ผลของภาวะการเก็บเชื้อต่อการรอดชีวิตและความสามารถในการย่อยสลายไพรีน ของกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK

นางสาวกานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF STORAGE CONDITIONS ON VIABILITY AND PYRENE DEGRADING ABILITY OF THE STK BACTERIAL CONSORTIUM INOCULUM

Miss Kanchana Sitlaothaworn

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

510062

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของภาวะการเก็บเชื้อต่อการรอดชีวิตและความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK
โดย	นางสาวกานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวนิชย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริโฉม ทุ่งเก้า)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร : ผลของภาวะการเก็บเชื้อต่อการรอดชีวิตและความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย (STK EFFECTS OF STORAGE CONDITIONS ON VIABILITY AND PYRENE DEGRADING ABILITY OF THE STK BACTERIAL CONSORTIUM INOCULUM) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. กาญจณา จันทองจีน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผศ.ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์, 88 หน้า

กลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถย่อยสลายและใช้ไพรีนซึ่งเป็นสารพิษเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ งานวิจัยนี้มุ่งที่จะเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้เพื่อใช้ในการบำบัดการปนเปื้อนของไพรีนในดิน เศษใบไม้ประกอบด้วยใบจามจุรี ใบหูกวาง ใบโพธิ์ และใบประดู่ เลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ที่แบ่งเป็นไม่เติม และเติมไพรีน 100 พีพีเอ็ม และปรับความชื้น บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ ในที่มืด เป็นเวลา 14 วัน แบ่งกล้าเชื้อที่สร้างเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ใช้กล้าเชื้อ 1.5 กรัม เก็บใส่ถุงอะลูมิเนียม ปิดถุงและทำให้ภายในเป็นสุญญากาศ แยกเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ และอุณหภูมิห้อง ส่วนที่ 2 ใช้กล้าเชื้อเดียวกัน นำไปลดความชื้นให้เป็น 40% และ 30%ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ โดยการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เก็บใส่ถุงอะลูมิเนียมและปิดถุงให้ภายในเป็นสุญญากาศ แยกเก็บที่ภาวะเดียวกับส่วนที่1 เปรียบเทียบกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ที่มี 10% ซูโครส เป็นสารป้องกันความเย็น และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ เมื่อครบเวลา 0 4 8 และ 12 เดือนนับจำนวนเชื้อ STK ที่เก็บทั้ง 2 แบบโดยทำ Viable plate count พบว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ให้การอยู่รอดชีวิตสูงกว่าที่อุณหภูมิห้อง และพบว่าการเก็บด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์มีการรอดชีวิตสูงกว่าวิธีที่เก็บด้วยการเลี้ยงกล้าเชื้อในเศษใบไม้ โดยพบว่าในเดือนที่ 8 และ 12 ของการเก็บรักษาจำนวนเซลล์ลดลง 13.3% และ17.6% ตามลำดับ และพบว่าในภาวะการเลี้ยงในเศษใบไม้ที่ความชื้น30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ใส่ไพรีน เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ มีการรอดชีวิตใกล้เคียงกับไลโอฟิไลซ์ที่สุด คือ ค่าจำนวนเซลล์ลดลงลดลง 29.3% และ 36.8% เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไพรีน 100 พีพีเอ็ม โดยเติมกล้าเชื้อในเศษใบไม้หรือในไลโอฟิไลซ์ ลงในสเลอรีดิน (ดิน : น้ำ = 1: 8) ที่ไม่ปลอดเชื้อ วิเคราะห์ปริมาณไพรีน ด้วยวิธี HPLC พบว่า กลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บโดยเลี้ยงในเศษใบไม้สามารถย่อยสลายไพรีนได้ดีกว่าการเก็บด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ โดยในเดือนที่12 ของการเก็บรักษา กลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้ที่ความชื้น 30%ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ใส่และไม่ใส่ไพรีน เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ทำให้ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ เท่ากับ และ 6.8% และ 10.5% ตามลำดับ ขณะที่การเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ด้วยวิธีไลโอฟไลซ์ทำให้ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ 11%. ติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ในช่วงเวลาของการบำบัดไพรีนในสเลอรีดินด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา..2551..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4972220523 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : MIXED LEAVES/ STK CONSORTIUM/ PYRENE

KANCHANA SITLAOTHAWORN : EFFECTS OF STORAGE CONDITIONS ON VIABILITY AND PYRENE DEGRADING ABILITY OF THE STK BACTERIAL CONSORTIUM INOCULUM. ADVISOR : ASSOC. PROF. KANCHANA JUNTONGJIN, Ph.D, CO-ADVISOR : ASST. PROF. KOBCHAI PATTARAGULWANIT, Ph.D., 88 pp.

A potent bacterial consortium STK, capable of degrading and utilizing pyrene as a carbon and energy source was preserved in sterile mixed leaves (*Samanea saman (Jacq.)Merr., Terminalia catappa L., Ficus religiosa L.* and *Pterocarpus macrocarpus Kurz.*) as an inoculum for bioremediation of pyrene contaminated soil. The STK consortium was cultivated in the sterile mixed leaves, with and without 100 ppm pyrene, with the moisture content adjusted to 70% of water holding capacity and incubated at 30°C in the dark for 14 days. This inoculum was then divided into 2 parts, the first part was put into aluminium bag, packed under vacuum condition. The second part had the moisture contents reduced to 40% or 30% of water holding capacity by freezing-dryer was then packed in aluminium bag under vacuum condition. Tthe bags were stored at 4°C or at room temperature. Lyophilization, using 10% (w / w) sucrose as a cryoprotectant, was set up to store the STK culture in order to use as standard control. After 4, 8 and 12 months of storage, the sample stored at 4°C were found to survival better than at room temperature, whilst lyophilization was also better at preserving STK viability than freeze-dried in mixed leaves since only 13.3% and 17.6% of cell number respectively decreased after 8 and 12 months of storage while the best survival of the later technique using 30% moisture content and kept at 4°C resulted 29.3% and 36.8% decrease. The pyrene degrading ability of STK stored by the two stated techniques was investigated in non-sterile soil slurry (soil:water = 1:8) contaminated with pyrene. The concentration of remaining pyrene in the soil slurry was observed by HPLC analysis. In contrast to the viability results, the pyrene degradation efficiency was higher in the freeze-dried STK in mixed leaves than in the lyophilized sample. At 12 months of storage, inoculum prepared at 30% moisture content with and without pyrene and stored at 4°C had remaining pyrene levels of 6.8% and 10.5%, respectively, whereas that of the lyophilized inoculum was 11%. DGGE profile analysis confirmed degradation of pyrene in the slurry was achieved by the STK activity.

Department	: Microbiology	Student's Signature	Kanchana Sitlaothaworn
Field of study	: Industrial Microbiology	Advisor's nature	Kanchana Juntongjin
Academic Year	: 2008	Co-Advisor's Signature	K. Pattaragulwanit

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ด้วยดี โดยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร .กาญจณา จันทองจีน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องควบถ้วนสมบูรณ์ ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านอื่นๆ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านอื่นๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริโฉม ทุ่งเก้า เป็นอย่างสูงที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คุณสุทธิรักษ์ นิยมฤทธิ์ (พี่หน่อย) ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆแก่ผู้วิจัยในขั้นตอนวิธีการดำเนินงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆแก่ผู้วิจัยในการดำเนินงานวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่างๆตลอดมา

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตรายและหน่วยปฏิบัติการวิจัยการบำบัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี ที่กรุณาสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ และพี่ๆน้องๆ ทุกคน ที่มีส่วนช่วยเหลือในหลายๆด้าน

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดาที่ล่วงลับไปแล้วที่เป็นแรงบันดาลใจ และกำลังใจในการศึกษาตลอดมา รวมถึงมารดา พี่สาวและพี่ชายที่คอยสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญรูป..... ญ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. วารสารปริทัศน์..... 5

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย..... 24

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เคมีภัณฑ์..... 26

3.1 วิธีดำเนินงานวิจัย..... 28

3.1.1 เตรียมวัสดุพาหะ (carrier materials) และดิน..... 28

3.1.2 เตรียมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพื่อเพาะเลี้ยงในเศษใบไม้..... 29

3.1.3 การเลี้ยงกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้..... 30

3.1.4 เก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในภาวะต่างๆ..... 33

3.1.5 เก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์..... 35

3.1.6 ทดสอบการรอดชีวิตของกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ทุกภาวะการเก็บรักษา เมื่อเวลาผ่านไป 0 4 8 และ 12 เดือน..... 38

3.1.7 ทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อในสเลอรีดิน..... 38

3.1.8 การวิเคราะห์ปริมาณไพรีน..... 38

3.1.9 การตรวจหาปริมาณกลุ่มแบคทีเรีย STK ด้วยวิธี viable plate count..... 39

3.1.10 ติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ในช่วงเวลาของการบำบัดด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis..... 40

4. ผลการทดลอง..... 45

4.1 ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินและเศษใบไม้ที่นำมาใช้ในการทดลอง..... 45

4.2 จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้..... 46
4.3 จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ที่ภาวะต่างๆ ก่อนและหลังผ่านกระบวนการเก็บ..... 47
4.4 ผลของการอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาในเศษใบไม้ที่ภาวะต่างๆ และวิธีไลโอฟิไลซ์ เป็นเวลา 0 4 8 และ12 เดือน..... 48
4.5 ผลของการมีและไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บต่อการอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาในเศษใบไม้เป็นเวลา 0 4 8 และ 12 เดือน..... 48
4.6 ผลของอุณหภูมิในการเก็บต่อการอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาในเศษใบไม้เป็นเวลา 0 4 8 และ 12 เดือน..... 49
4.7 ผลของความชื้นในการเก็บต่อการรอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บในเศษใบไม้เป็นเวลา 0 4 0 8 และ 12 เดือน..... 51
4.8 ผลของความสามารถในการย่อยสลายของ STK ในกล้าเชื้อที่เลี้ยงด้วยเศษใบไม้ ที่ภาวะต่างๆ เป็นเวลา 0 4 8 และ12 เดือน..... 51
4.9 ผลของภาวะการเก็บรักษากล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ที่ความชื้นต่างๆ ต่อความสามารถในการย่อยสลายไพรีน..... 52
4.10 ผลของการมีและไม่มีไพรีนในการเก็บรักษากล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ในศษใบไม้ ต่อความสามารถในการย่อยสลายไพรีน..... 55
4.11 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษากล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ในศษใบไม้ ต่อความสามารถในการย่อยสลายไพรีน..... 58
4.12 ผลของการติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ในช่วงเวลาของการบำบัดด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis..... 59
5. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง..... 62
6. ข้อเสนอแนะในการวิจัย..... 69
รายการอ้างอิง..... 70
ภาคผนวก
ภาคผนวกก..... 78
ภาคผนวก ข..... 80
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 88

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีน.....	12
ตารางที่ 2.2	ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักแบบของแข็ง (solid state fermentation process).....	18
ตารางที่ 2.3	ลักษณะโคโลนีของกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	20
ตารางที่ 4.1	ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของเศษใบไม้.....	45
ตารางที่ 4.2	ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่นำมาใช้ในการทดลอง.....	46
ตารางที่ 4.3	การรอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาในเศษใบไม้ ที่ภาวะต่างๆ และวิธีไลโอฟิไลซ์เป็นเวลา 0 8 และ12 เดือน	48
ตารางที่ 4.4	แสดงปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในสเลอรี่ดินทุกวันที่ 0 และ 10.....	53

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ 2.1	โครงสร้างสาร PAHs ทั้ง 17 ชนิด(USEPA).....	6
รูปที่ 3.1	แสดงภาพเศษใบไม้ที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านการคัดกรองกรองแล้ว.....	28
รูปที่ 3.2	แสดงภาพดินที่ใช้ในการทดลองที่บดและผ่านการคัดกรองแล้ว.....	29
รูปที่ 3.3	แสดงภาพลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีไพรีนเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับที่เวลา 0 วัน.	30
รูปที่ 3.4	แสดงภาพชุดการทดลอง กลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้.....	32
รูปที่ 3.5	ถุงฟลอยด์ และถุงอะลูมิเนียม ตามลำดับ.....	34
รูปที่ 3.6	อะลูมิเนียมหลังปิดผนึกในสภาพสุญญากาศ.....	34
รูปที่ 3.7	เครื่อง freeze dryer.....	35
รูปที่ 3.8	ระยะ primary dry แสดงการทำงานของเครื่องเซนติฟิวจ์.....	37
รูปที่ 3.9	ระยะsecondary dry.....	37
รูปที่ 4.1	จำนวนกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ ที่ภาวะต่างๆ ก่อน และหลังผ่านขบวนการเก็บ.....	47
รูปที่ 4.2	ก) และ ข) จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาในเศษใบไม้ที่ภาวะต่างๆ มีไพรีน และไม่มีไพรีนในการเก็บ เป็นเวลา 0 4 8 และ 12 เดือน.....	49
รูปที่ 4.3	การอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในภาวะต่างๆ เมื่อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ก) และ 4 °ซ (ข) เป็นเวลาที่ 0 4 8 และ 12 เดือน.....	50
รูปที่ 4.4	แผนภูมิแท่งแสดงการย่อยสลายไพรีนในสภาวะสเลอรี่อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1:8 โดย กล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ ที่มีไพรีนระหว่างการเก็บที่ 4 °ซ ปีนเวลา 0 เดือน.....	52
รูปที่ 4.5	การย่อยสลายไพรีนในสเลอรีดิน และจำนวนกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK (เก็บรักษาในภาวะ ความชื้น 30 % มีไพรีน เก็บที่ 4 °ซ เป็นเวลา 8 (ก) และ12 (ข) เดือน) เป็นเวลา 10 วัน.....	54
รูปที่ 4.6	เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในสเลอรีดิน ในวันที่ 10 ของการบ่ม เมื่อเก็บกล้าเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4°ซ โดยเก็บที่ภาวะความชื้น 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ ที่เวลา 12 เดือน.....	55
รูปที่ 4.7	เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในสเลอรีดินในวันที่ 10 ของการบ่ม เมื่อมี	

รูปที่ 4.7 เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในสเลอรีดินในวันที่ 10 ของการบ่ม เมื่อมีและไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บกล้าเชื้อ ที่ความชื้น 70% (ก) และ 30% (ข) ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ในเวลา 0 4 8 และ 12 เดือน..... 56

รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในสเลอรีดิน โดยกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้เก็บเป็นเวลา 4 เดือน (ก) 8 เดือน (ข) และ 12 เดือน (ค) ที่ภาวะความชื้น 30%ของค่าความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีน เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ และ อุณหภูมิห้อง..... 57

รูปที่ 4.9 แสดงเปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในสเลอรีดิน โดยกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ที่เก็บในภาวะความชื้น 70% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ เก็บที่ 4 °ซ และกล้าเชื้อที่เก็บด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ เมื่อเวลาผ่านไป 0 4 8 และ 12 เดือน..... 58

รูปที่ 4.10 แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rDNA แสดงพลวัตรประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองการสลายตัวของไพรีนในสเลอรีดินไม่ปลอดเชื้อ ที่ผสมกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เวลาต่างๆ โดยวิธี DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40%-70%denaturant..... 60

รูปที่ 4.11 การเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่(%) ในสเลอรีดินที่ไม่ปลอดเชื้อ ที่ได้จากการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ ที่ภาวะความชื้น 30 % ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่ 4 °ซ เวลา 8 เดือน (นำมาติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ในช่วงเวลาของการบำบัดด้วยวิธี(DGGE)..... 61

รูปที่ 4.12 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง LB ของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในการบำบัดสเลอรีดิน (อัตราส่วนดินต่อน้ำ เท่ากับ 1:8) โดยเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับเศษใบไม้ที่ภาวะความชื้น 30 % ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่ 4 °ซ เวลา 8 เดือน..... 61

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันมีการใช้สารเคมีชนิดต่างๆเพิ่มขึ้นอย่างมากมายทั้งในภาคอุตสาหกรรม การคมนาคม ด้านการเกษตร และในชีวิตประจำวัน อันเป็นผลมาจากความเจริญก้าวหน้าทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของประเทศ เมื่อผลผลิตจากเทคโนโลยีเหล่านี้ล้าหลังหรือถูกใช้จนหมดคุณค่าหรือถูกแทนที่แล้ว มักขาดการจัดการที่ถูกต้องรวมทั้งของเสียที่เกิดจากการผลิตด้วย มีการทิ้งออกสู่สิ่งแวดล้อมทำให้เกิดการสะสมของของเสียจากแหล่งต่างๆ หากของเสียดังกล่าวเป็นของเสียที่อันตรายมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต มีการสะสมในปริมาณที่มากจนสามารถก่อพิษในสิ่งมีชีวิตได้ รวมถึงเกิดความล้าช้าในการจัดการและการกำจัดของเสียที่อันตรายเหล่านี้อย่างถูกต้อง ผลที่ตามมาก็คือ เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษ

ควันจากท่อไอเสีย ควันไฟ ก๊าซจากโรงงานอุตสาหกรรม ไฟป่า การเผาไร่นา น้ำทิ้งจากแหล่งชุมชน น้ำทิ้งจากโรงงานอุสาหกรรม การฝังกลบและการเผาขยะ และการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ เป็นต้น สิ่งเหล่านี้ล้วนแล้วก่อให้เกิดผลกระทบและอันตรายต่อคุณภาพอากาศ น้ำ ดิน และสุขภาพของมนุษย์ที่อาศัยอยู่บริเวณนั้นๆ ดังนั้นการจัดการกับของเสียอันตรายที่เกิดขึ้นเหล่านี้จึงควรได้รับการบำบัดอย่างเร่งด่วน เพื่อป้องกันผลกระทบที่ร้ายแรงต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตในอนาคต

ไพรีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) มีสมบัติละลายน้ำยาก ทำให้มีความทนทานต่อการย่อยสลาย (Trzesicka-Mlynarz และ Ward,1996) สารประกอบPAHs มีความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน เรื้อรังต่อสิ่งมีชีวิต และบางชนิดเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogens) ก่อการกลายพันธุ์ (mutagens) (Wilson และ Jones , 1993) การบำบัดโดยวิธีทางชีวภาพ หรือ bioremediation เป็นทางเลือกหนึ่งในการช่วยลดความเป็นพิษของ สารประกอบ PAHs และกากของเสียอันตรายอื่นๆ โดยการย่อยสลายสารพิษด้วยจุลินทรีย์ ซึ่ง สารประกอบ PAHs บางชนิดจะถูกย่อยสลายโดยสมบูรณ์ (mineralization) จนได้คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ และพลังงานที่จุลินทรีย์นำไปใช้ในการเจริญเติบโต การบำบัดโดยวิธีทางชีวภาพเป็นการบำบัดที่มีประสิทธิภาพ ประหยัด และทำได้ง่าย วิธีที่ช่วยให้การบำบัดทางชีวภาพมีประสิทธิภาพ คือ การกระตุ้นให้จุลินทรีย์ท้องถิ่นในบริเวณที่มี

การปนเปื้อน ทำงานและเพิ่มกิจกรรมในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในบริเวณนั้นได้ดี (biostimulation) ทำได้โดยการเติมสารอาหารลงไป เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือสารอินทรีย์อื่น และปรับภาวะให้เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ย่อย และอีกวิธีคือ การเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่นที่มีสมบัติย่อยสลายสารประกอบ PAHs ลงในบริเวณที่ปนเปื้อน (bioaugmentation) เพื่อให้เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพ แต่จุลินทรีย์ต่างถิ่นมักอยู่รอดได้น้อย เนื่องจากเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นไม่ได้ (Wilson และ Jones, 1993)

ในการบำบัดสารประกอบ PAHs ที่ปนเปื้อนในดินโดยวิธีทางชีวภาพต้องอาศัยระยะเวลาในการบำบัด เนื่องจากสารประกอบ PAHs มีสมบัติไฮโดรโฟบิกทำให้การละลายน้ำต่ำ รวมทั้งสามารถจับและแทรกตัวอยู่ภายในช่องว่างของอนุภาคดินได้ดี ดังนั้นสมบัติไฮโดรโฟบิกของผิวเซลล์ของจุลินทรีย์จึงมีผลต่อการยึดเกาะระหว่างเซลล์กับสารประกอบ PAHs (Van Loosdrecht และคณะ, 1987) จำนวนของจุลินทรีย์จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเติมลงในดินธรรมชาติ เนื่องจากยังไม่คุ้นเคยกับสภาพดินธรรมชาติ จึงได้มีผู้ทดลองใช้วัสดุพาหะบางชนิดเป็นแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์เกาะติดอยู่กับวัสดุนั้นและสามารถใช้สารอินทรีย์จากวัสดุพาหะเหล่านั้นในการเจริญ ทำให้จุลินทรีย์สามารถอยู่รอดและเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปในดินปนเปื้อนได้ (Van Veen และคณะ, 1997) จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จึงมีความสำคัญต่อการบำบัดสารประกอบ PAHs ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ เป็นต้น การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs เหล่านี้ให้คงประสิทธิภาพจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นทั้งในด้านงานวิจัย และงานบำบัดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

การเก็บรักษาจุลินทรีย์มีวัตถุประสงค์เพื่อรักษาความมีชีวิตของจุลินทรีย์เอาไว้ ในสภาพบริสุทธิ์ไม่มีจุลินทรีย์อื่นๆมาปนเปื้อนและต้องคงความสามารถให้เหมือนเดิมทุกประการ วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์นั้นแตกต่างกันตั้งแต่ง่ายจนถึงวิธีที่ยุ่งยาก ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง รวมทั้งสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและแรงงาน ประสิทธิภาพของวิธีการเก็บจุลินทรีย์แตกต่างกันไป ดังนั้นการที่จะเลือกใช้วิธีใดในการเก็บรักษาจุลินทรีย์นั้นควรคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ให้เหมาะสมสอดคล้องกับจุดประสงค์ในการใช้จุลินทรีย์ วิธีการเก็บรักษาต่างๆ มีผลต่อการมีชีวิตของจุลินทรีย์ซึ่งจะมีโอกาสตายไปในระหว่างกระบวนการเก็บ (preservation process) และในช่วงการเก็บ (storage) จึงควรเลือกวิธีที่ทำให้จุลินทรีย์ที่มีชีวิต (viable cell) เหลืออยู่จำนวนมากใกล้เคียงกับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในตอนเริ่มต้น เพื่อขจัดปัญหาการเปลี่ยนแปลงลักษณะ (characteristics) บางอย่างของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการเพื่อคงความอยู่รอดของจุลินทรีย์เอาไว้ (สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, 2539)

ปัจจุบันมีวิธีการเก็บจุลินทรีย์ไว้เป็นสต๊อคแบบง่าย แต่ก็มีข้อบกพร่อง เช่น การต่อเชื้อ (subculture) ซึ่งมีโอกาสปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นได้ง่าย มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะบางอย่างทำให้จุลินทรีย์นั้น ๆ ไม่สามารถคงลักษณะเดิมไว้ได้ โอกาสที่เกิดจะมีมากขึ้นตามความถี่ในการย้ายเชื้อ (สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ , 2539) วิธีทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) ซึ่งเป็นวิธีที่ยอมรับว่ามีประสิทธิภาพในการเก็บ รา ยีสต์ แบคทีเรีย สามารถเก็บจุลินทรีย์ได้ครั้งละมากๆ สามารถคงความมีชีวิตของจุลินทรีย์ได้ยาวนานถึง 50 ปีหรือมากกว่านี้ สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และให้ผลคุ้มค่าหากจุลินทรีย์นั้นเป็นจุลินทรีย์ที่จัดว่ามีคุณค่ามาก หรือจำเป็นต้องให้บริการแจกจ่ายจุลินทรีย์ให้หน่วยงานอื่นๆ ที่ห่างไกลออกไป แต่เป็นวิธีที่ค่อนข้างยากและใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง

มีปัจจัยหลายอย่างที่มีอิทธิพลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียหลังทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เช่น ชนิดของแบคทีเรีย สารป้องกันความเย็น (cryoprotectants) ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น อัตราการทำให้แข็ง (freezing rate) และการเก็บหลังกระบวนการ เป็นต้น (Asa และคณะ, 2006)

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเซลล์เริ่มต้นสำหรับทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง ควรมากกว่า 10^8 เซลล์ ต่อ มล. เนื่องจากเซลล์จำนวนมากตายระหว่างการเก็บ Costa และคณะ (2000) พบว่าความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น สัมพันธ์กับสารป้องกันความเย็นที่ใช้ในการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เมื่อใช้ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 10^{10} เซลล์ ต่อ มล. ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ Miyamoto-Shinohara และคณะ (2000) พบว่า แบคทีเรียแกรมลบมีความสามารถอยู่รอดต่ำกว่า แบคทีเรียแกรมบวก

Costa และคณะ (2002) เปรียบเทียบระหว่าง glass vial ถุงพลาสติกแบบบาง และถุงพลาสติกแบบหนาที่ใช้ในการเก็บรักษา *Pantoea agglomerans* พบว่าถุงพลาสติกแบบหนาจะให้การเก็บที่ดีกว่าถุงพลาสติกแบบบาง เนื่องจากถุงพลาสติกแบบบางจะมีระดับออกซิเจนและความชื้นที่ผ่านเข้ามาสูงกว่า

Bozoglu และคณะ (1987) เปรียบเทียบความสามารถในการมีชีวิตของ *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* ที่เก็บในแก๊สไนโตรเจน และภายใต้สุญญากาศ พบว่าการเก็บใน glass vial ที่ถูกปิดผนึกให้ภายในเป็นสุญญากาศ หรือ ในแก๊สไนโตรเจน ให้ผลดีกว่าเก็บในภาวะที่มีอากาศ

การลดความชื้นเหลือ 25%-30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ และกำจัดอากาศออกระหว่างการเก็บ เป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยลดอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากน้ำและอากาศเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อกิจกรรมของอัตราเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ นอกจากนี้อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บยังมีผล

ต่อการยืดระยะเวลาการเก็บ Trivedi และคณะ (2005) ศึกษาการสร้างกล้าเชื้อของแบคทีเรียสองชนิด คือ *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas corrugata* ที่ตรึงอยู่บนวัสดุพาหะ และเก็บภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าจำนวนของเซลล์ที่เก็บที่อุณหภูมิห้องลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับที่เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส จะยับยั้งการแบ่งตัวและกิจกรรมต่างๆภายในเซลล์แบคทีเรีย เป็นผลให้ลดการใช้สารอาหาร (Van Shrevan, 1970)

ทิมากร แสงดำ (2547) ได้คัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่มีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิกสูงจากปุ๋ยหมักใบมะขาม โดยใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน พบว่ามีประสิทธิภาพสูงมากในการย่อยสลายไพรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในห้องปฏิบัติการ กลุ่มแบคทีเรียนี้ประกอบด้วย 3 สายพันธุ์ คือ *Zoogloea* sp. *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. ดังนั้น การเพิ่มการอยู่รอดและการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK เพื่อใช้ในการบำบัดสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อมจึงเป็นสิ่งที่ควรศึกษาต่อไป

วิธัญญา ชวเจริญพันธ์ (2549) ศึกษาการสร้างกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในวัสดุพาหะที่จะเติมลงในดินเพื่อทำให้แบคทีเรียคุ้นเคย และสามารถมีชีวิตรอดขณะที่ใช้บำบัดในดินที่ปนเปื้อนไพรีน พบว่าสามารถเก็บรักษากล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับเศษใบไม้ด้วยการบ่มเป็นเวลา 6 เดือน โดยยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนได้

ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ โดยหาวิธีเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษาให้นานมากขึ้น โดยกำจัดอากาศและลดความชื้นระหว่างการเก็บ และใช้ต้นทุนในการเก็บรักษาต่ำ โดยเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ซึ่งเป็นวิธีที่เชื่อว่าสามารถเก็บรักษาแบคทีเรียได้เป็นระยะเวลานาน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาผลกระทบของการเก็บเชื้อในภาวะต่างๆต่อการรอดชีวิต และความสามารถในการย่อยสลายไพรีนในดิน ของกลุ่มแบคทีเรีย STK

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK เป็นระยะเวลานาน ต้นทุนต่ำ และยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีน

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

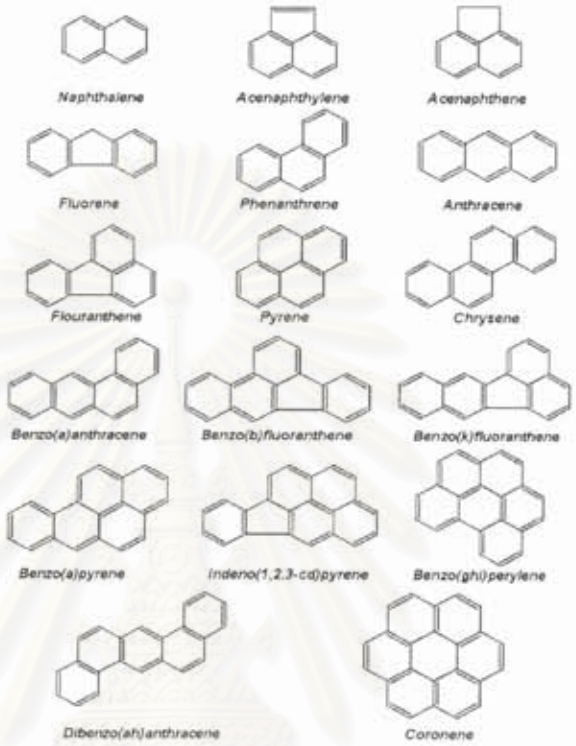
สารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกลุ่มหนึ่งที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม มีความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน และเรื้อรังต่อสิ่งมีชีวิต และบางชนิดเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogens) ก่อการกลายพันธุ์ (mutagens) (Wilson และ Jones , 1993) สาเหตุของการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs เกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารพวกไฮโดรคาร์บอน อาจเกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ตามธรรมชาติ เช่น การเกิดไฟป่า ภูเขาไฟระเบิด การรั่วซึมของน้ำมันที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ เช่น โรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการรักษาเนื้อไม้และครีเอโซท กระบวนการกลั่นน้ำมันปิโตรเลียม น้ำทิ้งจากโรงงานกลั่นน้ำมัน น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ควันจากท่อไอเสียรถยนต์ การปรุงอาหารโดยการผัด ทอด ปิ้งย่าง โดยใช้ความร้อนสูง เป็นต้น จากสมบัติความเป็นพิษดังกล่าวนี้ทำให้ The United States Environmental Protection Agency (USEPA) ได้กำหนดให้สารประกอบ PAHs อยู่ในกลุ่มของสารก่อมลพิษลำดับต้น (priority pollutants) ที่ต้องเฝ้าระวังและหาหนทางทั้งวิธีทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีววิทยาเพื่อที่จะกำจัดออกไปจากสิ่งแวดล้อม

สมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสารประกอบ PAHs

เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีคาร์บอนและไฮโดรเจนเรียงตัวเป็นวงเบนซีนมาเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง มุมงอ หรือเป็นกลุ่มตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สารประกอบ PAHs มีสมบัติละลายน้ำยาก และการละลายน้ำจะลดลงเมื่อน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น ทำให้มีความทนทานต่อการย่อยสลาย (Trzesicka-Mlynarz และ Ward , 1996) สารประกอบ PAHs มี 2 พวก คือ สารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight PAHs) จะประกอบด้วยวงเบนซีน 2-3 วง เป็นสารที่ระเหย ละลาย ย่อยสลายได้ง่ายกว่าพวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น แนฟทาลีน, ฟีแนนทรีน, อะซีแนฟทีน, ฟลูออรีน และ
แอนทราซีน (Wade, 1999)

อีกพวกคือ สารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight PAHs) จะประกอบด้วยวงเบนซีน 4 วงขึ้นไป เช่น ไพรีน, เบนโซ(เอ)ไพรีน, ไดเบนโซไพรีน (Wade, 1999)

สารประกอบ PAHs ประเภทนี้ถูกดูดซับในดินและตะกอนต่างๆได้ดีมากและทนต่อการย่อยสลายด้วยจุลชีพ ดังนั้นจึงพบสารประเภทนี้ในสิ่งแวดล้อมได้มากกว่า



รูปที่ 2.1 **โครงสร้างสารประกอบ** PAHs **ทั้ง** 17 **ชนิด** (USEPA)
(www.hearnas.sk/pops/pict6.JPG.)

ไพรีน (pyrene)

ไพรีนจัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน มีชื่อเรียกทางเคมีว่า เบนโซ[ดี, อี, เอฟ]ฟีแนนทรีน (benzo[d, e, f]phenanthrene) โครงสร้างทางเคมีของไพรีนเกิดจากวงเบนซีน 4 วงเชื่อมต่อกัน

สมบัติทางเคมีกายภาพ

สูตรโมเลกุล	$C_{16}H_{10}$
น้ำหนักโมเลกุล	202.3
ลักษณะปรากฏ	ผลึกสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน
อุณหภูมิหลอมเหลว	56 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิการกลายเป็นไอ	393 - 404 องศาเซลเซียส
ความหนาแน่นที่ 14 องศาเซลเซียส	1.271กรัมต่อ ตร.ซม.

