรีย์สารหรือสารอาหารในดินมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์เป็นอย่างยิ่ง ดินที่มีสารอินทรีย์มากก็จะมีจุลินทรีย์มากด้วย นอกจากนี้ ปริมาณจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหรือปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดและปริมาณของสาร ความชื้นในดิน การระบายอากาศ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่างสภาวะบางอย่าง เช่น เกิดน้ำท่วม การปรับปรุงดิน การเติมปุ๋ย เป็นต้น

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในดิน

ความลึก (ซ.ม.)	จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ในดิน 1 กรัม				
	Aerobic bacteria	Anaerobic bacteria	Actinomycetes	Fungi	Algae
3-8	7,800,000	1,950,000	2,080,000	119,000	25,000
20-25	1,800,000	379,000	245,000	50,000	5,000
35-40	472,000	98,000	49,000	14,000	500
65-75	10,000	1,000	5,000	6,000	100
135-145	100	400	-	3,000	-

ที่มา: Maier *et al.* (2000)

2.2 สมบัติทางกายภาพของดิน

2.2.1 เนื้อดิน (soil texture) เป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงความหยาบ หรือความละเอียดของอนุภาคที่ประกอบขึ้นเป็นดิน เช่น หินแร่ชนิดต่าง ๆ ซึ่งจะมีอนุภาค (particle) ต่างแตกต่างกัน เช่น กลุ่มอนุภาคดินทราย (sand soil particle) กลุ่มอนุภาคดินซิลต์ (silt soil particle) และกลุ่มอนุภาคดินเหนียว (clay soil particle) กลุ่มอนุภาคดินทรายมีเส้นผ่าศูนย์กลางสมมูล (equivalent diameter) ดังนี้ ทรายหยาบมีขนาด 0.20-2.00 มิลลิเมตร ทรายละเอียดมีขนาด 0.02-0.20 มิลลิเมตร กลุ่มขนาดดินซิลต์มีขนาด 0.002-0.02 มิลลิเมตร และกลุ่มอนุภาคดินเหนียวมีขนาด < 0.002 มิลลิเมตร ซึ่งสัดส่วนหรือเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของกลุ่มอนุภาคดังกล่าว แสดงถึงประเภทของเนื้อดินในโคอะแกรมสามเหลี่ยมพิจารณาประเภทของเนื้อดิน (ภาพที่ ข1) ประเภทเนื้อดินมีความสำคัญอยู่ที่สัดส่วนหรือปริมาณของกลุ่มอนุภาคในดินประเภทนั้น ๆ ทั้งนี้เพราะอนุภาคแต่ละกลุ่มมีคุณสมบัติที่ต่างกัน เช่น กลุ่มอนุภาคดินเหนียวมีความไว (active) มากที่สุดในการควบคุมคุณสมบัติของดิน เพราะดินเหนียวมีอนุภาคที่เล็ก และมีพื้นที่จำเพาะสูง จึงมีพื้นที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่า คือมีการเกาะยึดกันเอง

(cohesion) และเกาะยึดกับสารอื่น (adhesion) เช่น ธาตุหรืออนุภาคต่าง ๆ เอนไซม์ และสารอินทรีย์อื่น ๆ รวมทั้งจุลินทรีย์ในดิน และกลุ่มอนุภาคดินเหนียวมีการพองตัว (swelling) และหดตัว (shrinkage) เมื่อเปียกหรือแห้งได้ง่าย ดังนั้นเมื่อทราบประเภทของเนื้อดินจึงสามารถคาดคะเนถึงสัดส่วนของกลุ่มอนุภาค และคุณสมบัติชนิดนั้น ๆ ได้อย่างคร่าว ๆ ด้วย

2.2.2 โครงสร้างของดิน (soil structure) ปกติอนุภาคดินจะถูกเชื่อมยึดกับอนุภาคอื่น ๆ โดยสารเชื่อม (cementing agent) ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดินกลายเป็นเม็ดดิน และหลังจากเม็ดดินเชื่อมยึดกัน เรียกว่าโครงสร้างของดิน ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ของดิน มีผลต่อความจุอากาศ ความจุในการดูดซับน้ำ ความสะดวกในการเคลื่อนที่ของน้ำและก๊าซในดิน โครงสร้างของดิน แบ่งได้ 3 ประเภท คือ กลุ่มไม่มีโครงสร้าง (อนุภาคอยู่โดดเดี่ยวไม่เชื่อมยึดกัน) เช่น sandy loam กลุ่มมีโครงสร้าง ได้แก่ โครงสร้างลักษณะแผ่น (plate-like) โครงสร้างคล้ายก้อน (blocky) และโครงสร้างทรงกลม (spheroidal) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่การเชื่อมยึดติดกันของ อนุภาคดินไม่แข็งแรงนัก ทำให้ดินมีความร่วนซุยดี การระบายน้ำและอากาศของดินดีกว่าดินที่มี โครงสร้างประเภทอื่น ๆ สุดท้ายคือพวกโครงสร้างถูกทำลาย คือ เดิมเป็นพวกที่มีโครงสร้างประเภทใดประเภทหนึ่งแต่ถูกทำลายทำให้ช่องว่างในดินลดน้อยลง

2.2.3 ความหนาแน่นและความพรุนของดิน (density and porosity of soil) ความหนาแน่นของดิน หมายถึง สัดส่วนระหว่างมวล (mass) ของดินกับปริมาตร (volume) ของดิน ความหนาแน่นของดินมี 2 ประเภท คือ ความหนาแน่นรวม (bulk density) ซึ่งหมายถึงสัดส่วนระหว่างมวลของดินขณะที่ดินแห้งสนิทกับปริมาตรทั้งหมด และความหนาแน่นอนุภาค (particle หรือ solid phase density) หมายถึง สัดส่วนระหว่างมวลของดินขณะที่ดินแห้งสนิทกับปริมาตรของอนุภาคของดิน ส่วนความพรุนของดิน หมายถึง ปริมาตรของสิ่งที่ไม่ใช่ของแข็งที่ปรากฏในดินเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาตรดินทั้งหมด ซึ่งความหนาแน่นรวมของดินจะแปรผกผันกับความพรุนของดิน โดยปกติความหนาแน่นของดินอยู่ระหว่าง 1.0-1.6 กรัมต่อมิลลิเมตร และความพรุนของดินอยู่ระหว่าง 20-60 % (สมศักดิ์, 2528)

3. การฟื้นฟูสภาพแวดล้อมโดยวิธีชีวภาพ (Bioremediation)

การฟื้นฟูสภาพแวดล้อมโดยวิธีชีวภาพ เป็นกระบวนการบำบัดทางชีวภาพโดยการใช้จุลินทรีย์ หรือเรียกว่า จุลินทรีย์บำบัด (สมศักดิ์, 2528) จุลินทรีย์จะใช้สารปนเปื้อนดังกล่าวเป็นอาหารหรือ พลังงานและเปลี่ยนสารพิษเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ การที่จะใช้จุลินทรีย์

จากแหล่งอื่น (exogenous microbes) ที่ไม่พบในแหล่งปนเปื้อน อาจทำได้เช่นกัน แต่ต้องทำการปรับสภาพบริเวณที่ปนเปื้อนเพื่อให้แน่ใจว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถดำรงชีวิตและบำบัดสารพิษที่ปนเปื้อนได้ (U.S. EPA, 1996)

การย่อยสลายทางชีวภาพ เป็นการย่อยสลายโดยธรรมชาติ โดยการเติมปุ๋ยในโตรเจนและฟอสฟอรัส เป็นอาหารที่เชื้อจุลินทรีย์ต้องการ หรือการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิม วิธีนี้จะสามารถกำจัดสารมลพิษได้รวดเร็วขึ้น KostECKI and Calabrese (1991) เสนอวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนโดยวิธีทางชีวภาพเป็น 2 แบบ คือ

3.1 microbiological approach คือ การพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์ทำได้ 2 ทาง ได้แก่ การเพิ่มปริมาณเชื้อโดยการเก็บเชื้อจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารมลพิษมาทำการคัดแยกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายมาเพิ่มปริมาณ แล้วเติมกลับลงไปในพื้นที่ที่มีสารมลพิษและอีกทางหนึ่งคือ การพัฒนาประสิทธิภาพของเชื้อ โดยการเก็บจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารมลพิษมาคัดแยกแล้วนำไปทำการปรับปรุงสายพันธุ์ ให้ย่อยสลายสารมลพิษได้ดีขึ้นหรือเจริญได้เร็วขึ้นแล้วค่อยไปทำการย่อยสลายสารมลพิษที่ต้องการ

3.2 microbial ecology approach คือ การปรับปรุงสภาพแวดล้อมในพื้นที่ปนเปื้อนทั้งทางด้านฟิสิกส์ เช่น อุณหภูมิ หรือทางด้านเคมี ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง การเติมสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งช่วยให้จุลินทรีย์ในดินเจริญและย่อยสลายสารมลพิษได้ดีขึ้น (กฤตินี, 2539)

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมโดยวิธีชีวภาพในดิน

4.1 ความชื้น (moisture) มีผลต่ออัตราการย่อยสลาย และยังส่งผลถึงการส่งผ่านสารอาหารและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย และปริมาณออกซิเจนในดินอีกด้วย โดยปกติความชื้นในดินที่เหมาะสมในการทำงานของจุลินทรีย์จะประมาณร้อยละ 30 - 80 (Baker and Diane, 1994) พบว่าความชื้นที่ร้อยละ 60 ของน้ำซึบเหมาะสมสำหรับย่อยสลายการปนเปื้อนของน้ำมันดีเซลในดิน โดยใช้เทคนิคการบำบัดแบบการหมัก (composting) นอกจากนี้ Debbie and Bartha (1979) ศึกษาปัจจัยของสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการย่อยน้ำมันในดินในชุดการทดลองที่จำลองขึ้นพบว่า การย่อยสลายที่เกิดขึ้นในสภาพที่มีความชื้นในดินประมาณร้อยละ 30 - 90 ความเป็นกรดเป็นด่าง 7.5 - 7.8 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60 ต่อ 1 อัตราส่วนคาร์บอนต่อฟอสฟอรัสเท่ากับ 800 ต่อ 1

และอุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส หากมีความชื้นมากเกินไปจะไปลดปริมาณออกซิเจนในดิน กรณีนี้อาจแก้ไขได้โดยเพิ่มพื้นที่ผิวของดินที่สัมผัสอากาศ เช่น การพรวนดินบ่อย ๆ สำหรับดินที่มีความชื้นน้อยเกินไปสามารถแก้ไขได้โดยการฉีดพ่นน้ำลงไป (กฤตินี, 2539)

4.2 ความเป็นกรดด่างของดิน (soil pH) จะพบอยู่ในช่วง 2.5 – 11 โดยส่วนใหญ่ดินจะมีสภาพเป็นกรด ซึ่งในขบวนการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน Dibble and Bartha (1979) พบว่าที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 7 – 9 เป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุด การปรับสภาพดินให้เป็นกลาง ส่วนใหญ่ คือการเติมปูนขาวโดย Fu and Alexander (1992) ทำการตรวจสอบการย่อยสลายสไตรีน (styrene) ในน้ำทะเลสาบ และตัวอย่างดิน พบว่าการย่อยสลายเกิดรวดเร็วที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7.23 และจะช้าลงอย่างมากที่ความเป็นกรดด่าง 3.78 ส่วน Verstrate *et al.* (1976) พบว่าการปรับสภาพดินที่เป็นกรด (pH 4.5) เข้าใกล้สภาพที่เป็นกลาง (pH 7.4) จะทำให้อัตราการย่อยสลายแก๊สโซลีน (gasoline) ในดินสูงขึ้นเป็น 2 เท่า นอกจากนี้ช่วงที่ความเป็นกรดเป็นด่างเป็นกลางยังทำให้ธาตุอาหารในโตรเจน และฟอสฟอรัสเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่นำไปใช้ได้ และยังช่วยลดการละลายของโลหะหนักที่เป็นพิษ เพราะละลายได้ดีที่ความเป็นกรดเป็นด่างต่ำ (Baker and Diane, 1994)

4.3 อินทรีย์วัตถุในดิน (soil organic matter) อินทรีย์วัตถุทำให้ดินเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจนถึงสีดำ เนื่องจากฮิวมัสที่ได้จะมีสีน้ำตาลเข้ม อินทรีย์วัตถุทำให้ขนาดของอนุภาคดินที่ละเอียดและมีพื้นที่ผิวจำนวนมาก อินทรีย์วัตถุในดิน มีพื้นที่ผิวมากทำให้ดินมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดีขึ้น ทำให้ดินมีความชุ่มชื้น อินทรีย์วัตถุเป็นแหล่งให้ธาตุ ในโตรเจน ฟอสฟอรัส และกำมะถัน ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยามีเนรัลไลเซชัน (mineralization) ซึ่งจะปลดปล่อยธาตุดังกล่าวออกมาอย่างช้า ๆ ซึ่งปริมาณธาตุไนโตรเจนทั้งหมดขึ้นอยู่กับปริมาณอินทรีย์วัตถุที่อยู่ในดิน (กรมพัฒนาที่ดิน, 2545) อินทรีย์วัตถุในดินจึงเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญสำหรับจุลินทรีย์ในดินทำให้จุลินทรีย์ในดินสามารถทำกิจกรรมต่าง ๆ ได้ดีขึ้น และทำให้ดินเหมาะกับการทำงานของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่าง ๆ ได้เร็วขึ้น นอกจากนี้อินทรีย์วัตถุช่วยเพิ่มความต้านทานการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างของดิน (buffer capacity) เนื่องจากอินทรีย์วัตถุในดินมีจำนวนประจุลบอยู่เป็นจำนวนมากสามารถจะดูดซับไอออนบวกได้เป็นปริมาณมากด้วย ดังนั้นดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูงสามารถต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างได้ดี ปฏิกิริยาที่ได้จากสมการจะเป็นปฏิกิริยาสมดุล (equilibrium reaction) เมื่อใส่สารประกอบที่มีความเป็นกรดด่างลงไปในดินก็ไม่สามารถทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของดินเพิ่มขึ้นหรือลดลง (ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2542)

4.4 ธาตุอาหารประเภทอนินทรีย์สาร (inorganic minerals) ธาตุอาหารหลักที่จำเป็นสำหรับ ขบวนการย่อยสลาย คือ ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ซึ่งมีปริมาณจำกัดในดิน สำหรับไนโตรเจน พบว่าแบคทีเรียจะเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียก่อนเสมอ และการเติมไนโตรเจนสามารถช่วย เพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ได้จริง (Baker and Diane, 1994) การเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน (denitrification) ในดินเปียก ก็เป็นปัจจัยที่ทำให้ไนโตรเจนในดินลดลงอย่างรวดเร็ว (Fitzpatrick, 1986) ส่วนฟอสฟอรัสในดินจะมีอยู่อย่างจำกัดเนื่องจากละลายได้ยาก ฟอสฟอรัสส่วนใหญ่ที่อยู่ใน รูปสารอนินทรีย์ คือ H_2PO_4^- และ HPO_4^{2-} ส่วนในรูปสารอินทรีย์จะอยู่ในรูปฮิวมัส ฟอสฟอรัสในดิน ส่วนใหญ่จะละลาย น้ำได้ดีที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 – 7.0 การเพิ่มสารอาหารในดิน เพิ่ม ประสิทธิภาพการย่อยสลายของจุลินทรีย์ได้โดยการเติม ปุ๋ยยูเรีย ฟอสฟอรัส หรือเกลือของ ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (Jamison *et al.*, 1975; Jobson *et al.*, 1974) Song *et al.* (1990) รายงานว่า การเติมปุ๋ย NH_4NO_3 และ K_2HPO_4 ช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนทั้งในดินทราย ดิน ร่วน และดินร่วนปนทราย มีการทำการทดลองเติมปุ๋ยที่ประกอบด้วยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสใน อัตราส่วนต่างๆ ลงในดินชนิดต่างๆ พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส ประมาณ 25 ต่อ 1 ต่อ 0.5 เป็นค่าที่เหมาะสมในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในดิน (Baker and Diane, 1994) Westlake *et al.* (1978) ศึกษาการย่อยสลายของน้ำมันในดินบริเวณตะวันตกเฉียงเหนือ ของประเทศแคนาดา โดยการเติมปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสพบว่า จะมีการเพิ่มจำนวนของ แบคทีเรีย แต่ไม่พบการเพิ่มจำนวนของเชื้อรา อย่างไรก็ตามถ้ามีการเติมธาตุอาหารมากเกินไปอาจ ทำให้การย่อยสลายลดลงได้ เพราะจากการทดลองพบว่า ถ้ามีธาตุอาหารในดินมากเกินไปจุลินทรีย์ จะไม่ย่อยสลายคราบน้ำมันที่มีส่วนประกอบพวกอะโรมาติกซึ่งย่อยได้ยากกว่า (Fedorak and Westlake, 1981) Vestrate *et al.* (1976) รายงานว่าการเติมไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ช่วยให้การย่อย สลายฟีนอลที่ปนเปื้อนในดินเพิ่มขึ้น Raymond *et al.* (1976) พบว่าดินที่มีการบำรุงหรือใส่ปุ๋ยจะเกิด การย่อยสลายน้ำมันดีกว่าดินที่ไม่ได้รับการบำรุง

4.5 ตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptors) กระบวนการย่อยสลายสามารถเกิดได้ทั้งใน สภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน แต่สภาวะที่มีออกซิเจนจะย่อยสลายได้เร็วและสมบูรณ์กว่าซึ่งปริมาณ ออกซิเจนในดินจะขึ้นอยู่กับความพรุนของดิน และน้ำในดินซึ่งจะไปอยู่ตามรูพรุนของดินทำให้ ออกซิเจนน้อยลง ในดินจะมีออกซิเจนอย่างน้อยที่สุดร้อยละ 10 ของช่องว่างในดินซึ่งเพียงพอต่อ จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศจะเจริญได้ แต่เพื่อให้กระบวนการการย่อยสลายเร็วขึ้นอาจมีการเติม อากาศในดิน วิธีการเติมอากาศขึ้นกับขนาดพื้นที่ ปริมาณของไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนและความ ลึกที่ปนเปื้อนในดิน สัดส่วน 0.90 – 1.36 กิโลกรัมของออกซิเจนต่อการย่อยสลายปิโตรเลียม ไฮโดรคาร์บอน (petroleum hydrocarbon) จำนวน 0.45 กิโลกรัม เพื่อให้แน่ใจว่ามีออกซิเจนเพียงพอ

(Wilson *et al.*, 1986) หรือมีการเติมอากาศในช่องว่างระหว่างเม็ดดิน (pore space) อย่างน้อยร้อยละ 10 (Paul and Clark, 1989 ; Foth, 1984) กรณีที่มีการปนเปื้อนไม่ลึกนัก (6 – 12 นิ้ว) นิยมใช้ฟางโปรยลงไปแล้วทำการไถพรวน ซึ่งจะช่วยปรับโครงสร้างของดินด้วย (Baker and Diane, 1994) สำหรับดินที่ปนเปื้อนลึก อาจทำได้โดยการขุดฝังท่อเติมอากาศ แต่วิธีที่ง่ายและประหยัดกว่า คือ การเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide: H_2O_2) เพื่อช่วยการทำงานของจุลินทรีย์ให้ย่อยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นออกซิเจน และน้ำ Freeman and Sferri (1991) เปรียบเทียบระหว่างการฝังท่อเติมอากาศกับการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าการเจริญของเชื้อไม่แตกต่างกันในการเติมอากาศทั้ง 2 แบบ อย่างไรก็ตามการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต้องให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 50 – 200 ppm เพราะถ้ามากเกินไปอาจไปยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

4.6 อุณหภูมิ (temperature) อุณหภูมิมีผลต่อขบวนการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนทั้งทางตรงและทางอ้อม ทางตรง คือ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้น 10 องศาเซลเซียส จากค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละชนิด จะทำให้จุลินทรีย์มีเมตาบอลิซึม (metabolism) สูงขึ้นเป็น 2 เท่า (Baker and Diane, 1994) ส่วนในทางอ้อม คือ ที่อุณหภูมิสูงความชื้นของดินจะเปลี่ยนไปเนื่องจากน้ำระเหยไปบางส่วน Atlas (1975) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิในการย่อยสลายน้ำมันดิบในน้ำพบว่าที่ 200 องศาเซลเซียส โครงสร้างไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวมีอัตราการย่อยสลายสูงกว่าที่อุณหภูมิอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด Debbie and Bartha (1979) ได้ทดลองย่อยสลายน้ำมันในกากตะกอนจุลินทรีย์ (sludge) โดยวิธีกองดิน (biofarming) พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แทบจะไม่เกิดการย่อยสลาย ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส การย่อยสลายเพิ่มขึ้นได้น้อย แต่ที่ 28 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส การย่อยสลายสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด Song *et al.* (1990) เปรียบเทียบการย่อยสลายทางชีวภาพของเชื้อเพลิงแก๊สโซลีน น้ำมันเตา น้ำมันดีเซล และ น้ำมันให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส 27 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าการย่อยสลายจะดีที่สุด คือ 27 องศาเซลเซียส ขึ้นไป วิธีการควบคุมอุณหภูมิให้มีสถานะที่เหมาะสม ได้แก่ การใช้ปุ๋ยหรือวัสดุคลุมดิน (mulches) และการใช้พลาสติกคลุมดิน ซึ่งพบว่าการใช้ปุ๋ยหรือวัสดุคลุมดินสามารถควบคุมการแปรปรวนของอุณหภูมิในดินได้ดีพอควร (Sims *et al.*, 1986) การใช้พลาสติกคลุมดินสามารถลดและควบคุมการระเหยของสารประกอบอินทรีย์ระเหย (volatile organic compounds) ไปสู่อากาศ แต่ต้องเลือกชนิดของพลาสติกที่เหมาะสม เนื่องจากพลาสติกสามารถทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ได้ (Ying *et al.*, 1990)

4.7 ชนิดและปริมาณของสารไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อน เนื่องจากสารไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินมีหลายรูป และ โครงสร้างแตกต่างกันในบางรูปจุลินทรีย์ย่อยสลายได้เร็วกว่า เช่น

แนฟทาลิน แอนทราซีน เป็นต้น Cooper (1986) สำหรับกลุ่ม พวกอะโรมาติไฮโดรคาร์บอนที่โครงสร้างซับซ้อนจุลินทรีย์จะเข้าไปย่อยสลายได้ยากกว่า ดังนั้นจึงมีการเติมสารเคมีบางชนิดลงไปเพื่อช่วยให้ไฮโดรคาร์บอนเปลี่ยนรูปไปให้ง่ายแก่การย่อยสลายจึงเป็นสิ่งจำเป็น เช่น สารลดแรงตึงผิว (surfactants) Ritman and Johnson (1989) รายงานว่าการเติมสารลดแรงตึงผิวช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น (lubricating oil) Ying *et al.* (1990) ศึกษาผลการเติมสารลดแรงตึงผิวกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน (petroleum hydrocarbon) พบว่าการปนเปื้อนลดลงอย่างมาก (ร้อยละ 94) เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวรวมกับอาหารเลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์ ภายในระยะเวลา 16 สัปดาห์ Ellis *et al.* (1990) พบว่าการใช้สารลดแรงตึงผิว ให้ผลดีต่อการย่อยสลายพอ ๆ กับการเติมธาตุอาหารและการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ Cooper (1986) ได้สังเกตการย่อยสลายทางชีวภาพของสารที่ไม่ละลายน้ำ เช่น ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนแสดงให้เห็นว่าขั้นตอนแรกในการย่อยสลายจุลินทรีย์จะสร้างสารลดแรงตึงผิว (emulsifying agents) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความสามารถในการละลาย นอกจากนี้จะมีการผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายตามมา ส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถนำไปย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนได้ดีขึ้น

4.8 ความเข้มข้นของสารปนเปื้อนในดิน ยังมีความเข้มข้นมากก็จะต้องใช้เวลาในการย่อยสลายมากขึ้น ถ้ามีความเข้มข้นของสารปนเปื้อนมากเกินไปจุลินทรีย์จะทนได้ อาจส่งผลทำให้จุลินทรีย์ตายเนื่องจากสารปนเปื้อนเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ กฤตินี (2539) ได้ทำการทดลองการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนในดินโดยวิธีธรรมชาติ พบว่าภายในระยะเวลา 84 วัน ตัวอย่างดินที่เติมน้ำมันดิบที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 มีการลดลงของนอร์มัลอัลเคน (normal alkane) ร้อยละ 80 ในดินชายฝั่ง แม่น้ำ และร้อยละ 69 ในดินป่าชายเลน ในขณะที่ความเข้มข้นอัตราส่วนน้ำมันร้อยละ 4 และร้อยละ 8 ในดินทั้งสองชนิด (ดินชายฝั่งแม่น้ำ และดินป่าชายเลน) มีการลดลงของนอร์มัลอัลเคนใกล้เคียงกันที่ร้อยละ 13 และร้อยละ 8 ตามลำดับ การลดลงของนอร์มัลอัลเคนจะต่ำลง เมื่อความเข้มข้นของน้ำมันดิบในดินสูงขึ้น

4.9 ระยะเวลาการสัมผัสของสารปนเปื้อนและจุลินทรีย์ในดิน ต้องมีระยะเวลาที่เหมาะสม เพราะในช่วงแรกจุลินทรีย์ต้องใช้เวลาในการปรับตัวที่เรียกว่า metabolic adaptation ในระยะ lag phase ของกราฟการเจริญเติบโต (growth curve) โดยการปรับตัวนี้จะทำให้การผลิตเอนไซม์ในการย่อยสลายสารปนเปื้อนในดินดำเนินไปได้ดี ดังนั้นระยะเวลาการสัมผัสของสารปนเปื้อนและจุลินทรีย์ในดินจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญสำหรับการออกแบบระบบการย่อยสลายทางชีวภาพ Raymond *et al.* (1976) พบว่าจุลินทรีย์ในดินที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้จะเพิ่มปริมาณมากขึ้นภายหลังจากที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยปริมาณ

จุลินทรีย์ในดินที่เพิ่มขึ้นนี้จะคงที่เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 1 ปี Pinholt *et al.* (1979) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในดินขณะที่เกิดการย่อยสลายน้ำมัน พบว่ามีเชื้อราที่สามารถย่อยสลายน้ำมันได้เพิ่มจำนวนขึ้นร้อยละ 60 – 82 ขณะที่แบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 3 เป็นร้อยละ 50 หลังจากที่มีน้ำมันปนเปื้อนลงไป Sparrow *et al.* (1978) พบว่าแบคทีเรียในดิน taiga soil จะเพิ่มปริมาณขึ้นเมื่อมีการปนเปื้อนของน้ำมันดิบ และระยะเวลาที่มีการปนเปื้อนเป็นเวลานานจะใช้เวลาในการฟื้นฟูดินปนเปื้อนนานกว่าเนื่องจากระยะเวลาที่มีผลต่อการดูดซับสารมลพิษของดิน เมื่อสารมลพิษสามารถเกาะกับอนุภาคดินได้ดี ทำให้จุลินทรีย์ต้องใช้เวลาในการเข้าย่อยสลายสารมลพิษ