ความถ่วงจำเพาะที่ 23 องศาเซลเซียส	1.271
การละลาย	
ในน้ำ	0.77 กรัมต่อลิตร ที่ 25 องศาเซลเซียส
ในตัวทำละลาย	เบนซีน ไดเอทธิลอีเทอร์ อีเทอร์ ปิโตรเลียมอีเทอร์ โทลูอีน เอทธานอล คาร์บอนไดซัลไฟด์
สัมประสิทธิ์แบ่งการละลาย	
Log K_{ow}	4.88
Log K_{ow}	4.58
ความดันไอที่ 25 องศาเซลเซียส	2.5×10^{-6} มม.ปรอท

ความเป็นพิษของไพรีน

หน่วยงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกาไม่ระบุให้ไพรีนเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ แต่สามารถทำให้เกิดการระคายเคืองผิวหนังบริเวณที่สัมผัสกับสารโดยตรง (skin irritant) มีรายงานถึง ผู้หญิงตั้งครรภ์ที่สูบบุหรี่ หรือได้รับควันบุหรี่เป็นเวลานาน จะส่งผลต่อเด็กทารกโดยผ่านทางการให้นม ทำให้เด็กเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (mutation) (Zanieri และคณะ, 2007) ส่วนในสัตว์ Kochevar และคณะ (1982) พบว่าไพรีนทำให้เกิดอาการแพ้แสงของผิวหนังอย่างรุนแรงในหนูตะเภา มีบางรายงานพบว่าการป้อนไพรีนให้หนู mice ทำให้เกิดความผิดปกติของเลือด น้ำหนักไตลด น้ำหนักตับเพิ่ม และท่อกรวยไตเสื่อมสภาพ (Randerath และคณะ, 1997) นอกจากนี้ Faust และคณะ (1998) พบว่าไพรีนสามารถกระตุ้นเบนโซ(เอ)ไพรีนให้ก่อมะเร็งได้

การปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs ในดิน

สาเหตุการปนเปื้อนสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อม เกิดจากกระบวนการสันดาปที่ไม่สมบูรณ์ของน้ำมันเชื้อเพลิง โดยสารประกอบ PAHs กระจายตัวอยู่ในอากาศ ซึ่งสามารถรวมตัวกับฝุ่นละออง เขม่าควัน และสะสมอยู่ในอนุภาคดิน โดยเฉพาะบริเวณที่มีการจารจรหนาแน่น และย่านอุตสาหกรรม

ดินเป็นแหล่งที่อยู่ของสิ่งมีชีวิต และเป็นที่รองรับของเสีย สิ่งปฏิกูลต่างๆจากสิ่งมีชีวิต ดินจึงมีความซับซ้อน และหลากหลายทางด้านปัจจัยทางเคมีและกายภาพ ซึ่งมีผลต่อการนำสารประกอบอินทรีย์ที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิกไปใช้ประโยชน์โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน (Straube

และคณะ, 1999) การปนเปื้อนสารประกอบ PAHs หรือสารประกอบอินทรีย์ในดินมีรูปแบบการอยู่ร่วมกันภายในอนุภาคดินหรือฮิวมัสที่แตกต่างกันออกไป การปนเปื้อนในอนุภาคดินอาจเกิดจากสมบัติทางกายภาพ เช่น ส่วนที่เป็นของแข็งปะปนในอนุภาคดินหรือการที่อนุภาคดินถูกเคลือบด้วยของเหลว หรือดูดซับอยู่กับอนุภาคดิน ซึ่งสารปนเปื้อนจะสามารถถูกชะออกจากอนุภาคดินได้ง่ายโดยอาศัยตัวทำละลายอินทรีย์ หากมีการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs ในดินเป็นเวลานาน ดินจะสามารถดูดซับสารปนเปื้อนนั้นไว้ โดยการดูดซึมและแทรกอยู่ระหว่างชั้นน้ำตามช่องว่างภายในอนุภาคดิน ทำให้สารปนเปื้อนถูกชะละลายออกมาได้น้อย และหากสารปนเปื้อนจับกับอนุภาคดินโดยอาศัยพันธะทางเคมี จะทำให้สารถูกชะออกมาได้ยากยิ่งขึ้น เนื่องจากอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้าง สมบัติทางเคมีของโมเลกุลสาร ทำให้สารอยู่ในรูป bound residue หรืออาจเกิดจากสารประกอบหรือสารที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายรวมตัวกับสารที่เกิดจากกระบวนการภายในดิน โดยกระบวนการทางเคมีกายภาพภายในดิน ซึ่ง bound residue ที่เกิดขึ้นนี้ ทำให้จุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตในดินนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยกว่าในรูปแบบอื่นๆ (Verstraete และ Devliegher, 1996) แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs มีผลต่อการบำบัดสารประกอบ PAHs โดยวิธีทางชีวภาพ

Kastner และคณะ (1999) สรุปสาเหตุการเกิด bound residue ไว้ดังนี้

1. สารเมแทบอไลท์ที่เกิดจากการย่อยสลายจะถูกออกซิไดซ์ และเข้ารวมตัวกับสารประกอบฟีนอลิก เกิดเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่คล้ายกับกรดฮิวมิกในดิน
2. คาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากการย่อยสลายสารประกอบ PAHs อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดินอาจถูกตรึงอยู่ในอนุภาคดิน
3. สารประกอบ PAHs ที่ปนเปื้อนตั้งแต่เริ่มต้นจะเกาะติดอยู่ในอนุภาคดิน

สารประกอบPAHs ส่วนใหญ่สามารถดูดซับกับอินทรีย์วัตถุที่อยู่ในดิน ทำให้สารประกอบ PAHs ไม่ถูกย่อยสลายโดยขบวนการทางชีวภาพ การดูดซับระหว่างสารประกอบ PAHs และอินทรีย์วัตถุจะเพิ่มขึ้นเมื่อวงอะโรมาติกของโมเลกุลสารประกอบ PAHs มีจำนวนมากขึ้น ทำให้โมเลกุลดังกล่าวมีสมบัติไลโปโฟบิกเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ความสามารถในการถูกย่อยสลายและสกัดสารประกอบ PAHs ออกจากอินทรีย์วัตถุในดินเกิดยากขึ้น สารประกอบ PAHs จึงมีโอกาสสัมผัสกับอนุภาคดินได้นานขึ้น โดยสารประกอบ PAHs จะแพร่เข้าสู่อินทรีย์วัตถุอย่างช้าๆ และทำให้ถูกดูดซับกับอนุภาคดินได้แน่นขึ้น อาจเกิด bound residue และเกิดการตรึงสารประกอบ PAHs ภายในรูพรุนขนาดเล็กของอนุภาคดิน หรืออินทรีย์วัตถุได้ ซึ่งเป็นเหตุผลที่ทำให้สารประกอบ PAHs ถูกสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน (Wiessenfels และคณะ, 1992 ; Lundstedt,

2003) เมื่อไพรีนและสารประกอบ PAHs เข้าสู่สิ่งแวดล้อมอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการต่างๆ ทั้งทางด้านเคมีและกายภาพ ได้แก่ การระเหยกลายเป็นไอ การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของแสง การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทางเคมี การสะสมสารอยู่ภายในสิ่งมีชีวิต หรือการดูดซับโดยอนุภาคของดินเป็นต้น (Cernigia, 1992) ซึ่งสมบัติของดินที่แตกต่างกันเป็นปัจจัยสำคัญในการบำบัดสาร สารประกอบ PAHs ที่ปนเปื้อนในดินด้วยวิธีทางชีวภาพ สมบัติดังกล่าวได้แก่ องค์ประกอบของอินทรีย์วัตถุในดิน โครงสร้างและอนุภาคของดิน ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อมและอัตราการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ (Wilson และ Jones, 1993)

Bollag และคณะ (1998) กล่าวว่าการย่อยสลายสารอินทรีย์สังเคราะห์โดยจุลินทรีย์จะได้สารเมตาโบไลท์ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับกรดฮิวมิก (humic acid) และสามารถจับกับอินทรีย์วัตถุที่มีอยู่ในดินได้ดีกว่าสารตั้งต้นเดิม การดูดซับระหว่างสารอินทรีย์สังเคราะห์กับอินทรีย์วัตถุในดินทำให้แบคทีเรียไม่สามารถนำสารดังกล่าวไปใช้ได้ (Ressler และคณะ, 1999)

Nieman และคณะ (1998) รายงานว่าไพรีนและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนรูปของไพรีน จะรวมตัวกับอนุภาคของสารอินทรีย์เกิดกระบวนการสร้างสารฮิวมิกในดิน ทำให้ไพรีนถูกดูดซับไว้ในดิน และจุลินทรีย์ย่อยสลายได้ยากขึ้น นอกจากจะคำนึงถึงชนิดและความสามารถของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการบำบัด ยังต้องคำนึงถึงระยะเวลาที่ไพรีนอยู่ในแหล่งปนเปื้อนนั้นด้วย เพราะหากปล่อยไว้นานก็จะทำให้การบำบัดยากขึ้น เนื่องจากไพรีนจะจับกับอนุภาคอินทรีย์วัตถุในดินด้วยพันธะโควาเลนซ์ได้แน่นยิ่งขึ้นตามเวลา ทำให้สกัดออกมาได้ยากและถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ได้น้อยลง เพราะโอกาสที่จุลินทรีย์สัมผัสกับไพรีนลดลงตามเวลา ยังรวมถึงสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนด้วยเช่นกัน (Gothrie และ Pfeaender, 1998)

การบำบัดไพรีน และสารประกอบ PAHs อื่นในสิ่งแวดล้อม

เมื่อไพรีน และสารประกอบ PAHs เข้าสู่สิ่งแวดล้อม มักจะสะสมอยู่ในดิน ตะกอนดิน น้ำ ฝุ่นละอองพืช และอากาศ โดยจะเกาะติดอยู่ในอนุภาคดิน ตะกอนดิน หรือฝุ่น ซึ่งสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้โดยกระบวนการต่างๆ ทั้งทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ แม้ว่าการบำบัดสารประกอบ PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยทางเคมีและทางกายภาพจะถูกนำมาใช้ แต่วิธีนี้ก็ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ (Samanta และคณะ, 2002)

การนำวิธีการบำบัดสิ่งแวดล้อมทางชีวภาพ โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตที่มีอยู่ในธรรมชาติ หรือมีการตกแต่งพันธุกรรมแล้ว เพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารอินทรีย์อันตรายที่ปนเปื้อนให้มีระดับความเป็นพิษน้อยลงหรือหมดไป โดยจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตจะสามารถใช้สาร

ปนเปื้อนเป็นแหล่งอาหาร คาร์บอน และพลังงาน สำหรับใช้ในการเจริญเติบโตและดำรงชีวิต (Maria, 1999 ; Dua และคณะ, 2002)

เทคโนโลยีในการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพในปัจจุบันมีหลายวิธีดังต่อไปนี้ (Trejo และ Quintero, 2000)

Bioaugmentation เป็นวิธีที่มีการเติมจุลินทรีย์ที่ทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษลงไปในบริเวณที่มีการปนเปื้อน

Biostimulation เป็นวิธีที่มีการเติมสารอาหารหรือปัจจัยต่างๆที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ลงไปในบริเวณที่มีการปนเปื้อน เพื่อกระตุ้นให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นมีการเพิ่มจำนวนและมีกิจกรรมในการย่อยสลายสารพิษได้ดีขึ้น

Biofilters เป็นวิธีที่มีการใช้คอลัมน์ยาวที่มีจุลินทรีย์อยู่ภายในเพื่อบำบัดสารปนเปื้อนที่กระจายออกสู่บรรยากาศ

Bioreactor เป็นวิธีการย่อยสลายในถังหมัก

Bioventing เป็นวิธีการบำบัดแหล่งที่ปนเปื้อนโดยมีการให้อากาศและให้สารอาหารเพื่อกระตุ้นการเจริญและกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ประจำถิ่น

Composting เป็นวิธีการบำบัดโดยใช้ออกซิเจนและอุณหภูมิสูงร่วมกับการเติมปุ๋ยหมักหรือวัสดุทางการเกษตรเพื่อเป็นวัสดุค้ำจุนการเจริญของจุลินทรีย์

Landfarming เป็นวิธีการบำบัดแหล่งที่มีการปนเปื้อนโดยการขุดดินหรือปั๊มน้ำขึ้นมาแล้วปล่อยให้มีการย่อยสลายของจุลินทรีย์แบบใช้อากาศ (aerobic)

วิธีการบำบัดทางชีวภาพอาจทำโดยวิธี Biostimulation ซึ่งเป็นวิธีกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่น (indigenous microorganism) หรือเหนี่ยวนำจุลินทรีย์บริเวณนั้นให้มีประสิทธิภาพและเพิ่มกิจกรรมในการย่อยสลายสารปนเปื้อนหรือลดความเป็นพิษในบริเวณนั้นได้สูงขึ้น โดยการเติมวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร มูลสัตว์ สารอาหารลงไปในดิน เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปรแตสเซียม เป็นต้น การเติมวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร หรือมูลสัตว์เป็นการเพิ่มปริมาณสารอาหารและปริมาณออกซิเจน ทำให้เกิดการถ่ายเทอากาศ ปรับภาวะให้เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตบริเวณนั้น อีกทั้งยังลดความสามารถของสารประกอบ PAHs ในการเข้าจับกับอนุภาคดิน ทำให้สารประกอบ PAHs เคลื่อนที่แทรกเข้าสู่อนุภาคดินได้ช้าลง จุลินทรีย์จึงนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างรวดเร็ว (Kaster และ Mahro, 1996)

Charoenchang และคณะ (2003) พบว่า การเติมวัสดุทางการเกษตร ได้แก่ เปลือกถั่วลิสง ใบจามจุรี สามารถช่วยเร่งการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยลด

ปริมาณไพรีนจนตรวจไม่พบภายในเวลา 42 วันของการทดลอง ซึ่งคาดว่าเกิดจากการทำงานของแบคทีเรียที่อยู่บนวัสดุทางการเกษตรดังกล่าว

สุพินดา ศิริวราศิลป์ (2545) ใช้ใบไม้ของพืชตะกูลถั่วที่ร่วงหล่น (ใบจามจุรี ใบมะขาม และใบนนทรี) เติมในดินที่ถูกปนเปื้อนด้วยไพรีน พบว่าใบมะขามสามารถลดไพรีนได้หมด ภายใน 56 วัน รองลงมาคือ ใบจามจุรี และใบนนทรี และเมื่อปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการย่อยสลาย พบว่าการย่อยสลายไพรีนเพิ่มจาก 75% เป็น 93% อาจสรุปได้ว่าการลดของไพรีน และสารประกอบ PAHs ที่ปนเปื้อนในดินเกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ที่อยู่บนใบพืชที่เติมลงไป

อีกวิธีหนึ่งที่ช่วยส่งเสริม และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม คือ การเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่น (exogenous microorganism) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายหรือเปลี่ยนโครงสร้างสารพิษ ลงในบริเวณที่มีการปนเปื้อนหรือเรียกว่า Bioaugmentation วิธีการนี้มีปัจจัยข้อจำกัดที่ควรคำนึงถึง ได้แก่ เกิดภาวะแข่งขันระหว่างจุลินทรีย์ต่างถิ่นกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น และจุลินทรีย์ที่เติมลงไปต้องปรับตัวให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมในดินบริเวณที่ปนเปื้อน ดังนั้นจุลินทรีย์ต่างถิ่นจะต้องสามารถเพิ่มจำนวนและอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ (Vidali, 2001) วิธีการบำบัดทางชีวภาพนี้เป็นกระบวนการทางธรรมชาติที่ไม่เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้พื้นที่ดังกล่าวเกิดความเสียหายน้อยที่สุด สามารถกำจัดพิษได้อย่างถาวร และค่าใช้จ่ายต่ำว่าวิธีการบำบัดอื่นๆ (Korda และคณะ, 1997) แต่วิธีนี้ก็มีข้อจำกัดที่อาจจะส่งผลต่อประสิทธิภาพของการย่อยสลายโดยสิ่งมีชีวิตนั้นๆ จึงต้องคำนึงถึงปัจจัยแวดล้อมหลายประการ เช่น ชนิดและสมบัติของสารปนเปื้อน อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ปริมาณออกซิเจนที่สามารถนำไปใช้ได้ ความชื้น สารอาหาร เป็นต้น

การย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรีย

แบคทีเรียบริสุทธิ์

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมา มีการคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่ย่อยสลายสารประกอบ PAHs จากตัวอย่างดิน น้ำหรือตะกอนดินในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนสารประกอบในกลุ่มนี้ โดยพบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่มีทั้งกลุ่มที่เป็นแกรมบวก เช่น *Mycobacterium* sp. *Norcardia* sp. และกลุ่มที่เป็นแกรมลบ เช่น *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp. เป็นต้น ตัวอย่างแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายไพรีนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน (mineralization) แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีน

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

ผลที่ได้จากการย่อยสลายไพรีนที่สมบูรณ์โดยแบคทีเรียบริสุทธิ์ ได้แก่ มวลชีวภาพ น้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ (Cerniglia, 1992 ; Wilson และJones, 1993) การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อย แบคทีเรียทั่วไปจะสามารถย่อยสลายสารนี้ได้ยาก แบคทีเรียบางกลุ่มสามารถผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ส่วนใหญ่พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ กลไกนำสารประอบ PAHs เกิดขึ้นโดยการเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารโดยการสัมผัสโดยตรงกับผลึกสารประกอบ PAHs แบคทีเรียบางชนิดสามารถ

สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มการละลายน้ำของสารประกอบ PAHs จึงทำให้แบคทีเรียเข้าสัมผัสกับสารประกอบ PAHs ได้ง่าย แบคทีเรียสามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้หลายชนิด เนื่องจากออกซิจีเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสับสเตรตได้หลายชนิด (broad specificity enzyme) ซึ่งถือว่าเป็นลักษณะที่ดีเพราะในสิ่งแวดล้อมมีการปนเปื้อนสารประกอบ PAHs หลายชนิด (Baver และ Capone, 1998; Stringfellow และ Aitken, 1995)

ในบางครั้งพบว่าการทำงานของแบคทีเรียบริสุทธิ์ไม่สามารถใช้ไพรีนหรือสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงได้โดยตรง อาจต้องอาศัยสับสเตรตร่วม (co-substrate) เป็นสารตั้งต้นให้เกิดการย่อยสลายและ/หรือใช้ในการเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย หรือช่วยการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาก่อน เพื่อให้เกิดการย่อยสลายแบบโคเมแทบอลิซึม (co-metabolism) โดยเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างของสารประกอบ PAHs บางส่วน ซึ่งแบคทีเรียไม่สามารถใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เมื่อในระบบมีสับสเตรตร่วมจึงมีการเปลี่ยนโครงสร้างของสารประกอบ PAHs ต่อไป (Cerniglia, 1992)

สารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีความเสถียรสูงทำให้ยากต่อการย่อยสลาย ดังนั้นแบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์เดี่ยวส่วนใหญ่ไม่สามารถย่อยสลายสารดังกล่าวได้สมบูรณ์ การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีโมเลกุลซับซ้อนนั้นต้องอาศัยกระบวนการย่อยสลายแบบโคเมแทบอลิซึมหรืออาศัยการย่อยสลายโดยกลุ่มจุลินทรีย์ (Wilson และ Jones, 1993)

กลุ่มแบคทีเรีย (consortium)

โดยทั่วไปสารประกอบ PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมมีด้วยกันหลายชนิด ในบางกรณีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จึงจำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียหลายๆชนิด แบคทีเรียเหล่านั้นจะอยู่ด้วยกันแบบ synergism โดยปกติสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะถูกย่อยสลายได้ยากโดยแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว การย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรียจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ให้ดียิ่งขึ้น ทำให้อัตราเร็วในการย่อยสลายเพิ่มขึ้น ที่สำคัญยังทำให้เกิดการย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) ความสัมพันธ์หรือกลไกที่เกิดขึ้นระหว่างการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียต่อการย่อยสลายสารประกอบ PAHs นั้น สิ่งที่สำคัญคือ ระบบเอนไซม์ แบคทีเรียชนิดที่ 1 สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายสารตั้งต้นได้ แต่เนื่องจากไม่มีระบบเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายให้สมบูรณ์ จึงทำให้เกิดการสะสมของสารมัธยันตร์ ส่งผลให้เป็นพิษต่อแบคทีเรียชนิดที่ 1 ในขณะที่แบคทีเรียชนิดที่ 2 มีระบบเอนไซม์ที่สามารถ

ย่อยสลายสารมัธยันตร์นั้นได้ อาจมีผลทำให้ความเป็นพิษของสารมัธยันตร์ลดลง หรือสามารถนำสารดังกล่าวไปใช้ในการเจริญได้ ผลจากการเจริญของแบคทีเรียตัวที่ 2 อาจสร้างวิตามิน กรดอะมิโน หรือสารที่ช่วยให้มีการย่อยสลายสารตั้งต้นดีขึ้น เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและต่อการย่อยสลายของสารประกอบ PAHs ของแบคทีเรียชนิดอื่นต่อไป (Mueller และคณะ, 1989)

Juhasz และคณะ (1997) แยกแบคทีเรียจากดินที่ปนเปื้อนสารประกอบ PAHs ได้กลุ่มแบคทีเรียที่ประกอบด้วย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ VUN10,001 VUN10,002 และ VUN10,003 มาเรียงร่วมกันพบว่า กลุ่มแบคทีเรียนี้สามารถใช้ไพรีน ฟลูออรีน และฟีแนนทรีน เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ ยังสามารถย่อยสลายฟลูออแรนธีน เบนโซ[เอ]ไพรีน และไดเบนซ์[เอ, เอช]แอนทราซีน ซึ่งมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยวงอะโรมาติก 5 วง โดยกระบวนการเมแทบอลิซึมที่มีฟีแนนทรีนเป็นสับสเตรตเพื่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

การบำบัดสารประกอบ PAHs ทางชีวภาพ โดยการเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่นที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษในดินนั้น ต้องคำนึงถึงปัญหาที่สำคัญเกี่ยวกับการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ต่างถิ่นโดยทั่วไปจำนวนแบคทีเรียต่างถิ่นจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเติมในดินธรรมชาติ เนื่องจากยังไม่คุ้นเคยกับสภาพในดินธรรมชาติ เช่น สภาพของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ วิตามิน เป็นต้น นอกจากนี้ปัจจัยทางชีวภาพและกายภาพของดินก็เป็นส่วนสำคัญต่อการลดลงของจำนวนแบคทีเรีย (Van Veen และคณะ, 1995)

ปัจจัยทางกายภาพของดิน

ลักษณะของเนื้อดิน แร่ธาตุในดินเหนียวจะช่วยป้องกันแบคทีเรียจากการถูกจับกินของโปรโตซัว

ความตึงผิวของน้ำ (water tension) ความตึงผิวน้ำสูง ทำให้เกิดการขาดน้ำ มีแรงดันออสโมติกสูง

สารอินทรีย์คาร์บอน (organic carbon) การขาดสารอินทรีย์คาร์บอนชนิดที่ต้องการจะทำให้การเจริญของแบคทีเรียหยุดชะงักลงและมีกิจกรรมลดลง

สารอาหารอนินทรีย์ (inorganic nutrients) การขาดไนโตรเจน ฟอสฟอรัส จะทำให้การเจริญของแบคทีเรียหยุดลง

ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระดับความเป็นกรดด่างสามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียได้ รวมทั้งอาจมีผลต่อการปลดปล่อยสารอาหารบางชนิดในดิน เช่น ฟอสฟอรัส หรือปลดปล่อยอลูมิเนียมอิออนซึ่งเป็นสารพิษในดิน

อุณหภูมิ มีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม และกิจกรรมของแบคทีเรีย

สารเคมีที่เป็นพิษ (toxic waste) สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไวต่อสารชนิดนี้ สามารถคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความต้านทานและย่อยสลายสารเคมีชนิดนี้ได้

ปัจจัยทางชีวภาพของดิน

สภาวะการล่า predation) ประชากรของแบคทีเรียลดลงเนื่องจากถูกจับกินโดยศัตรูธรรมชาติ

การแก่งแย่ง (competition) เกิดการแย่งอาหารกันระหว่างแบคทีเรียประจำถิ่นกับแบคทีเรียต่างถิ่น

การเจริญของรากพืช (root growth) การปลดปล่อยสารอินทรีย์บางชนิดจากรากพืช เป็นต้น (Van Veen และคณะ, 1997)

การเพิ่มความสามารถในการอยู่รอดของจุลินทรีย์ต่างถิ่น เมื่อนำมาบำบัดในดินปนเปื้อนสารประกอบ PAHs

ได้มีงานวิจัยที่ศึกษาถึงการเพิ่มความสามารถในการอยู่รอดของจุลินทรีย์ต่างถิ่น ดังนี้

Labare และ Alexander (1995) ทดลองบำบัดดินปนเปื้อนสารประกอบ PAHs ภาวะเสลอรีด้วยอัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:1 (กรัม/มล.) พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญ และการย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ดีขึ้นจาก 4.4% เป็น 36.9% เนื่องจากน้ำสามารถช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างจุลินทรีย์ และฟีแนนทรีน การเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสดังกล่าวเกิดจากดินแตกตัว ทำให้สารประกอบ PAHs เคลื่อนไปยังวัฏภาคน้ำอย่างรวดเร็ว รวมทั้งเพิ่มการเคลื่อนที่ของจุลินทรีย์ด้วย (Doick และ Semple, 2003) เช่นเดียวกับรายงานของ Fu และ Alexander (1995) ที่ทำการบำบัดสารประกอบ PAHs สภาวะเสลอรีด้วยอัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:10 (กรัม/มล.) พบว่า สามารถเพิ่มการย่อยสลายฟีแนนทรีนได้

การใช้ประโยชน์จากวัสดุพาหะ (carrier materials) เพื่อเพิ่มการเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรียหลังจากบำบัดลงดิน วัสดุพาหะที่นำมาใช้ ได้แก่ วัสดุทางธรรมชาติ (ดิน, เศษใบไม้ชนิดต่างๆ) วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (เปลือกข้าว, ฟางข้าว, รำข้าว, แกลบ) และสารอินทรีย์พอลิเมอร์ ซึ่งมีลักษณะเป็นรูพรุน เพื่อใช้ในการตรึงเซลล์แบคทีเรีย เช่น แคลเซียมอาร์จีเนต อะกาโรส คาร์ราจีแนน

สมบัติของวัสดุพาหะที่เพิ่มการเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรียต่างถิ่นในดิน (Hupe และคณะ ,1996) ได้แก่

1. ช่วยเพิ่มการส่งผ่านออกซิเจนในดิน
2. เป็นแหล่งสะสมอาหารที่สำคัญและแร่ธาตุที่สำคัญ โดยเฉพาะไนโตรเจนและฟอสฟอรัส
3. ช่วยป้องกันแบคทีเรียจากการถูกจับกินโดยโปรโตซัว
4. ช่วยป้องกันการแก่งแย่งอาหารระหว่างแบคทีเรียท้องถิ่นกับแบคทีเรียต่างถิ่น
5. ช่วยดูดซับสารประกอบ PAHs ในดินได้

จึงมีรายงานวิจัยที่ศึกษาการใช้ประโยชน์จากวัสดุพาหะ (carrier materials) เพื่อเพิ่มการเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรียหลังจากการบำบัดลงดิน ดังนี้

Van Dyke และ Prosser (2000) ได้ศึกษาการสร้างกล้าเชื้อแบคทีเรียในวัสดุพาหะที่เป็นดินปลอดเชื้อ (carrier) ก่อนนำไปบำบัดในดินที่ปนเปื้อนสารประกอบ PAHs เพื่อเพิ่มการอยู่รอดของ *Pseudomonas fluorescens* ในดิน ทำการทดลองโดยเลี้ยง *Pseudomonas fluorescens* ในอาหารเหลวก่อนนำลงดิน พบว่า การเลี้ยงในวัสดุพาหะก่อนนำลงดิน การรอดชีวิตของแบคทีเรียจะสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากจะช่วยป้องกันการถูกจับกินโดยโปรโตซัว การแก่งแย่งอาหารระหว่างแบคทีเรียท้องถิ่นกับ *Pseudomonas fluorescens* ที่เติมลงไปและเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญต่อการเจริญของแบคทีเรีย จากนั้นศึกษาระยะระเวลาในการเลี้ยงเชื้อในวัสดุพาหะ ซึ่งมีผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียเมื่อลงดินเหมือนกัน โดยทำการทดลองเปรียบเทียบการเลี้ยงแบคทีเรียในวัสดุพาหะเป็นเวลา 0, 7, 14 วัน ก่อนนำลงดิน พบว่า เมื่อนำมาบำบัดลงดิน แบคทีเรียที่เลี้ยงในวัสดุพาหะเป็นเวลา 14 วัน จะให้การอยู่รอดของแบคทีเรียสูงที่สุด เนื่องจากระยะเวลาที่ยาวนานจะทำให้แบคทีเรียปรับตัวและทนต่อสภาพสิ่งแวดล้อมได้ยิ่งขึ้น

จากการวิจัยข้างต้นได้ศึกษาการใช้ประโยชน์จากวัสดุพาหะ (carrier materials) เพื่อเพิ่มการเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรียหลังจากบำบัดลงดิน พบว่ามีกระบวนการคล้ายกับการหมักในอาหารแข็ง (solid state fermentation) (Krishna, 2005) เนื่องจากการหมักในอาหารแข็งเป็นกระบวนการหมักชนิดหนึ่งที่เลี้ยงจุลินทรีย์บนสารตั้งต้น (substrate) หรือวัสดุพาหะที่เป็นของแข็ง (solid material) ปราศจากน้ำ โดยที่จุลินทรีย์จะเจริญอยู่ในรูพรุนที่ซับซ้อนหรือเจริญที่

พื้นผิวของวัสดุพาหะที่เป็นของแข็ง วัสดุพาหะที่เป็นของแข็งหรือสารตั้งต้น (substrate) ได้แก่ วัสดุทางธรรมชาติ (ดิน, เศษใบไม้ชนิดต่างๆ) วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (เปลือกถั่ว, ฟางข้าว, รำข้าว, แกลบ) และสารอินทรีย์พอลิเมอร์ ซึ่งมีลักษณะเป็นรูพรุน เพื่อใช้ในการตรึงเซลล์แบคทีเรีย เช่น แคลเซียมอาร์จีเนต อะกาโรส คาร์ราจีแนน เป็นต้น การหมักในอาหารแข็งที่กล่าวมานี้ สามารถนำไปผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆได้ เช่น เอนไซม์บางชนิด ผลิตภัณฑ์ทางด้านอาหาร การทำปุ๋ย เป็นต้น

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทอย่างมากสำหรับการหมักในอาหารแข็ง คือ ราและแบคทีเรีย โดยเฉพาะราที่สร้างเส้นใย (filamentous fungi) มีความสำคัญที่สุด เนื่องจากสามารถปรับตัวกับสภาวะที่มีค่า A_w (water activity) ต่ำๆได้และทนต่อสภาวะที่มีความดันออสโมติกสูงได้ เนื่องจากความเข้มข้นของสารอาหารสูง ส่วนแบคทีเรียมักจะมีผลต่อการหมักแบบธรรมชาติ (Krishna, 2005) เช่น การทำปุ๋ยหมัก (compost) การหมักหญ้าในฉาง (ensiling) การผลิตอาหาร การผลิตเอนไซม์บางชนิด เป็นต้น

นอกจากปัจจัยทางชีวภาพที่เกิดจากสมบัติของจุลินทรีย์แล้ว การหมักแบบของแข็งจะเกิดประสิทธิภาพสูงสุด (ผลิตภัณฑ์และชีวมวลสูงๆ) ได้นั้น จะต้องอาศัยปัจจัยทางกายภาพร่วมด้วย (Krishna, 2005) ก็คือ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ เช่น ความชื้น อากาศ ความเป็นกรดด่าง สารอาหาร เป็นต้น (ดังตารางที่ 2.2)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 **ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักแบบของแข็ง** (solid state fermentation process) (Krishna, 2005)

พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม
ความชื้น	โดยทั่วไป ความชื้นของวัสดุพาหะจะอยู่ในช่วง 30-85% ในแบคทีเรียความชื้นของวัสดุพาหะจะมีค่าสูงกว่า 70% ในราความชื้นของวัสดุพาหะจะอยู่ในช่วง 20-70%
ออกซิเจน	มากกว่า 1% ของปริมาตรในดิน การเติมวัสดุที่มีรูพรุนขนาดเล็ก เพื่อเพิ่มช่องว่างในดิน ทำให้มีกระบวนการระบายน้ำและการถ่ายเทอากาศ
ค่าความเป็นกรดด่าง	ในแบคทีเรีย pH อยู่ในช่วง 6-7.5 ในรา pH อยู่ในช่วง 3.8-6 ในยีสต์ pH อยู่ในช่วง 4-5
สารอาหาร	ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน แร่ธาตุ และวิตามินหรือโคแฟกเตอร์ โดยมีคาร์บอนอยู่ในช่วง 40-50% ไนโตรเจนอยู่ในช่วง 3-12%
สารตั้งต้น (substrate)	วัสดุทางธรรมชาติ (ดิน, เศษใบไม้ชนิดต่างๆ) วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (เปลือกถั่ว, ฟางข้าวรำข้าว, แกลบ) และสารอินทรีย์พอลิเมอร์ (แคลเซียมอาร์จีเนต อะกาโรส คาร์ราจีแนน) การเลือกวัสดุพาหะที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ราคาถูก มีปริมาณเพียงพอต่อการนำไปใช้ เป็นต้น
ขนาดอนุภาคของสาร	อนุภาคมีขนาดเล็ก มีข้อดีในการถ่ายเทความร้อน และมีการแลกเปลี่ยนออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างอากาศและพื้นผิววัสดุพาหะ อนุภาคมีขนาดใหญ่ จะมีประสิทธิภาพในการหายใจหรือการได้รับอากาศได้ดีกว่า

Krishna และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษา โดยเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. บนวัสดุทางการเกษตร ซึ่งเป็นการหมักในอาหารของแข็ง พบว่า *Pseudomonas* sp. สามารถเจริญและอยู่รอดได้เมื่อนำไปใช้เป็นปุ๋ยหมักให้กับดิน ช่วยในการปรับปรุงและบำรุงดิน โดยเพิ่มปริมาณแร่ธาตุอาหาร และรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดิน

จากงานวิจัยที่ได้กล่าวมาข้างต้น ที่ศึกษาถึงความสามารถในการอยู่รอดของจุลินทรีย์โดยใช้ประโยชน์จากวัสดุพาหะและการหมักแบบของแข็ง (solid state fermentation) นั้น เพื่อรักษาจุลินทรีย์ให้มีชีวิตรอดได้ยาวนานยิ่งขึ้น โดยยังมีความบริสุทธิ์และไม่เปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม จึงทำการเก็บจุลินทรีย์เพื่อหยุดหรือลดการเจริญเติบโต โดยควบคุมปัจจัยที่จำเป็นในการเจริญ เช่น การจำกัดอากาศ อุณหภูมิ สารอาหาร น้ำ เป็นต้น การเก็บรักษาจุลินทรีย์แต่ละวิธีต้องทำให้เชื้อยังมีชีวิตอยู่และคงเดิมให้มากที่สุดและไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ได้มีงานวิจัยที่ศึกษาถึงการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญและอยู่รอดได้ในสภาวะของแข็ง (solid state)

Pesenti- Barili และคณะ (1991) ได้ศึกษาการอยู่รอดของ *Agrobacterium radiobacter* K84 บนวัสดุหลายชนิดเพื่อนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืช คัดเลือกวัสดุพาหะทั้ง 8 ชนิด โดยเลี้ยง *Agrobacterium radiobacter* K84 บนวัสดุพาหะทั้ง 8 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย Agriperlite, Expanded clay, Kaolin, Celite, Diatom, Porosil MP, Micro-cel และ Vermiculite บรรจุใส่ถุง แล้วกำจัดอากาศออก จากนั้นเปรียบเทียบการเก็บรักษาเชื้อบนวัสดุพาหะทั้ง 8 ชนิด ที่อุณหภูมิ 4 และ 21 องศาเซลเซียส พบว่า *Agrobacterium radiobacter* K84 สามารถเจริญและอยู่รอดบน Vermiculite, Celite, Porosil MP ได้ดีที่สุดและแบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ประมาณ 1-2 ปี และที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส พบว่า *Agrobacterium radiobacter* K84 สามารถเจริญและอยู่รอดบน Kaolin, Expanded clay, Porosil MP ได้ดีและแบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ประมาณ 3-5 เดือน จากงานวิจัยจะเห็นว่าวัสดุพาหะแต่ละชนิดส่งเสริมการเจริญและรอดชีวิตของแบคทีเรียได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิในการเก็บรักษาแบคทีเรีย

เสาวลักษณ์ อ้นเมฆ (2550) สร้างหัวเชื้อแบคทีเรีย RRM-V3 ในใบจามจุรีก่อนที่จะใส่ลงไปในดิน พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้อย่างรวดเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ซึ่งไพรีนและฟีแนนทรีนเหลืออยู่

เพียง 11.25% และ 7.59% ภายใน 3 วัน ตามลำดับ จากงานวิจัยจะเห็นว่าใบจามจุรีส่งเสริมการเจริญและรอดชีวิตของแบคทีเรีย และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้

จากที่กล่าวมาข้างต้นการบำบัดทางชีวภาพโดยการเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่นที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ลงในดิน เพื่อให้เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพ ต้องคำนึงถึงความอยู่รอดและความสามารถในการย่อยสลายสารพิษของจุลินทรีย์ต่างถิ่นที่เติมลงไปในดินเป็นสำคัญ