5. เห็ดรา

5.1 ลักษณะทั่วไปของเห็ด

เห็ดรา (fungi) เป็นสิ่งมีชีวิตที่แยกเป็นรา ยีสต์ และเห็ด เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ พบทั้งในน้ำ บนบก และในอากาศ มีลักษณะคล้ายสาหร่าย แต่ไม่มีคลอโรฟิลล์ เป็นเส้นใยเล็ก ๆ ซึ่งแต่ละเส้นเรียกว่า ไยรา (hypha) เส้นเหล่านี้มักอยู่รวมกันเป็นกระจุก จัดเป็นฝั่วย่อยสลายเพราะย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ให้เน่าเปื่อยกลายเป็นสารอินทรีย์ ซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี วิถีชีวิตเห็ดทุกชนิดมีลักษณะคล้ายคลึงกัน เริ่มจากสปอร์เมื่อลอยไปตกอยู่ในบริเวณสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมจะงอกเป็นไยรา (hypha) และกลุ่ม mycelium แล้วรวมเป็นกลุ่มก้อนเกิดเป็นดอกเห็ด เมื่อดอกเห็ดเจริญเติบโตขึ้นจะสร้างสปอร์ซึ่งจะปลิวหรือหลุดไปงอกเป็นไยราได้อีกหมุนเวียนเช่นนี้เรื่อยไป รูปร่างเป็นดอกเห็ดที่เรารู้จักกัน ลักษณะต่าง ๆ ที่มองเห็นได้จากภายนอกแตกต่างกันออกไป ดังต่อไปนี้

5.1.1 รูปร่างของดอกเห็ด ดอกเห็ดจะมีรูปร่างสวยงามแตกต่างกันไป แล้วแต่ว่าชนิด บางชนิดมีรูปร่างคล้ายร่มกาง บางชนิดเหมือนปะการัง บางชนิดเหมือนรังนก

5.1.2 ขนาด มีขนาดแตกต่างกันออกไป มีทั้งขนาดเล็กเท่าหัวไม้ขีดไฟ ไปจนถึงขนาดใหญ่เท่าลูกฟุตบอล

5.1.3 สี มีทั้งสีสวยสะดุดตา และกลมกลืนไปกับสภาพแวดล้อม

5.1.4 กลิ่น บางชนิดมีกลิ่นหอมชวนรับประทาน แต่บางชนิดมีกลิ่นเหม็นเวียนศีรษะ

5.1.5 แหล่งกำเนิด เห็ดแต่ละชนิดมีแหล่งกำเนิดแตกต่างกัน บางอย่างเกิดขึ้นในป่า บนภูเขา บนพื้นดินตามทุ่งนา บนพื้นดินที่มีปลวก บนต้นไม้ บนพืชหรือบนเห็ดด้วยกัน

นอกจากเห็ดในธรรมชาติแล้วปัจจุบันเห็ดยังพบได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดตามโรงเรือน โดยเฉพาะการเพาะเห็ดในถุงพลาสติกกำลังเป็นที่นิยมทำกันมาก เนื่องจากการเพาะเห็ดในถุงพลาสติกนี้ ใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ขี้เลื่อย หรือฟางข้าวผสมอาหารเสริม สามารถทำได้ง่ายเพียงอ่านจากตำราหรือจากการเข้ารับการฝึกอบรม หรือเรียนรู้จากเพื่อนบ้าน ดังนั้นการเพาะเห็ดในถุงพลาสติกจึงแพร่หลายไปอย่างรวดเร็ว ครอบคลุม หลายพื้นที่ หลายจังหวัดของประเทศไทย เหตุนี้ จึงทำให้มีเห็ดที่เพาะจากถุงจำหน่ายและบริโภคกันทั่วไปและสม่ำเสมอ เห็ดที่นิยมเพาะในถุงพลาสติกส่วนมากได้แก่ เห็ดสกุลนางรม (เช่น เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมภูฐาน เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดนางนวล และเห็ดนางรมฮังการี เป็นต้น) เห็ดหลินจือ เห็ดหูหนู เห็ดหอม เห็ดตีนแรด เห็ดยานางิ เห็ดเหล่านี้สามารถเพาะได้บนวัสดุหลายชนิด โดยเฉพาะขี้เลื่อย หรืออาหารหมักจากฟาง

5.2 เห็ดรากับการผลิตเอนไซม์

เห็ดนอกจากใช้เป็นอาหารแล้ว ยังมีความสำคัญต่อกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ เนื่องจากเห็ดสามารถผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายโครงสร้างที่ซับซ้อน เช่น เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) ไซลานเนส (xylanase) แลคเคส (laccase) เปอร็อกซิเดส (peroxidase) และลิกนินเนส (ligninase) (Reddy *et al.*, 2003) เห็ดบางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 1 หรือ 2 ชนิดแต่บางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ที่กล่าวถึงข้างต้นได้ทั้งหมด (Elisashvili *et al.*, 2008) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเอวิเซล (avicel) ขี้เลื่อย (saw-dust) และจมูกข้าวสาลี (wheat bran) เป็นสับสเตรทพบว่าเห็ดหอม (*Lentinus edodes*) และเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju*) มีอัตราการเจริญดีมาก และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสในระดับที่ค่อนข้างสูง ในขณะที่เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) สามารถเจริญเติบโตได้ดีและมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในระดับที่ค่อนข้างสูง ในทางตรงกันข้ามเมื่อใช้ไซแลนจาก birchwood เป็นสับสเตรทพบว่า *L. edodes* และ *P. sajor-caju* มีการเจริญเติบโตดี พร้อมทั้งแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสในระดับที่สูงแต่ไม่พบเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่กลับพบในเส้นใยของเห็ดแสดงว่าไม่มีการปลดปล่อยเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสออกนอกเซลล์ ในขณะที่ *V. volvacea* มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำในอาหารที่มีไซแลนเป็นสับสเตรทและไม่พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส (Basal *et al.*, 2003) ซึ่งตรงกับรายงานของ Saksek *et al.*, (2002) และ Basal *et al.*, (2003) ที่พบว่าเห็ดในตระกูล *Pleurotus* sp. สามารถเจริญในสับสเตรทที่เป็นลิกโนเซลลูโลสได้หลากหลายชนิด แต่ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ในระดับต่ำ ในขณะที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสได้ในระดับที่สูง จึงอาจกล่าวได้ว่า *Pleurotus* sp. ใช้สับสเตรทที่เป็นเฮมิเซลลูโลสได้ดีกว่าเซลลูโลสนอกจากนี้ *P. ostreatus*

และ *P. sajor-caju* ยังสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสและฟีนอลออกซิเดส (phenol oxidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยสลายสารประกอบลิกนิน (Sannia *et al.*, 1986) ในขณะที่ *V. volvacea* ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบลิกนินได้ (Basal *et al.*, 2003)

ส่วนรูปแบบการผลิตเอนไซม์ในเห็ดหูหนู *Auricularia* sp. พบว่าการผลิตเอนไซม์ลิกนินเนส สูงในช่วงแรกของการเจริญของเส้นใย จากนั้นจะลดต่ำลงในขณะที่เอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มสูงขึ้นทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ ซึ่งจะกลายเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญของเส้นใยและเป็นการเพิ่มอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยโดยจะเกิดการรวมตัวกันเป็นดอกเห็ด (Lau *et al.*, 2003) และ Machuca *et al.* (2001) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ของ *Pleurotus* sp. 2 สายพันธุ์ได้แก่ *P. ostreatus* และ *P. sajor-caju* ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีหอยกกล้วยเป็นสับสเตรท พบว่า *P. ostreatus* และ *P. sajor-caju* ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ดีกว่า เซลลูโลสและลิกนินโดยจะย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสในช่วงแรกของการเจริญและย่อยสลายลิกนินเป็นลำดับถัดมาจากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้เข้าใจถึงรูปแบบการผลิตเอนไซม์ของเห็ดในสับสเตรทต่าง ๆ ซึ่งเป็นพื้นฐานความรู้ที่สำคัญในการนำไปพัฒนา ปรับปรุง และประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ที่ต้องการเอนไซม์ที่มีราคาถูก โดยการผลิตเอนไซม์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร หรือ จากอุตสาหกรรมป่าไม้ (Elisashvili *et al.*, 2001) ภายหลังจากเพาะเลี้ยงและเก็บเกี่ยวดอกเห็ดแล้ว วัสดุที่เหลือจากการเพาะเห็ดจะเป็นแหล่งของเอนไซม์ที่มีราคาถูกและนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ต่อไป (Elisashvili *et al.*, 2003)

เห็ดที่นิยมนำมาสกัดเอนไซม์ลิกนินโนไลติก คือ กลุ่มเห็ดสกุลนางรม (*Pleurotus* sp.) ซึ่งตามธรรมชาติเห็ดนางรมมีความสำคัญในด้านการเป็นอาหารของมนุษย์ สามารถเจริญเติบโตบนต้นไม้ได้ตามธรรมชาติ และสามารถสร้างเอนไซม์ลิกนินโนไลติก เอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสได้ (จารุวรรณ, 2548) มีการศึกษาการสร้างเอนไซม์ลิกนินโนไลติกของเห็ดนางรมในการย่อยสลายสารมลพิษในดิน สีย้อมผ้าที่ปะปนออกมากับน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอ และการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษ (Breen and Singleton, 1999) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการสกัดเอนไซม์ในเห็ดชนิดอื่น ๆ เช่น เห็ดหลินจือ เห็ดหอม เป็นต้น



เห็ดนางรม
(*Pleurotus ostreatus*)



เห็ดหลินจือ
(*Ganoderma lucidum*)



เห็ดเป่าฮื้อ
(*Pleurotus cystidiosus*)



เห็ดนางฟ้า
(*Pleurotus sajor-caju*)



เห็ดหอม
(*Lentinus edodes*)



เห็ดหูหนู
(*Auricularia* spp.)

ภาพที่ 2 ตัวอย่างชนิดเห็ดที่ใช้ในการทดลอง

ที่มา: Breen and Singleton (1999)

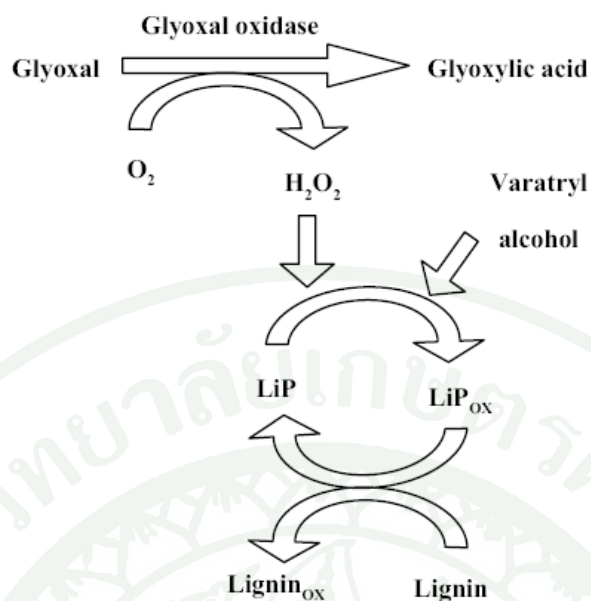
5.3 เอนไซม์ลิกนินโอไลติกในเชื้อราขาว

เอนไซม์หลักที่สำคัญในการบำบัดสีของเชื้อรากลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ประเภทออกซิโดรีดักเตส ที่จับออกมานอกเซลล์ เพื่อย่อยสลายสารประเภทลิกนิน (extracellular ligninolytic

enzyme) ซึ่งเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่ คือ เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase ; LiP) เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase ; MnP) และเอนไซม์แลคเคส (laccase ; Lac) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ในช่วงเมตาบอลิซึมทุติยภูมิ (secondary metabolism) โดยเชื้อรากลุ่มนี้บางตัวสามารถผลิตเอนไซม์ได้ทั้ง 3 ชนิด แต่บางสายพันธุ์สามารถผลิตได้เพียงหนึ่งหรือสองชนิดเท่านั้น (Wilson *et al.*, 1986) กลุ่มเอนไซม์ชนิดนี้มีคุณสมบัติไม่เฉพาะเจาะจง จึงสามารถย่อยสลายโมเลกุลที่ย่อยสลายได้ยากได้แก่ สารมลพิษอินทรีย์ที่ย่อยสลายยาก เช่น chlorophenol, nitrotoluenes, polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) รวมทั้งสีย้อมซึ่งเอนไซม์ทั้งสามชนิดจะมีปฏิกิริยาในการย่อยสลายสารต่างกัน ดังนี้

5.3.1 เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase ; LiP ; EC 1.11.1.14)

เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Lignin peroxidase; EC 1.11.1.7) เป็นเอนไซม์ตัวแรกที่มีการค้นพบว่า สามารถย่อยสลายลิกนินได้โดยอาศัยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นตัวทำให้เกิดการตัดพันธะ $C\alpha-C\infty$ ของสารประกอบลิกนิน และ methylated lignin โดยทำการแยกเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสครั้งแรกจาก *Phanerochaete chrysosporium* น้ำหนักโมเลกุล 42 kDa มี protoheme IX เป็น prosthetic group โดยมี 1 โมลของ protoheme IX ต่อโมลของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส โดยปกติเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน แต่ต้องมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัว กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา (Renganathan *et al.*, 1986) เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในธรรมชาติมีองค์ประกอบเป็น heme iron atom (Fe III) เอนไซม์ Lip เป็นเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซลล์ในช่วง secondary metabolism ในสถานะที่มีการจำกัดไนโตรเจน เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล สารประกอบเอมีนที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน สารประกอบอีเทอร์ที่เป็นวงแหวน และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนและมีโมเลกุลขนาดใหญ่ กลไกการย่อยลิกนินเริ่มจากเอนไซม์ Lip ถูกออกซิไดส์โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ทำให้เกิดสารตัวกลางที่มีการสูญเสียอิเล็กตรอนและสารนี้จะออกซิไดส์สับสเตรทและทำให้เอนไซม์กลับสู่สภาวะปกติ (Breen and Singleton, 1999) ดังแสดงในภาพที่ 3

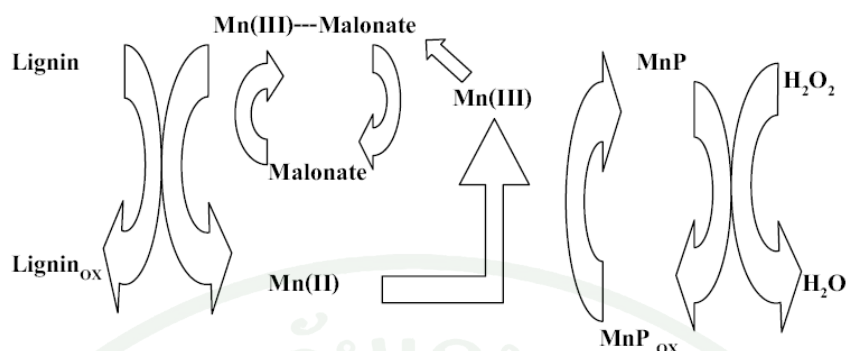


ภาพที่ 3 กลไกการทำงานของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

ที่มา : Breen and Singleton (1999)

5.3.2 เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase; MnP)

เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส มีกลไกการทำงานเหมือนกับเปอร์ออกซิเดสทั่วไปโดยจะมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา โดย $Mn(II)$ ทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอน 2 ตัว แก่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เกิดเป็น สารประกอบปฏิกิริยา (MnP_{ox}) จะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็น สารประกอบทุติยภูมิ (MnP) และเข้าสู่สภาวะเดิมคือ เอนไซม์ MnP และถ้ามีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากเกินไปจะทำให้เกิดเป็น สารประกอบตติยภูมิ ($Mn(III)$) ได้อีก ซึ่งสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอล (phenolic) รวมทั้งสีย้อมได้ด้วยเช่นกัน เอนไซม์ MnP สามารถออกซิไดซ์ glutathione dithiothreitol และ NADPH และผลิตน้ำได้จากออกซิเจน ซึ่งเกิดในปฏิกิริยา $Mn(II)$ -dependent reaction และสามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันสำหรับการย่อยสลายลิกนิน (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 กลไกการทำงานของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

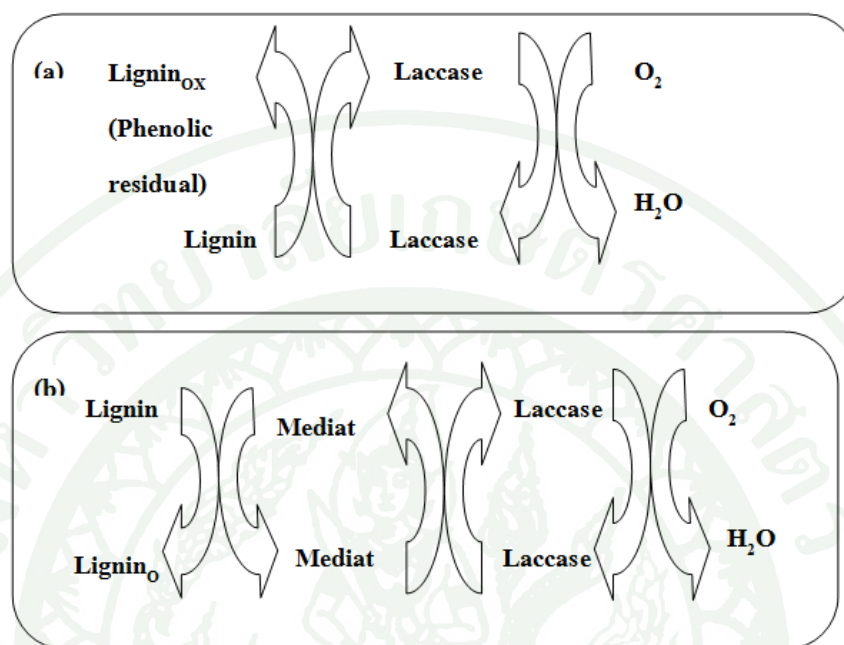
ที่มา : Breen and Singleton (1999)

5.3.3 เอนไซม์แลคเคส (laccase ; Lac; EC 1.10.3.2)

เอนไซม์แลคเคส เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม extracellular glycoprotein เอนไซม์แลคเคสเป็นเอนไซม์ที่มีทองแดง (Cu) เป็นองค์ประกอบของโมเลกุลทำหน้าที่ในการออกซิไดส์สารประกอบฟีนอล (phenolic compound) และสารที่ไม่ใช่สารประกอบฟีนอล (nonphenolic compounds) เช่น guaiacol, 2,6-dimethoxyphenol, p-phenylene diamine และ syringaldazine เป็นต้น และรีดิวซ์โมเลกุลออกซิเจนได้เป็นน้ำ ซึ่งเอนไซม์แลคเคสอาจจะทำปฏิกิริยาโดยตรงกับส่วนที่เป็นสารประกอบฟีนอลของลิกนิน หรืออาจต้องการสารตัวกลาง (mediator compound) ซึ่งทำหน้าที่เป็นโคสับสเตรท (Breen and Singleton, 1999) กลไกการทำงานแสดงในภาพที่ 5 สารตัวกลางที่รู้จักดี ได้แก่ ABTS (2, 2'- azinobis-(3)-ethylbenzethiazoline-6-sulphonate)

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินโอไลติก ได้แก่ เชื้อราขาว (white rot fungi) เชื้อราน้ำตาล (brown rot fungi) และ ราผุอ่อน (soft rot fungi) กลุ่มที่ได้รับความสนใจได้แก่ เชื้อราขาว เช่น *P. chrysosporium* (Hatakka, 1994) *P. cinnabarinus* (Eggert et al., 1997), *P. ostreatus* (Baldrian and Gebriel, 2003) เป็นต้น ซึ่ง *P. chrysosporium* เป็นเชื้อที่พบการผลิตเอนไซม์ลิกนินโอไลติก มากที่สุด เชื้อราขาวแต่ละชนิดจะสร้างเอนไซม์แต่ละชนิดแตกต่างกัน บางชนิดสร้างเอนไซม์ได้ทั้ง 3 ชนิด บางชนิดสร้างเอนไซม์ได้เพียง 2 หรือ 1 ชนิดเท่านั้น (Kirk and Cullen, 1998) ในกรณีของ *P. chrysosporium* มีการสร้างเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดแต่ในการทำงานเอนไซม์แลคเคสจะทำงานร่วมกับเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส หรือเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมากกว่าการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Eggert et

al., 1997) ส่วนรูปแบบการย่อยลิกนินใน *P. ostreatus* เป็นการทำงานร่วมกันของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคส (Baldrian and Gebriel, 2003) ดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 5 กลไกการทำงานของเอนไซม์แลคเคส (a) ไม่ใช้มีเดียเตอร์ (b) ใช้มีเดียเตอร์

ที่มา : Breen and Singleton (1999)

ตารางที่ 3 ตัวอย่างชนิดของเชื้อราขาวและชนิดของเอนไซม์ที่ผลิตได้

เชื้อรา	เอนไซม์
<i>Lentinus tigrinus</i>	Lac และ MnP
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	LiP และ MnP
<i>Pleurotus eryngii</i>	LiP และ MnP
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Lac และ MnP
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Lac และ MnP
<i>Trametes (Coriolus) versicolor</i>	Lac LiP และ MnP

ที่มา : Wensenberg *et al.* (2003)

6. การใช้วัสดุเหลือใช้ในพื้นฟูดินปนเปื้อน

พื้นฟูสภาพแวดล้อมโดยวิธีชีวภาพ เป็นกระบวนการทางสิ่งแวดล้อมที่สามารถเกิดขึ้นเองได้ในสภาพธรรมชาติ (natural attenuation) โดยการเปลี่ยนของเสียที่เป็นสารอินทรีย์ให้กลับมาเป็นชีวมวลของพวกสิ่งมีชีวิตในดิน โดยเฉพาะจุลินทรีย์ ที่มีการย่อยสลายสารเหล่านี้เพื่อใช้เป็นอาหาร จุลินทรีย์จะเข้าไปย่อยสลายสารเหล่านี้ให้อยู่ในรูปของ CO_2 , CH_4 และกรดอินทรีย์ต่าง ๆ

ก้อนเชื้อเห็ดที่มาจากโรงเพาะเห็ดนั้นเป็นของเสียที่ถูกนำไปทิ้ง และจะส่งกลิ่นเหม็นบริเวณที่นำไปทิ้งก่อให้เกิดความรำคาญ และต้องเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดขยะเหล่านั้น ก้อนเชื้อเห็ดที่หมดระยะเก็บผลผลิตแล้วยังคงมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์มาย่อยสลายสารอินทรีย์ต่าง ๆ รวมไปถึงสาร PAHs ด้วย หากเราสามารถนำก้อนเชื้อเห็ดที่ใช้แล้วนี้มา พื้นฟูดินที่มีการปนเปื้อนสาร PAHs โดยเติมลงไปในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนในอัตราส่วนที่เหมาะสม และปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับการทำงานของจุลินทรีย์ในก้อนเชื้อเห็ดเพื่อเป็นเพิ่มประสิทธิภาพในการพื้นฟูดินที่มีการปนเปื้อน PAHs ได้ดียิ่งขึ้น ก็จะเป็นการเพิ่มคุณค่าของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมไปถึงลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดอันตรายจากการสัมผัสกับสาร PAHs ให้แก่ ประชาชน และเกษตรกร ที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของ PAHs ได้อีกทางหนึ่ง

ปัจจุบันประเทศไทยมีการศึกษาและทำวิจัยในด้านนี้น้อยและควรจะต้องเล็งเห็นถึงเหตุจำเป็นที่จะต้องบำบัดในดิน หากปล่อยให้เกิดการปนเปื้อนสาร PAH จะทำให้ที่ดัดแปลงเป็นพืช นอกจากจะใช้งานด้านเกษตรกรรมไม่ได้แล้ว ยังส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้น งานวิจัยนี้สนใจที่จะพื้นฟูดินที่ปนเปื้อนสาร PAHs ในดิน โดยใช้ก้อนเชื้อเห็ดที่เก็บผลผลิตแล้วมาใช้ในการพื้นฟูโดยจุลินทรีย์ต่าง ๆ ในก้อนเห็ดนั้นยังสามารถผลิตเอนไซม์มาย่อยสลายสารอินทรีย์ในดินได้อีกเพื่อเปลี่ยนเป็นสารอาหารให้แก่จุลินทรีย์เอง เพื่อให้ระบบนิเวศน์ รวมทั้งสิ่งแวดล้อม คงสภาพอยู่ได้ถ้าใช้การบำบัดดินปนเปื้อนสาร PAHs รวมทั้งสารอินทรีย์ชนิดอื่นทางชีวภาพ

นอกจากนี้ยังนำไปสู่การวิจัยและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สาร PAHs รวมไปถึงเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนา การสกัดเอนไซม์จากวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด มาใช้ในการลด PAHs ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น นำไปสู่การพัฒนาระบบการบำบัดมลพิษต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมที่ปลดปล่อยสาร PAHs และเป็นองค์ความรู้ที่เป็นประโยชน์ต่อภาคเอกชนหรือภาครัฐ ที่จะนำไปประยุกต์ใช้เทคนิคการบำบัดดินปนเปื้อนสารอินทรีย์ชนิดอื่น ในพื้นที่ปนเปื้อนในดิน อันเกิดจากสารปิโตรเคมีที่เป็นปัญหามลพิษได้

7. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การหมักทำปุ๋ย (composting) เป็นวิธีการบำบัดของเสียจากเกษตรกรรมและของเสียชุมชนที่ใช้อย่างแพร่หลาย โดยการทำปุ๋ยหมัก ซึ่งมีตั้งแต่ระบบอย่างง่ายคือลักษณะกองดิน (windrows) จนถึงระบบที่ต้องใช้ความรู้ด้านวิศวกรรมขั้นสูงหรือระบบที่มีการ feed ของเสียอย่างต่อเนื่อง (Atlas and Bartha, 1987) และในปัจจุบันได้ประยุกต์วิธีการทำปุ๋ยหมักมาใช้ในการบำบัดสารปนเปื้อนในดิน เช่น heavy oil, petroleum waste, PAHs, explosive และอื่น ๆ (EPA, 1996; Backer and Herson, 1994) Wong et al. (2000) ศึกษาการบำบัดดินที่ปนเปื้อน PHAs ด้วยวิธีการหมักร่วมกับมูลสุกร ที่อัตราส่วน 3:1 พบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถบำบัดสาร phenanthrene และ anthracene ได้มากกว่า 90 % ภายในระยะเวลาหมัก 21 วัน

Sasek et al. (2002) ได้ศึกษาการใช้วัสดุเหลือใช้มาลดปริมาณสาร PAHs ในดิน โดยใช้ก้อนเชื้อเห็ดที่ใช่แล้ว (*Agaricus bisporus*) ผสมเปลือกถั่ว มูลไก่ และขี้ปัสสาวะ โดยอัตราส่วนดินต่อ วัสดุที่ใช้เป็น 1 : 4 ปรับความชื้น 60 % ค่าไนโตรเจน 1.7 % หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 100 วัน ในกล่อง ขนาด 1.3 x 1.35 x 2.5 m (กว้างx ยาวx สูง) ปิดทิ้งไว้เป็นเวลา 100 วัน และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่า PAHs ในวันที่ 54 และ 100 โดยใช้เครื่อง HPLC (Hewlet-Packard 1090; Column: 5 μ m, size : 250-4 mm) พบว่าสามารถลด PAHs ได้ 20-60 % ใน 54 วัน และ 38-80 % ใน 100 วัน หลังจากครบ 100 วัน แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษทางนิเวศวิทยา (ecotoxicity) โดยใช้ bioluminescent bacteria (*Vibrio fischerii*) ไล้เดือนดิน (*Eisenia fetida*) และอัตราการงอกของเมล็ดมัสตาร์ด (*Brassica alba*) ผลที่ได้พบว่า จากค่า EC₂₀ พบว่าเปอร์เซ็นต์ การยับยั้งการเรืองแสงลดลง ไล้เดือนดินสามารถอยู่รอดได้หลังจากทิ้งไว้ 14 วันและเมล็ดมัสตาร์ดสามารถงอกได้ ในเวลา 7 วัน แสดงให้เห็นว่าวัสดุเหลือใช้ดังกล่าวสามารถลดความเป็นพิษของสาร PAHs ได้โดยใช้เดือนดินสามารถอยู่รอดได้ในดินหลังจากมีการฟื้นฟูแล้ว และอัตราการงอกของเมล็ดก็เพิ่มขึ้นจากดินที่ยังไม่ได้ฟื้นฟู