ทิมากร แสงดำ (2547) ได้คัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย STK จากปุ๋ยหมักใบมะขาม โดยใช้แผ่นพอลิเตตระฟลูออโรเอทธิลีน (PTFE) ที่เคลือบด้วยไพรีน ซึ่งกลุ่มแบคทีเรีย STK ประกอบด้วยแบคทีเรีย STK1 STK2 และ STK3 ที่มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียที่จัดอยู่ในจีนัส *Zoogloea* sp., *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้มีสมบัติไฮโดรโฟบิซิตี้สูง แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้ไพรีนเข้มข้น 100 มก./ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ โดยพบว่าสามารถย่อยสลายไพรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้หมดในระยะเวลา 8 วัน และสามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs อื่น ได้แก่ ฟีแนนทรีน ไดเบนโซฟูแรน อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน และยังสามารถย่อยสลาย แอนทราซีนกับฟลูออรีนได้เล็กน้อย รวมทั้งเบนโซ[เอ]ไพรีนในขณะที่มีน้ำมันดีเซลรวมอยู่ด้วย

ตารางที่ 2.3 แสดงลักษณะโคโลนีของกลุ่มแบคทีเรีย STK

แบคทีเรีย สายพันธุ์บริสุทธิ์	ลักษณะที่ศึกษา	
	โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB	รูปร่างเซลล์และการติดสีแกรม
STK1	โคโลนีกลมแบน สีขาว ขอบเรียบ โปร่งแสงตรงกลางทึบแสง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-5 มม.	แท่ง แกรมลบ
STK2	โคโลนีกลมแบน สีเหลือง ขอบเรียบ โปร่งแสง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-5 มม.	แท่ง แกรมลบ
STK3	โคโลนีกลมแบน สีขาว ขอบเรียบ โปร่งแสง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มม.	แท่งสั้น แกรมลบ

ปิยะวรรณ เพชราภา (2549) ทำการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย STK พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK ไม่สามารถย่อยสลายไพรีนในดินระบบนิเวศจำลองแบบ solid state ตลอดระยะเวลาที่บ่มเชื้อเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าปริมาณไพรีนยังคงที่ ผู้วิจัยได้เสนอสมมติฐานว่า อาจเกิดจากแบคทีเรีย STK ที่เติมลงไปในดินมีสมบัติไฮโดรโฟบิกสูงเป็นผลให้เซื้อไม่สามารถกระจายตัว เนื่องจากในระบบทดลองในดินเป็นระบบนิ่งไม่ได้มีการเขย่าตลอดเวลาดังเช่นการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีการขย่าตลอดระยะเวลาของการทดลอง นอกจากนี้การที่ไพรีนอยู่ในดินเป็นระยะเวลานานขึ้น เป็นผลให้มีการจับติดอยู่กับอนุภาคของดินมากขึ้น ทำให้แบคทีเรียนำไปใช้ได้ยากขึ้น (low availability) (Johnsen และคณะ, 2005)

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จึงมีความสำคัญต่อการบำบัดสารประกอบ PAHs ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs เหล่านี้ให้คงประสิทธิภาพจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นทั้งในด้านงานวิจัย และงานบำบัดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

การเก็บรักษาจุลินทรีย์แต่ละวิธีมีจุดเด่นแตกต่างกัน โดยมีวัตถุประสงค์เดียวกัน คือ เพื่อรักษาความมีชีวิตของจุลินทรีย์เอาไว้ในสภาพบริสุทธิ์ไม่มีจุลินทรีย์อื่นๆมาปนเปื้อน และต้องคงความสามารถให้เหมือนเดิมทุกประการ วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์นั้นแตกต่างกันตั้งแต่ง่ายจนถึงวิธีที่ยุ่งยาก ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง รวมทั้งสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและแรงงาน ประสิทธิภาพของวิธีการเก็บจุลินทรีย์แตกต่างกันไป ดังนั้นการที่จะเลือกใช้วิธีใดในการเก็บรักษาจุลินทรีย์นั้นควรคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ให้เหมาะสมสอดคล้องกับจุดประสงค์ในการใช้จุลินทรีย์ วิธีการต่างๆ มีผลต่อการมีชีวิตของจุลินทรีย์ซึ่งจะมีโอกาสตายไปในระหว่างกระบวนการเก็บรักษา และในช่วงการเก็บจึงควรเลือกวิธีที่ทำให้จุลินทรีย์ที่มีชีวิต เหลืออยู่จำนวนมากใกล้เคียงกับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในตอนเริ่มต้น เพื่อขจัดปัญหาการเปลี่ยนแปลงลักษณะบางอย่างของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการเพื่อคงความอยู่รอดของจุลินทรีย์เอาไว้ (สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, 2539)

ปัจจุบันมีวิธีการเก็บจุลินทรีย์แบบง่าย เช่น

การต่อเชื้อ (subculture) ซึ่งมีโอกาสปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นได้ง่าย มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะบางอย่างทำให้จุลินทรีย์นั้น ๆ ไม่สามารถคงลักษณะเดิมไว้ได้ โอกาสที่เกิดจะมีมากขึ้นตามความถี่ในการย้ายเชื้อ (สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ , 2539)

การเก็บรักษาแบคทีเรียในอุณหภูมิเยือกแข็ง (freezing) อุณหภูมิเยือกแข็งที่ใช้เก็บแบคทีเรียควรต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส และเก็บแบคทีเรียที่อายุน้อย อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ควรมีสารป้องกันอันตรายที่จะเกิดกับเซลล์ในขณะแช่แข็งได้ดี (Protective Agent) เช่น Glycerol หรือ Dimethylsulphoxide มีกระบวนการเกิดอิเล็กโตรไลซิสต่ำ และไม่ละลาย กลับเป็นของเหลวได้ง่าย แบคทีเรียส่วนใหญ่ทนต่อการแช่แข็งได้ดี แต่มีจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Neisseria* sp.หรือ *Haemophilus* sp. ที่ทนต่อการแช่แข็งได้ไม่ดี แต่สามารถเก็บที่อุณหภูมิต่ำมากๆ (Super Cooling) โดยการแช่แข็งอย่างรวดเร็วได้ ซึ่งวิธีนี้จะทำให้อัตราเมแทบอลิซึมและการเกิดปฏิกิริยาเคมีของจุลินทรีย์ลดลง

Gelatin Discs เป็นวิธีที่ใช้ในการเก็บรักษาแบคทีเรีย โดยใช้เทคนิคการทำให้แห้งในโถเก็บความชื้น หรือใช้เครื่องดูดอากาศ

Deep Tube Stock Agar เป็นการลดอัตราเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย โดยให้มีสารอาหารปริมาณต่ำๆ เพื่อให้แบคทีเรียใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนน้อยที่สุด

วิธีทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) ซึ่งเป็นวิธีที่ยอมรับว่ามีประสิทธิภาพในการเก็บ รา ยีสต์ แบคทีเรีย สามารถเก็บจุลินทรีย์ได้ครั้งละมากๆ สามารถคงความมีชีวิตของจุลินทรีย์ได้ยาวนานถึง 50 ปีหรือมากกว่านี้ สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และให้ผลคุ้มค่าหากจุลินทรีย์นั้นเป็นจุลินทรีย์ที่จัดว่ามีคุณค่ามาก หรือจำเป็นต้องให้บริการแจกจ่ายจุลินทรีย์ให้หน่วยงานอื่นๆ ที่ห่างไกลออกไป แต่เป็นวิธีที่ค่อนข้างยากและใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง

มีปัจจัยหลายอย่างที่ทีอิทธิพลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย หลังทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เช่น ชนิดของแบคทีเรีย สารป้องกันความเย็น (cryoprotectants) ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น อัตราการทำให้แข็ง (freezing rate) และการเก็บหลังกระบวนการ เป็นต้น (Asa และคณะ, 2006)

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเซลล์เริ่มต้นสำหรับทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง ไม่ควรต่ำกว่า 10^8 เซลล์ ต่อ มล. เนื่องจากเซลล์จำนวนมากตายระหว่างการเก็บ Costa และคณะ (2000) พบว่าความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น สัมพันธ์กับสารป้องกันความเย็นที่ใช้ในการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เมื่อใช้ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 10^{10} เซลล์ ต่อ

มล. ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ Miyamoto-Shinohara และคณะ (2000) พบว่า แบคทีเรียแกรมลบสามารถอยู่รอดต่ำกว่าแบคทีเรียแกรมบวก

Costa และคณะ (2002) เปรียบเทียบระหว่าง glass vial ถุงพลาสติกแบบบาง และถุงพลาสติกแบบหนาที่ใช้ในการเก็บรักษา *Pantoea agglomerans* พบว่าถุงพลาสติกแบบหนาจะให้การเก็บที่ดีกว่าถุงพลาสติกแบบบาง เนื่องจากถุงพลาสติกแบบบางจะมีระดับออกซิเจนและความชื้นที่ผ่านเข้ามาสูงกว่า

Bozoglu และคณะ (1987) เปรียบเทียบความสามารถในการมีชีวิตของ *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* ที่เก็บในแก๊สไนโตรเจน และภายใต้สุญญากาศ พบว่าการเก็บใน glass vial ที่ถูกปิดผนึกให้ภายในเป็นสุญญากาศ หรือ ในแก๊สไนโตรเจน ให้ผลดีกว่าเก็บในภาวะที่มีอากาศ

การลดความชื้นเหลือ 25%-30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ และกำจัดอากาศออกระหว่างการเก็บ เป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยลดอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากน้ำและอากาศเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อกิจกรรมของอัตราเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ นอกจากนี้อุณหภูมิที่ใช้ในเก็บยังมีผลต่อการยืดระยะเวลาในการเก็บ Trivedi และคณะ (2005) ศึกษาการสร้างกล้าเชื้อของแบคทีเรียสองชนิด คือ *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas corrugata* ที่ตรึงอยู่บนวัสดุพาหะ และเก็บภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าจำนวนของเซลล์ที่เก็บที่อุณหภูมิห้องลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับที่เก็บที่ องศาเซลเซียส เนื่องจากที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส จะยับยั้งการแบ่งตัวและกิจกรรมต่างๆภายในเซลล์แบคทีเรีย เป็นผลให้ลดการใช้สารอาหาร (Van Shrevan, 1970)

วิธัญญา ขวเจริญพันธ์ (2549) ศึกษาการสร้างกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในวัสดุพาหะที่จะเติมลงในดินเพื่อทำให้แบคทีเรียคุ้นเคย และสามารถมีชีวิตรอดขณะที่ใช้บำบัดในดินที่ปนเปื้อนไพรีน พบว่าสามารถเก็บรักษากล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับเศษใบไม้ด้วยการบ่มเป็นเวลา 6 เดือน โดยยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนได้ ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ โดยหาวิธีเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษาให้นานมากขึ้น โดยกำจัดอากาศและลดความชื้นระหว่างการเก็บ และใช้ต้นทุนในการเก็บรักษาต่ำ และเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์

บทที่3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, สหรัฐอเมริกา
2. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, สหรัฐอเมริกา
3. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, ญี่ปุ่น
4. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ "ISSCO" laminar flow รุ่น BVT – 124 ของบริษัท International Sciencetific Supply,สหรัฐอเมริกา.
5. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunswick Scientific, สหรัฐอเมริกา
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys20 บริษัท Thermospectonic, ญี่ปุ่น
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น Sorvall® Biofuge Stratos บริษัท Heraeus., เยอรมัน
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น KM-15200 บริษัท Kubota, Japan.
9. ตู้อบแห้ง บริษัท Contherm Scientific, นิวซีแลนด์
10. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS400 ของบริษัท Decan Ultrasonics, อังกฤษ
11. ตู้บ่มเชื้อ รุ่น Heraeus type B 5050 E ของบริษัท Heraeus, เยอรมัน
12. ชุดเครื่องมือทำไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) สำหรับตรวจสอบปริมาณของ PAHs

    ลิควิดโครมาโทกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, ญี่ปุ่น

    คอลัมน์ (column) : Inertsill ODS-3 ขนาด 4.6 x 150 มิลลิเมตร ของบริษัท GL Science, ญี่ปุ่น

    เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-2A ของบริษัท Shimadzu, ญี่ปุ่น

    เครื่องบันทึก (recorder) Chromatography รุ่น C-RIA ของบริษัท Shimadzu, ญี่ปุ่น

    กระบอกฉีดยา (microsyringe) ขนาด 100 ไมโครลิตร รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, สหรัฐอเมริกา

13. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, ญี่ปุ่น

14. เครื่องคัดกรองขนาดดิน ขนาดความกว้างของรู 0.84 และ 1.18 มิลลิเมตร รุ่น O.S.K.119 Standard Sieve ของบริษัท Okawa Seiki, ญี่ปุ่น

15. เครื่องบด (blender) รุ่น MX-T31GH ของบริษัท Matsushita Electric, ไต้หวัน

16. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, สหรัฐอเมริกา

17. ไมโครปิเปต ขนาด 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Drummond Scientific, สหรัฐอเมริกา

18. หัวกรอง ชนิด PTFE ขนาดความกว้างของรู 0.20 และ 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, ญี่ปุ่น

19. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, ญี่ปุ่น

20. ปิเปต (pipette) ขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร ของบริษัท Gilson,ฝรั่งเศส

21. ขวดแก้วฝาเกลียว (vial) ขนาด 22 ml (Screw Cap with Teflon Liner) ของบริษัท Lab System , ประเทศไทย

22. เครื่อง vacuum seal

23. ถุงอะลูมิเนียม กว้าง 8 ยาว 12 เซนติเมตร

24. อะลูมิเนียมฟอล์ย

24. เครื่องปั้มสุญญากาศ (lyophilize)

25. หลอดแก้ว (ampule)

26. เดซิเคเตอร์

27. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ –20 ° ซ ของบริษัท Sanyo Electric, ญี่ปุ่น

28. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ –70°ซ รุ่น ULT1786 ของบริษัท Forma Scientific, สหรัฐอเมริกา

29. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (Thermo-block) รุ่น MylabTH Thermo- Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, เกาหลี

30. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA. และ รุ่น MJ Mini^{TM} Personal Thermal Cycler บริษัท Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา

31. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) รุ่น WB 14 ของบริษัท Memmert, เยอรมัน

32. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชั่น 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา

ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis)

Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-2 Advance, ญี่ปุ่น

Mini Sub-Cell GT agarose gel electrophoresis systems ของบริษัท Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา

33. เครื่องมือ DCode™ system ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา

เคมีภัณฑ์

1. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, ญี่ปุ่น
2. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา
3. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, เยอรมัน
5. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemicals, ออสเตรเลีย
6. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, ฝรั่งเศส
7. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, ออสเตรเลีย
8. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, ฝรั่งเศส
9. เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) ของบริษัท May & Baker, อังกฤษ
10. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, ออสเตรเลีย

11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, เยอรมัน
12. เมธานอล (CH_3OH) ของบริษัท Merck, เยอรมัน
13. เอธิลอะซีเตท ($CH_3COOC_2H_5$) ของบริษัท Merck, เยอรมัน
14. ไดคลอโรมีเธน (CH_2Cl_2) ของบริษัท Merck, เยอรมัน
15. อะซีโตน (CH_3COCH_3) ของบริษัท Merck, เยอรมัน

16. ไดเมธิลซัลฟอกไซด์(CH_3SOCH_3) ของบริษัท Carlo ERBA, อิตาลี
17. แบคโตอการ์ (Bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา

18. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท Merck, เยอรมัน
19. ไซโคลเฮกซามีด (cyclohexamide) ของบริษัท Sigma Chemical, สหรัฐอเมริกา
20. โซเดียมอะซีเตต (CH_3COONa) ของบริษัท Merck, เยอรมัน
21. สารปฏิชีวนะนิสเตติน (nystatin) ของบริษัท Bio Basic INC., แคนาดา
22. Triton 100 ของบริษัท Research organic, สหรัฐอเมริกา
23. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท Merck, เยอรมัน
24. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท IUAI, ญี่ปุ่น
25. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenolblue) ของบริษัท Fluka, เยอรมัน
26. โปรตีเนสเค (Proteinase K) ของบริษัท Sigma, สหรัฐอเมริกา
27. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, สหรัฐอเมริกา
28. *Taq* DNA polymerase ของบริษัท New England Biolabs, สหรัฐอเมริกา
29. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท New England Biolabs, สหราชอาณาจักร
30. 100 base pair DNA ladder ของบริษัท New England Biolabs, สหรัฐอเมริกา
31. โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ ของบริษัท Operon Biotechnologies GmbH, เยอรมัน
32. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, สหรัฐอเมริกา
33. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 .2H_2O$) ของบริษัท Sigma, สหรัฐอเมริกา
34. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalal tesque, ญี่ปุ่น
35. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), [($C_{16}H_{32}N(CH_3)_3$)Br] ของบริษัท TCI-EP, ญี่ปุ่น.
36. Geneclean II Kit ของบริษัท Q-BIOgene, สหรัฐอเมริกา
37. Formamide (Deionized) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา
38. 40% Acrylamide/Bis solution, 37.5:1 (2.6% C) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา
39. Urea ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา
40. Ammonium persulfate ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา
41. TEMED (N,N,N′,N′-Tetra-methyl-ethylenediamine) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา

42. 50xTAE ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา

43. Dye solution ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา.

44. Ethidium bromide solution เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เตรียมวัสดุพาหะ (carrier materials) และดิน

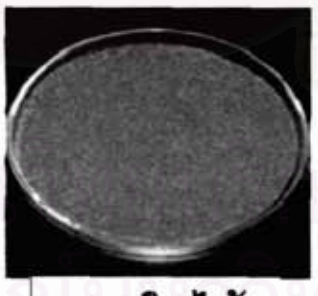
3.1.1. การเก็บตัวอย่าง

3.1.1.1 เก็บเศษใบไม้ที่ร่วงหล่นมาจากบริเวณภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประกอบด้วยใบจามจุรี ใบหูกวาง ใบโพธิ์ และใบประดู่ ผสมกัน

3.1.1.2 ดินที่ใช้ในการทดลอง นำมาจากบริเวณสวนผลไม้ ฝั่งธนบุรี กรุงเทพฯ โดยดินนี้อยู่ในบริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อนจากสาร PAHs มาก่อน โดยขุดลึกจากผิวประมาณ 2 เซนติเมตร ทำการแยกเศษใบไม้และหินออก