Atagana et al. (2004) ได้ศึกษาการใช้มูลสัตว์ปีกร่วมกับวัสดุเหลือใช้ในการฟื้นฟูดินที่ปนเปื้อน PAHs โดยใช้มูลสัตว์ปีกลงไปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการลดสาร PAHs วัสดุที่ใช้คือเศษแผ่นไม้ ผสมกับดินในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เพื่อเพิ่มอากาศในกองดินและใส่มูลสัตว์ปีกลงไป ในอัตราส่วน 4 ต่อ 1 โดยวัดอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ความชื้น ในกองหมักทุก ๆ เดือน วิเคราะห์ปริมาณสาร PAHs โดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph flameionization detector (GC-FID) การเปลี่ยนแปลงในกอง พิจารณาจากค่า CO₂ ที่เปลี่ยนแปลงไป

จากผลการศึกษาพบว่าการใช้มูลสัตว์ปีกร่วมกับวัสดุเหลือใช้ในการฟื้นฟูดินที่ปนเปื้อน PAHs จะสามารถลดความเข้มข้นของสาร PAHs เหลือปริมาณ 1 mg/kg ใน เวลา 19 เดือน และเห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างดินที่ใช้มูลสัตว์ปีกช่วยในการฟื้นฟูดินที่ไม่ใช้ในการฟื้นฟู จากรายงานดังกล่าวจะสามารถนำไปสู่การพัฒนาการลดปริมาณสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดินและ การปรับปรุงปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการฟื้นฟูดินปนเปื้อนสาร PAHs ได้แก่ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน อุณหภูมิ ความชื้น และ ค่าความเป็นกรดด่าง ในดิน ที่เหมาะสมต่อไป

Matsubara *et al.* (2005) ได้คัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพเพื่อใช้สำหรับฟื้นฟูดินที่ปนเปื้อนสาร PAHs โดยใช้เชื้อราในกลุ่ม white-rot fungi ซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณของ PAHs ทำการทดสอบกับดินทราย(sand) เลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็ง สารPAHs ที่นำมาทำการทดลอง คือ ฟรีแนนทรีน และ ไพรีน เชื้อราที่นำมาทำการศึกษา มีดังนี้ *Coriolus versicolor* *Schizophyllum commune* *Pleurotus ostreatus* *Pycnoporus coccineus* *Irpex lacteus* *Bjerkandera adusta* *Coprinus cinereus* *Ganoderma lucidum* และ *Trichoderma harzianum* และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วย เครื่อง Gas Chromatograph flameionization detector (GC-FID) จากการศึกษาพบว่าเชื้อราแต่ละกลุ่มจะสามารถลดความเข้มข้นของ ฟรีแนนทรีน ได้ดีกว่า ไพรีน เชื้อราที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการลด ฟรีแนนทรีน คือ *T. harzianum* และพบว่าปริมาณของ ฟรีแนนทรีน มีผลต่อการเจริญของเชื้อราชนิดนี้ เนื่องจากจะเจริญได้ดีเมื่อมี ฟรีแนนทรีน เท่านั้น และยังพบว่าเชื้อราที่สามารถนำมาพัฒนาในการลด PAHs ตัวอื่นได้ดี คือ *S. commune* และ *P.ostreatus* เพราะสามารถลดได้ทั้ง ฟรีแนนทรีน และไพรีน เนื่องจากมีอัตราการเจริญได้ดีทำให้แข่งขันกับเชื้อราอื่น ๆ ได้ดีกว่า

นาริรัตน์ และคณะ (2003) ได้ศึกษาการใช้วัสดุจากการเกษตรเพื่อเร่งการย่อยสลายสาร PAHs โดยจุลินทรีย์ในดิน โดยใช้ดินทรายที่ทำให้ปนเปื้อนด้วย ฟรีแนนทรีน ฟลูโอเรนทรีน และ ไพรีน ผสมกับวัสดุการเกษตรแต่ละชนิด ได้แก่ ฟางข้าว เปลือกถั่วลิสง และไบจามจูรีในอัตราส่วน 9:1 ในหลอดแก้วที่มีฝาเกลียวปิดและทำให้เป็นระบบนิเวศจำลองที่มีดิน 2 กรัม โดยปรับความชื้นที่ 60% ของความจุในการอุ้มน้ำของดินและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด วิเคราะห์ปริมาณสาร PAHs โดยใช้เครื่อง HPLC พบว่า การเติมเปลือกถั่วและไบจามจูรีช่วยทำให้ปริมาณ ฟรีแนนทรีน และ ลดลงจนตรวจไม่พบภายใน 24 วัน ส่วน ฟลูโอเรนทรีน และ ไพรีน ลดลงจนตรวจไม่พบ ภายใน 42 วัน ในขณะที่ฟางข้าวไม่มีผลช่วยการย่อยสลาย ปริมาณ PAHs ไม่ลดลงในดินที่ไม่เติมวัสดุทางการเกษตรและในชุดควบคุมที่ใช้ดินปลอดเชื้อ จากนั้นทำการตรวจหาปัจจัยทางชีวภาพพบว่า ตรวจหาแบคทีเรียที่ย่อยสลาย ฟรีแนนทรีน ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของแบคทีเรียที่ย่อย

สลายสารนี้ โดยการตรวจหาบริเวณไฮดรอปโคโลนิของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ซึ่ง จี๊ด ฟันด้วยสารละลาย ฟรีแนนทรีน พบแบคทีเรียที่ย่อยสลาย ฟรีแนนทรีน จำนวนมากทั้งในดินที่ผสม เปลือกถั่วและดินที่ผสมใบจามจุรี นอกจากนี้ได้หาค่า bioavailability ที่มีต่อสาร PAHs พบว่า ใบจามจุรีจะทำให้ bioavailability ที่มีอยู่ในดินสูงกว่าในเปลือกถั่ว



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ

- 1.1 Analytical balance; 4 digits
- 1.2 Autoclave
- 1.3 Centrifuge
- 1.4. Gas Chromatograph
- 1.5 Hot plate
- 1.6 Incubator
- 1.7 Magnetic stirrer
- 1.8 pH meter
- 1.9 Shaker
- 1.10 Thermometer

2. อุปกรณ์

- 2.1 Beaker
- 2.2 Deionized water volumetric flask
- 2.3 Filter paper 0.45 μm
- 2.4 Flasks
- 2.5 Funnel
- 2.6 Magnetic bar
- 2.7 Measuring pipet
- 2.8 Vial 1.5 ml
- 2.8 Transfer pipet

3. สารเคมี

- 3.1 Acetonitrile (CH_3CN) HPLC grade
- 3.2 Anthracene-stock standard solution
- 3.3 Benzo[a]pyrene-stock standard solution

3.4 Deionized water

3.5 Napthalene-stock standard solution

3.6 Polyoxyethylene 10 lauryl ether (POLE) (C₁₂E₁₀) A.R. grade

3.7 Pyrene-stock standard solution

วิธีการ

1. การศึกษาและรวบรวมข้อมูลเบื้องต้น

รวบรวมค้นคว้าและตรวจสอบผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและการใช้ในการวิจารณ์ผลการศึกษา

2. วิธีการดำเนินงาน

2.1 การเตรียมก้อนเลี้ยงเชื้อเห็ดที่เก็บผลผลิตแล้ว

นำก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ด 6 ชนิด คือ เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju*) เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) เห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) และเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) เห็ดหูหนู (*Auricularia spp.*) และ เห็ดหอม (*Lentinus edode*) ซึ่งเป็นก้อนเลี้ยงเชื้อหลังจากหมดระยะการเก็บดอกเห็ดแล้ว จากฟาร์มเพาะเห็ดอรัญญิก อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม นำก้อนเลี้ยงเชื้อเห็ดเก็บที่ตู้เย็นที่มีอุณหภูมิและความชื้นเหมาะสม ก่อนนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของก้อนเชื้อเห็ดที่ใช้แล้วทั้ง 6 ชนิด เมื่อนำไปทดลองทำการผสมคลุกเคล้าก้อนเลี้ยงเชื้อเห็ดให้เป็นเนื้อเดียวกันสำหรับเห็ดแต่ละชนิดก่อนนำไปผสมกับดินที่ทำให้ปนเปื้อนด้วยสาร PAHs แล้ว

2.2 การเตรียมดินสำหรับวิเคราะห์และทำการทดลอง

2.2.1 เตรียมดินโดยนำดินพื้นที่นาจากจังหวัดปทุมธานี มาตากโดยวิธี ผึ่งลม ทบดินให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 เซนติเมตร นำดินตัวอย่างไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี ก่อนทำการทดลองลดปริมาณสาร PAHs ในดิน ดังนี้ ค่าอินทรีย์วัตถุในดิน ค่าความสามารถใน

การแลกเปลี่ยนประจุบวกของดิน (CEC) ค่าความเป็นกรดต่างของดิน ปริมาณไนโตรเจนในดิน ชนิดของเนื้อดิน และค่าความชื้นของดิน

2.2.2 นำดินตัวอย่างมาใส่กระบอกอะลูมิเนียม ขนาด กว้าง 1.5 ฟุต x ยาว 1.5 ฟุต x สูง 1 ฟุต กระบะละ 10 กิโลกรัม ทำให้ปนเปื้อนด้วยสาร PAHs ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ไพรีน (pyrene) แนฟทา ลีน (naphthalene) เบนโซไพรีน (benzo [a] pyrene) และแอนทราซีน (anthracene) ที่ความเข้มข้น 110 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน

2.3 ศึกษาชนิดของก้อนเชื้อเห็ดที่ใช้แล้วที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการลดปริมาณ PAHs

โดยเทียบอัตราส่วนก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินมีการปนเปื้อนของ PAHs ในปริมาณ ที่เท่า ๆ กันในอัตราส่วนก้อนเชื้อเห็ดต่อดินปนเปื้อน PAHs 2 ต่อ 5 กิโลกรัม ที่อุณหภูมิห้อง และความชื้นความชื้นให้อยู่ระหว่าง 40 – 60 % นำดินที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ ปริมาณสาร PAHs และ ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส ปริมาณคาร์บอน ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด อุณหภูมิ และค่าความเป็น กรดต่าง มีขั้นตอนดังนี้

2.3.1 ทำให้ดินปนเปื้อนด้วยสาร PAHs 4 ชนิด ได้แก่ ไพรีน แนฟทา ลีน เบนโซเอ ไพรีน และ แอนทราซีน 110 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน

2.3.2 ทิ้งดินที่ปนเปื้อนสาร PAHs ไว้ 7 วันหลังจากนั้น เติมก้อนเชื้อเห็ด 6 ชนิด ได้แก่ เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมฮังการี เห็ดหลินจือ เห็ดหูหนู เห็ดหอม และเห็ดเป๋าฮื้อ ในอัตราส่วน 2 ต่อ 5 กิโลกรัม ในแต่ละชนิด โดยใช้หนึ่งกระบอกทดลองต่อก้อนเชื้อเห็ด 1 ชนิด (ชนิดละ 2 กระบอก)

2.3.3 หลังจากผสมก้อนเชื้อเห็ด เก็บตัวอย่างดินเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ค่า กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสเริ่มต้น ปริมาณคาร์บอน และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

2.3.4 เก็บตัวอย่างดินในแต่ละชุดการทดลอง ทุก ๆ สัปดาห์ ไปวิเคราะห์ปริมาณ PAHs และค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส ปริมาณคาร์บอน และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดพร้อมทั้ง วัด อุณหภูมิ ความชื้น และค่าความเป็นกรดต่างของดินในกระบอกทดลอง

2.4 การวิเคราะห์ชนิดและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ในก้อนเชื้อเห็ดที่ใช้แล้ว ที่มีผลต่อการลด PAHs ในดิน

2.4.1 เตรียมตัวอย่างดินและก้อนเชื้อเห็ดที่จะใช้ดังนี้

- ก. ดินที่มี PAHs ปนเปื้อน 110 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
- ข. ก้อนเชื้อเห็ดเปล่าที่ผ่านการฆ่าด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ
- ค. ก้อนเชื้อเห็ด ที่ใช้แล้ว 6 ชนิด คือ เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม อังการี เห็ดเป่าฮือ เห็ดหลินจือ เห็ดหูหนู และ เห็ดหอม
- ง. ผสมดินปนเปื้อนกับก้อนเชื้อเห็ดลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราส่วน ดินปนเปื้อน 100 กรัม ต่อก้อนเชื้อเห็ด 100 กรัม โดยมีชุดควบคุมเป็นดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ผสมกับก้อนเชื้อเห็ดเปล่าที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว หลังจากผสมกันแล้วเก็บตัวอย่างดินเพื่อนำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ และปริมาณ PAHs เริ่มต้น จากนั้นปิดฝาด้วยสำลีบางๆปล่อยให้อากาศเข้าไปได้ เก็บขวดทดลองทั้งหมดไว้ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะ เวลา 7 วัน เพื่อดูประสิทธิภาพในการลดปริมาณสาร PAHs โดย นำดินที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส ค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

2.4.2 วิธีการสกัดเอนไซม์

- ก. ชั่งตัวอย่างดินปนเปื้อนสาร PAHs ที่ผสมกับก้อนเชื้อเห็ดแล้ว 15 กรัม เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ปริมาณ 30 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที นาน 6 ชั่วโมง
- ข. นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อแยกเอนไซม์ที่สกัดออกมาได้และนำส่วนที่ใสไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ด้วย ด้วยเครื่อง ยูวี วิสทิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

2.4.3 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสวิเคราะห์จากการวัดอัตราการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้น ในสารละลายที่ประกอบไปด้วย 2,2 -azinobis-3-ethyben-thiazoline-6-sulfonate (ABTS) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ซัคซินิคแอคติกบัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์ (pH 4.5) และ เอนไซม์ ที่สกัดได้ 100 μ l โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ของ ABTS ที่ถูกออกซิไดซ์ ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 420 nm ($E_{420} = 36000M^{-1}cm^{-1}$) ด้วยเครื่อง ยูวี วิสทิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Robinson *et al.*, 2001)

2.4.4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสตรวจวัดด้วยวิธี MBTH/DMAB โดยในสารละลาย 4 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH), MnSO_4 , H_2O_2 , ซัคซินิกแอคติกบัฟเฟอร์ 100 nM (3-dimethylamino benzoic acid), (pH 4.5) และ เอนไซม์ ที่สกัดได้ 100 μl โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 590 nm ($E_{590} = 36000\text{M}^{-1}\text{cm}$) ด้วยเครื่อง ยูวี วิสสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Robinson *et al.*, 2001)

2.5 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการลดปริมาณ PAHs ของก้อนเชื้อเห็ดที่ใช้แล้ว โดยมีปัจจัยดังนี้

2.5.1 การเก็บตัวอย่างจากกองดินทดลองในข้อ 2.3.4 เก็บตัวอย่างทั้งหมด 4 จุด ใช้วิธีการแบ่งพื้นที่หน้าตัดของกองดินเป็น 4 ส่วนเท่า ๆ กัน แล้วเก็บตัวอย่างที่บริเวณกึ่งกลางของพื้นที่ที่แบ่งดังกล่าว โดยแต่ละจุดเก็บตัวอย่างละ 5 กรัม แล้วนำมารวมกันเป็นตัวแทนของตัวอย่าง สำหรับการวิเคราะห์สาร PAHs ซึ่งจะมีน้ำหนักประมาณ 20 กรัม ก่อนนำไปวิเคราะห์สาร PAHs ทำซ้ำ 5 ครั้งสำหรับการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ความถี่ในการเก็บตัวอย่าง คือ วันแรก วันที่ 7 14 21 และ 28

2.5.2 การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างดินที่ได้จากข้อ 2.5.1 มาคุณสมบัติทางด้านเคมี และกายภาพ มีรายละเอียด ดังนี้

ก. ความชื้น ใช้วิธี gravimetric method โดยอบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

ข. ค่า pH ใช้ pH meter โดยใช้อัตราส่วนน้ำ:ตัวอย่าง เท่ากับ 1:1

ค. ปริมาณคาร์บอน ใช้วิธีการคำนวณของ Gotaas (1976)

ง. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ใช้วิธี Kjeldahl method

จ. อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ใช้วิธีการคำนวณ

ฉ. ปริมาณสาร PAHs โดยวิธีสกัดด้วยเครื่อง Sonicator ซึ่งวิธีนี้สามารถ ให้ค่า % recovery ของสาร PAHs ได้ 91 % ที่ความเข้มข้น 50 ppm (American Public Health Association, 1998)

2.5.3 วิธีการสกัด PAHs จากดินตัวอย่าง

ก. เก็บตัวอย่างดินในแต่ละกระบะ ในข้อ 2.6.1 มาทำให้แห้งที่โดยอบในตู้อบอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งดินตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร (ทำซ้ำ 5 หลอดในแต่ละกองดินที่เก็บมา)

ข. จากนั้นเติมสาร POLE เข้มข้น 6.5 % ลงในดินที่อบไว้แล้วนำไปใส่เครื่องเพื่อสกัดสาร PAHs ด้วย เครื่อง Sonicator ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

ค. กรองด้วยกระดาษกรอง PTFE ขนาด 0.45 μm วัดปริมาตร สารที่เหลือจากการกรอง หลังจากนั้น นำสารละลายที่ได้จากการกรอง 1 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) ตามวิธีของ Matsubara *et al.*, (2005)

2.5.3 วิเคราะห์ปริมาณของสาร PAHs

วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC ที่วิเคราะห์ได้ทั้งปริมาณและคุณภาพของสาร PAHs ในของดินที่เก็บมาจากกระบะทดลอง

สภาวะที่ใช้คือ

Solvent	:	Solvent A	25%	Deionized water
		Solvent B	75%	Acetonitrile
Detector	:	UV Detector		
		Wave length 254 nm		
Injection	:	Autosampler		
		Injection volume 25 μl		
Column	:	Mightysil RP-18 GP 250-4.6		
Flow rate	:	1.0 ml/min		

นำค่าที่ได้จากการวัดมาคำนวณหา % removal ของสาร PAHs ทั้ง 4 ชนิด ตามสูตร

$$\% \text{ removal} = \frac{(\text{ความเข้มข้นเริ่มต้น} - \text{ความเข้มข้นหลังสิ้นสุดการทดลอง}) \times 100}{(\text{ความเข้มข้นเริ่มต้น})}$$

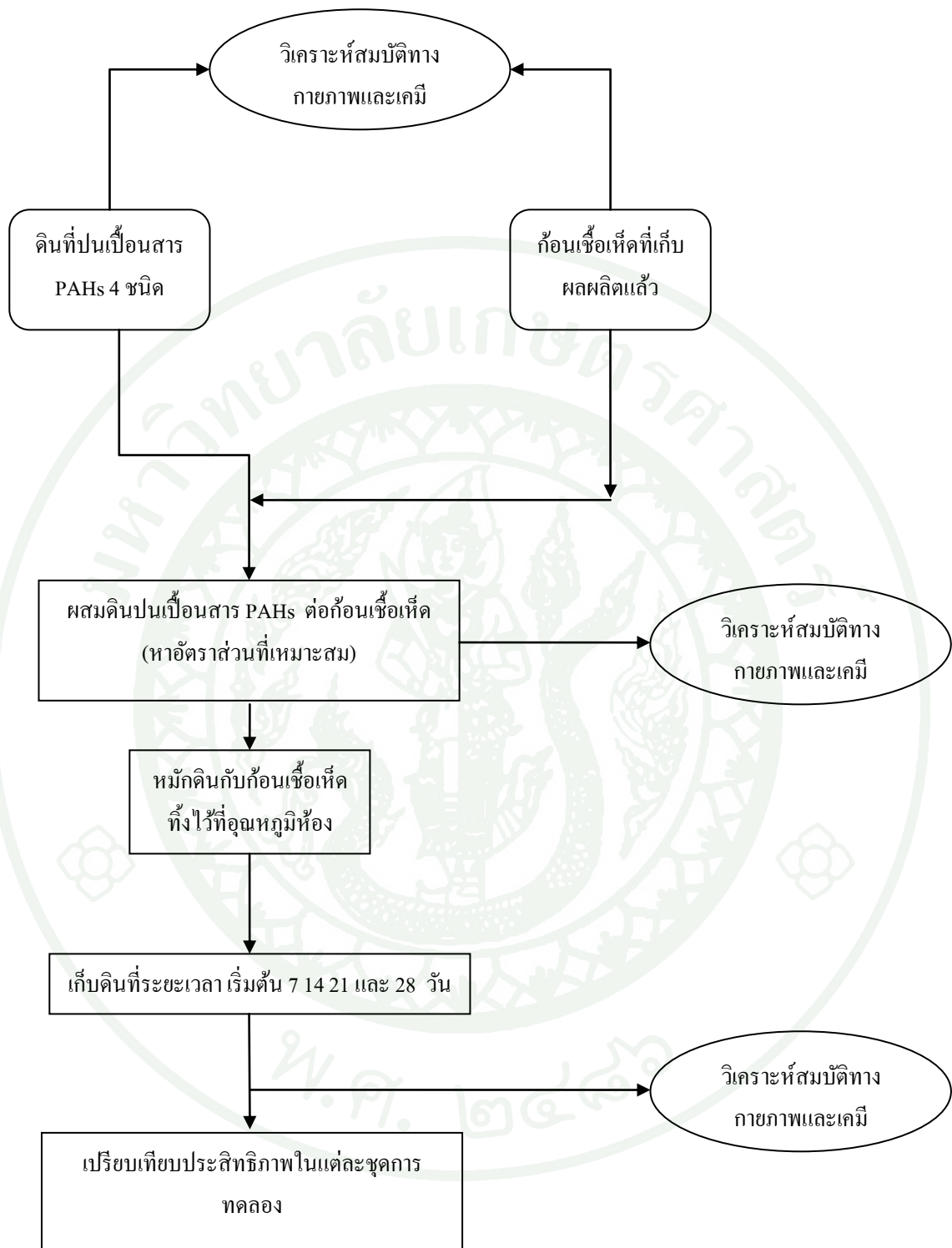
2.6 เปรียบเทียบอัตราส่วนก้อนเชื้อเห็ดกับดินมีการปนเปื้อนของ PAHs ที่มีผลต่อการลดปริมาณ PAHs ของก้อนเชื้อเห็ดที่ใช้แล้วเลือกก้อนเชื้อเห็ด นางรมฮังการีมาทำการทดลอง ดังนี้

2.6.1 การเตรียมตัวอย่างดิน

ก. ทำการปนเปื้อนดินด้วยสาร PAHs 4 ชนิด ได้แก่ ไพรีน แนฟทาลีน เบนโซไพรีน และ แอนทราซีน 110 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน

ข. ก้อนเชื้อเห็ดเปล่าที่ผ่านการฆ่าด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

2.6.2 เปรียบเทียบอัตราส่วนดินมีการปนเปื้อนของ PAHs กับก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการี ที่อัตราส่วน 1:1 2:1 2:3 และ 3:1 โดยน้ำหนัก ภายใต้สภาวะปกติ ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) ปรับความชื้นให้เป็น 60 % เป็นระยะเวลา 28 วัน เพื่อดูประสิทธิภาพในการลดปริมาณสาร PAHs ในแต่ละอัตราส่วน นำดินที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ค่ากิจกรรมเอนไซม์ แลคเคส อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดต่าง



ภาพที่ 6 แผนการทดลองโดยรวม

4. สรุปผลและจัดทำรูปเล่มรายงาน

วิเคราะห์ผลการทดลอง ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ โปรแกรม least significant differences (LSD) ใน SPSS for Windows 6.0 ศึกษาความเป็นไปได้ในการปรับใช้จริง และจัดทำรายงาน

5. สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่หลักที่ใช้ในการทดลองตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย ตั้งอยู่ที่อาคารปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ ชั้น 8 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และห้องปฏิบัติการกลางสำนักโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

6. ระยะเวลาที่ทำงานวิจัย

เริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม 2550 ถึง ตุลาคม 2552

ผลและวิจารณ์

จากการหมักดินปนเปื้อนดินด้วยสาร PAHs 4 ชนิด ได้แก่ แนฟทาลิน แอนทราซีน ไพรีน และเบนโซเอไพรีน ที่ระดับความเข้มข้นดังนี้ แนฟทาลิน 110 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน แอนทราซีน 110 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ไพรีน 110 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน เบนโซเอไพรีน 110 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินทิ้งไว้ 72 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำมาผสมกับก้อนเชื้อเห็ด 6 ชนิด ได้แก่ เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมฮังการี เห็ดหลินจือ เห็ดหูหนู และเห็ดเป๋าฮื้อ ในอัตราส่วน 2 ต่อ 5 กิโลกรัม ในแต่ละชนิด โดยใช้กระบะทดลอง 3 กระบะ ต่อ ก้อนเชื้อเห็ด 1 ชนิด โดยมีชุดควบคุม คือ ดินที่ปนเปื้อน PAHs ผสมกับก้อนเชื้อเห็ดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เก็บตัวอย่างในวันแรก 7 14 21 และ 28 ของระยะเวลาการหมักเพื่อวิเคราะห์หาค่าต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณคาร์บอน ปริมาณไนโตรเจน ที่จะนำไปหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และปริมาณ PAHs ทั้ง 4 ชนิด ได้ผลการทดลองดังนี้

1. สมบัติทางกายภาพและเคมีของดินและก้อนเชื้อเห็ด

ผลการวิเคราะห์ดินตัวอย่าง โดยหาค่าความชื้น ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณคาร์บอน ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และชนิดของเนื้อดิน โดยชนิดของเนื้อดินจะเกี่ยวข้องกับการดูดซับและดูดซึมของสาร PAHs ในดินตัวดูดซับหลักคืออนุภาคดินเหนียว และอนุภาคอินทรีย์วัตถุ ดินที่มีอนุภาคดินเหนียวมาก จะดูดซึมน้ำได้มาก ดินที่นำมาทดลองมีปริมาณอนุภาคดินเหนียว 55.61 % เมื่อเทียบกับโคอะแกรมสามเหลี่ยมพิจารณาประเภทเนื้อดิน (ภาพผนวกที่ ข1) พบว่า เนื้อดินเป็นดินเหนียว แสดงว่าดินชนิดนี้มีอนุภาคขนาดเล็กและสามารถดูดซับสาร PAHs ได้ดี และอุ้มน้ำได้ดี นอกจากนี้ดินตัวอย่าง จัดเป็นดินชนิดที่มีปริมาณอินทรีย์วัตถุสูง (2.11 %)

อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน Lau *et al.* (2003) กล่าวว่าค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็นค่าที่มีความสำคัญมากที่สุดในช่วงของความสมดุลของธาตุอาหารในกองหมัก เนื่องจากเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และเป็นตัวกำหนดอัตราการย่อยสลายในขบวนการหมัก (นาริรัตน์ (2542)) จากการวิเคราะห์ดินตัวอย่าง พบว่า มีปริมาณไนโตรเจน $0.53 \pm 0.01\%$ น้ำหนักแห้ง และปริมาณคาร์บอน $20.21 \pm 0.02\%$ น้ำหนักแห้ง (อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 37.94 ± 0.11)

ความชื้น เป็นปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เนื่องจากเป็นตัวกลางในการส่งผ่านอาหารและแก๊สออกซิเจนจากวัสดุหมักและอากาศไปยังจุลินทรีย์ ทั้งยังเป็นตัวกลางในการส่งผ่านเอนไซม์เข้าไปย่อยสลายวัสดุหมักด้วย (Lau *et al.*, 2003) ความชื้นของดินตัวอย่างอยู่ในระดับต่ำ (4.91 ± 0.03 %) เนื่องจากเป็นดินที่ผ่านการฝังถมให้แห้งก่อนนำมาทดลอง เมื่อนำดินมาทำการทดลองมีการควบคุมความชื้นในกองดินในช่วงร้อยละ 40-60 โดยการเติมน้ำสัปดาห์ละ 3 ครั้ง

ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง โดยทั่วไปค่าที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียจะมีค่าระหว่าง 6.0 – 7.5 และ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างระหว่าง 4.5 – 8.0 เหมาะสำหรับเชื้อรา (Baker *et al.*, 2001) ดินชนิดนี้มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างระหว่าง 3.64 ± 0.02 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่เหมาะสมกับเชื้อรา

ตารางที่ 3 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของดินตัวอย่าง

ค่าที่วัด	ผล
ค่าความชื้น (%)	4.91 ± 0.03
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	3.64 ± 0.02
ปริมาณไนโตรเจน (%)	0.53 ± 0.01
ปริมาณอินทรีย์คาร์บอน (%)	20.11 ± 0.02
เนื้อดิน	ดินเหนียว (มีอนุภาคดินเหนียว 55.61%)
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน	37.94 ± 0.11

ผลการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของดินแสดงใน ตารางที่ 3 และก่อนเชื้อเห็ดที่ใช้ในการหมัก จากผลในตารางที่ 4 ดังกล่าวพบว่า ก่อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดมีปริมาณอินทรีย์คาร์บอนสูง (50.70 ± 0.10 ถึง 52.06 ± 0.15 % น้ำหนักแห้ง) แต่ปริมาณไนโตรเจนปานกลาง (1.22 ± 0.57 ถึง 2.10 ± 0.02 % น้ำหนักแห้ง) จากการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี ANOVA พบว่า ค่าปริมาณคาร์บอน ให้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แต่ปริมาณไนโตรเจนให้ค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 24.8 ถึง 41.6 ฉะนั้นก่อนเชื้อเห็ดก็ยังคงมีปริมาณไนโตรเจนมากกว่าในดิน ดังนั้น ก่อนเชื้อเห็ดจึงเป็นวัสดุที่เหมาะสมในการเพิ่มค่าไนโตรเจนให้กับดิน ซึ่งไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญในการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่บำบัดดินที่ปนเปื้อนสาร PAHs ตามธรรมชาติ โดยอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักอยู่ในช่วง 25 ถึง 30 (Lau *et al.*, 2003)

ตารางที่ 4 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของก้อนเชื้อเห็ด

ชนิดก้อนเชื้อเห็ด	ความชื้น (%)	pH	ปริมาณไนโตรเจน (%)	ปริมาณคาร์บอน (%)
เห็ดสังกะสี	66.59 ± 0.59 ^a	5.21 ± 0.01 ^a	1.61 ± 0.04 ^{ab}	50.66 ± 0.54 ^a
เห็ดเป่าฮื้อ	68.46 ± 0.16 ^a	5.44 ± 0.01 ^a	1.22 ± 0.57 ^b	52.06 ± 0.15 ^a
เห็ดหลินจือ	38.44 ± 0.68 ^b	3.98 ± 0.00 ^b	2.10 ± 0.02 ^a	51.99 ± 0.11 ^a
เห็ดนางรมภูฐาน	68.83 ± 0.38 ^a	5.18 ± 0.01 ^a	1.29 ± 0.06 ^b	50.70 ± 0.10 ^a
เห็ดหูหนู	81.37 ± 0.11 ^a	6.36 ± 0.07 ^a	1.94 ± 0.00 ^a	51.78 ± 0.29 ^a
เห็ดหอม	68.60 ± 0.31 ^a	5.32 ± 0.01 ^a	1.23 ± 0.01 ^b	51.15 ± 0.02 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวดิ่งเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยวิธี least significant differences (LSD)

ตารางที่ 5 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกองดินที่ผสมก้อนเชื้อเห็ดแล้ว

ชนิดก้อนเชื้อเห็ด	Enzyme activity U/kg	PAHs concentrations mg/kg soil	C/N Ratio ส่วน	ความชื้น %	อุณหภูมิ °C	pH
เห็ดสังกะสี	130.8 ^a	110 ^a	33.07 ^a	46 ^a	24.4 ^a	5.4 ^a
เห็ดเป่าฮื้อ	87.5 ^{ab}	110 ^a	36.24 ^a	48 ^a	28.5 ^a	4.5 ^a
เห็ดนางรมภูฐาน	59.6 ^b	110 ^a	36.01 ^a	45 ^a	26.5 ^a	4.4 ^a
เห็ดหลินจือ	48.6 ^b	110 ^a	28.41 ^a	49 ^a	27.6 ^a	3.6 ^b
เห็ดหูหนู	42.3 ^b	110 ^a	33.11 ^a	45 ^a	26.3 ^a	5.0 ^a
เห็ดหอม	26.7 ^b	110 ^a	35.49 ^a	50 ^a	25.4 ^a	4.5 ^a
ชุดควบคุม	2 ^c	110 ^a	27.07 ^a	49 ^a	26.4 ^a	3.68 ^b

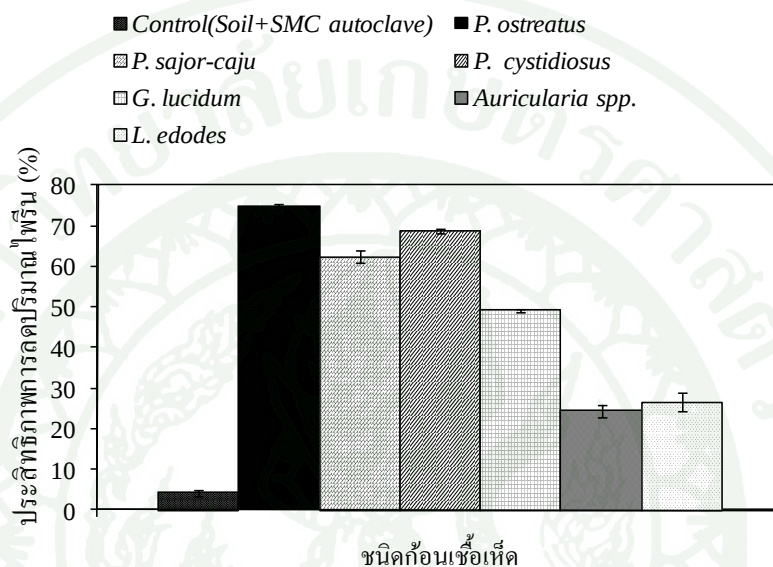
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวดิ่งเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยวิธี least significant differences (LSD)

ผลการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของกองดินหมักที่ผสมก้อนเชื้อเห็ดแล้วแสดงใน ตารางที่ 5 พบว่า กองดินหมักก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (27.37 ถึง 36.24 จากการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี ANOVA พบว่า ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ให้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ก้อนเชื้อเห็ดก็ยังคงมีปริมาณไนโตรเจนมากกว่าในดิน ดังนั้น ก้อนเชื้อเห็ดจึงเป็นวัสดุที่เหมาะสมในการเพิ่มค่าไนโตรเจนให้กับดิน ซึ่งไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญในการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่บำบัดดินที่ปนเปื้อนสาร PAHs สังเกตได้จากค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของกองดินมีความเหมาะสมกับการหมักดินมากขึ้นเมื่อเติมก้อนเชื้อเห็ดลงไป ค่าความชื้นอุณหภูมิเริ่มต้นของกองดินนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรดด่างในกองดินที่ใช้ก้อนเชื้อเห็ดหลินจือมีค่าแตกต่างจากก้อนเชื้อเห็ดชนิดอื่นเนื่องจากโดยทั่วไปก้อนเชื้อเห็ดชนิดนี้จะมีลักษณะเป็นกรดเล็กน้อยจึงจะเกิดดอกเห็ด และค่ากิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น พบว่ากองดินที่มีก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงสุดที่ 130.8 U/kg และก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดสามารถให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

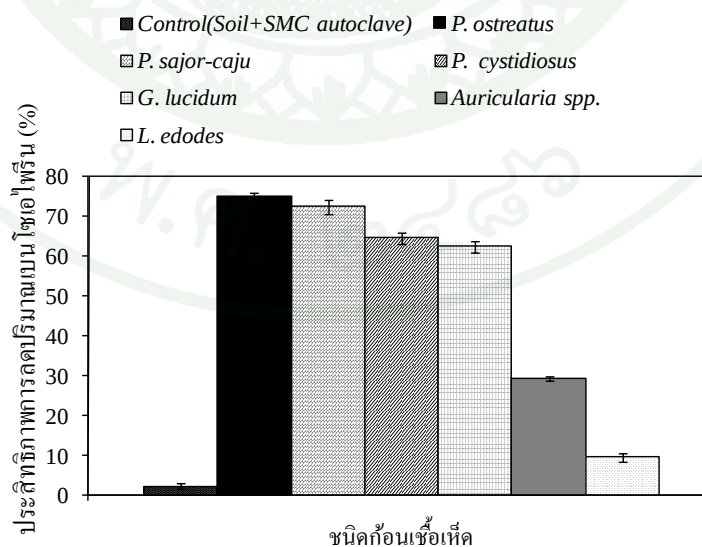
2. ประสิทธิภาพการลดปริมาณสาร PAHs ในดิน

ประสิทธิภาพการลดปริมาณสาร PAHs ในดิน 4 ชนิด ได้แก่ ไพริน (ภาพที่ 7) เบนโซเอไพรีน (ภาพที่ 8) แอนทราซีน (ภาพที่ 9) แนฟทาลีน (ภาพที่ 10) โดยใช้ก้อนเชื้อเห็ดที่ใช้แล้ว 6 ชนิด คือ เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมฮังการี เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดหลินจือ เห็ดหูหนู และเห็ดหอม มาใช้ลดปริมาณสาร PAHs ในดิน เมื่อทำการทดลองเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีให้ประสิทธิภาพสูงที่สุดในการลดปริมาณสาร PAHs 4 ชนิด ที่อัตราการลดลงของไพรีน เบนโซเอไพรีน แอนทราซีน และแนฟทาลีน เป็น 74.2 ± 0.29 79.49 ± 0.35 79.36 ± 0.72 และ 80.33 ± 0.58 % ตามลำดับ นอกจากนี้ ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของก้อนเชื้อเห็ด สอดคล้องกับความเข้มข้นของสาร PAHs ที่ลดลง เนื่องจากก้อนเชื้อเห็ดที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์มากกว่าจึงมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสาร PAHs ในดินได้ในปริมาณมากกว่า จากการทดลองนี้พบว่า ก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการียังสามารถให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสได้ปริมาณสูงสุด (89.3 U/kg) ในแต่ละสัปดาห์ ซึ่งตรงกับรายงานของ Lau *et al.* (2003) ที่ก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีให้ประสิทธิภาพในการลดปริมาณสาร PAHs ทั้ง 16 ชนิดได้สูงกว่าก้อนเชื้อเห็ดชนิดอื่นเมื่อทำการทดลองที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ ในห้องทดลอง และจากรายงานของ Matsubara *et al.* (2005) ที่ทำการคัดเลือกชนิดของเชื้อราขาวที่มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณ ไพรีนและ ฟรีเนนทรีน ในดินที่ปนเปื้อน และมีการเติม

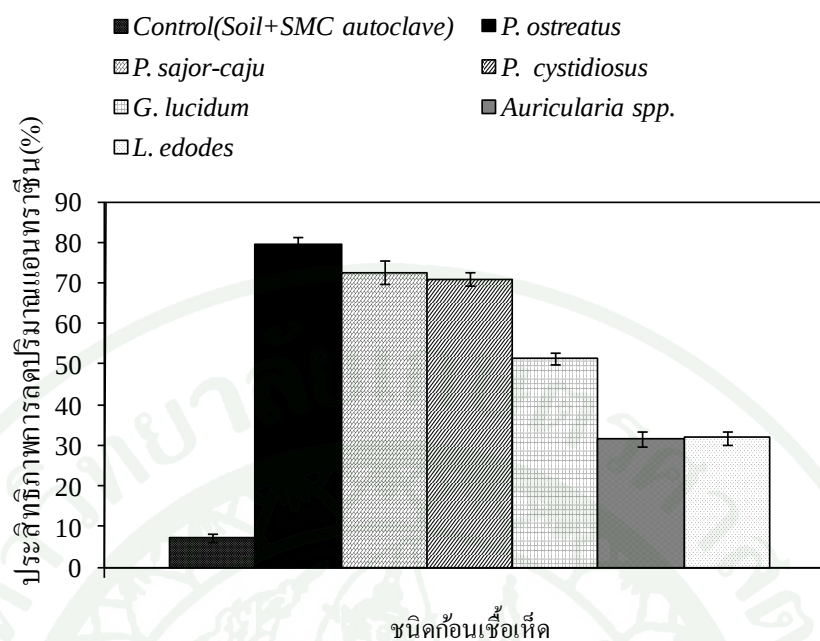
เชื้อจุลินทรีย์ 11 ชนิด พบว่าเชื้อรา *Schizophyllum commune* เชื้อรา *Pycnoporus coccineus* และเชื้อรา *Pleurotus ostreatus* มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณ ไพรินและ ฟรีแนทรีน ในดินสูงกว่าเชื้อราชนิดอื่น ๆ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยมีอัตราการย่อยสลายระหว่าง 65- 80 % และไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเทียบอัตราการย่อยสลายระหว่างเชื้อราทั้ง 3 ชนิด เมื่อทำการทดลอง 28 วัน



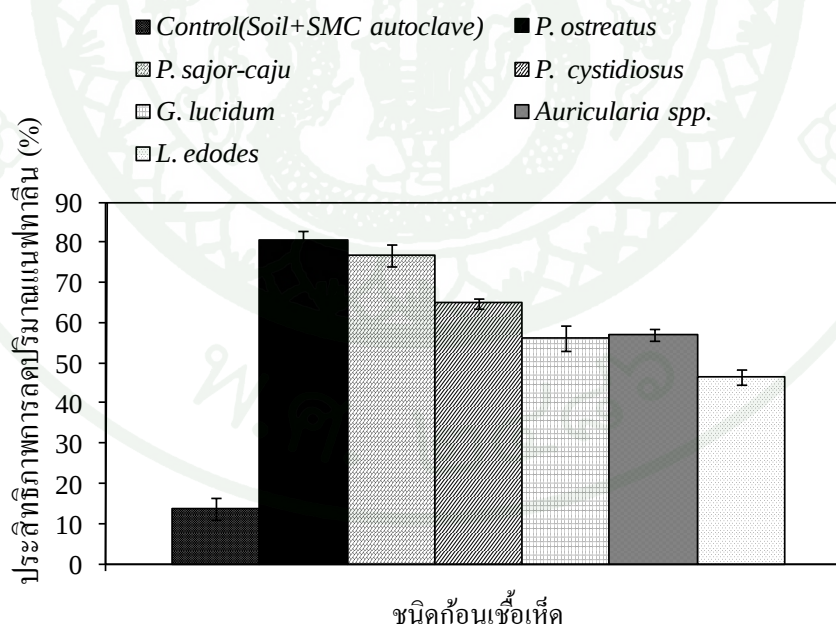
ภาพที่ 7 ประสิทธิภาพการลดปริมาณ ไพริน ในกองหมักก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 28 วัน



ภาพที่ 8 ประสิทธิภาพการลดปริมาณ เบนโซไพรีนในกองหมักก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 28 วัน



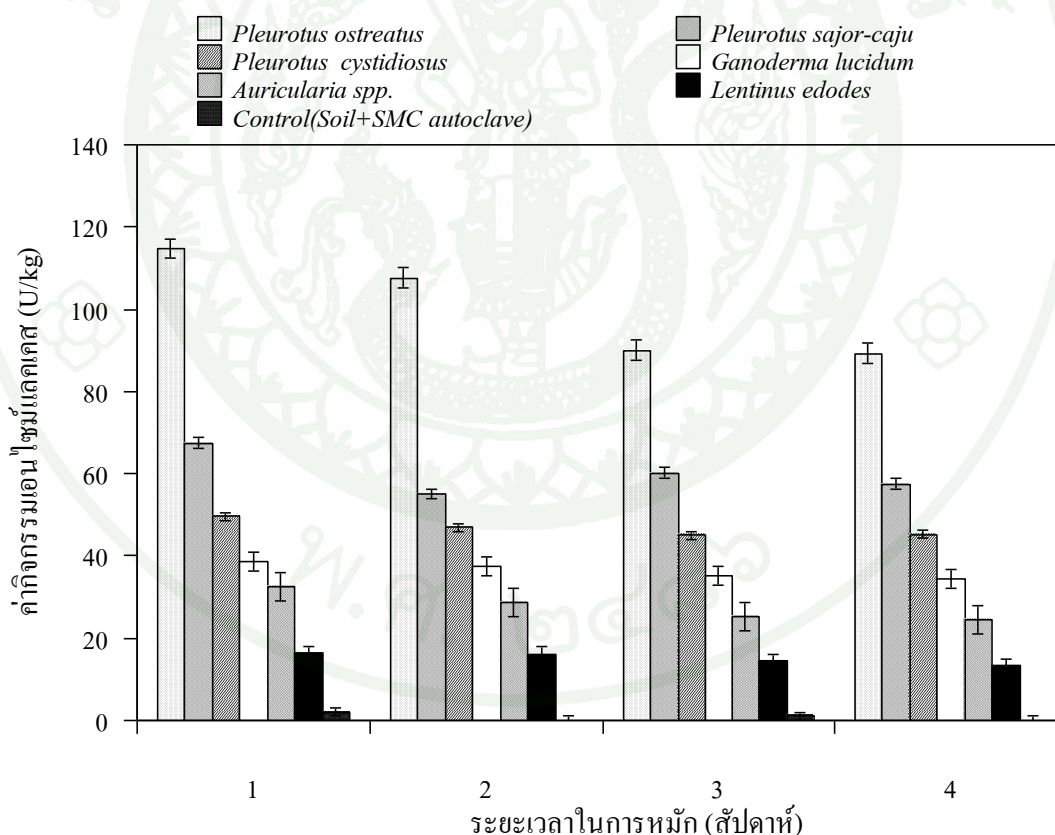
ภาพที่ 9 ประสิทธิภาพการลดปริมาณ แอนทราซีน ในกองหมักก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 28 วัน



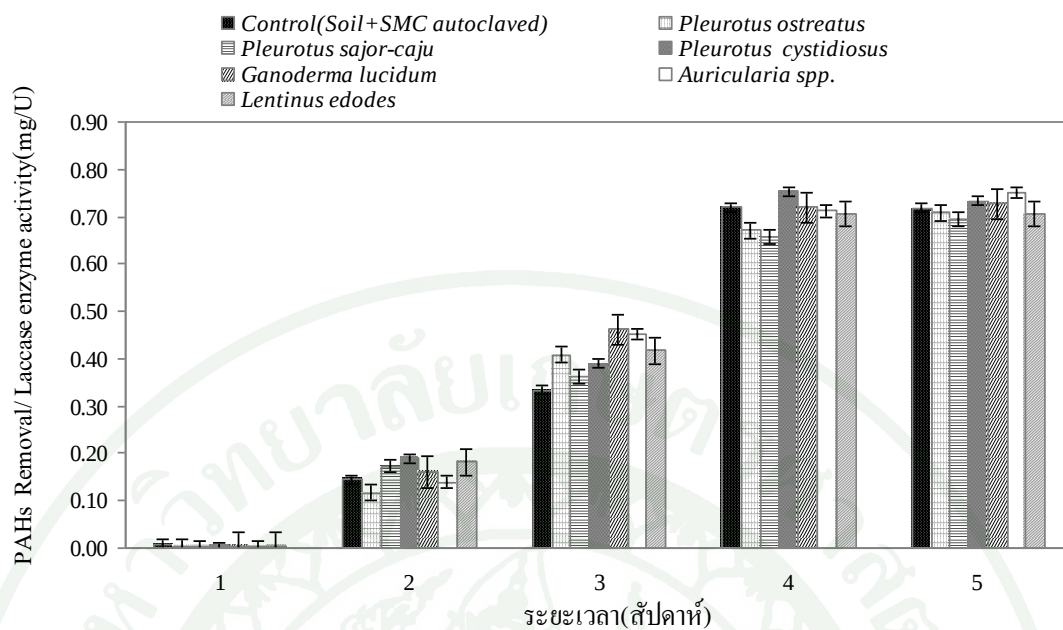
ภาพที่ 10 ประสิทธิภาพการลดปริมาณ แอฟลาทอกซิน ในกองหมักก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 28 วัน

3. ผลของเอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส 1 ยูนิตต่อปริมาณสาร PAHs ที่ลดลง

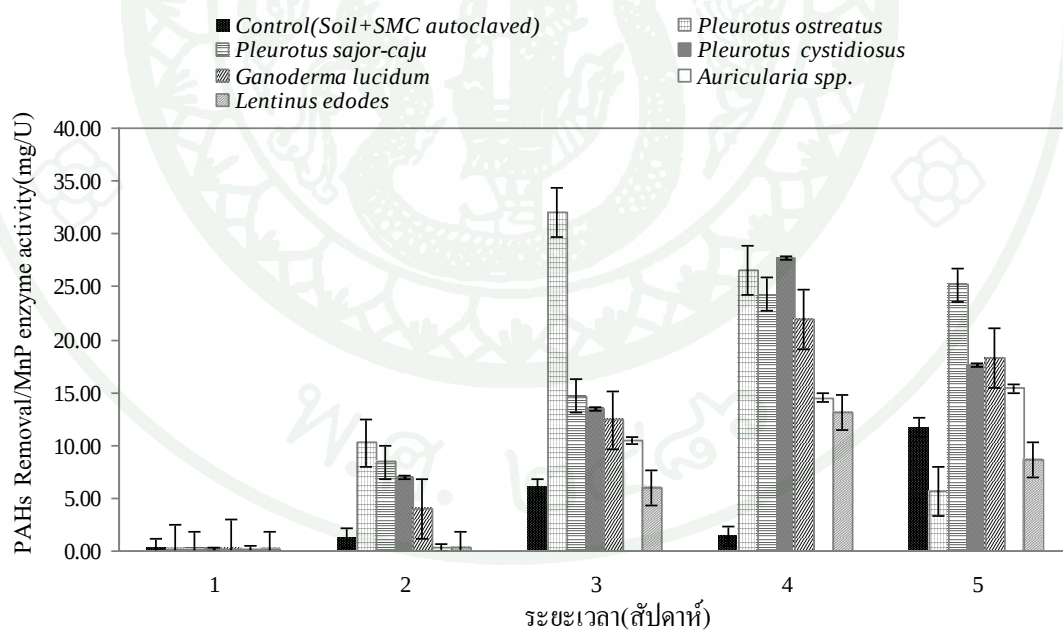
จากภาพที่ 11- 13 สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของเอนไซม์และการลดลงของสาร PAHs ได้ ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของแต่ละก้อนเชื้อเห็ดสามารถผลิตได้ในปริมาณที่ต่างกัน (ภาพที่ 13) และก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีให้ปริมาณค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุด แต่เมื่อนำค่าปริมาณสาร PAHs ที่ลดลงต่อเอนไซม์แลคเคส 1 ยูนิต พบว่าเอนไซม์แลคเคสของก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกันในการลดปริมาณสาร PAHs ในการทำงาน 1 ยูนิตเท่ากัน และเมื่อเทียบกับค่าปริมาณสาร PAHs ที่ลดลงต่อเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส 1 ยูนิต พบว่าให้ค่าแตกต่างกันอย่างมากและแต่ละสัปดาห์ให้ค่าไม่คงที่ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แลคเคสมีผลต่อการลดลงของสาร PAHs เพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 11 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสในกองหมักก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อน ที่ระยะเวลา 28 วัน



ภาพที่ 12 ปริมาณสาร PAHs ที่ลดลงต่อเอนไซม์แลคเคส 1 หน่วย ที่ระยะเวลา 5 สัปดาห์



ภาพที่ 13 ปริมาณสาร PAHs ที่ลดลงต่อเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส 1 หน่วย ที่ระยะเวลา 5 สัปดาห์

ตามหลักการทำงานของเอนไซม์โดยทั่วไปเอนไซม์ชนิดเดียวกัน จะสามารถทำงานได้ไม่แตกต่างกันที่ปริมาณการผลิตที่แตกต่างกัน Inchang *et al.* (2001) เนื่องจากค่าปริมาณสาร PAHs ที่ลดลงต่อเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส 1 ยูนิต ให้ค่าแตกต่างกันอย่างมากและแต่ละสัปดาห์ให้ค่าไม่คงที่แสดงว่า เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส 1 ยูนิต ลดปริมาณสาร PAHs ได้หลายความเข้มข้นไม่ตรงกับหลักการทำงานของเอนไซม์ จึงสรุปได้ว่า เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ไม่มีผลต่อการลดปริมาณสาร PAHs ในการทดลองนี้

โดยทั่วไปเอนไซม์ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส 1 ยูนิต สามารถทำให้สาร PAHs ลดลงได้มากกว่าเอนไซม์แลคเคส (Saito *et al.*, 2003) แต่ในการทดลองนี้เอนไซม์ชนิดนี้สามารถผลิตได้ในปริมาณน้อยมากและไม่มีความแตกต่างกันในก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดจึงไม่มีผลต่อการลดลงของสาร PAHs

4. การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในกองหมัก

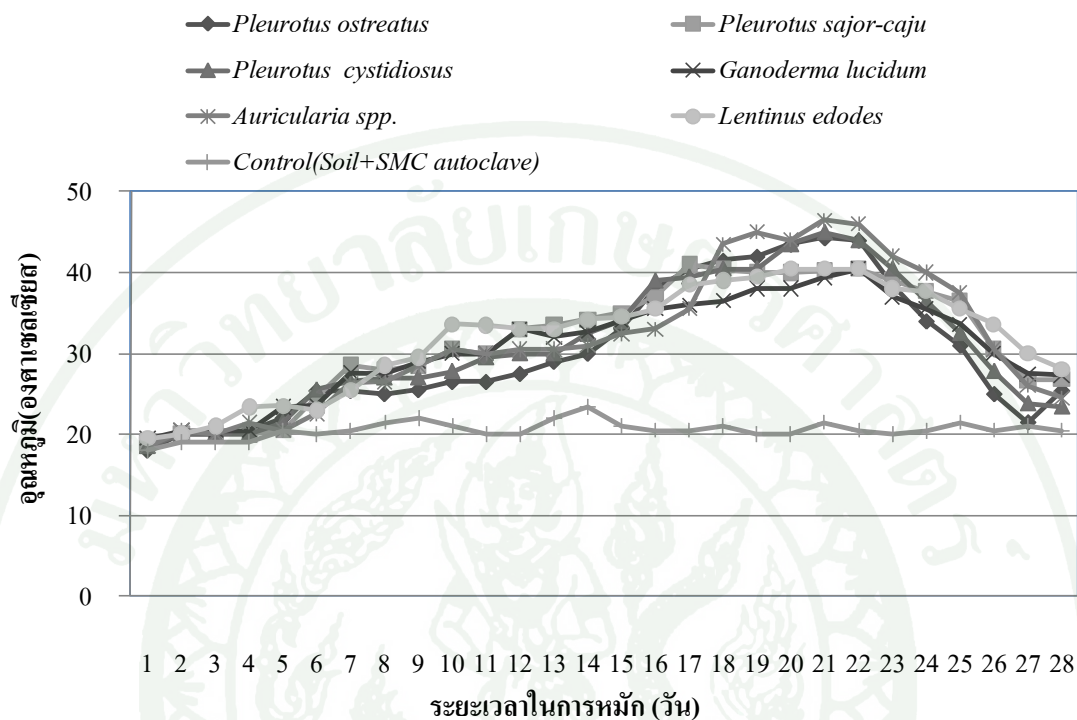
อุณหภูมิมีผลต่อขบวนการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน ทั้งทางตรงและทางอ้อม ทางตรงคือ เมื่ออุณหภูมิเป็น 10 องศาเซลเซียส จากค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละชนิด จะทำให้จุลินทรีย์มีเมตาบอลิซึม (metabolism) สูงขึ้นเป็น 2 เท่า อุณหภูมิมีผลต่อทุกกระบวนการทางชีวเคมีในสลายไฮโดรคาร์บอนทั้งทางตรงและทางอ้อม การสลายไฮโดรคาร์บอนจะเกิดขึ้นในช่วงอุณหภูมิสูงหรืออุณหภูมิต่ำ ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียพวกชอบอุณหภูมิต่ำจะเจริญที่อุณหภูมิ 4 - 25 องศาเซลเซียส เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อนี้เพิ่ม จาก 4 เป็น 8 องศาเซลเซียส และจาก 8 เป็น 25 องศาเซลเซียส การใช้ออกซิเจนในการย่อยสลายสารพวกไฮโดรคาร์บอนจะเพิ่มมากขึ้นเป็น 2 เท่า (Baker and Diane, 1994) ในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสการเจริญของแบคทีเรียถึงระดับ stationary phase จะใช้เวลานาน ทำให้เวลาที่ใช้ในการสลายไฮโดรคาร์บอนจะนานกว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า และที่อุณหภูมิ 0 และ 5 องศาเซลเซียส แบคทีเรียบางชนิดจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน และ ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ (optimum temperature) ของเชื้อรา คือ 20 -30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเชื้อราจะเจริญน้อยลงแต่จะมีกิจกรรมสูงเนื่องจากอุณหภูมิเป็นตัวเร่งการทำงาน และ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เชื้อราทุกชนิดจะเริ่มตาย (Amir *et al.*, 2005)

อุณหภูมิยังมีผลต่อค่าความชื้นของดิน เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงความชื้นของดินจะเปลี่ยนไปเนื่องจากน้ำระเหย ไปบางส่วน Lau *et al.* (1995) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิในการย่อยสลาย

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดินพบว่าที่ 45 องศาเซลเซียส ไฮโดรคาร์บอนอิมตัวมีอัตราการย่อยสลายสูงกว่าที่อุณหภูมิอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด Debbie and Bartha (1979) ได้ทดลองย่อยสลาย PAHs ในกากตะกอนจุลินทรีย์ (sludge) โดยวิธีกองดิน (biofarming) พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสมีการย่อยสลายได้ดี

จากการทดลองนี้ในกองหมักของก้อนเชื้อแต่ละชนิดมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเฉลี่ยในกองหมักคล้ายคลึงกันใน จากกองหมักของก้อนเชื้อเห็ดทั้ง 6 ชนิด เมื่อคำนวณทางสถิติด้วยวิธี ANOVA พบว่า ระดับอุณหภูมิให้ค่าไม่แตกต่างกัน ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ คือ ภายในสัปดาห์แรกอุณหภูมิเพิ่มขึ้นน้อย โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 29.0 องศาเซลเซียส ในกองหมักก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการี แสดงถึงการปรับตัวของจุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อน PAHs ในดินได้ จากนั้นอุณหภูมิค่อยเพิ่มขึ้น ๆ ลดลงอยู่ในช่วง 30.0-47.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 20 วัน แล้วหลังจากนั้นจึงเข้าใกล้อุณหภูมิของบรรยากาศ สำหรับในกองที่เป็นชุดควบคุม ที่ไม่ได้เติมเชื้อเห็ด อุณหภูมิเฉลี่ยเพิ่มขึ้นช้ากว่ากองอื่น ๆ 1 สัปดาห์ โดยอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นไม่สูงมากนัก และมีค่าสูงสุดเท่ากับ 27.0 องศาเซลเซียส จากนั้น อุณหภูมิจึงลดลงอยู่ในช่วง mesophilic เป็นเวลา 9 วัน แล้วจึงเข้าใกล้อุณหภูมิบรรยากาศ ส่วน อุณหภูมิเฉลี่ยของชุดควบคุม มีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 24.0 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิเฉลี่ยจะต่างจากอุณหภูมิ บรรยากาศเพียงเล็กน้อยประมาณ 0.5-2.0 องศาเซลเซียส การที่อุณหภูมิเฉลี่ยในกองหมักสูงขึ้นนั้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ กรรณิการ์ (2543) กล่าวว่า การที่จุลินทรีย์เคยสัมผัสกับสารปนเปื้อนมาก่อนจะเป็นการลดระยะเวลาในการปรับตัวที่เรียกว่า metabolic adaptation ในระยะ lag phase ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ทำให้การผลิตเอนไซม์เพื่อการย่อยสลาย ดำเนินไปได้ด้วยดี และเป็นการเร่งอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพให้เร็วขึ้น PAHs จะลดปริมาณลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากไปเร่งกิจกรรมของจุลินทรีย์ กราฟช่วงแรกอุณหภูมิจะมีการเพิ่มขึ้นรวดเร็ว แต่จากการทดลองที่ได้อุณหภูมิที่เกิดขึ้นไปตามปกติไม่ได้มีอุณหภูมิสูงเร็วเกินไป เนื่องมาจากในสัปดาห์แรกจุลินทรีย์ต้องมีการปรับสภาพกับดินเพราะดินเริ่มต้นนั้น ความชื้นยังไม่ดีพอแม้จะมีการปรับความชื้นแต่ดินก่อนมาทดลองมีความชื้นต่ำเกินไปจึงต้องใช้ระยะเวลาในการดูดซึมน้ำเข้าสู่ดิน และอุณหภูมิ มีผลต่ออัตราการย่อยสลาย Moretto *et al.* (2005) กล่าวว่าเมื่ออุณหภูมิเป็น 10 องศาเซลเซียส จากค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละชนิด จะทำให้จุลินทรีย์มีเมตาบอลิซึม (metabolism) สูงขึ้นเป็น 2 เท่า อัตราการย่อยสลายก็จะเพิ่มขึ้นตาม เมื่ออัตราการลดลงของ PAHs ควบคู่กับอุณหภูมิจะพบว่ามีทิศทางไปในแนวเดียวกันคือเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของ PAHs สูงขึ้น สังเกตได้จาก วันที่ 21 จะมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของ PAHs ลดลงไปด้วยและในวันที่ 21 มีอุณหภูมิเฉลี่ยของกองดินที่มีก้อนเชื้อเห็ด ทุกชนิด

สูงขึ้น สำหรับอุณหภูมิที่เกิดขึ้นในกระบอกควบคุม พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้อยในวันที่ 21 อุณหภูมิในกระบอกดังกล่าวยังคงใกล้เคียงกับบรรยากาศคือ 27.3 องศาเซลเซียส

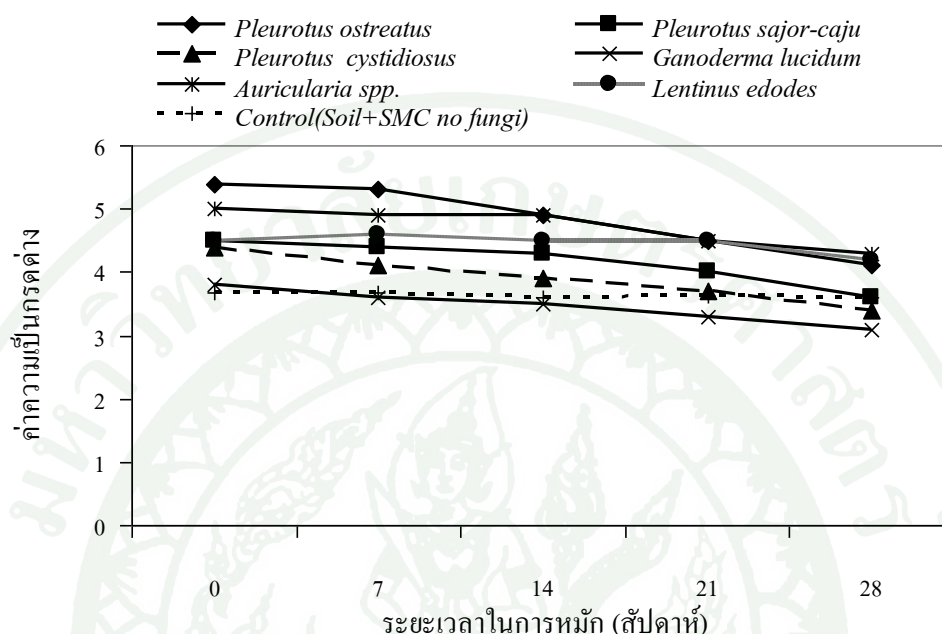


ภาพที่ 14 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเฉลี่ยในกองหมักที่มีดินปนเปื้อนสาร PAHs

5. การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างในกองหมัก

ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ในการทดลองนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์จากตัวอย่างที่เก็บมา ณ วันแรก 7 14 21 และ 28 ของการทดลอง โดยการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดเป็นด่างนั้นแสดงในภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ในกองหมักแต่ละชนิด ตลอดระยะเวลาการหมัก จากการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี ANOVA พบว่า ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ให้ไม่ค่าแตกต่างกันในช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอยู่ระหว่าง 3.0- 4.5 โดยแนวโน้มของทุกกองหมัก ลดลงจนมีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ใกล้เคียง 3.0 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ทั้งนี้การลดลงของค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ในช่วงหลังของการหมักอาจเกิดจากสภาพการระบายอากาศที่ไม่เหมาะสมเนื่องจากกองหมักยุบตัวลง ทำให้บางส่วนในบ่อหมักมีสภาพการหมักแบบไร้อากาศ (anaerobe) จึงส่งผลให้ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ในกองหมักลดลง นอกจากนี้ก้อนเชื้อเห็ดสามารถผลิตกรดได้เล็กน้อย Hou *et al.* (2004) ประกอบกับค่าความเป็นกรดของดินที่มีอยู่เดิมทำให้ค่า

ความเป็น pH ลดลง ส่วนชุดควบคุมมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง เพียงเล็กน้อย (0.2 หน่วย) อยู่ระหว่าง 3.0-3.2



ภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง ในกองหมักที่มีดินปนเปื้อน PAHs

การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง ในกองหมักจะบ่งบอกถึงการทำงานของจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากการย่อยสลายของจุลินทรีย์จะมีการปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาเช่น เช่น กรดแลกติก กรดอะซิติกและกรดฮิวมิก และจะมีค่าความเป็นกรดและด่างของปุ๋ยอินทรีย์ที่มาจากการหมักระหว่าง 3-4 โดยปฏิกิริยาชีวเคมีดังกล่าวเกิดจากสารอินทรีย์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile acid) และสารอื่น ๆ โดยแบคทีเรียพวกสร้างกรด (acid former) กรดที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ คือ กรดอะซิติก (acetic acid) และกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) (Mirsal, 2004) และ สุปราณี (2532) รายงานว่าค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเชื้อราควรมีค่าอยู่ ระหว่าง 4.0-5.6 ซึ่งตรงกับงานวิจัยนี้ และจากรายงานของ Robinson *et al.* (2005) พบว่า เอนไซม์แลคเคสชอบค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ที่ค่อนข้างเป็นกรด อยู่ระหว่าง 3.5 - 5.2 ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้ที่พบค่าความเป็นกรดต่างในกองดินอยู่ระหว่าง 3.4 - 5.1

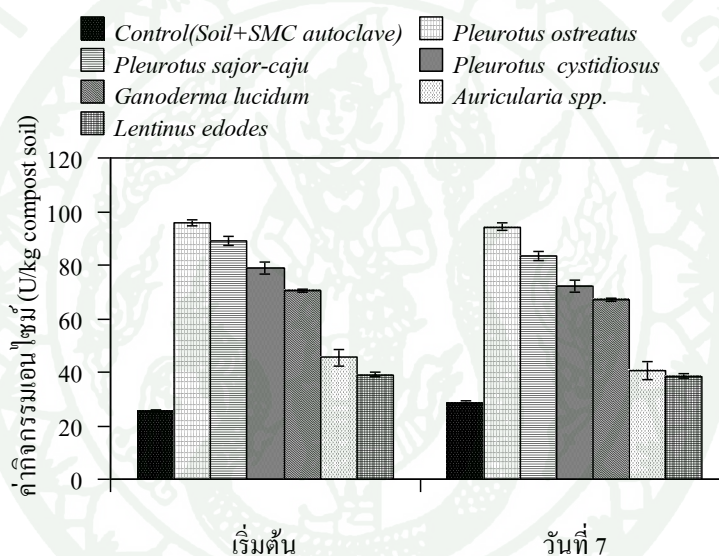
6. ชนิดเอนไซม์ที่ก่อกวนเชื้อเห็ดผลิตได้และผลต่อการลดปริมาณสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดิน

ผสมดินปนเปื้อนกับก้อนเชื้อเห็ดลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราส่วน ดินปนเปื้อน 100 กรัม ต่อก้อนเชื้อเห็ด 100 กรัม โดยมีชุดควบคุมเป็นดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ อื่น ๆ ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที หลังจากผสมกันแล้ว เก็บตัวอย่างดินเพื่อนำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ และปริมาณ PAHs เริ่มต้น จากนั้นปิดฝาด้วย สำลีบางๆปล่อยให้อากาศเข้าไปได้ เก็บขวดทดลองทั้งหมดไว้ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 7 วัน เพื่อดูประสิทธิภาพในการลดปริมาณสาร PAHs โดย นำดิน ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส ค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ ออกซิเดสหลังจากครบ 7 วัน

Pierzynski *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาการใช้เอนไซม์จากกลุ่มเชื้อราขาวมาทดสอบการ ย่อยสลาย PAHs 16 ชนิด โดยเลือกเชื้อราขาวที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากงานวิจัยมาทดสอบ เอนไซม์ คือ เชื้อ *P. ostreatus* พบว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs คือ เอนไซม์ แลคเคส และ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส โดยไม่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ลิกันินเปอร์ออกซิเดส เนื่องจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส มีค่ามากกว่าจึงนำมาศึกษาการย่อยสลาย PAHs โดยเชื้อ *P. ostreatus* ผลิตแลคเคส ได้มากถึง 210.0 U /kg เมื่อสกัดเอนไซม์จากเชื้อราบริสุทธิ์ที่เลี้ยงในจานเพาะเชื้อ ในขณะที่ในงานวิจัยนี้พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส มีค่าสูงสุดเพียง 95.91 U/kg ในก้อนเชื้อเห็ดนางรมสังกะสี เนื่องจากการสกัดเอนไซม์จากก้อนเชื้อเห็ดเหลือที่ใช้แล้วจะมี ปริมาณเอนไซม์น้อยกว่าเอนไซม์ที่สกัดจากเชื้อบริสุทธิ์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ การศึกษาของ Hou *et al.* (2004) ซึ่งนำสารละลายเอนไซม์แลคเคส (crude laccase) ที่ผลิตโดย *P. ostreatus* สายพันธุ์ 32 มาใช้ในการกำจัดไพรีน พบว่าเชื้อ สามารถลดปริมาณไพรีนได้ในปริมาณต่ำ เพียง 45.2 % แต่สำหรับแนฟทาลินและแอนทราซีน พบว่า สามารถลดปริมาณ ได้สูงถึง 90.00 % ในเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสสูงถึง 410.00 U/ kg ซึ่งสอดคล้องกับ งานวิจัยนี้ที่ แนฟทาลินและแอนทราซีนมีอัตราการลดลงมากกว่าไพรีน แสดงให้เห็นว่าชนิดของสาร PAHs มีบทบาททำให้เอนไซม์มีความสามารถในการย่อยสลายได้ต่างกัน สารที่มีความซับซ้อนมาก ก็จะย่อยได้ยากกว่าสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนน้อยกว่า จากผลการศึกษาข้างต้นทำให้เห็นว่า *P. ostreatus* มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ได้แตกต่างกัน ทั้งในลักษณะของชนิดและปริมาณ เอนไซม์เนื่องจากสภาวะและอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน และนอกจากนี้ความแตกต่าง ของโครงสร้าง PAHs แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลอง จะทำให้ปริมาณการลดลงของสาร PAHs มี

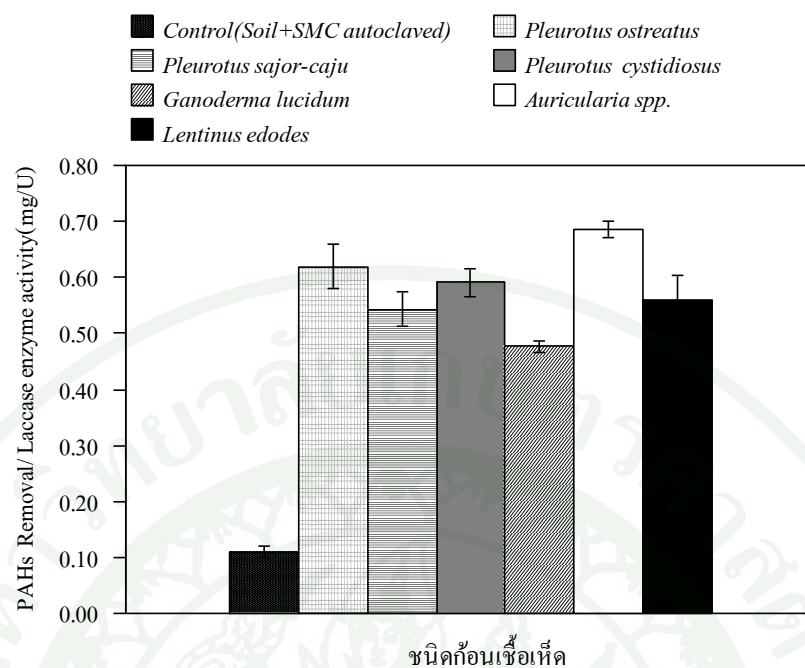
ความแตกต่างกัน จากการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี ANOVA พบว่า เอนไซม์แลคเคสมีปริมาณสูงสุด เมื่อเทียบกับเอนไซม์ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ให้ค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากภาพที่ 16 พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่พบในขวดทดลองดินปนเปื้อน PAHs ที่ผสมก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการี มีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุด เท่ากับ 95.91 U/kg และค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่พบในขวดทดลองของก้อนเชื้อเห็ดหอมมีค่าต่ำที่สุด 38.5 U/kg ให้ค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

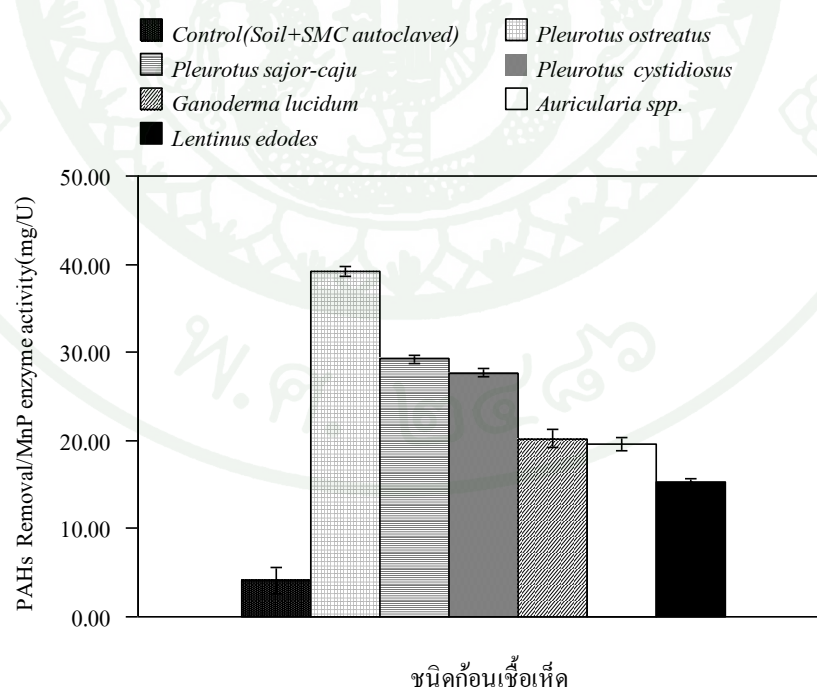


ภาพที่ 16 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสในกองหมักก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อน ที่ระยะเวลา 7 วัน

จากภาพที่ 16- 18 สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของเอนไซม์และการลดลงของสาร PAHs ได้ ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของแต่ละก้อนเชื้อเห็ดสามารถผลิตได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 17) และก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีให้ปริมาณค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุด แต่เมื่อนำค่าปริมาณสาร PAHs ที่ลดลงต่อเอนไซม์แลคเคส 1 หน่วย พบว่าเอนไซม์แลคเคสของก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกันในการลดปริมาณสาร PAHs ในการทำงาน 1 หน่วยเท่ากัน และเมื่อเทียบกับค่าปริมาณสาร PAHs ที่ลดลงต่อเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส 1 หน่วย พบว่าให้ค่าแตกต่างกันอย่างมากและแต่ละสัปดาห์ให้ค่าไม่คงที่ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แลคเคสมีผลต่อการลดลงของสาร PAHs เพียงอย่างเดียว ตรงกันผลการทดลองที่ข้อที่ 3 (หน้า 45)

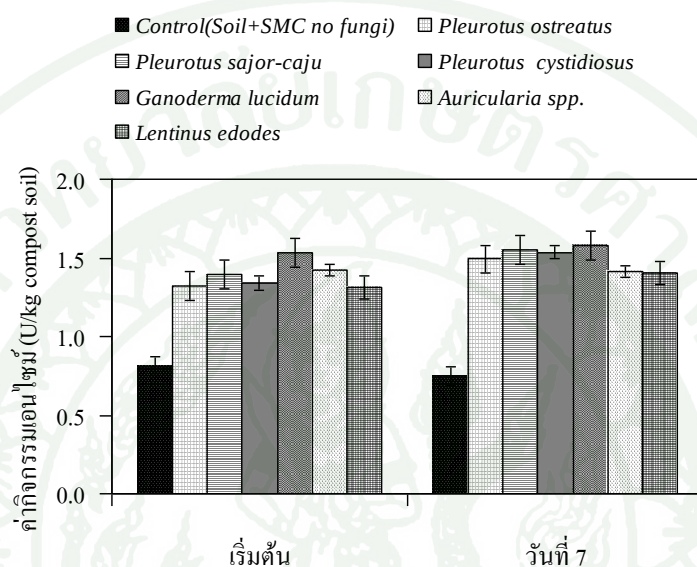


ภาพที่ 17 ปริมาณสาร PAHs ที่ลดลงต่อเอนไซม์แลคเคส 1 หน่วย ในกองหมักก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 7 วัน

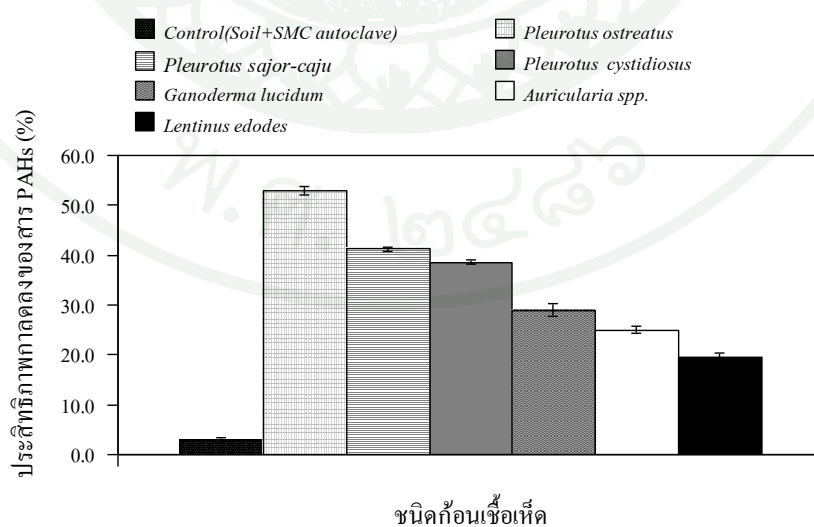


ภาพที่ 18 ปริมาณสาร PAHs ที่ลดลงต่อเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส 1 หน่วย ในกองหมักก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 7 วัน

สำหรับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ MnP นั้นมีน้อยมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้ เนื่องจากเอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อราสายพันธุ์ *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singers มักพบเอนไซม์แลคเคสมากกว่า (Lau *et al.*, 2001) และในก้อนเชื้อเห็ดทุกชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ไม่แตกต่างกันเมื่อ ทดสอบทางสถิติในช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ แสดงในภาพที่ 19



ภาพที่ 19 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในกองหมักก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 7 วัน



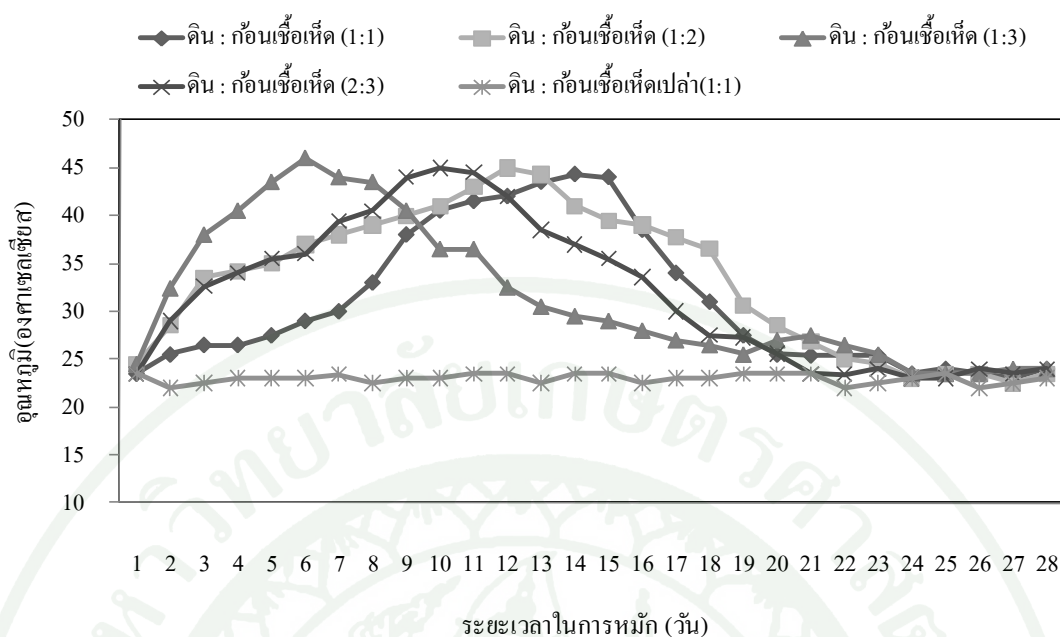
ภาพที่ 20 ประสิทธิภาพการลดปริมาณสาร PAHs ในเขตทดลองก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 7 วัน