3.1.2. การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์และใช้ในการทดลอง

นำเศษใบไม้มาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน นำไปปั่น และคัดกรองโดยใช้เครื่องคัดกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.85 มิลลิเมตร (รูปที่ 3.1) แบ่งเศษใบไม้เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพและเคมี ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลอง



เศษใบไม้

รูปที่ 3.1 แสดงภาพเศษใบไม้ที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านการคัดกรองแล้ว

นำดินมาปั่นและคัดกรองโดยเครื่องคัดกรองขนาดดินเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.85 มิลลิเมตร (รูปที่ 3.2) จากนั้นทำการแบ่งดินเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร PAHs ด้วยวิธี HPLC และ

42. 50xTAE ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา

43. Dye solution ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา.

44. Ethidium bromide solution เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เตรียมวัสดุพาหะ (carrier materials) และดิน

3.1.1. การเก็บตัวอย่าง

3.1.1.1 เก็บเศษใบไม้ที่ร่วงหล่นมาจากบริเวณภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประกอบด้วยใบจามจุรี ใบหูกวาง ใบโพธิ์ และใบประดู่ ผสมกัน

3.1.1.2 ดินที่ใช้ในการทดลอง นำมาจากบริเวณสวนผลไม้ ฝั่งธนบุรี กรุงเทพฯ โดยดินนี้อยู่ในบริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อนจากสาร PAHs มาก่อน โดยขุดลึกจากผิวประมาณ 2 เซนติเมตร ทำการแยกเศษใบไม้และหินออก

3.1.2. การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์และใช้ในการทดลอง

นำเศษใบไม้มาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน นำไปปั่น และคัดกรองโดยใช้เครื่องคัดกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.85 มิลลิเมตร (รูปที่ 3.1) แบ่งเศษใบไม้เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพและเคมี ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลอง

เศษใบไม้

รูปที่ 3.1 แสดงภาพเศษใบไม้ที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านการคัดกรองแล้ว

นำดินมาปั่นและคัดกรองโดยเครื่องคัดกรองขนาดดินเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.85 มิลลิเมตร (รูปที่ 3.2) จากนั้นทำการแบ่งดินเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร PAHs ด้วยวิธี HPLC และ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพและเคมี ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลอง

ดิน

รูปที่ 3.2 แสดงภาพดินที่ใช้ในการทดลองที่บดและผ่านการคัดกรองแล้ว

3.1.3. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.1.3.1 นำเศษใบไม้ 0.5 กิโลกรัม ส่งวิเคราะห์ที่ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาเกษตรศาสตร์บางเขน เพื่อวิเคราะห์ ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณโปแทสเซียม สารอินทรีย์คาร์บอน และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

3.1.3.2 เศษใบไม้ 1.0 กิโลกรัม วิเคราะห์หาค่าความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (Water Holding Capacity) (ภาคผนวก ข)

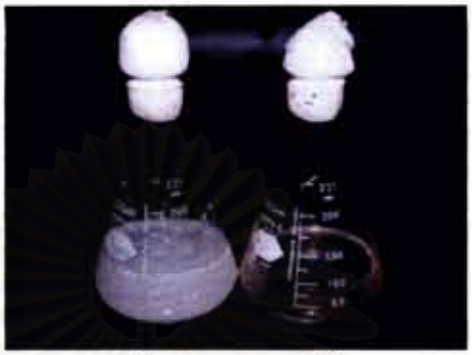
3.1.3.3 นำตัวอย่างดิน 0.5 กิโลกรัม ส่งวิเคราะห์ที่ฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมีกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เพื่อวิเคราะห์ ลักษณะเนื้อดิน ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุหรือไอออน (cation exchange capacity) ความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณโปแทสเซียม สารอินทรีย์คาร์บอน และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

3.2 เตรียมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพื่อเพาะเลี้ยงในเศษใบไม้

3.2.1 การเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ใน Carbon Free Mineral Medium (CFMM)

นำกลุ่มแบคทีเรีย STK (ทิมากร แสงดำ, 2547) มาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM (Komukai-Nakamura และคณะ, 1996) ที่มีไพรีนเข้มข้น 100 มก.ต่อ ลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่

ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน (รูปที่ 3.3) เพื่อเพิ่มจำนวนกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน



0 วัน 8 วัน

รูปที่ 3.3 แสดงภาพลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีไพรีนเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับที่เวลา 0 วัน

3.3 การเลี้ยงกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้

3.3.1 โดยเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ใน CFMM จากข้อ 3.2.1 นำมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนเซลล์แบคทีเรียมาล้างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ทำการปั่นเหวี่ยงในสภาวะเดิม โดยทำตามขั้นตอนนี้2 ซ้ำ นำส่วนเซลล์มาแขวนลอยในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % เพื่อปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^{12} CFU / ml แล้วนำมาเลี้ยงในเศษใบไม้

3.3.2 ชั่งเศษใบไม้ 1.5 กรัม ใส่ในขวดแก้วฝาเกลียว 40 ขวด ต่อ 1 ชุดการทดลอง (12 ชุดการทดลอง) นำมาปรับความชื้น (moisture content) ให้เท่ากับ 70% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ และปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7-7.5 โดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ผสมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล ลงไปให้มีน้ำหนักตรงกับค่าที่คำนวณจากความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำที่ได้จากการวิเคราะห์ แล้วผสมกับเศษใบไม้ให้เข้ากันโดยเครื่องผสม แบ่งการทดลองเป็น12 ชุดการทดลอง

ชุดการทดลองที่ 1 เติมสารละลายไพรีนในอะซิโตนลงในเศษใบไม้ให้ได้ความเข้มข้น 100 มก.ต่อ กก.ของเศษใบไม้ แล้วผสมให้เข้ากันโดยเครื่องปั่นผสมอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืนเพื่อให้อะซิโตนระเหยจนหมด (ชุดการทดลองที่1 นำไปใช้ในการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรียในภาวะการเก็บที่ความชื้น 70% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บและเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส)

ชุดการทดลองที่ 2 ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 (ชุดการทดลองที่2 นำไปใช้ในการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรียในภาวะการเก็บที่ความชื้น 70% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่อุณหภูมิห้อง)

ชุดการทดลองที่ 3 ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 (ชุดการทดลองที่3 นำไปใช้ในการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรียในภาวะการเก็บที่ความชื้น 40% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส)

ชุดการทดลองที่ 4 ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 (ชุดการทดลองที่4 นำไปใช้ในการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรียในภาวะการเก็บที่ความชื้น 40% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่อุณหภูมิห้อง)

ชุดการทดลองที่ 5 ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 (ชุดการทดลองที่5 นำไปใช้ในการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรียในภาวะการเก็บที่ความชื้น 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส)

ชุดการทดลองที่ 6 ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 (ชุดการทดลองที่6 นำไปใช้ในการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรียในภาวะการเก็บที่ความชื้น 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่อุณหภูมิห้อง)

ชุดการทดลองที่ 7 ไม่มีการเติมไพรีน (ชุดการทดลองที่ 7 นำไปใช้ในการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรียในภาวะการเก็บที่ความชื้น 70% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส)

ชุดการทดลองที่ 8 ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 7 (ชุดการทดลองที่8 นำไปใช้ในการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรียในภาวะการเก็บที่ความชื้น 70% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่อุณหภูมิห้อง)

ชุดการทดลองที่ 9 ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 7 (ชุดการทดลองที่9 นำไปใช้ในการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรียในภาวะการเก็บที่ความชื้น 40% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส)

ชุดการทดลองที่ 10 ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 7 (ชุดการทดลองที่10 นำไปใช้ในการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรียในภาวะการเก็บที่ความชื้น 40% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่อุณหภูมิห้อง)

ชุดการทดลองที่ 11 ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 7 (ชุดการทดลองที่11 นำไปใช้ในการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรียในภาวะการเก็บที่ความชื้น 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส)

ชุดการทดลองที่ 12 ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 7 (ชุดการทดลองที่12 นำไปใช้ในการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรียในภาวะการเก็บที่ความชื้น 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่อุณหภูมิห้อง)

จากนั้นเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ได้จากข้อ 3.1.1 โดยมีความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 10^{12} CFU ต่อ กรัมของเศษใบไม้ ลงในเศษใบไม้ทั้ง 12 ชุดการทดลอง ผสมให้เข้ากัน นำขวดไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน (วิธัญญา ขวเจริญพันธ์, 2549) โดยมีการขยับฝาเกลียวเพื่อให้อากาศ และวัดความชื้นทุกๆ 7 วัน แสดงในรูปที่ 3.4

รูปที่ 3.4 แสดงภาพชุดการทดลอง กลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้

3.3.3 เมื่อครบ 14 วัน นำ 1 ขวดของแต่ละชุดการทดลองไปตรวจหาปริมาณกลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ โดยนำมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.4 เก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในภาวะต่างๆ

ทดลองก่อนการทำลดความชื้นที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ การทดลองหาเวลาที่ใช้ในการลดความชื้นดังนี้

- นำกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เจริญในเศษใบไม้เป็นเวลา 14 วัน มาเก็บใส่ถุงอะลูมิเนียมฟอล์ย ลดความชื้นให้เหลือประมาณ 40% และ 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำด้วยปั๊มจากเครื่องไลโอฟิไลซ์
- จับเวลาที่ใช้ในการลดความชื้นให้เหลือประมาณ 40% และ 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ
- พบว่าใช้เวลา 4 และ10 ชั่วโมง ในการลดความชื้นให้เหลือ 40% และ 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มตามลำดับ (10 ชั่วโมงเป็นเวลาที่มากที่สุดที่เครื่องสามารถทำงานได้)

เก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในภาวะต่างๆ

นำกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เจริญในเศษใบไม้เป็นเวลา 14 วัน มาเก็บไว้ โดยแบ่งวิธีการเก็บดังนี้

3.4.1 เก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรียชุดการทดลองที่ 1 2 7 และ 8 ในข้อ 3.3.2 ใส่ถุงอะลูมิเนียม แล้วปิดถุงให้ภายในเป็นสุญญากาศด้วยเครื่องผนึกสุญญากาศ (vacuum seal) แยกเก็บชุดการทดลองที่ 1 และ7 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และชุดการทดลองที่ 2 และ8 เก็บที่อุณหภูมิห้อง แสดงในรูปที่ 3.5 และ 3.6

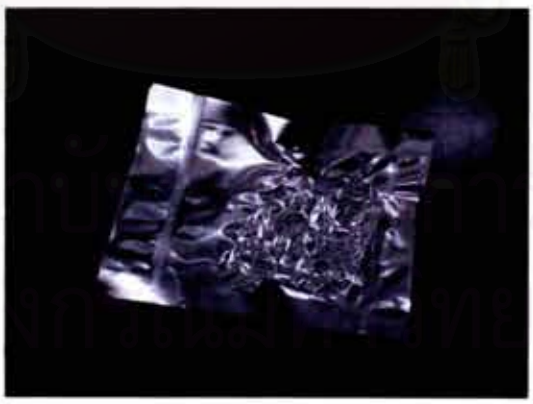
3.4.2 เก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรียชุดการทดลองที่ 3 4 9 และ 10 ในข้อ 3.3.2 เช่นเดียวกัน โดยลดความชื้นให้เหลือประมาณ 40% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำด้วยปั๊มจากเครื่องไลโอฟิไลซ์แสดงในรูปที่3.7 จากนั้นใส่ถุงอะลูมิเนียม แล้วปิดถุงให้ภายในเป็นสุญญากาศ

ด้วยเครื่องสุญญากาศ (vacuum seal) แยกเก็บชุดการทดลองที่ 3 และ9 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และชุดการทดลองที่ 4 และ10 เก็บที่อุณหภูมิห้อง แสดงในรูปที่ 3.5 และ 3.6

3.4.3 เก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรียชุดการทดลองที่ 5 6 11 และ 12 ในข้อ 3.3.2 เช่นเดียวกัน โดยลดความชื้นให้เหลือประมาณ 30% ของความจุสูงสุดในการชุ่มน้ำด้วยปั๊มจากเครื่องไลโอฟิไลซ์แสดงในรูปที่3.7 จากนั้นใส่ถุงอะลูมิเนียม แล้วปิดถุงให้ภายในเป็นสุญญากาศด้วยเครื่องสุญญากาศ (vacuum seal) แยกเก็บชุดการทดลองที่ 5 และ11 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และชุดการทดลองที่ 6 และ12 เก็บที่อุณหภูมิห้อง แสดงในรูปที่ 3.5 และ 3.6

3.4.4 ตรวจหาปริมาณกลุ่มแบคทีเรีย STK ทุกภาวะการเก็บทันทีหลังผ่านกระบวนการเก็บรักษาด้วยวิธี viable plate count (ข้อ 3.9)

รูปที่ 3.5 ถุงฟลอยด์ และถุงอะลูมิเนียม ตามลำดับ



รูปที่ 3.6 ถุงอะลูมิเนียมหลังปิดผนึกในสภาพสุญญากาศ

รูปที่ 3.7 เครื่อง freeze dryer

3.5 เก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์

3.5.1 การเตรียม ampoule

Ampoule เป็นหลอดแก้วเล็กๆ ชนิด neutral หรือ soft glass และไม่เป็น alkaline ไม่นิยมใช้ pyrex เพราะเนื้อแก้วทนไฟกว่า ทำให้ยุ่งยากตอนใช้ไฟลนเปิดหลอด (sealing)หลอด ampoule มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายในประมาณ 6 มิลลิเมตร ยาว 100 มิลลิเมตร ส่วนท้ายของหลอดจะโค้งมน หลอด ampoule ทุกหลอดที่จะนำไปใช้ต้องล้างให้สะอาด โดยแช่ไว้ใน 2% HCL 1 คืนแล้วล้างด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง น้ำกลั่นอีก 2-3 ครั้งแล้วนำไปอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส

3.5.2 กลุ่มแบคทีเรีย STK

อายุการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จะมีผลต่ออายุของการเก็บรักษา โดยมีผู้ทดลองแล้วพบว่าอายุที่พอเหมาะคือระยะ late logarithmic phase หรือระยะ early stationary phase () นำกลุ่มแบคทีเรีย STK จากข้อ 3.2.1 มาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนเซลล์แบคทีเรียมาล้างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ทำการปั่นเหวี่ยงในภาวะเดิม โดยทำตามขั้นตอนนี้ 2 ซ้ำ นำส่วนเซลล์มาแขวนลอยในอาหารเหลว carbon free mineral medium (CFMM) และเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ตั้งต้นเท่ากับกล้าเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในเศษใบไม้เป็นเวลา 14 วัน

3.5.3 ขั้นตอนการเตรียม cell suspension

3.5.3.1 ใช้ Pasteur pipette ดูดแบ่ง 20% sucrose sterile (ภาคผนวก ข) ผสมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK จากข้อ3.5.2 (ความเข้มข้นสุดท้ายของซูโครสเป็น 10%(v/v))

3.5.3.2 ใช้ pasture pipette ผสมกับ ซูโครสให้เข้ากัน

3.5.3.3 ดูด cell suspension แบ่งใส่ในหลอด ampoule หลอดละ 0.2 มล.

3.5.3.4 เปลี่ยนจากจุกสำลีไปเป็นจุกผ้า (sterile technique)

3.5.3.5 นำไปทำตามกระบวนการไลโอฟิไลซ์

3.5.4 ขั้นตอนการทำไลโอฟิไลซ์

การทำ primary dry

ในระยะ primary dry เครื่องเซนติฟิวจ์เริ่มทำงาน cell suspension ที่ใส่ลงไปในหลอด ampoule จะถูกเหวี่ยงเป็น slant เป็นการเพิ่มพื้นที่หน้าตัดให้เชื้อ และป้องกันการเกิดฟองอากาศ ในระยะนี้น้ำจะถูกดึงออกจาก cell suspension และอุณหภูมิจะลดลงจนเซลล์แข็งตัว เครื่อง vacuum จะทำงานจนเกิดสภาพสุญญากาศ น้ำในเซลล์จุลินทรีย์จะถูกดึงออกมาจนเหลือ free water ประมาณ 5-10% ในระยะนี้อัตราการตายค่อนข้างสูงเพราะน้ำที่ถูกดึงออกมาจากเซลล์จะกลายเป็นน้ำแข็งโดยการทำงานของ refrigeration system

3.5.4.1 เซนติฟิวจ์ 16 นาที หลังจากนั้นทิ้งไว้ 3 ชั่วโมงเพื่อจะได้มีการ freeze อย่างทั่วถึง

3.5.4.2 เปลี่ยนจากจุกผ้าไปเป็นจุกสำลี (sterile technique)

3.5.4.3 ตัดปลายสำลีให้พอดีกับปากหลอด ampoule ด้วยกรรไกรที่ sterile แล้ว

3.5.4.4 ใช้แท่งแก้วงอดันจุกสำลีลงไปจนถึงปลาย slant

3.5.4.5 นำหลอด ampoule ไปหลอมเพื่อคอดหลอด (constrict) และเป็นการลดพื้นที่หน้าตัดของปลายหลอด ampoule ก่อนที่จะนำไปทำขั้น secondary dry

การทำ secondary dry

นำหลอดที่ทำคอดทั้งหมดไปเสียบเข้ากับจุกของ manifold ที่ต่อกับเครื่อง Freeze dryer/Lyophilizer เพื่อทำให้แห้งและทำให้ภายในหลอดเป็นสุญญากาศทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จนตัวอย่างแห้งในระยะ secondary dry สภาพสุญญากาศสูงขึ้น น้ำในเซลล์จะเหลือเพียง 1-2 % ซึ่งถ้าดึงน้ำออกจนหมดจะเป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ทำให้จุลินทรีย์ตายได้