7. ผลการเปรียบเทียบอัตราส่วนก่อนเชื้อเห็ดกับดินมีการปนเปื้อนของ PAHs ที่มีผลต่อการลดปริมาณ PAHs ของก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการี

จากการเปรียบเทียบอัตราส่วนดินมีการปนเปื้อนของ PAHs 4 ชนิด ได้แก่ ไพรีน แอนทราซีน เบนโซไพรีน และ แอนทราซีน 110 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินกับก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการี ที่อัตราส่วนที่ 1:1 2:1 2:3 และ 3:1 ภายใต้สภาวะปกติ ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) ปรับความชื้นให้เป็น 60 % เป็นระยะเวลา 28 วัน เพื่อดูประสิทธิภาพในการลดปริมาณสาร PAHs ในแต่ละอัตราส่วน นำดินที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลกเคส และอุณหภูมิ

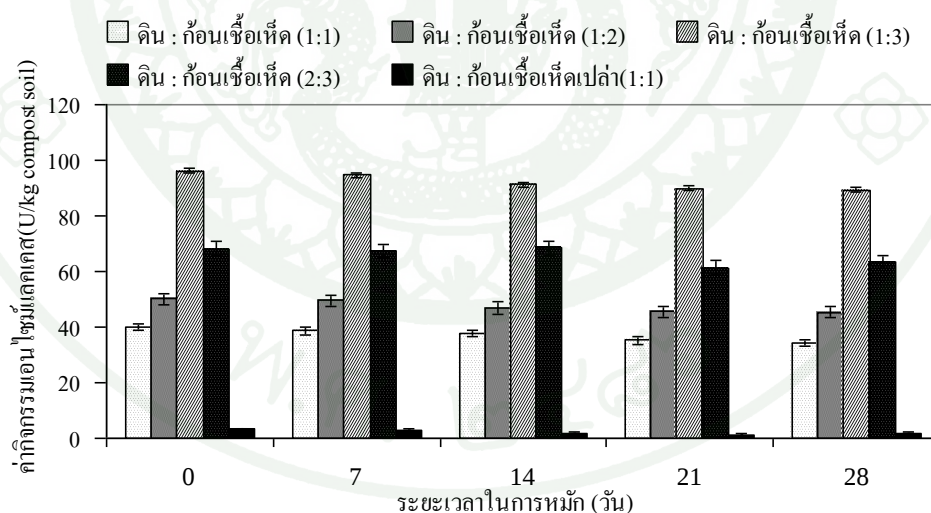
7.1 ผลของอุณหภูมิ

จากการทดลองนี้ แสดงดังภาพที่ 21 ในกองหมักของแต่ละอัตราส่วนมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเฉลี่ยในกองหมักแตกต่างกันเมื่อคำนวณทางสถิติด้วยวิธี ANOVA ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยพบว่า ในกองหมักของอัตราส่วนดินต่อก้อนเชื้อเห็ด 1:3 มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเฉลี่ยในกองหมัก ภายในสัปดาห์แรกอุณหภูมิเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 46.0 องศาเซลเซียส ในกองหมักที่ 1 และ 2 ตามลำดับ แสดงถึงการเกิดกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสาร PAHs ในดินได้ทันที จากนั้นอุณหภูมิลดลงอยู่ในช่วง mesophilic เป็นเวลาประมาณ 20 วัน แล้วจึงเข้าใกล้อุณหภูมิบรรยากาศ สำหรับในกองหมักของอัตราส่วนดินต่อก้อนเชื้อเห็ด 1:2 และ 2:3 อุณหภูมิเฉลี่ยเพิ่มขึ้นช้ากว่าประมาณ 1 สัปดาห์ โดยอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีค่าสูงสุดเท่ากับ 45.0 และ 45.5 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากนั้น อุณหภูมิจะลดลงอยู่ในช่วง mesophilic เป็นเวลา 14 วัน แล้วจึงเข้าใกล้อุณหภูมิบรรยากาศ สำหรับในกองหมักของอัตราส่วนดินต่อก้อนเชื้อเห็ด 1:1 อุณหภูมิเฉลี่ยเพิ่มขึ้นช้ากว่าประมาณ 2 สัปดาห์ โดยอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีค่าสูงสุดเท่ากับ 43.5 องศาเซลเซียส จากนั้น อุณหภูมิจะลดลงอยู่ในช่วง mesophilic เป็นเวลา 10 วัน แล้วจึงเข้าใกล้อุณหภูมิบรรยากาศ ส่วนอุณหภูมิเฉลี่ยของชุดควบคุมที่มี (อัตราส่วนดินต่อก้อนเชื้อเห็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1:1) มีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 22.0 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่อัตราส่วน 2:5 พบว่าใน การทดลองนี้ อุณหภูมิเฉลี่ยสูงสุดจะเกิดเร็วกว่าเนื่องจากการเติมก้อนเชื้อเห็ดในปริมาณที่มากขึ้น ทำให้การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเฉลี่ยในกองหมักสูงขึ้นด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ กรรณิการ์ (2543) กล่าวว่า การที่จุลินทรีย์มีปริมาณมากกว่าจะเป็นการลดระยะเวลาในการปรับตัวที่เรียกว่า metabolic adaptation ในระยะ lag phase ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ทำให้การผลิตเอนไซม์เพื่อการย่อยสลาย ดำเนินไปได้ด้วยดี และเป็นการเร่งอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพให้เร็วขึ้น



ภาพที่ 21 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเฉลี่ยในกองหมักที่มีดินปนเปื้อนสาร PAHs

7.2 ผลของค่ากิจกรรมเอนไซม์

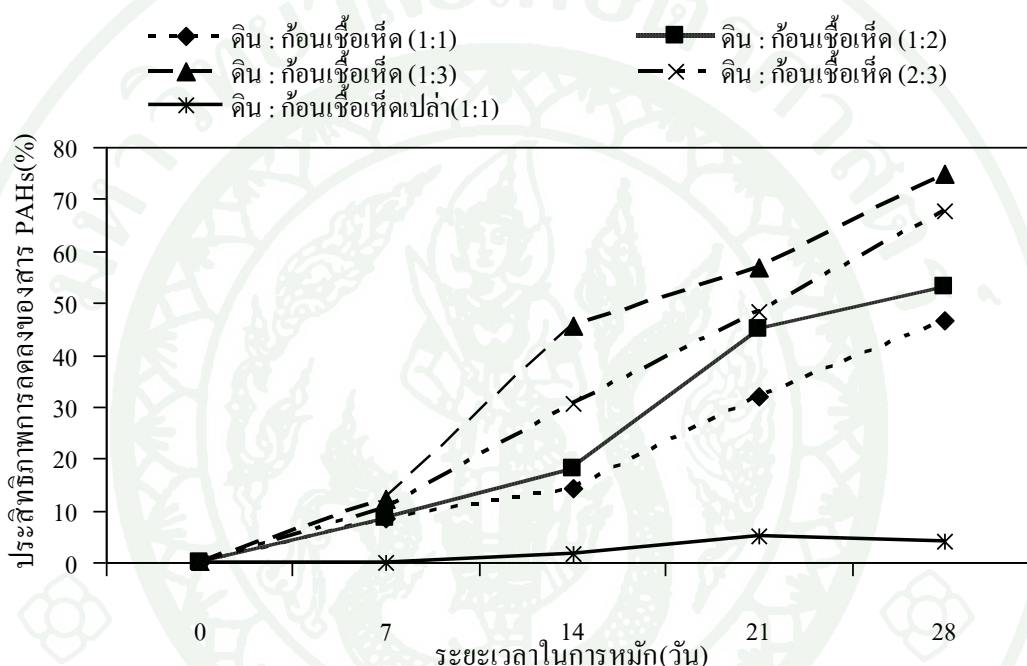


ภาพที่ 22 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสในกองหมักก้อนเชื้อเห็ดนางรมสังกะสีในแต่ละอัตราส่วนกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 28 วัน

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณเอนไซม์ในกองหมักแต่ละอัตราส่วนมีความแตกต่างกันเมื่อคำนวณทางสถิติด้วยวิธี ANOVA ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่า ในกองหมักของอัตราส่วนดินต่อก้อนเชื้อเห็ดนางรมสังกะสี 1:3 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุด (94.8

U/kg) ตามด้วย อัตราส่วน 2:3 (67.5 U/kg) อัตราส่วน 1:2 (49.6 U/kg) อัตราส่วน 1:1 (38.6 U/kg) และชุดควบคุมอัตราดินต่อก่อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1:1 (3.0 U/kg) โดยผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ว่า การเพิ่มปริมาณก่อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีทำให้การผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นเนื่องจากมีปริมาณจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น

7.3 ผลของประสิทธิภาพการลดลงของสาร PAHs ในแต่ละอัตราส่วน

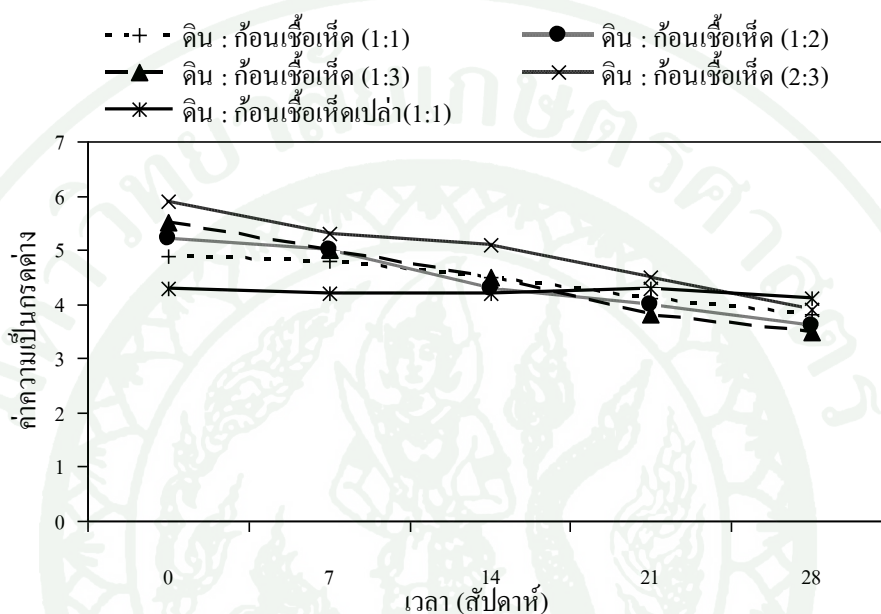


ภาพที่ 23 ประสิทธิภาพการลดลงของสาร PAHs ในกองหมักก่อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีในแต่ละอัตราส่วนกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 28 วัน

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณความเข้มข้นของสาร PAHs ในแต่ละอัตราส่วนมีค่าลดลงแตกต่างจากชุดควบคุม (อัตราดินต่อก่อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1:1) เมื่อคำนวณทางสถิติด้วยวิธี ANOVA ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยในกองหมักของอัตราส่วนดินต่อก่อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการี 1:3 มีความเข้มข้นของ PAHs น้อยที่สุด เมื่อเวลาผ่านไป 28 วัน โดยจะเหลือความเข้มข้นเพียง 7.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามด้วย อัตราส่วน 2:3 (12.35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) อัตราส่วน 1:2 (21.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) อัตราส่วน 1:1 (31.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และชุดควบคุมอัตราดินต่อก่อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1:1 (92.6 มิลลิกรัมต่อ

กิโลกรัม) ผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ว่า การเพิ่มปริมาณก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีจะทำให้การผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น เนื่องจากมีปริมาณจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น และทำให้ปริมาณสาร PAHs ลดลง

7.4 ผลของค่าความเป็นกรดต่าง



ภาพที่ 24 ค่าความเป็นกรดต่างในกองหมักก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีในแต่ละอัตราส่วนกับดินปนเปื้อนที่ระยะเวลา 28 วัน

ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ในการทดลองนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์จากตัวอย่างที่เก็บมา ณ วันแรก 7 14 21 และ 28 ของการทดลอง โดยการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดเป็นด่างนั้นแสดงในภาพที่ 24 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ในกองหมักแต่ละชนิด ตลอดระยะเวลาการหมัก จากการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี ANOVA พบว่า ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ให้ไม่ค่าแตกต่างกันในช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอยู่ระหว่าง 3.0- 4.5 โดยแนวโน้มของทุกกองหมัก ลดลงจนมีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ใกล้เคียง 3.0 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ทั้งนี้การลดลงของค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ในช่วงหลังของการหมักอาจเกิดจากสภาพการระบายอากาศที่ไม่เหมาะสมเนื่องจากกองหมักยุบตัวลง ทำให้บางส่วนในบ่อหมักมีสภาพการหมักแบบไร้อากาศ (anaerobe) จึงส่งผลให้ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ในกองหมักลดลง

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การศึกษาวิจัยการฟื้นฟูดินที่ปนเปื้อนสาร PAHs ผ่านกระบวนการหมักโดยการนำก้อนเชื้อเห็ดที่หมดระยะเวลาเก็บผลผลิตแล้ว 6 ชนิด คือ เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมฮังการี เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดหลินจือ เห็ดหูหนู และ เห็ดหอม มาลดปริมาณสาร PAHs ในดิน เมื่อทำการทดลองเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีให้ประสิทธิภาพสูงที่สุดในการลดปริมาณสาร PAHs 4 ชนิด ที่อัตราการลดลงของ ไพรีน เบนโซเอไพรีน แอนทราซีน และแนฟทาลิน เท่ากับ 74.2 ± 0.29 , 79.49 ± 0.35 , 79.36 ± 0.72 และ 80.33 ± 0.58 % ตามลำดับนอกจากนี้ สาร PAHs ที่โครงสร้างมีวงอะโรมาติกน้อยกว่ามีอัตราการลดลงสูงกว่าสาร PAHs ที่มีวงอะโรมาติกมากกว่า แนฟทาลินและแอนทราซีนมีอัตราการลดลงสูงกว่า ไพรีนและเบนโซเอไพรีน

ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของก้อนเชื้อเห็ด สอดคล้องกับอัตราการลดลงของสาร PAHs ที่ลดลง โดยก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีที่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ปริมาณสูงสุด (89.3 mU/g) ในแต่ละสัปดาห์ อัตราการลดลงของสาร PAHs ก็มีมากที่สุดเช่นกัน

การทดสอบประสิทธิภาพในการลดปริมาณสาร PAHs ที่อัตราส่วนดินต่อก้อนเชื้อเห็ดและปรับสภาพให้เหมาะสม เมื่อผ่านไป 28 วันพบว่าอัตราส่วน 1:3 มีประสิทธิภาพการลดลงของ PAHs สูงที่สุด ที่ 74.9 ± 0.48 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยอัตราส่วน 2:3 (67.8 ± 0.73 เปอร์เซ็นต์) อัตราส่วน 1:2 (53.0 ± 0.68 เปอร์เซ็นต์) และอัตราส่วน 1:1 ส่วน (46.7 ± 0.86 เปอร์เซ็นต์)

สำหรับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ พบว่าอุณหภูมิจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 47.5 ± 1.3 องศาเซลเซียส ในวันที่ 21 และจะค่อย ๆ ลดลงในสัปดาห์ต่อไป ยิ่งอุณหภูมิสูงขึ้นอัตราการลดลงของสาร PAHs ก็จะยิ่งมากขึ้นเนื่องจากไปเพิ่มกิจกรรมของจุลินทรีย์ ส่วนค่าความเป็นกรดด่าง จะค่อย ๆ ลดลงจากเดิม จากการศึกษาที่มีความเป็นไปในการใช้ประโยชน์จากก้อนเชื้อเห็ดที่เก็บผลผลิตแล้วโดยนำมาฟื้นฟูสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดินได้

ข้อเสนอแนะ

การใช้การศึกษาวิจัยการฟื้นฟูดินที่ปนเปื้อนสาร PAHs ผ่านกระบวนการหมักโดยการนำก้อนเชื้อเห็ดที่หมดระยะเวลาเก็บผลผลิตแล้วมาใช้ประโยชน์ สิ่งที่ต้องคำนึงถึงซึ่งได้จากการวิจัยมีดังนี้

การศึกษาวิจัยในอนาคต

1. การศึกษาถึงประสิทธิภาพการฟื้นฟูดินปนเปื้อน PAHs โดยใช้ก้อนเชื้อเห็ด ควรศึกษาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการบำบัดเพิ่มเติม และทำการคัดแยกเชื้อนั้นเพื่อใช้เป็นเชื้อเร่งในกระบวนการหมัก
2. ศึกษาประสิทธิภาพการฟื้นฟูดินปนเปื้อน PAHs โดยใช้ดินจากพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนจริง และทำการบำบัด ณ พื้นที่ที่มีการปนเปื้อน ด้วยกระบวนการหมักโดยใช้ก้อนเชื้อเห็ดที่เก็บผลผลิตแล้ว
3. ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดดินที่ปนเปื้อน PAHs โดยการใช้เชื้อเร่งในการหมักอย่างต่อเนื่อง สามารถเติมก้อนเชื้อเห็ดลงไปดินได้อีก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ
4. ศึกษาการบำบัดดินที่ปนเปื้อน PAHs ชนิดอื่นๆ หรือดินที่ปนเปื้อนสารมลพิษอื่น ๆ ด้วยกระบวนการหมักโดยใช้ก้อนเชื้อเห็ดที่ใช้แล้ว

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2543. **ความรู้สิ่งเป็นพิษ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์ลาดพร้าว, กรุงเทพฯ.
- กรรณิการ์ ชูเกียรติวัฒนา. 2543. **จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม**. พิมพ์ครั้งที่ 5. โคราซออฟเซ่การพิมพ์, นครราชสีมา.
- กฤตยาพร ทัพพะทัต. 2538. **ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำและตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเล จ.ระยอง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- กฤตินี กาญจนภา. 2539. **ไบโอรีมิดิเอชันของดินปนเปื้อนน้ำมันดิบ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- กองจัดการสารอันตรายและกากของเสีย. 2543. **พีเอเอช**. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการของสารเคมี เฉพาะเรื่อง กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ.
- กัลยา วัฒนากร. 2543. **การปนเปื้อนของสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในเอสทูรี แม่น้ำเจ้าพระยา**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ขนิษฐา สมตระกูล, สุภารัตน์ สวนจิตร, และ สุชาติ อุปถัมภ์. **การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ด้วยจุลินทรีย์ที่ใช้ phenol เป็นสารตั้งตอคาร์บอน**. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- จารุวรรณ สนมวัฒนะวงศ์. 2548. **เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบลิโนเชลลูโลสในเห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus* 10**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จรรยา สารินทร์. 2537. **การกระจายของอาลิฟาติกและอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตะกอนบริเวณอ่าวไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จิราณย์ ไชยปวิวงศ์. 2544. การสะสมของสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ในตะกอนบริเวณเอสทูรีแม่น้ำท่าจีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชมรมนักเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย. 2543. คู่มือการเพาะเห็ดนางฟ้า. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์เกษตรบุ๊ค, กรุงเทพฯ.

นาริรัตน์ เจริญช่าง, ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, กอบชัย ภัทรกุลวณิชช์, สุเทพ ธนียวัน, และ กาญจนา จันทองจีน. 2546. การใช้วัสดุจากการเกษตรเร่งการย่อยสลายสาร พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ในดิน. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 4(8):33-47

ปัญญา โพธิ์รัฐดิรัตน์ และ กิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2538. เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์ริ้วเขียว, กรุงเทพฯ.

ประดิษฐ์ มีสุข. 2548. เคมินทรีย์เบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 8. กรุงเทพฯการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ประนัฎา พิมพ์. 2548. การแยกและศึกษาจุลินทรีย์จากดินปนเปื้อนที่สามารถย่อยฟินอล. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 6(39): 63–68.

พัชรา วีระกะลัส. 2543. เอนไซม์. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2542. วิธีการวิเคราะห์ ดิน ปุ๋ย น้ำ. โครงการพัฒนาวิชาการดิน ปุ๋ย และสิ่งแวดล้อม ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ไมตรี สุทธจิตต์. 2532. โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน : พิษวิทยาและการตรวจวัด. ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่

เขาวา สุวดี. 2548. เอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯการพิมพ์. กรุงเทพฯ.

- วิโรจน์ บุญอำนวยวิทยา. 2547. การเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพของโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAH) ในดินโดยสารลดแรงตึงผิวแบบไม่มีประจุ (ระยะที่ 1-2) วารสารวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี 32(2): 225-239.
- สมศักดิ์ วั่งโน. 2528. จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน. โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด, กรุงเทพฯ.
- สุณีย์ นิธิสินประเสริฐ. 2544. เอกสารคำสอนวิชาการสลายตัวและกระบวนการย่อยสลายด้วยชีวภาพ. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ศุภมาส พนิชศักดิ์พัฒนา. 2540. ภาวะมลพิษของดินจากการใช้สารเคมี. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Amir, M.H., G. Merlina, H. Hamdi and J.C. Revel. 2005. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons during composting of lagooning sewage sludge. **Appl. Microbiol.** 58: 449–458.
- Atlas, R.M. and J. Philp. 2005. **Bioremediation**. 2nd ed. ASM Press, Washington DC.
- Ardon, O., Z. Kerem and Y. Hadar. 1996. Enhancement of laccase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. **J. Biotechnol.** 51: 201-207.
- Atagana, H.I. 2004. Co-composting of PAHs-contaminated soil with poultry manure, Lett. **Appl. Microbiol.** 39: 163–168.
- Baker, H.K. and S.H. Diane. 1994. **Bioremediation Environmental Microbiology Associates**. McGraw-Hill, New York.
- Baldrian, P. and J. Gabriel. 2002. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. **FEMS Microbiol. Lett.** 206: 69-74.

- Baldrian, P. and J. Gabriel . 2003. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in presence of cadmium. **FEMS Microbiol. Lett.** 220: 235-240.
- Basal, E., H. Pecker, M.K. Yalinkilic and A. Temiz. 2003. Cultivation of oyster mushroom on waste paper with some added supplementary materials. **Biores. Technol.** 89: 95-97.
- Bhat, M.K. and S. Bhat. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnol. Adv.** 15: 583-620.
- Breen, A. and F.L. Singleton. 1999. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. **Curr. Biotechnol. Adv.** 15: 583-620.75.
- Buswell, J.A., Y.J. Cai and S.T. Chang. 1993. Fungal-and substrate-associated factors affecting the growth of individual mushroom species on different lignocellulosic substrate, **Appl. Environ Microbiol.** 76: 141-150.
- Chang, S.T. 1999. World production of cultivated edible and medicinal mushroom in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes*. (Berk). **Int. J. Medicinal Mushroom** 1: 291-300.
- Chang, S.C. and K.H. Steinkraus. 1982. Lignocellulolytic enzyme produced by *Lentinus edodes*, the edible straw mushroom. **Appl. Environ Microbiol.** 43: 440-446.
- Chen, S., W. Ge and J.A. Buswell. 2004. Biochemical and molecular characterization of a laccase from the edible straw mushroom, *Pleurotus*. **Eur. J. Biochem.** 271: 318-328.
- Cohen, R., L. Persky and Y. Hadar. 2002. Biotechnological application and potential of wooddegrading mushrooms of the fungus *Pleurotus*. **Applied Microbiology Biotechnology.** 58(5):582-594.

- Debbie, J.T. and R. Bartha. 1979. Effect of Environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. **Applied and Environmental Microbiology** 31: 729-739.
- Eggen, T. and A. Majcherezyk. 1998. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **International Biodeterioration & Biodegradation** 41: 111-117.
- Eggert, C., U. Temp and K.E.L. Eriksson. 1997. Laccase is essential for lignin degradation by The white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. **FEBS Lett.** 407: 89-92.
- Ellis, B., M.T. Balba and P. Thelie. 1990. Bioremediation of oil contaminate land. **Environmental Technology** 11: 443-455.
- Elisashvili, V., D. Chichua, E. Kachishvili, N. Tsiklauri and T. Khar Dziani. 2003. Linocellulolytic enzyme activity during growth and fruiting of the edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) kumm. (Agaricomycetideae). **Internal Journal Medicine Technology** 5(2): 103-109.
- EPA. 1996. **A Citizen's Guide to Bioremediation**. Popular Science. Available Source: <http://www.epa.gov/swertio1/download/citizens/bioremediation.pdf>. August 1, 2007.
- Eriksson, K.E.L., R.A. Blanchette and P. Ander. 1990. **Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Component**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Fedorak, P.M. and D.W.S. Westlake. 1981. Degradation of aromatics and saturatedes in crude oil by enrichment. **Water Air and Soil Pollution** 16: 367 – 375.
- Freeman, M.H. and P.R. Sferra. 1991. **Innovation Hazardous Waste Treatment Technology Series Vol.3**. Technomic Publishing, Inc., Ohio.
- Fitzpatrick, E.A. 1986. **An Introduction to Soil Science**. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Flathman, P.E., D.E. Jerger and J.H. Exner. 1994. **Bioremediation field experience**. 1st ed. CRC Press Inc., London.

Fu, M.H. and M. Alexander. 1992. Biodegradation of styrene in samples of natural environments. **Environ. Sci. Technol.** 26: 1540 – 1544.

Galhaup, C., H. Wagner, B. Hinterstoisser and D. Haltrich. 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading asidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme Microb. Technol.** 30: 529-536.

Hamman, A. 2004. Bioremediation capabilities of white rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology** 74: 1873-1882.

Harman, A. and C.P. Kubicek. 2002. **Trichoderma and Gliocladium Volume 2 Enzyme, biological control and commercial applications**. Taylor G Francis, London.

Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiol. Rev.** 13: 125-135.

Hofrichter, M., M. Kalsi, T. Vares, S. Galkin, K. Scheibner, W. Fritsch and A. Hatakka, 1990. Production of manganese peroxidase and organic acid and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (¹⁴C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. **Applied and Environmental Microbiology** 65: 1864-1870.

Howard, R.L., E.L. Jansen van Renabury and S. Howard. 2003. Linocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African J. Biotechnol.** 2(12): 602-619.

Inchang, S.T., J.A. Buswell and S.W. Chiu. 2001. **Mushroom Biology and Mushroom Product**. Chinese University of Hong Kong, Chinese University Press, Hong Kong.

- _____. 1996. **Lignolytic enzyme production and secretion in edible mushroom fungi produc.** Chinese University of Hong Kong, Chinese University Press. Hong Kong.
- Buswell, J.A. and M. Wayman. 1992. Novel inducers derived from starch for laccase production by mushroom. **Process Biochem.** 27: 327-334.
- Jamison, V.M., R.L. Raymond and J.O. Hudson. 1975. Biodegradation of high-octane-gasoline in ground water. **Dev. Ind. Microbiol.** 16: 305 – 312.
- Jobson, A., F.D. Cook and D.W.S. Westlake. 1973. Effect of amendment on the microbial utilization of oil applied to soil. **Appl. Microbiol.** 27(1): 166 – 171.
- Jung, H., F. Xu and K. Li. 2002. Purification and characterization of laccase from Wood degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. **Enzyme Microb. Technol.** 30: 161-168.
- Kirk, T.K. and D. Cullen. 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. **Enzyme Microb. Technol.** 12: 273-307.
- Inchang R.A. and M. Akhtar. 2003. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry.** John Wiley&Sons, Inc., Canada.
- Inyoung S.T. and T.H. Quimio. 2004. **Tropical mushrooms biological nature and cultivation methods.** Chinese university of Hong Kong, Chinese University Press. Hong Kong.
- Kostecki, P.T. and E.J. Calabresa. 1991. **Hydrocarbon Contaminate Soils and Groundwater.** National Academy of Sciences, Washington D.C.
- Kurtzman, R.H. and F. Zadrazil. 1982. Physiological and taxonomic considerations for cultivation of *Pleurotus* mushrooms, pp. 299-348.

- Lau, K.L., Y.Y. Tsang, and S.W. Chiu. 2003. Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples. **Biotechnol. Adv.** (17): 563-573.
- Machuca, A. and A. Ferraz. 2001. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white-and brown- rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. **Enzyme Microb. Technol.** 29: 386-391.
- Maier, M.R., L.I. Pepper, and P.C. Gerba. 2000. **Environmental microbiology**. Academic Press. Washington D.C.
- Matsubara, M., J.M. Lynch and F.A.M. Deleij . 2005. A simple screening procedure for selecting fungi with potential for use in the bioremediation of contaminated land. **Appl. Environ Microbiol.** 43: 440-446.
- Martins, M.A.M., I.C. Ferreira, I.M. Santos, M.J. Queiroz and N. Lima. 2001. Biodegradation of Bioaccessible Textile Azo Dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **J. Biotechnol.** 89: 91-98.
- _____, M.J. Queiroz, A.J.D. Silvestre and N. Lima. 2002. Relationship of Chemical Structure of Textile Dyes on The Pre-Adaptation Medium and The Potentiality of their Biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. **Res. Microbiol.** 153: 361-368.
- _____, N. Lima, A.J.D. Silvestre and M.J. Queiroz. 2003. Comparative Studies of Fungal Degradation of Single or Mixed Bioaccessible Reactive Azo Dyes. **Chemosphere** 29: 473-477.
- Moretto, L.M., S.I. Silvestr, P. Ugo, G. Zorzi, F. Abbondanzi, C. Baiocchi and A. Iacondini 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by composting in a soot-contaminated alkaline soil. **J. Hazard. Mater.** 126 : 141-148.

- Miles, P.G. and S.T. Chang. 1997. **Mushroom Biology**. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, Singapore.
- Mirsal, I.A. 2004. **Soil Pollution: Origin Monitoring & Remediation**. 1st ed. Springer-Verlag, New York.
- Mishra, C. and G.F. Leatham. 1990. Recovery and fractionation of extracellular degradative enzyme from *Lentinula edodes* cultures cultivated on a solid lignocellulosic substrate. **J. Ferment. Eng.** 69:8-15.
- Nishizawa, Y., R. Nakabayashi and E. Shinagawa. 1995. Purification and characterization of laccase from white rot fungus *Trametes sanguinea* M85-2. **J. Ferment. Bioengng.** 80(1): 91-93.
- Ögel, Z.B., K. Yarangümeli, H. Dünder and I. Ifrij. 2001. Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanase production. **Enzyme Microb. Technol.** 28: 689-695.
- Ohga, S. and D.J. Royse. 2001. Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplement sawdust. **FEMS Microb. Lett.** 201: 111-115.
- Paul, E.A. and F.E. Clark. 1989. **Soil Microbiology and Biochemistry**. Academic Press, Inc., New York.
- Pierzynski, G.M., J.T. Sims and G.F. Vance. 2005. **Soils and environmental quality**. 1st ed. CRC Press, Boca Raton.
- Pinholt, Y., S. Struwe and A. Kjoller. 1979. Microbial changes during oil decomposition in soil. **Holartic Ecol.** 2: 195 – 200.

- Qinnghe, C., Y. Xiaoyu, N. Tiangui, J. Cheng and M. Qiugang. 2004. The screening of culture condition and properties of laccase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochem.** 39:1561-1566.
- Raymond, R.L., J.O. Hubson and V.W. Jamison. 1976. Oil degradation in soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 31: 522 – 535.
- Reddy, G.V., P.R. Babu, P. Komaraiah, K.R.R.M. Roy and I.L. Kothari. 2003. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using to *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process Biochem.** 38: 1457-1462.
- Ritman, B.E. and N.M. Johnson. 1989. Rapid biological clean-up of soil contaminated with lubricating oil. **Water Sci. and Technol.** 21: 209 – 219.
- Robinson, T., B. Chandran and P. Nigam. 2001. Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolorization of textile dyes. **Enzyme Microb. Technol.** 29 : 575-579.
- Sasek, V., M. Bhatt, T. Cajthaml, K. Malachova and D. Lednicka. 2002. Compost-mediated removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil. **Archive of Environmental Contamination and Toxicology** 2003 44: 336–342 .
- Saito, T., P. Hong, K. Kato, M. Okazaki, H. Inagaki, S. Maeda and Y. Yokogawa. 2003. Purification and characterization an extracellular laccase of a fungus (fammily Chaetomiaceae) isolated from soil. **Enzyme Microb. Technol.** 33: 520-526.
- Sanyal, A., R.K. Kundu, S.N. Sinha and D.K. Dube. 1988. Extracellular cellulolytic enzyme system of *Aspergillus japonicus* : 1. Effect of different carbon sources. **Enzyme Microb. Technol.** 10: 85-90.

- Schneider, P., M.B. Caspersen, K. Mondorf, T. Halkier, L.K. Skov, P.R. Østergaard, K.M. Brown, S.H. Brown and F. Xu. 1999. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. **Enzyme Microb. Technol.** 25: 502-508.
- Singh, A. and O.P. Ward. 2004. **Applied bioremediation and phytoremediation.** 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
- Sims, R., D. Sorensen, J. McLean, R. Dupont, J. Jurinak and K. Wagner. 1986. **Contaminated Surface Soils In-Place Treatment Techniques.** Noyes Publications, Park Ridge, N.J.
- Silva, E.M., A. Machuca and A.M.F. Milagres. 2003. Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strain. **Process Biochem.** 40: 161-164.
- Sparrow, I.B., C.V. Devenport and R.C. Gorbon. 1978. Response of Microorganisms to Hot Crude Oil Spills on a Subarctic Taiga Soil. **Arctic** 31: 324 – 338.
- Soden, D.M. and A.D.W. Dobson. 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. **Microbiol.** 147:1755-1763.
- Song, H.G., X. Wang and R. Bartha. 1990. Bioremediation Potential of Terrestrial Fuel Spills. **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 652 – 656.
- Suto, M. and F. Tomita. 2001. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. **Biosci. Bioeng. J.** 92(4): 305-311.
- Tan, Y.H. and M.N. Wahab. 1997. Extracellular Enzyme Production During Anamorphic Growth in the Edible Mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 13: 613-617.
- Tengerdy, R.P. and G. Szakacs. 2003. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochem. Engng. J.** 13: 169-179.

- Smith, T.M., C.F. Thurton and D.A. Wood. 1999. Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes in the mycelium of *Agaricus bisporus* during fruit body development on a solid state. **Mycol. Res.** 103(12): 1557-1560.
- Tour, U., K. Winterhalter and A. Fiechter. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **J. Biotechnol.** 41: 1-17.
- U.S. EPA. 1989. **Mouse Oral Subchronic Toxicity Study with Acenaphthene.** Washington DC: 89
- Verstrate, W., R. Vanlooche, R. DeBorger and A. Verlinde. 1976. Modeling of the Breakdown and the Mobilization of Hydrocarbons in Unsaturated Soil Layers. **Appl. Sci.** 49: 78-89.
- Westlake, D.W.S., A. Jobson and F.D. Cook. 1978. In Situ Degradation of Oil in Soil of the Boreal Region of the Northwest Territories. **Canadian Journal of Microbiol.** 24: 254 – 260.
- Wilson, J.T., L.E. Leach, M. Henson and J.N. Jones. 1986. In Situ Bioremediation as a Ground-Water Reclamation Technique. **Ground Water Mon. Rev.** 1: 56 – 64.
- Wood, T.M. 1992. Fungal Cellulase. **Biochem. Soc. Transac.** 20: 97 – 110.
- Wood, T.M. and K.M. Bhat. 1988. Method for Measuring Cellulase Activity. **Method in Enzymol.** 160: 87-91.
- Yildiz, S., Ü.C. Yildiz, E.D. Gezer and A. Temiz. 2003. Some lignocellulosic waste used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. **Process Biochem.** 38: 301-306.

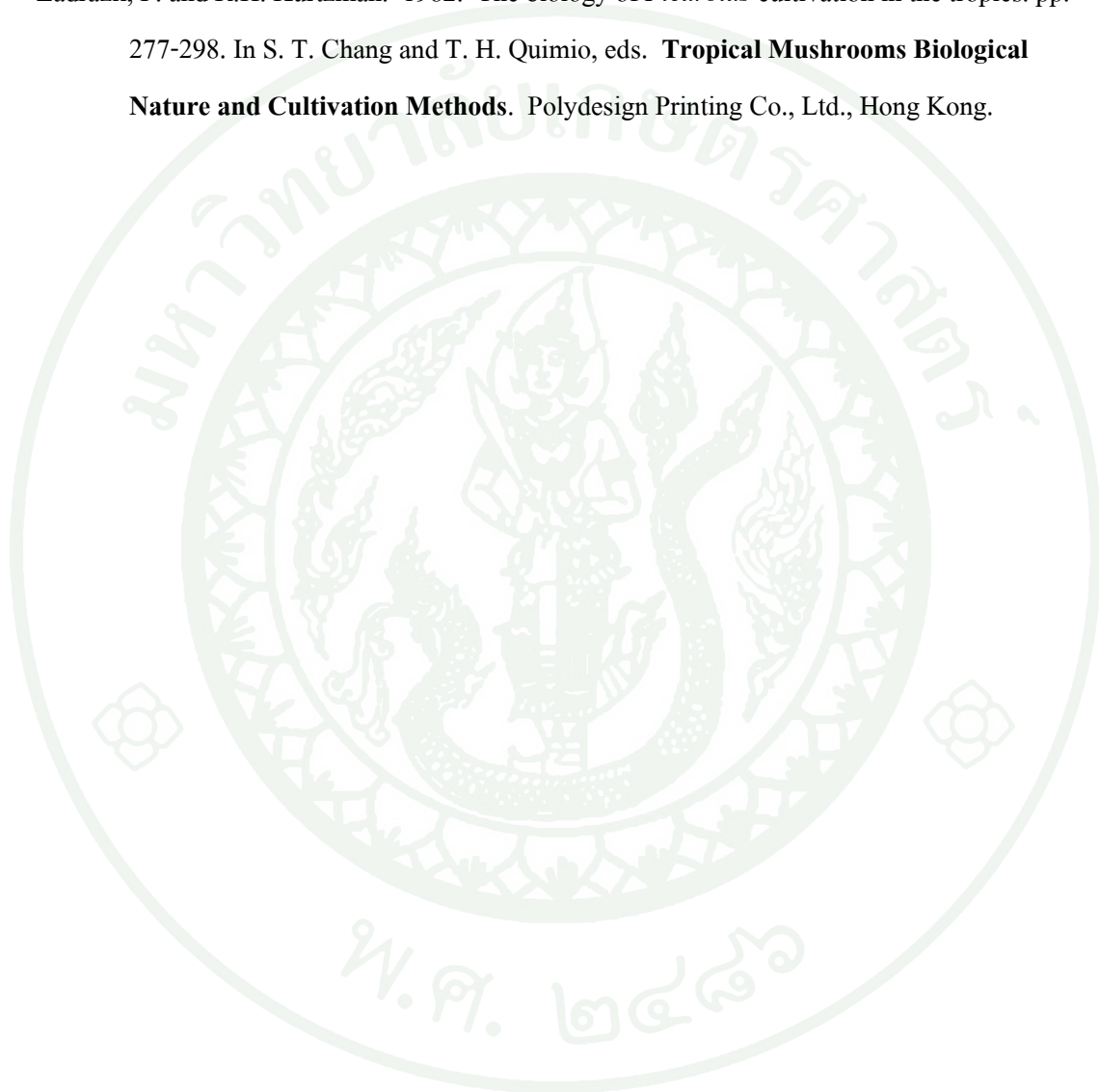
Ying, A.J., G.D. Shepherd and D. Wright. 1990. Bioremediation of Heavy Petroleum Oil in Soil at a Railroad Maintenance Yard. In P.T. Kostecki and E.J. Calabrese, eds.

Petroleum Contaminated Soils 3. Lewis Publishers, Chelsea.

Zadrazil, F. and R.H. Kurtzman. 1982. The biology of *Pleurotus* cultivation in the tropics. pp.

277-298. In S. T. Chang and T. H. Quimio, eds. **Tropical Mushrooms Biological**

Nature and Cultivation Methods. Polydesign Printing Co., Ltd., Hong Kong.







สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

1.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

1.1.1 สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (สารละลาย x) ซึ่งโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.799 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.1.2 สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 1.1 โมลาร์ (สารละลาย y) ซึ่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 14.196 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.1.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆผสมสารละลาย x และสารละลาย y (ข้อ 1.2.1 และ 1.2.2) ให้มีปริมาตรตามที่แสดงในตารางผนวกที่ 1 แล้วนำไปปรับพีเอชตามที่ต้องการ จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

1.2 การเตรียมสารละลายสับสเตรต

1.2.1 เตรียมสารละลาย syringaldazine เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่ใช้เป็นสับสเตรตในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แลคเคส เตรียมโดยชั่งสับสเตรตสารละลาย syringaldazine (Sigma, Germany) 0.3604 กรัม ละลายในสารละลายแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตร เป็น 1 ลิตร

1.2.2 เตรียมสารละลาย verathyl alcohol เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ที่ใช้เป็นสับสเตรตในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

1.2.3 เตรียมสารละลาย MBTS (3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ที่ใช้เป็นสับสเตรตในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

ตารางผนวกที่ ก1 ปริมาณสารละลาย x และสารละลาย y ที่ใช้ผสมเพื่อปรับค่าความเป็นกรดต่าง
สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ

พีเอช	สารละลาย x (มิลลิลิตร)	สารละลาย y (มิลลิลิตร)
5.7	93.5	6.5
5.8	92.0	8.0
5.9	90.0	10.0
6.0	87.7	12.3
6.1	85.0	15.0
6.2	81.5	18.5
6.3	77.6	22.5
6.4	73.5	26.5
6.5	68.5	31.5
6.6	62.5	37.5
6.7	56.5	43.5
6.8	51.0	49.0
6.9	45.0	55.0
7.0	39.0	61.0
7.1	33.0	67.0
7.2	28.0	72.0
7.3	23.0	77.0
7.4	19.0	81.0
7.5	16.0	84.0
7.6	13.0	87.0
7.7	10.5	90.5
7.8	8.5	91.5
7.9	7.0	93.0
8.0	5.3	94.7



ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของดินและก้อนเชื้อเห็ด

วิธีการวิเคราะห์ดิน

1. วิเคราะห์ดิน

1.1 การหาความชื้นในดิน

1.1.1 นำ Moisture can มาอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำ Moisture can ที่อบแล้วมาใส่ใน Desiccator ทิ้งไว้ให้เย็น

1.1.2 ชั่งน้ำหนัก Moisture can ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนัก ชั่งดินปทุมประมาณ 5 กรัม ใส่ลงใน Moisture can จดบันทึกน้ำหนักที่ได้

1.1.3 นำ Moisture can ที่มีดินปทุมอยู่ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นใน Desiccator แล้วชั่งน้ำหนักดินหลังอบอีกครั้ง

1.1.4 คำนวณหาความชื้นของดิน ดังนี้

$$\text{ความชื้น (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างดินก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างดินหลังอบ}) \times 100}{(\text{น้ำหนักตัวอย่างดินก่อนอบ})}$$

1.2 วิเคราะห์ ค่า pH ของดินและก้อนเชื้อเห็ด

1.2.1 นำดินที่ผ่านการบดแล้วมาผ่านตะแกรงร่อนขนาด 2 มม. ชั่งดินดังกล่าว 10 กรัม (ถ้าเป็นก้อนเชื้อเห็ดให้คลุกก้อนเชื้อเห็ดก่อนชั่ง) ใส่ลงใน Beaker ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนคร่าวแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้ดินกับน้ำทำปฏิกิริยากัน

1.2.2 ทำ standardize pH meter ด้วย buffer solution pH 7.0 และ 4.0 ก่อนการวัด pH ของดิน แล้วนำค่า pH ที่บันทึกไว้แล้วนำมาประเมินค่าการวิเคราะห์ของดิน โดยเทียบระดับกับตารางมาตรฐาน ค่า pH ของดิน ในตารางผนวกที่ ข1

ตารางผนวกที่ ข1 ประเมินค่าการวิเคราะห์ของดิน

ระดับ (rating)	pH
เป็นกรดจัดมาก (extremely acid)	< 4.5
เป็นกรดจัด (very strongly acid)	4.5-5.0
เป็นกรดแก่ (strongly acid)	5.1-5.5
เป็นกรดปานกลาง (moderately acid)	5.6-6.0
เป็นกรดเล็กน้อย (slightly acid)	6.1-6.5
เป็นกลาง (neutral)	6.6-7.3
เป็นด่างอย่างอ่อน (slightly alkaline)	7.4-7.8
เป็นด่างปานกลาง (moderately alkaline)	7.9-8.4
เป็นด่างแก่ (strongly alkaline)	8.5-9.0
เป็นด่างจัด (extremely alkaline)	>9.0

ปฏิกิริยาของดิน (Soil reaction), pH (ดิน : น้ำ = 1:1)

ที่มา : กรมพัฒนาที่ดิน (2545)

1.3 วิเคราะห์ไนโตรเจน

1.3.1 ใช้วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ (Standard Operating Procedure) Total Kjeldahl Nitrogen (TKN) โดยวิธี Kjeldahl และ Titration ซึ่งตัวอย่างดิน 1 g, potassium sulfate 2 g และ copper sulfate 0.8 กรัม ใส่ในหลอดทดลองเติมกรด H_2SO_4 12 มิลลิลิตร ย่อยที่อุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3.2 เมื่อครบ 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 15 min เติมน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร นำไป digest กับ กรด Boric 4 % 30 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 นาที จะได้สารละลายสีเขียวอมฟ้า จากนั้นไตเตรด ด้วย สารละลาย HCl 0.01 M จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอมม่วง

1.4 วิเคราะห์สารอินทรีย์

1.4.1 ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัมใส่ลงใน erlenmeyer flask 250 มิลลิลิตร เติม $K_2Cr_2O_7$ 0.1 ลงไป 10 มิลลิลิตร เติม H_2SO_4 (conc.) 15 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ 1-2 นาทีแล้วตั้งทิ้งไว้ให้น้ำสารละลายและดินทำปฏิกิริยากันประมาณ 30 นาที เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

1.4.2 หยด O-phenanthroline indicator 5 หยด ไตเตรทสารละลายด้วยสารละลาย $Fe(NH_4)_2(SO_4)$ 0.5 N จนสารละลายเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลแดงจุด ปริมาตร $K_2Cr_2O_7$ และ $Fe(NH_4)_2(SO_4).6H_2O$ ที่ใช้

1.4.3 ทำ blank เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ดิน จากนั้นคำนวณหา ปริมาณ organic carbon และ ปริมาณ organic matter

สูตรหาปริมาณอินทรีย์วัตถุ (organic matter: OM)

$$\% OC = (B-T)N/B \times (100/77) \times (3/10^3) \times (100/X) \times$$

เมื่อ

B = จำนวนมิลลิลิตรของ $Fe(NH_4)_2(SO_4).6H_2O$ ที่ไตเตรทกับ blank

T = จำนวนมิลลิลิตรของ $Fe(NH_4)_2(SO_4).6H_2O$ ที่ไตเตรทกับตัวอย่างเดิม

N = ความเข้มข้นของ $K_2Cr_2O_7$

X = น้ำหนักของดิน (กรัม)

$$\% OM = \% \text{ organic carbon} \times 1.724$$

1.5 วิเคราะห์ค่า CEC

1.5.1 ชั่งดินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร. น้ำหนัก 5.00 กรัม ใส่ในกระดวยกรองที่พันวางไว้ในกรวยกรองซึ่งวางอยู่บนขวดชมพู 250 มิลลิลิตร

1.5.2 ชะดิน (Leach) ด้วย NH_4OAc เข้มข้น 1.0 M, pH 7.0 ครั้งละ 25 มิลลิลิตร 4 ครั้ง การชะดินแต่ละครั้งต้องรอให้ NH_4OAc ผ่านกระดวยกรองลงไปให้หมด แล้วจึงชะครั้งต่อไป

1.5.3 ชะดินในกระดวยกรองต่อด้วย NH_4Cl เข้มข้น 0.25 M ครั้งละ 25 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ชะดินด้วย C_2H_5OH เข้มข้น 40% ครั้งละ 25 มิลลิลิตร อีก 4 ครั้งเพื่อให้ได้ $Free NH_4^+$

1.5.4 ชะดินด้วย NaCl เข้มข้น 10% ครั้งละ 25 มิลลิลิตร 4 ครั้ง โดยใช้ขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร รองรับและปรับปริมาตรด้วย NaCl เข้มข้น 10%

1.5.5 นำไปกลั่นด้วยชุดกลั่นโดยเปิดสารที่ผ่านการย่อย มา 20 มิลลิลิตร และเติม NaOH เข้มข้น 32% จำนวน 5 มิลลิลิตร เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และรองรับสิ่งกลั่นด้วย H_3BO_3 เข้มข้น 4% จำนวน 5 มิลลิลิตร โดยหยด mixed indicator 3-4 หยด สารละลาย H_3BO_3 จะมีสีเขียวทำการ กลั่นประมาณ 5 นาที จนได้สิ่งกลั่นประมาณ 20 มิลลิลิตร

1.5.6 นำสารละลายที่กลั่นได้ไปไทเทรต กับกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.12 M จนถึง end point ซึ่งสีเขียว ของสารละลาย Boric จะเปลี่ยนเป็นสีชมพู

1.5.7 บันทึกปริมาตรของกรด H_2SO_4 ที่ใช้ เพื่อนำมาใช้คำนวณต่อไป ทำการกลั่น reagent blank ควบคู่ไปด้วยทุกครั้งที่ทำกร่วิเคราะห์

สูตรคำนวณ C.E.C

$$\text{C.E.C} = N \times (T - B) \times A \times 100$$

N = Normality ของ standard H_2SO_4 (ใช้ 0.02 N)

T = ปริมาณของ standard H_2SO_4 ที่ใช้ titrate sample

B = ปริมาณของ standard H_2SO_4 ที่ใช้ titrate sample

A = ปริมาณทั้งหมดของ aliquot

1.6 วิเคราะห์ชนิดของเนื้อดิน

1.6.1 ชั่งตัวอย่างดินชั่งดินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร. จำนวน 60 กรัม ใส่ใน beaker เติมน้ำ 100 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย H_2O_2 ลงใน beaker การเติมให้เติมทีละน้อย ๆ ประมาณ 5-10 มิลลิลิตร ทุกครั้งที่เติมต้องรอให้ปฏิกิริยาสงบเสียก่อน เร่งปฏิกิริยาให้เร็วขึ้นได้โดยอุ่น hot plate เมื่อดินไม่ทำปฏิกิริยาอีกแล้ว ตั้งทิ้งไว้ 1 ชม. เพื่อไล่ H_2O_2 ที่เกินพอกออกไป ทิ้งให้เย็น

1.6.2 ถ่ายดินจาก beaker ลงในกรวยซึ่งรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 ให้หมด แล้วชะดินในกรวยกรองด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 50 มิลลิลิตร จนครบ 200 มิลลิลิตร

1.6.3 นำดินในกรวยกรองใส่ลงใน Beaker นำไปอบที่อุณหภูมิ 105-110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-24 ชั่วโมง แล้วนำไปทำให้เย็นใน desiccators

1.6.4 ชั่งน้ำหนักของดินที่ได้นี้ 40 กรัม ลงใน dispersion cup เติมน้ำกลั่น 5 % ลงไป 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปกวนด้วยเครื่องกวน (mechanical stirrer) เป็นเวลา 5 นาที

1.6.5 ถ่ายตัวอย่างดินที่กวนแล้วลงใน sedimentation cylinder นิดน้ำล้างใส่ดินลงใน sedimentation cylinder ให้หมด เติมน้ำกลั่นลงไป 100-200 มิลลิลิตร หย่อน hydrometer ลงไปแล้ว เติมน้ำกลั่นลงไปจนถึงขีดล่างของ sedimentation cylinder ถ้าใช้ดิน 100 กรัม ให้เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดบนของ sedimentation cylinder

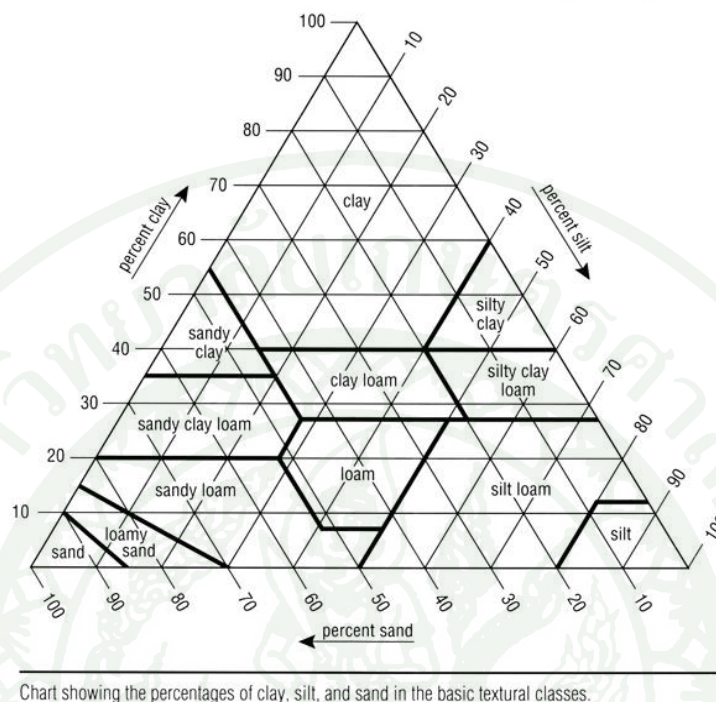
1.6.6 ยก hydrometer ออก ใช้จุกยางปิด sedimentation cylinder ให้แน่นใช้มือหนึ่งจับปากของ Sedimentation cylinder ตรงจุกยางอีกมือหนึ่งจับก้นของ sedimentation cylinder กระดก ก้นของ sedimentation cylinder ขึ้นลงหลาย ๆ ครั้ง เพื่อเขย่าให้อนุภาคของดินกระจายอย่างสม่ำเสมอ แล้ววางลงเปิดจุกยางเริ่มจับเวลา

1.6.7 เมื่อถึงวินาทีที่ 20 หย่อน hydrometer ลงไปในสารแขวนลอย อ่านค่าเมื่อครบ 40 วินาทีพอดี นับตั้งแต่วาง sedimentation cylinder ลงบนโต๊ะ วัดอุณหภูมิของสารแขวนลอยตรงที่ระดับศูนย์กลางของปริมาตรของกระเปาะ hydrometer จดค่าไว้ และปฏิบัติซ้ำอีกครั้ง เมื่อได้เวลาอีก 20 วินาทีจะครบ 2 ชม. อ่านค่าเมื่อได้เวลา 2 ชั่วโมง พอดี

1.6.8 เติมน้ำกลั่น 5 % จำนวน 100 มิลลิลิตร ลงใน sedimentation อีกใบหนึ่งแล้วปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 7 จดค่าที่ได้ในข้อ 7 และ 8 ไว้ นำไปคำนวณ

1.6.9 คำนวณเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของ sand silt clayอนุภาคดินเหนียว ในส่วนที่เป็นอนินทรีย์สารของตัวอย่างดินที่ใช้ในการวิเคราะห์นี้ โดยถือว่าขณะที่อ่านค่าเมื่อวินาทีนั้น ไม่มีอนุภาคจำพวก sand อยู่รอบกระเปาะ hydrometer และขณะที่อ่านค่าเมื่อ 2 ชม. ไม่มีอนุภาค sand และ silt อยู่รอบกระเปาะ hydrometer เลย

1.6.10 ใช้ไดอะแกรมสามเหลี่ยมพิจารณาประเภทของเนื้อดิน



ภาพผนวกที่ ข1 ไดอะแกรมสามเหลี่ยมพิจารณาประเภทของเนื้อดิน

ที่มา : กรมพัฒนาที่ดิน (2545)

สูตรคำนวณ

C

ได้จากการเปิดตาราง T

Corr 40 sec

ได้จากการคำนวณจากสูตร $100 - [(Hydro. + C) \times 2] = \%Sand$

Corr 1 hour

ได้จาก $[(Hydro. + C) \times 2] = \%Clay$

%Silt

ได้จาก $100 - (Sand + Clay)$

2. เตรียมความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

2.1 การเตรียมความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเพื่อหา สภาวะของเครื่องและทำ กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน โดยเตรียมความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เป็น Mixed Standard ที่ 5 ระดับความเข้มข้นคือ 0.25, 0.5, 1.0, 5.0 และ 10 ppm. โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) Hewlett-packard รุ่น HP 1100

สภาวะที่ใช้คือ

Solvent : Solvent A 25% Deionized
 Solvent B 75% Acetonitrile

Detector : UV Detector
 Wave length 254 nm

Injection : Autosampler
 Injection volume 25 μ l

Column : Mightysil RP-18 GP 250-4.6

Flow rate : 1.0 ml/min

กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานที่ได้แสดงใน ภาพผนวกที่ ข2-ข5

2.2 วิธีสกัดสาร PAHs จากตัวอย่างดิน

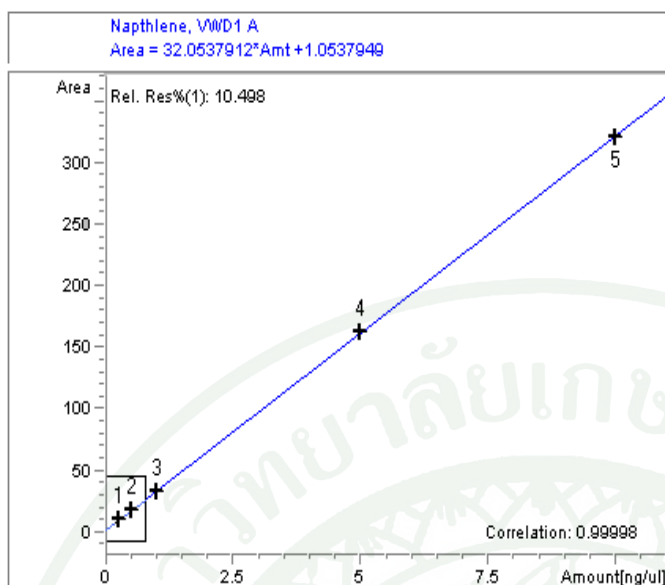
2.2.1 นำตัวอย่างดินมาทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งดินตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร

2.2.2 เติมสาร POLE ความเข้มข้น 6.5 % ลงในดินที่อบไว้แล้วนำไป ใส่เครื่อง Sonicator ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อสกัด PAHs ออกจากดิน

2.2.3 จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง PTFE ขนาด 0.45 μ m หลังจากนั้นเมื่อกระดาษกรองแห้งแล้ว ก็นำสารละลายที่ได้จากการกรอง 1 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC (ดัดแปลงจากวิธีของ Matsubara *et al.* (2005))

2.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

การสร้างกราฟมาตรฐาน จากสารมาตรฐานที่ใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ กันกับพื้นที่ใต้กราฟ การหาปริมาณของสารตัวอย่างนั้น ทำการวิเคราะห์โดยใช้สภาวะเดียวกันกับสารมาตรฐาน พื้นที่กราฟนำไปอ่านจากกราฟมาตรฐาน ได้เลย



Napthalene at exp. RT 6.246

VWD1 A Wavelength = 254 nm

Correlation: 0.99998

Residual Std. Dev. : 0.91168

Formular: $y = mx + b$

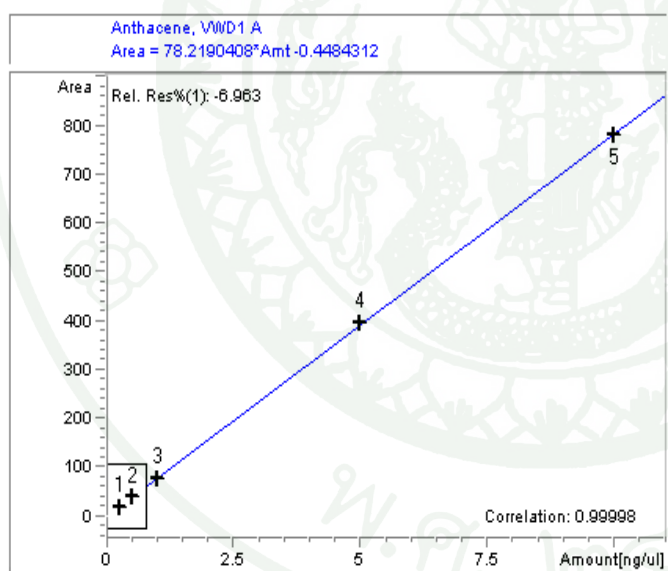
m: 32.05379

b: 1.05379

x: Amount (ng/ul)

y: Area

ภาพที่ผนวก ข2 กราฟมาตรฐานของ แนฟทาไลน์ ที่ความเข้มข้น 0.25,0.5,1.0,5.0,10 ppm.



Anthacene at exp. RT 10.342

VWD1 A Wavelength = 254 nm

Correlation: 0.99998

Residual Std. Dev. : 2.45853

Formular: $y = mx + b$

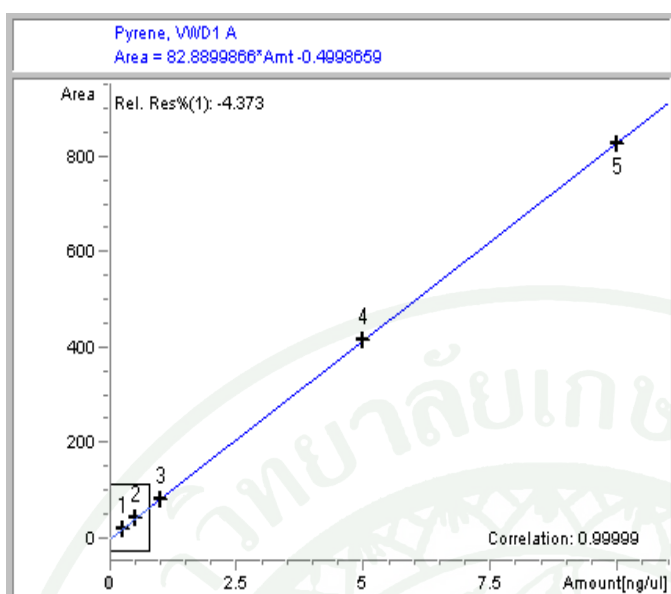
m: 78.21904

b: -4.48432e-1

x: Amount (ng/ul)

y: Area

ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานของ แอนทราซีน ที่ความเข้มข้น 0.25,0.5,1.0,5.0,10 ppm.



Pyrene at exp. RT 13.65

VWD1 A Wavelength = 254 nm

Correlation: 0.99999

Residual Std. Dev. : 1.43730

Formular: $y = mx + b$

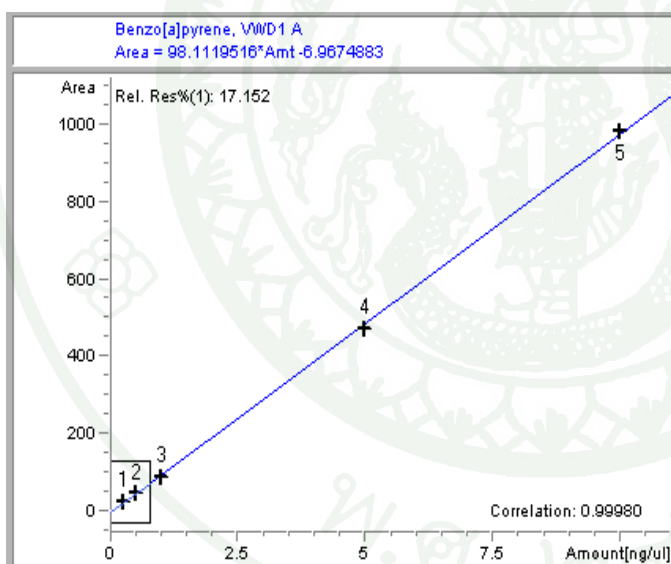
m: 82.88999

b : -4.99866e-1

x : Amount (ng/ul)

y : Area

ภาพผนวกที่ ข 4 กราฟมาตรฐานของ ไพรีน ที่ความเข้มข้น 0.25,0.5,1.0,5.0,10 ppm.



Benzo[a]pyrene at exp. RT 28.609

VWD1 A Wavelength = 254 nm

Correlation: 0.99980

Residual Std. Dev. : 8.74541

Formular: $y = mx + b$

m: 98.11195

b : -6.96749

x : Amount (ng/ul)

y : Area

ภาพผนวกที่ ข 5 กราฟมาตรฐานของ เบนโซไพรีนที่ความเข้มข้น 0.25,0.5,1.0,5.0,10 ppm.



ภาคผนวก ค

ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

ตารางผนวกที่ ค1 ผลการวิเคราะห์ดินเบื้องต้น

จำนวน	ความชื้น				
ตัวอย่าง	(%)	pH	% N	% OM	CEC
ตัวอย่างที่ 1	4.95	3.64	0.53	2.1	23.01
ตัวอย่างที่ 2	4.88	3.67	0.54	2.1	21.84
ตัวอย่างที่ 3	5.02	3.63	0.53	2.13	22.28
ค่าเฉลี่ย	4.93	3.65	0.53	2.11	22.373
สรุป	4.93 ± 0.048	3.64 ± 0.021	0.53 ± 0.007	2.11 ± 0.017	22.37 ± 0.586

ตารางผนวกที่ ค2 ค่าการวัดความชื้นของดินเริ่มต้น

ตัวอย่างที่	น้ำหนักดินเริ่มต้น	น้ำหนักดินหลังอบ	ความชื้นในดิน
	(g)	(g)	(%)
1	5.0092	4.7614	4.95
2	5.0068	4.7623	4.88
3	5.0010	4.7501	5.02
ค่าเฉลี่ย	5.0056	4.7586	4.93
SD	0.0027	0.0044	0.0476

ตารางผนวกที่ ค3 ผลการวัดค่าจาก Hydrometer

Soil No.	Wt. of soil (g)	40 Sec. Data				1 Hour Data			
		Hydro	Temp.	C	Corr.	Hydro	Temp.	C	Corr.
		Rdg.	°C		Rdg.	Rdg.	°C		Rdg.
1	50.00	37	28	2.88	20.24	25	3.05	3.78	57.56
2	50.00	37.00	27.00	2.52	20.96	22.00	30.40	3.74	51.49
3	50.00	38.00	31.00	3.96	16.08	25.00	30.80	3.89	57.78
Average	50.00	37.33	28.67	3.12	19.09	24.00	21.42	3.80	55.61

ตารางผนวกที่ ค4 สรุปการวิเคราะห์เนื้อดิน

Soil No.	% Sand	% Silt	% Clay	Class
1	20.24	22.2	57.56	Clay
2	20.96	28.51	51.49	Clay
3	16.08	26.14	57.78	Clay
Average	19.09	25.62	55.61	Clay

ตารางผนวกที่ ค5 ผลการวิเคราะห์ความเป็นกรดต่างของดิน

ครั้งที่	ค่าความเป็นกรดต่าง		
	ดิน:น้ำ(1:1)	ดิน:น้ำ(1:2.5)	ดิน:น้ำ(1:2)
1	3.64	3.94	3.69
2	3.67	3.94	3.84
3	3.63	3.95	3.72
ค่าเฉลี่ย	3.65	3.94	3.75

ตารางผนวกที่ ค6 ผลการวิเคราะห์ก่อนเชื้อเห็ดเบื้องต้น

ชนิดก้อนเชื้อเห็ด	ความชื้น (%)	pH	N (%)	C (%)
เห็ดสังกาวี	66.58 ± 0.589	5.21 ± 0.006	1.61 ± 0.044	50.66 ± 0.518
เห็ดเป่าฮื้อ	68.46 ± 0.157	5.44 ± 0.006	1.22 ± 0.569	52.06 ± 0.147
เห็ดหลินจือ	38.44 ± 0.682	3.98 ± 0.000	2.10 ± 0.020	51.99 ± 0.112
เห็ดนางรมภูฐาน	68.84 ± 0.384	5.18 ± 0.006	1.29 ± 0.06	50.69 ± 0.097
เห็ดหูหนู	81.37 ± 0.109	6.36 ± 0.066	1.94 ± 0.001	51.78 ± 0.295
เห็ดหอม	68.59 ± 0.306	5.32 ± 0.006	1.23 ± 0.007	51.15 ± 0.016

ตารางผนวกที่ ๑๗ ผลการทดลอง ณ วันแรกของการทดลอง สำหรับดินที่ปนเปื้อน PAHs

ชนิดก้อนเชื้อเห็ด	Enzyme activity	PAHs concentrations	อัตราการสลาย	C/N Ratio	ความชื้น	อุณหภูมิ	pH
	mU/kg	mg/kg soil	%	ส่วน	%	°C	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	130.8	110	-	33.07	46	20.4	5.4
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	87.5	110	-	36.24	52	28.5	4.5
<i>Pleurotus cystidiosus</i>	59.6	110	-	36.91	45	26.5	4.4
<i>Ganoderma lucidum</i>	48.6	110	-	28.41	49	27.6	3.8
<i>Auricularia</i> spp.	42.3	110	-	33.11	45	26.3	5.0
<i>Lentinus edodes</i>	26.7	110	-	38.49	53	25.4	4.5
Control(ดิน+Autoclave SMC)	2	110	-	33.07	54	26.4	3.68
ดินปนเปื้อน ไม่มีก้อนเชื้อ	-	110	-	27.07	43	24.4	3.68

หมายเหตุ หน่วยของอัตราการสลาย คือ % PAHs ที่ลดลงต่อสัปดาห์

ตารางผนวกที่ ค8 ผลการทดลอง ณ วันที่ 7 ของการทดลอง สำหรับดินที่ปนเปื้อน PAHs

ชนิดก้อนเชื้อเห็ด	enzyme activity	PAHs concentrations	อัตราการสลาย	C/N Ratio	ความชื้น	อุณหภูมิ	pH
	mU/kg	mg/kg soil	%	ส่วน	%	°C	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	114.8	96.5	12.27	24	40	20.4	5.3
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	67.5	98.3	10.64	23	45	28.5	4.8
<i>Pleurotus cystidiosus</i>	49.6	100.6	8.55	25	40	26.5	4.1
<i>Ganoderma lucidum</i>	38.6	103.8	5.64	24	45	27.6	3.6
<i>Auricularia</i> spp.	32.5	109.5	0.45	26	40	26.3	5.8
<i>Lentinus edodes</i>	16.4	110.6	-	23	47	25.4	4.6
Control(ดิน+Steriled SMC)	2	110	-	24	48	26.4	3.68
ดินปนเปื้อนไม่มีก้อนเชื้อ	-	110	-	25	49	20.4	3.64

หมายเหตุ หน่วยของอัตราการสลาย คือ % PAHs ที่ลดลงต่อสัปดาห์

ตารางผนวกที่ ๙ ผลการทดลอง ณ วันที่ 14 ของการทดลอง สำหรับดินที่ปนเปื้อน PAHs

ชนิดก้อนเชื้อเห็ด	enzyme activity	PAHs concentrations	อัตราการสลาย	C/N Ratio	ความชื้น	อุณหภูมิ	pH
	mU/kg	mg/kg soil	%	ส่วน	%	°C	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	107.6	52.6	45.49	24	45	27.4	4.9
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	55.1	78.3	20.35	23	46	34.2	4.3
<i>Pleurotus cystidiosus</i>	46.9	82.3	18.19	25	47	32.4	3.9
<i>Ganoderma lucidum</i>	37.5	85.1	18.02	24	45	32.6	3.5
<i>Auricularia spp.</i>	28.7	94.3	13.88	26	51	31	4.9
<i>Lentinus edodes</i>	16.2	101.6	9.77	23	45	34.2	4.5
Control(ดิน+Steriled SMC)	0	108	5.26	24	49	27.5	3.61
ดินปนเปื้อน ไม่มีก้อนเชื้อ	0	106	3.64	25	45	28.6	3.5

หมายเหตุ หน่วยของอัตราการสลาย คือ % PAHs ที่ลดลงต่อสัปดาห์

ตารางผนวกที่ ค10 ผลการทดลอง ณ วันที่ 21 ของการทดลอง สำหรับดินที่ปนเปื้อน PAHs

ชนิดก้อนเชื้อเห็ด	enzyme activity	PAHs concentrations	อัตราการสลาย	C/N Ratio	ความชื้น	อุณหภูมิ	pH
	mU/kg	mg/kg soil	%	ส่วน	%	°C	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	90	32.7	37.83	24	48	43.3	4.5
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	60.2	45.3	42.15	23	51	40.2	4
<i>Pleurotus cystidiosus</i>	45	45	45.32	25	45	45	3.7
<i>Ganoderma lucidum</i>	35.2	42.6	49.94	24	47	39.4	3.3
<i>Auricularia spp.</i>	25.3	76.3	19.09	26	45	46.3	4.5
<i>Lentinus edodes</i>	14.5	84.3	17.03	23	52	40.5	4.5
Control(ดิน+Steriled SMC)	1	98.5	8.80	24	53	27.3	3.63
ดินปนเปื้อนไม่มีก้อนเชื้อ	0	105	0.94	25	40	26.5	3.6

หมายเหตุ หน่วยของอัตราการสลาย คือ % PAHs ที่ลดลงต่อสัปดาห์

ตารางผนวกที่ ค11 ผลการทดลอง ณ วันที่ 28 ของการทดลอง สำหรับดินที่ปนเปื้อน PAHs

ชนิดก้อนเชื้อเห็ด	enzyme activity	PAHs concentrations	อัตราการสลาย	C/N Ratio	ความชื้น	อุณหภูมิ	pH
	mU/kg	mg/kg soil	%	ส่วน	%	°C	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	89.3	7.7	76.45	24	46	25.4	4.1
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	57.5	12.35	72.74	23	52	26.8	3.6
<i>Pleurotus cystidiosus</i>	45.3	21.32	52.62	25	45	23.4	3.4
<i>Ganoderma lucidum</i>	34.5	25.32	40.56	24	49	27.3	3.1
<i>Auricularia spp.</i>	24.5	45.68	40.13	26	45	24.5	4.3
<i>Lentinus edodes</i>	13.5	52.67	37.52	23	53	28.1	4.2
Control(ดิน+Steriled SMC)	0	90.2	8.43	24	54	25.4	3.59
ดินปนเปื้อนไม่มีก้อนเชื้อ	0	95.3	9.24	25	43	27.2	3.74

หมายเหตุ หน่วยของอัตราการสลาย คือ % PAHs ที่ลดลงต่อสัปดาห์

ตารางผนวกที่ ค12 การเปลี่ยนแปลงระดับอุณหภูมิในกองหมัก สำหรับดินที่ปนเปื้อนPAHs ในแต่ละชุดการทดลอง

วันที่	ระดับอุณหภูมิในกองหมัก (°C)								
	บรรยากาศ	control	Soil+ SMC	<i>P.ostreatus</i>	<i>P. sajor-caju</i>	<i>P. cystidiosus</i>	<i>G. lucidum</i>	<i>L. edodes</i>	<i>Auricularia</i> spp
1	29	29	29	29	28	28	28	25.5	25
2	28	28	28.5	28.8	27.5	27	27.3	25	26
3	29	29	29	29	28	28	28	26.5	26.5
4	28	28	28.5	28.8	27.5	27	27.3	25	26
5	26	26	30	30	29	29	29	27.5	27.5
6	29	29	31	30	29	29	29	27.5	27.5
7	30	30	32	32	33	33	33	30	30
8	25	29	28.5	28.8	27.5	27	27.3	25	26
9	26	29	29	29	28	28	28	26.5	26.5
10	27.5	32	32	32	33	33	33	30	30
11	28	35	35	35	36	35	35.5	31.5	31.5
12	30	37	37.5	37.3	40	40.5	40.3	35.5	35.5
13	27.5	41	41	41	40	39.5	39.8	39	39
14	29	29	47	47	44	44	44	40	41

ตารางผนวกที่ ค12 (ต่อ)

วันที่	ระดับอุณหภูมิในกองหมัก (°C)								
	บรรยากาศ	control	Soil+ SMC	<i>P.ostreatus</i>	<i>P. sajor-caju</i>	<i>P. cystidiosus</i>	<i>G. lucidum</i>	<i>L. edodes</i>	<i>Auricularia spp</i>
15	29	29	29	29	28	28	28	25.5	25
16	28	28	28.5	28.8	27.5	27	27.3	25	26
17	29	29	29	29	28	28	28	26.5	26.5
18	28	28	28.5	28.8	27.5	27	27.3	25	26
19	28	46	46.5	46.3	44	43.5	43.8	39	39
20	29	46	46	46	45	44.5	44.8	39	38.5
21	28	47	47	47	46	46	46	39.5	40
22	26	41	41	41	40	39.5	39.8	39	39
23	29	40	40	40	40	40	40	38	39
24	30	37	37.5	37.3	40	40.5	40.3	35.5	35.5
25	28	35	35	35	36	35	35.5	31.5	31.5
26	25	30	30	30	29	29	29	27.5	27.5
27	25	29	29	29	28	28	28	25.5	25
28	25	29	28.5	28.8	27.5	27	27.3	25	26

ตารางผนวกที่ ค13 การเปลี่ยนแปลงระดับอนุหภูมิในกองหมัก สำหรับดินที่ปนเปื้อน PAHs ในแต่ละอัตราส่วนของก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการี

วันที่	ระดับอนุหภูมิในกองหมัก ในแต่ละอัตราส่วน ดิน: ก้อนเชื้อเห็ด (°C)								
	บรรยากาศ	1:1	2:1	3:1	3:2	1:1	2:1	3:1	3:2
1	29	30	30	30	29	29	29	27.5	27.5
2	28	29	29	29	28	28	28	25.5	25
3	29	29	28.5	28.8	27.5	27	27.3	25	26
4	28	29	29	29	28	28	28	26.5	26.5
5	26	29	29	29	28	28	28	26.5	26.5
6	29	30	30	30	29	29	29	27.5	27.5
7	30	32	32	32	33	33	33	30	30
8	28	37	37.5	37.3	40	40.5	40.3	35.5	35.5
9	27.5	41	41	41	40	39.5	39.8	39	39
10	25	46	46.5	46.3	44	43.5	43.8	39	39
11	25	46	46	46	45	44.5	44.8	39	38.5
12	25	47	47	47	46	46	46	39.5	40
13	26	46	46.5	46.3	44	43.5	43.8	39	39
14	29	46	46	46	45	44.5	44.8	39	38.5

ตารางผนวกที่ ค13 (ต่อ)

วันที่	ระดับอุณหภูมิในกองหมัก ในแต่ละอัตราส่วน ดิน: ก้อนเชื้อเห็ด (°C)									
	บรรยากาศ	1:1	2:1	3:1	3:2	1:1	2:1	3:1	3:2	
15	28	46	46.5	46.3	44	43.5	43.8	39	39	
16	29	46	46	46	45	44.5	44.8	39	38.5	
17	28	47	47	47	46	46	46	39.5	40	
18	26	41	41	41	40	39.5	39.8	39	39	
19	29	40	40	40	40	40	40	38	39	
20	30	37	37.5	37.3	40	40.5	40.3	35.5	35.5	
21	28	35	35	35	36	35	35.5	31.5	31.5	
22	27.5	32	32	32	33	33	33	30	30	
23	25	30	30	30	29	29	29	27.5	27.5	
24	25	29	29	29	28	28	28	25.5	25	
25	25	29	28.5	28.8	27.5	27	27.3	25	26	
26	26	29	29	29	28	28	28	26.5	26.5	
27	25	29	28.5	28.8	27.5	27	27.3	25	26	
28	26	29	29	29	28	28	28	26.5	26.5	

ตารางผนวกที่ 14 ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะของเอนไซม์ Lac, MnP และ LiP ในก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิดหลังเก็บผลผลิตแล้ว 75 วัน

ชนิดก้อนเชื้อเห็ด	กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (U/kg soil)		
	Lac	MnP	LiP
<i>Pleurotus ostreatus</i>	5.98 ± 0.05	1.81 ± 0.24	0.62 ± 0.33
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	5.44 ± 0.02	1.40 ± 0.49	0.26 ± 0.14
<i>Pleurotus cystidiosus</i>	5.14 ± 0.02	1.15 ± 0.64	0.37 ± 0.10
<i>Ganoderma lucidum</i>	3.16 ± 0.03	1.40 ± 0.85	-
<i>Auricularia</i> spp.	1.12 ± 0.01	1.50 ± 0.24	-
<i>Lentinus edodes</i>	1.47 ± 0.02	0.38 ± 0.22	0.33 ± 0.04
Control(Soil+SMC no fungi)	-	-	-

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปของ ค่าเฉลี่ย ± กับค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- หมายถึงค่าที่วัดได้ต่ำกว่า 0.1 (U/kg soil)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวสุพัตรา ศรีพลอย
วัน เดือน ปี ที่เกิด	5 มกราคม 2527
สถานที่เกิด	อำเภอบ้านหมี่ จังหวัดลพบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยนเรศวร
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-Bioremediation of PAHs-contaminated Soil using Spent Mushroom Compost ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 7 th Eco-Energy and Material Science and Engineering Symposium -White-rot fungi enzyme spent mushroom compost to remediate soil contaminated with PAHs ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ The 2010 International Conference on Environmental Science and Development
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปี 2550 จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย -ได้รับทุนสนับสนุนโครงการส่งเสริมการวิจัยร่วมแบบทวิภาคี (Bilateral Research Cooperation, BRC) คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ประจำปี 2550 ไปทำงานวิจัยที่มหาวิทยาลัย Osaka Sangyo เมืองโอซาก้า ประเทศญี่ปุ่น -ได้รับทุนสนับสนุนการไปนำเสนอผลงานวิจัยระดับนานาชาติ (ทุนเสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่า) ประจำปี 2552 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์