Seal หลอด ampoule ขณะที่อยู่บนจุกของ manifold ที่ต่อกับเครื่อง Lyophilizer

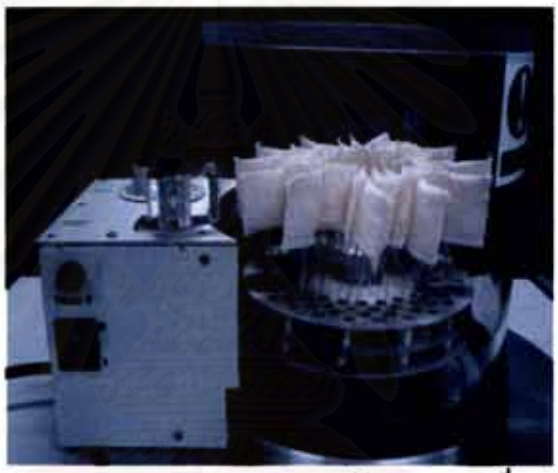
นำหลอด ampoule ที่ seal แล้วไปทดสอบความเป็นสุญญากาศ โดยใช้ Spark Tester ไปแตะที่ปลายหลอด

ถ้าเกิดแสงสีม่วง แสดงว่าเป็นสุญญากาศ

ถ้าไม่เกิดแสงสีม่วง แสดงว่าไม่เป็นสุญญากาศ

หลอดที่ผ่านการตรวจสอบนำไปเก็บที่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.5 นำ 1 หลอด จากข้อ 3.5.4 ไปตรวจหาปริมาณกลุ่มแบคทีเรีย STK ทันทีหลังจากทำไลโอฟิไลซ์โดยนำมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น



รูปที่ 3.8 ระยะ primary dry แสดงการทำงานของเครื่องเซนติฟิวจ์

รูปที่ 3.9 ระยะsecondary dry

3.6 ทดสอบการรอดชีวิตของกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ทุกภาวะการเก็บรักษา เมื่อเวลาผ่านไป 0 4 8 และ 12 เดือน

ตรวจหาปริมาณกลุ่มแบคทีเรีย STK เมื่อผ่านไป 0 4 8 และ 12 เดือน ด้วยวิธี viable plate count (ข้อ 3.9)

3.7 ทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อในสเลอรีดิน

เมื่อเก็บกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยวิธีในข้อ 3.4 และข้อ 3.5 ไว้เป็นเวลา 0 4 8 และ 12 เดือน แล้ว นำมาทดสอบการรอดชีวิต และการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในสเลอรีดินต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 8 (กรัม / มล.) (รุจา สารคุณ, 2548) โดยชั่งดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ 7.5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เติมไพรีนในอะซีโตน 100 มก.ต่อ ลิตร ในดินที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน เพื่อให้อะซีโตนระเหยจนหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไป 72 มล. แล้วผสมให้เข้ากัน เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียในเศษใบไม้ 1.5 กรัม (ข้อ 3.4) หรือจากการทำไลโอฟิไลซ์ (ข้อ 3.5) ผสมให้เข้ากัน เตรียมชุดการทดลองทั้งหมด 12 ขวดรูปชมพู่ สำหรับเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 5 และ10 วัน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดแต่ละเวลาเก็บตัวอย่าง 4 ขวด ขวดที่ 1 คือชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ขวดที่ 2 3 และ 4 เติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ 1.5 กรัม (ข้อ 3.4) หรือจากการทำไลโอฟิไลซ์ (ข้อ 3.5) โดยนำขวดที่1 2 และ 3 มาสกัดหาปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ ขวดที่ 4 นำไปหาปริมาณแบคทีเรีย STK ตามวิธีในข้อ 3.9 และติดตามกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยการทำ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ตามวิธีของ Iwamoto และคณะ (2000)

3.8 การวิเคราะห์ปริมาณไพรีน

3.8.1 นำขวดที่ 1 2 และ 3 จากข้อ 3.7 ที่ทำการการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในสเลอรีดินมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนวัฏภาคดินกับวัฏภาคน้ำ สกัดตัวอย่างแยกส่วนวัฏภาคดินกับวัฏภาคน้ำ

3.8.2 ส่วนของวัฏภาคดินสกัดด้วยไดคลอโรมีเธนตามวิธีของ Juhasz และคณะ (1997) โดยเติมโซเดียมซัลเฟต แอนไฮดรัส 1 เท่าของตัวอย่าง ลงในขวดแก้วบรรจุดิน จากนั้นสกัดด้วยไดคลอโรมีเธนปริมาตร 1 เท่าของตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 2 นาที นำตัวอย่างดินที่อยู่ในขวดแก้วไปจุ่มในอ่างกำเนิดเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแยกส่วน

ไดคลอโรมีเธนเก็บไว้ และสกัดตัวอย่างดินด้วยไดคลอโรมีเธนซ้ำอีก 2 ครั้งรวบรวมส่วนไดคลอโรมีเธนทั้งหมด ทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน ละลายไพรีนที่เหลืออยู่ในขวดก้นกลมด้วยด้วยเมธานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่ในหลอดแก้วขนาดเล็ก

3.8.3 ส่วนวัฏภาคน้ำสกัดด้วยเอธิลอะซีเตท ทำโดยนำส่วนวัฏภาคน้ำที่ทราบปริมาตรแน่นอนมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 2.0-3.0 โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นเติมเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของวัฏภาคน้ำลงในวัฏภาคน้ำผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นแยกส่วนเอธิลอะซีเตทเก็บไว้ ทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมส่วนเอธิลอะซีเตททั้งหมดเข้าด้วยกัน กำจัดน้ำที่ปนออกมาโดยการเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส จากนั้นนำส่วนเอธิลอะซีเตทไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน เติมเมธานอลปริมาตร 1 มล. ลงไปละลายสาร PAHs ในขวดก้นกลมที่ใช้ระเหย กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็ก แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ โดยวิธี HPLC ต่อไป เพื่อดูความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของกล้าเชื้อแบคทีเรีย

3.8.4 นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.8.2 และ 3.8.3 มาวิเคราะห์หาปริมาณไพรีนโดยวิธี HPLC (รูปที่ 3.10) ซึ่งมีส่วนประกอบและสภาวะต่างๆ ในระบบ ดังนี้

คอลัมน์ (column)	: inertsill® ODS ขนาด 4.6 x 150 มม.
ตัวชะสาร (Mobile phase)	: เมธานอล 80%
อัตราไหล (Flow rate)	: 1 มล.ต่อนาที
อุณหภูมิคอลัมน์	: 40 °ซ
ความยาวคลื่นแสงอุลตราไวโอเลตที่ใช้ตรวจวิเคราะห์	: 275 นาโนเมตร
ปริมาตรสารที่ฉีด	: 10 ไมโครลิตร

3.9 การตรวจหาปริมาณกลุ่มแบคทีเรีย STK ด้วยวิธี viable plate count

นำขวดที่ 4 จากข้อ 3.7 ที่ทำการทดสอบการรอดชีวิต และการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในสเลอร์รีดิน มาตรวจหากลุ่มแบคทีเรีย STK และแบคทีเรียในดิน โดยนำดินมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) ที่เติมไซโคลเฮกซามีด เข้มข้น 200 มก.ต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 3

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น ติดตามการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK และแบคทีเรียในดิน โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

3.10 ติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ในช่วงเวลาของการบำบัดด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

3.10.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) (ถ้าเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จะใช้เวลาประมาณ 3 วัน) ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์เป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 567 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นเติม 10% SDS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และโปรตีเนสเค (Proteinase K) (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของโปรตีเนสเคใน 0.5% SDS) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย (ประมาณ 0.7-0.8 มิลลิลิตร) ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้ติดส่วนตะกอนไปด้วย) จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโปรพานอลปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาจนกระทั่งตะกอนขาวของดีเอ็นเอปรากฏ หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของไอโซโปรพานอลทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธานอล 70% ที่เย็นจัด

ปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆ เทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอใน บัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และใส่ RNase A (ภาคผนวก ข) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

3.10.2 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน

สกัด DNA จากชุดการทดลอง ตามวิธีของ Sei และคณะ (2000) โดยชั่งดิน 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ เติม High extraction buffer 440 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) เติมโปรตีนเนสเค (proteinase K) 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติม 10% SDS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37°ซ นาน 2 ชั่วโมง โดยผสมให้เข้ากัน ทุก 20 นาที หลังจากนั้นสกัดด้วยสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) 2 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนน้ำใสและเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) เท่ากับปริมาตรของส่วนน้ำใส ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

เก็บส่วนน้ำใสซึ่งมีดีเอ็นเอลงในหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติม 3 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตต (ภาคผนวก ข)ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใส เติมเอธานอล 100% ที่เย็นจัดปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด นำไปแช่แข็งที่ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –70°ซ นาน 15 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70% ที่เย็นจัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ระเหยเอธานอลออกจากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอใน บัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) 50 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ 4 °ซ จนกว่าจะใช้

3.10.3 กำจัด humic acid และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1% (ภาคผนวก ข) ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ความ เข้มข้น 1 เท่า เทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกา

โรสแข็งตัวประมาณ 20 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ TAE ให้ท่วมเหนืออะกาโรสเจล 2-3 มม. ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตามหยอดลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ในบัฟเฟอร์ TAE นาน 1 นาที นำไปดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV)

ตัดส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอจากเจล และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย Geneclean II Kit (Q-BIOgene, USA) ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยนำเจลที่ตัดได้ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ และชั่งน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจลโดยหักออกจากน้ำหนักหลอดเปล่า เติม NaI ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ จนกระทั่ง อะกาโรสเจลละลายหมด เติม glass milk ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อ 1 ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที โดยเขย่าทุก 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอจับกับ glass milk ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสออก แล้วเติม washing buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยไมโครปิเปต นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนน้ำใสออกจนหมด โดยทำซ้ำ 2 รอบ นำไประเหยแห้งโดยบ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ นาน 5 นาที เติมน้ำปลอดประจุที่ฆ่าเชื้อแล้ว (ภาคผนวก ข) ปริมาตรเท่ากับปริมาตร glass milk ที่เติม บ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนน้ำใสที่มีดีเอ็นเออยู่เก็บไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ 4°ซ จนกว่าจะนำมาใช้

3.10.4 วิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260} X 50 X dilution factor

ตามวิธีของ Sambrook และ Russell (2001)

3.10.5 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย

โดยใช้ไพรเมอร์ EUB f933 ซึ่งมี GC clamp เชื่อมต่อบริเวณ 5' และ EUB r1387 (Kawai และคณะ, 2002) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR มีความยาวประมาณ 500 bp โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยา เป็นดังนี้

-10X PCR buffer	5 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1X buffer)	
- สารละลาย EUB f933 primer ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์	1 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 ไมโครโมลาร์)	
- สารละลาย EUB r1387 ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์	1 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 ไมโครโมลาร์)	
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร
- เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (ความเข้มข้นสุดท้าย 1.25 U)	0.25 ไมโครลิตร
-ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.3.4.3 (ประมาณ 100 นาโนกรัม)	
-น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ จนกระทั่งมีปริมาตรสุทธิ	50 ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

1. Initial denaturation step	อุณหภูมิ 94°ซ	เวลา 5 นาที
2. Touchdown program จำนวน 20 รอบ		
2.1 Denaturation step	อุณหภูมิ 94°ซ	เวลา 1 นาที
2.2 Annealing step	อุณหภูมิ 65°ซ	เวลา 1 นาที
(อุณหภูมิลดลงทีละ 0.5°ซ ในแต่ละรอบ)		
2.3 Extension step	อุณหภูมิ 72°ซ	เวลา 2 นาที
3. Denaturation step	อุณหภูมิ 94°ซ	เวลา 1 นาที
4. Annealing step	อุณหภูมิ 60°ซ	เวลา 1 นาที
5. Extension step	อุณหภูมิ 72°ซ	เวลา 2 นาที

6. ทำขั้นตอนที่ 3-5 จำนวน 30 รอบ

7. Final extension อุณหภูมิ 72°ซ เวลา 10 นาที

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) (Biorad,USA)

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ซึ่งทำโดยเตรียม อะกาโรสเข้มข้น 1% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ TAE 1 เท่า (ภาคผนวก ข) เทลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 20 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายเอ็นเอกับสีติดตาม หยอดดีเอ็นเอและหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิสโดยใช้ชุดทำอีเลคโทรโฟเรซิส Mupid ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 1 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 (Bio-Rad, USA.)

3.10.6 วิเคราะห์ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

ใช้อุปกรณ์ของ DCode™ system (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) ในการวิเคราะห์ DGGE โดยเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจล ที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 40 – 70% (ภาคผนวก ข) (100% denaturant ประกอบด้วย 7 M urea และ 40% formamide) ซึ่งทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant โดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต เมื่อทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant ลงในชุดแชนวิชเตรียมเจลแล้ว เสียบหวีลงไประหว่างกระจกแชนวิช โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้พอลิอะคริลาไมด์แข็งตัว นำชุดเจลแชนวิชใส่ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 6.8 ลิตร ที่ผ่านการให้ ความร้อนจนอุณหภูมิประมาณ 55°ซ ผสมผลิตภัณฑ์ PCR กับสีติดตามหยอดลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ที่ 60°ซ นาน 10 ชม. และย้อมพอลิอะคริลาไมด์เจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) นาน15 นาที นำไปดูด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 (Bio-Rad, USA.)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินและเศษใบไม้ที่นำมาใช้ในการทดลอง

เศษใบไม้ที่ใช้ในการทดลองเก็บมาจากบริเวณภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เศษใบไม้ประกอบด้วย ใบจามจุรี ใบหูกวาง ใบโพธิ์ และใบประดู่ ผสมกัน ผลวิเคราะห์ทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของเศษใบไม้ที่นำมาใช้ แสดงในตารางที่ 4.1 จากผลการวิเคราะห์พบว่าเศษใบไม้มีลักษณะเป็นกรด ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส (C:N:P) เท่ากับ 100:4:0.6 ใกล้เคียงกับค่าที่เหมาะสม (100:15:3) ต่อการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน (Zitrides, 1983; Riser-Robert, 1998)

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของเศษใบไม้

พารามิเตอร์	ผลการวิเคราะห์
ความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (%)	74.76**
ความเป็นกรดด่าง	5.4-5.7**
ปริมาณอินทรีย์คาร์บอน(%)	31.26*
ปริมาณไนโตรเจน(%)	1.27*
ปริมาณฟอสฟอรัส(%)	0.18*
ปริมาณโพแทสเซียม(%)	0.98*
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน(%)	25:1*

หมายเหตุ * วิเคราะห์โดย ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

** ภาคผนวก ข

สำหรับดินที่ใช้ในการทดสอบการอยู่รอดและความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของ STK ที่เก็บในเศษใบไม้และวิธีไลโอฟิไลซ์เก็บมาจากสวนผลไม้ ฝั่งธนบุรี กรุงเทพฯ เป็นลักษณะดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ เนื้อดินมีลักษณะร่วน ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส (C:N:P) เท่ากับ 100:14.4:0.3 ใกล้เคียงกับค่าที่เหมาะสม 100:10:1 ต่อการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน (Sang-Hwan Leeและคณะ, 2006) โดยที่แหล่งดินนี้ไม่มีการปนเปื้อนจากสาร

PAHs ตวรจสอบโดยการสกัดและวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินได้มาจาก ฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่4.2 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่นำมาใช้ในการทดลอง

พารามิเตอร์	ผลการวิเคราะห์
ลักษณะดิน	ดินร่วนปนทราย
ความเป็นกรดด่าง	7.4**
ความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (%)	53.46**
ค่าความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุหรืออิออน ($cmol_c kg^{-1}$)	25.6**
ปริมาณสารอินทรีย์ (%)	6.10*
ปริมาณคาร์บอน(%)	3.54*
ปริมาณไนโตรเจน(%)	0.51*
ปริมาณฟอสฟอรัส(%)	0.30*
ปริมาณโพแทสเซียม(%)	1.10*
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน(%)	6.94*

หมายเหตุ * วิเคราะห์โดย ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

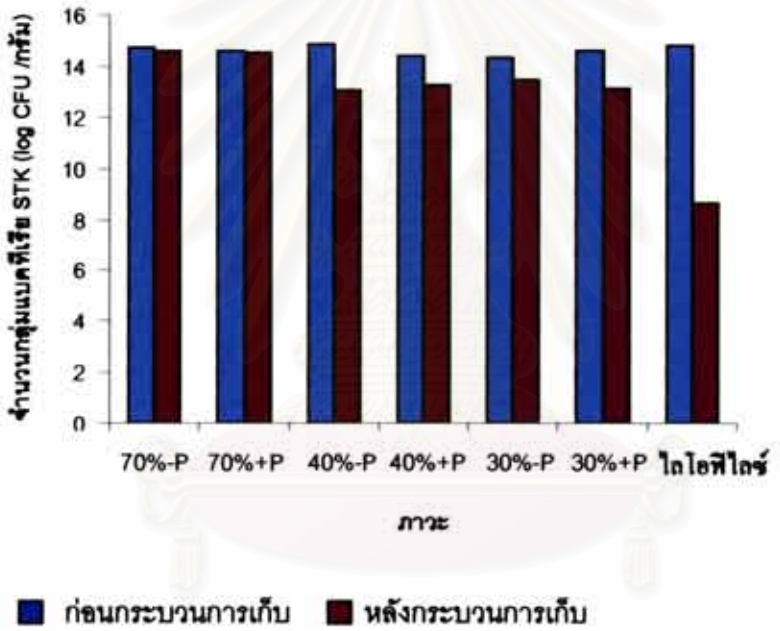
** วิเคราะห์โดยฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

4.2 จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้

จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้ในวันที่ 0 มีความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 10^{12} CFU / กรัมของเศษใบไม้ หลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 14 วันก่อนที่จะนำไปผ่านกระบวนการเก็บรักษา จำนวนกลุ่มแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 10^{14} CFU / กรัมของเศษใบไม้ แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK ใช้สารอาหารจากเศษใบไม้ในการเจริญเติบโต

4.3 จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ที่ภาวะต่างๆ ก่อนและหลังผ่านกระบวนการเก็บ

จากการทดลองเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ที่ภาวะต่างๆ และเก็บรักษาด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ ปริมาณตั้งต้นของกลุ่มแบคทีเรีย STK ก่อนกระบวนการเก็บรักษาที่ภาวะต่างๆ ที่มีค่า log CFU/ กรัมของเศษใบไม้ ประมาณ 14 พบว่าหลังกระบวนการเก็บจำนวนกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ลดลงทุกภาวะการเก็บแสดงในรูปที่ 4.1 โดยพบว่าหลังการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ร่วมกับเศษใบไม้ที่ภาวะความชื้น 40% และ 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ จำนวนเชื้อลดลงมากกว่าที่ภาวะความชื้น 70% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ และขั้นตอนการเก็บด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ ทำให้จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK ลดลงมากที่สุด



รูปที่ 4.1 จำนวนกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ ที่ภาวะต่างๆ ก่อน และหลังผ่านกระบวนการเก็บ (–P: ไม่มีไพริน และ +P: มีไพริน)

4.4 ผลของการอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาในเศษใบไม้เป็นเวลา 0 4 8 และ 12 เดือน

จากตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าหลังจากเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK เป็นเวลา 4 8 และ 12 เดือน จำนวนของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บโดยเลี้ยงในเศษใบไม้ลดลงทุกภาวะการเก็บรักษา กลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์มีการรอดชีวิตสูงกว่าวิธีที่เก็บรักษาด้วยการเลี้ยงกล้าเชื้อในเศษใบไม้ โดยพบว่าค่า log CFU / กรัมเศษใบไม้ ลดลงจาก 8.62 เป็น 7.67 7.47 และ 7.10 หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ลดลง 11.02 %13.34% และ17.63% ตามลำดับ พบว่าที่เวลา 4 และ8 เดือนในภาวะการเก็บรักษากล้าเชื้อ STK ในใบไม้ที่ความชื้น 30% ของค่าความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีน และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ มีการรอดชีวิตใกล้เคียงกับไลโอฟิไลซ์ คือ ค่า log CFU / กรัมเศษใบไม้ จาก 12.95 เป็น 10.51 และ 9.15 ลดลงคิดเป็น 18.84% และ 29.34% ตามลำดับ ซึ่งภาวะการเก็บนี้เป็นวิธีการเก็บกล้าเชื้อ STK ร่วมกับใบไม้ที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับภาวะอื่นๆ

ตารางที่4.3 การอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาในเศษใบไม้ ที่ภาวะต่างๆ และวิธีไลโอฟิไลซ์เป็นเวลา 0 4 8 และ12 เดือน

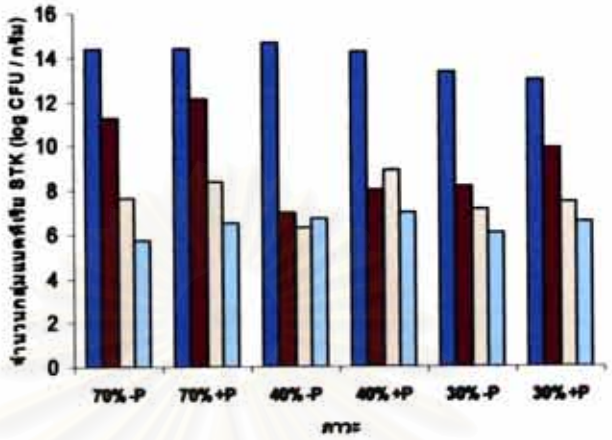
เดือน	ค่า log cfu / กรัม												
	70%-P		70%+P		40%-P		40%+P		30%-P		30%+P		Lyo
	RT	4 °ซ	RT	4 °ซ	RT	4 °ซ	RT	4 °ซ	RT	4 °ซ	RT	4 °ซ	4 °ซ
0	14.41	14.41	14.38	14.38	14.65	14.65	14.23	14.23	13.32	13.32	12.95	12.95	8.62
4	11.26	11.17	12.13	11.46	6.95	8.66	8.02	8.83	8.13	9.88	9.88	10.51	7.67
8	7.64	9.37	8.38	9.04	6.28	8.84	8.90	7.75	7.12	8.25	7.42	9.15	7.47
12	5.74	7.68	6.50	7.17	6.70	8.13	6.95	8.09	6.05	7.05	6.56	8.19	7.10

หมายเหตุ –P: ไม่มีไพรีน และ +P: มีไพรีน

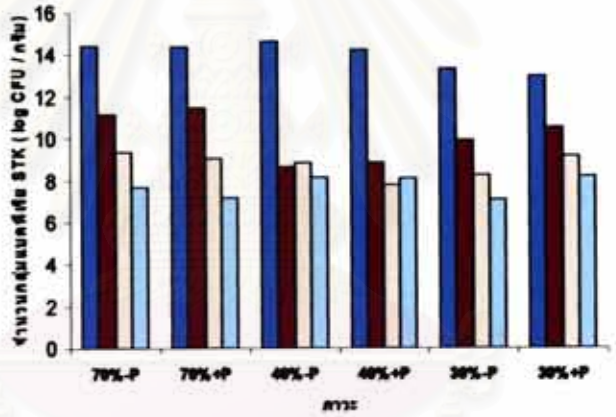
4.4.1 ผลของการมีและไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บต่อการอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาในเศษใบไม้เป็นเวลา 0 4 8 และ 12 เดือน

จากการทดลองพบว่า การเก็บรักษากล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ที่ภาวะความชื้น 70% 40% และ 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ที่มีการเติมไพรีนระหว่างการเก็บจำนวนเชื้อมีการรอดชีวิตสูงกว่าภาวะที่ไม่มีการเติมไพรีน แสดงในรูปที่ 4. 2

ก) เก็บที่อุณหภูมิห้อง



ข) เก็บที่ 4 °ซ



0 เดือน 4 เดือน 8 เดือน 12 เดือน

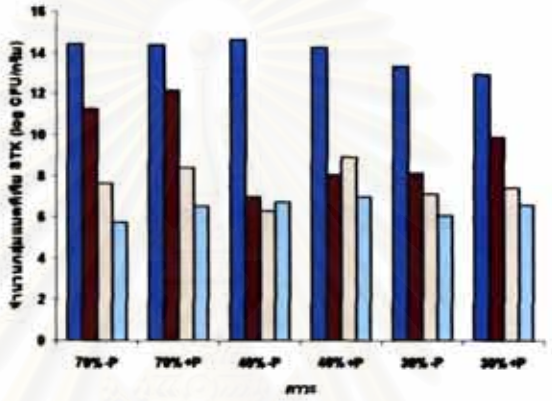
รูปที่ 4.2 ก) และ ข) จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาในเศษใบไม้ที่ภาวะต่างๆ มีไพรีน และไม่มีไพรีนในการเก็บ เป็นเวลา 0 4 8 และ 12 เดือน (–P: ไม่มีไพรีน และ +P: มีไพรีน)

4.4.2 ผลของอุณหภูมิในการเก็บต่อการอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาในเศษใบไม้เป็นเวลา 0 4 8 และ 12 เดือน

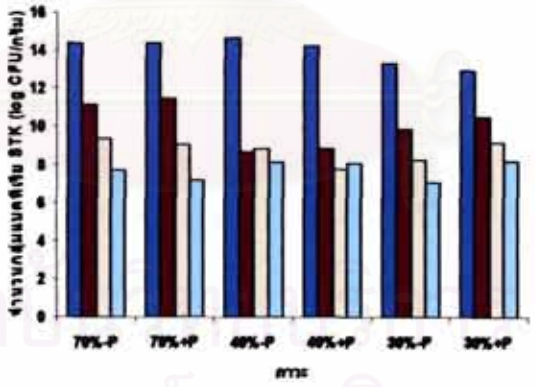
การเก็บรักษากล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ให้การอยู่รอดชีวิตสูงกว่าที่อุณหภูมิห้องแสดงในรูปที่ 4.3 ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับงานของ Trivedi และคณะ (2005) ที่ศึกษาการสร้างกล้าเชื้อของแบคทีเรียสองชนิด คือ *Bacillus subtilis* และ

Pseudomonas corrugata ที่ตรึงอยู่บนวัสดุพาหะ และเก็บภายใต้อุณหภูมิ 4 °ซ และที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าจำนวนของเซลล์ที่เก็บที่อุณหภูมิห้องลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับที่เก็บที่4 °ซ เนื่องจากที่อุณหภูมิ 4-10 ° ซ จะยับยั้งการแบ่งตัวและกิจกรรมต่างๆภายในเซลล์แบคทีเรีย เป็นผลให้เกิดการที่เซลล์ลดการใช้สารอาหาร (Van Shrevan, 1970)

ก) **เก็บที่อุณหภูมิห้อง**



ข) **เก็บที่ 4°ซ**



■ 0 เดือน ■ 4 เดือน □ 8 เดือน □ 12 เดือน

รูปที่ 4.3 การอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในภาวะต่างๆ เมื่อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ก) และ 4 °ซ (ข) เป็นเวลาที่ 0 4 8 และ 12 เดือน (–P: ไม่มีไพรีน และ +P: มีไพรีน)

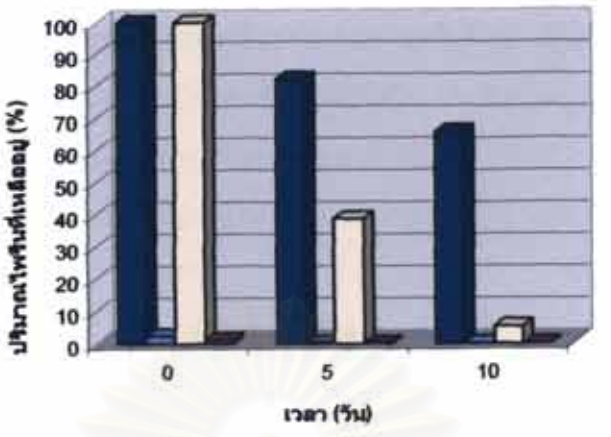
4.4.3 ผลของความชื้นในการเก็บต่อการรอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บในเศษใบไม้เป็นเวลา 0 4 0 8 และ 12 เดือน

เมื่อเวลาผ่านไป 12 เดือน พบว่าจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บในภาวะความชื้น 40% และ 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีการรอดชีวิตสูงกว่าที่ภาวะความชื้น 70% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำแสดงในรูปที่ 4.3 เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไป 4 เดือนพบว่าการเก็บที่ภาวะความชื้น 70% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ เก็บที่อุณหภูมิห้อง ถุงอะลูมิเนียมมีลักษณะโป่ง สาเหตุอาจเกิดจากกลุ่มแบคทีเรีย STK ใช้สารอาหารจากเศษใบไม้ในการเจริญเติบโตและผลิตแก๊สออกมา และพบว่าภาวะการเก็บที่ 4 °ซ ให้อัตราการรอดชีวิตสูงกว่าที่อุณหภูมิห้อง และการเก็บด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ยังคงให้อัตราการรอดชีวิตที่สูงเมื่อเวลาผ่านไป 12 เดือน

4.5 ผลของความสามารถในการย่อยสลายของ STK ในกล้าเชื้อที่เลี้ยงด้วยเศษใบไม้ ที่ภาวะต่างๆ เป็นเวลา 0 4 8 และ12 เดือน

เมื่อทำการทดลอบความสามารถในการย่อยสลายไพรีน 100 ppm ในดิน ใช้ภาวะเสลอรี เนื่องจากระบบเสลอรีจะให้ผลสูงสุดในการย่อยสลาย ทั้งนี้เพราะไพรีนสามารถสัมผัสกับเซลล์ของแบคทีเรียได้อย่างทั่วถึง โดยใช้กล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ และจากไลโอฟิไลซ์ ใส่ลงในสเลอรีดินที่ไม่ปลอดเชื้อ บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 10 วัน ผลการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในส่วนวัฏภาคน้ำเทียบกับส่วนวัฏภาคดิน โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณเริ่มต้นวันที่ 0 ส่วนวัฏภาคดินในชุดควบคุมและชุดทดลองเป็น 100 % เนื่องจากปริมาณไพรีนเริ่มต้นในชุดควบคุมและชุดทดลองไม่เท่ากัน พบว่าไพรีนจะติดอยู่ในส่วนวัฏภาคดินมากกว่าวัฏภาคน้ำ 1000 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 4.4 จึงทำการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนเฉพาะส่วนวัฏภาคดิน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.4 แผนภูมิแท่งแสดงการย่อยสลายไพรีนในสเลอรีอัตราส่วนดินต่อน้ำ เท่ากับ 1:8 โดยกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ เมื่อผ่านกระบวนการลดความชื้น และอยู่ในสภาพสุญญากาศก่อนการเก็บที่ 4 °ซ และอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0 เดือน

4.5.1 ผลของภาวะการเก็บรักษากล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ที่ความชื้นต่าง ๆ ต่อความสามารถในการย่อยสลายไพรีน

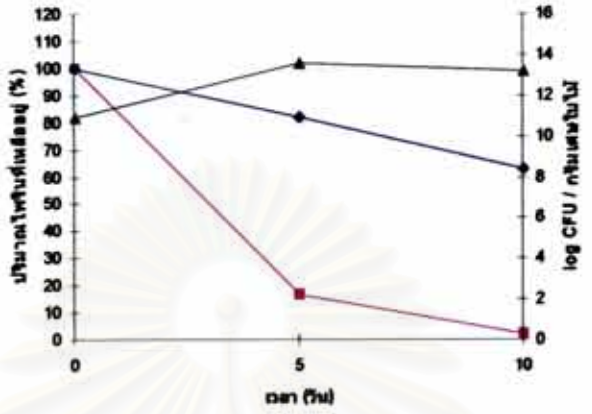
ผลการทดลองจากตารางที่ 4.4 พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 4 8 และ 12 เดือน กลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บโดยเลี้ยงในเศษใบไม้สามารถย่อยสลายไพรีนได้ดีกว่าการเก็บด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ เนื่องจาก เศษใบไม้ช่วยเพิ่มการเจริญและอยู่รอด และก่อให้เกิดการกระจายตัวของกลุ่มแบคทีเรีย STK เมื่อเติมลงดิน เป็นผลให้กลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถสัมผัสกับไพรีนในดินได้อย่างทั่วถึง จึงสามารถย่อยสลายไพรีนได้ดี และ จากตารางที่ 4.4 เดือนที่ 8 ของการเก็บ ภาวะการเก็บรักษากลุ่ม STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้ที่ความชื้น 30% ของค่าความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ที่มีไพรีน เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ให้การย่อยสลายไพรีนดีที่สุด มีปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ เท่ากับ 2.11 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ ที่มีปริมาณไพรีนเหลืออยู่เท่ากับ 10.44 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าการเก็บโดยไลโอฟิไลซ์ถึงแม้จะยังคงทำให้เชื้อแบคทีเรียมีชีวิตรอดได้ดี แต่ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนในดินจะสู้การเก็บด้วยการเลี้ยงในใบไม้แล้วลดความชื้นและอากาศไม่ได้ และภาวะการเก็บรักษากลุ่ม STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้ที่ความชื้น 30% ที่มีไพรีนผสมอยู่ เก็บที่อุณหภูมิห้อง สามารถย่อยสลายได้ดีรองลงมาจากการเก็บที่ 4 °ซ และมีค่าใกล้เคียงกับการเก็บ

โดยวิธีไลโอฟิไลซ์ จากผลการทดลองจะเห็นว่า ภาวะการเก็บรักษากลุ่ม STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้ที่ความชื้น 30% ของค่าความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำที่มีไพรีน เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ และที่อุณหภูมิห้อง ให้การย่อยสลายไพรีนดีที่สุดเมื่อเทียบกับภาวะการเก็บอื่นๆ

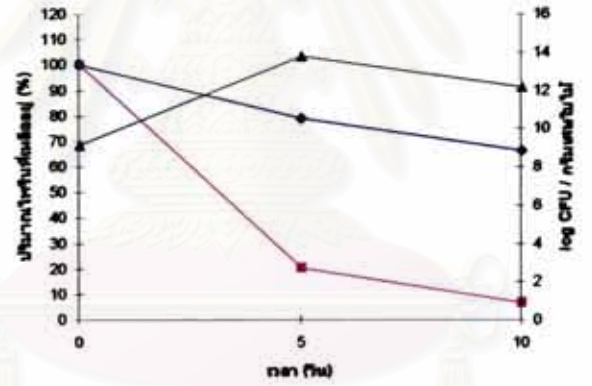
ตารางที่4.4 แสดงปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในสเลอรีดินทุกวันที่ 0 และ 10

ภาวะ	ไพรีน	อุณหภูมิ	วัน	ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ (%)			
				0 เดือน	4 เดือน	8 เดือน	12 เดือน
ความชื้น30%	ไม่มี	4 °ซ	0	100	100	100	100
			10	9.02	2.20	5.01	10.46
		อุณหภูมิห้อง	0	100	100	100	100
			10	6.51	19.54	11.7 5	7.61
	มี	4 °ซ	0	100	100	100	100
			10	15.22	3.37	2.11	6.84
		อุณหภูมิห้อง	0	100	100	100	100
			10	7.5	1.91	6.04	4.08
ความชื้น40%	ไม่มี	4 °ซ	0	100	100	100	100
			10	7.32	6.89	5.82	9.33
		อุณหภูมิห้อง	0	100	100	100	100
			10	9.7	7.56	10.88	18.46
	มี	4 °ซ	0	100	100	100	100
			10	3.22	28.96	34.58	30.61
		อุณหภูมิห้อง	0	100	100	100	100
			10	6.00	13.16	5.52	22.04
ความชื้น70%	ไม่มี	4 °ซ	0	100	100	100	100
			10	5.87	8.65	20.37	34.93
		อุณหภูมิห้อง	0	100	100	100	100
			10	11.89	43.46	47.28	41.46
	มี	4 °ซ	0	100	100	100	100
			10	7.02	3.10	3.37	8.46
		อุณหภูมิห้อง	0	100	100	100	100
			10	5.17	5.69	48.07	47.96
ไลโอฟิไลซ์	ไม่มี	4 °ซ	0	100	100	100	100
			10	12.42	8.2	10.44	10.95

ก) 8 เดือน



ข) 12 เดือน



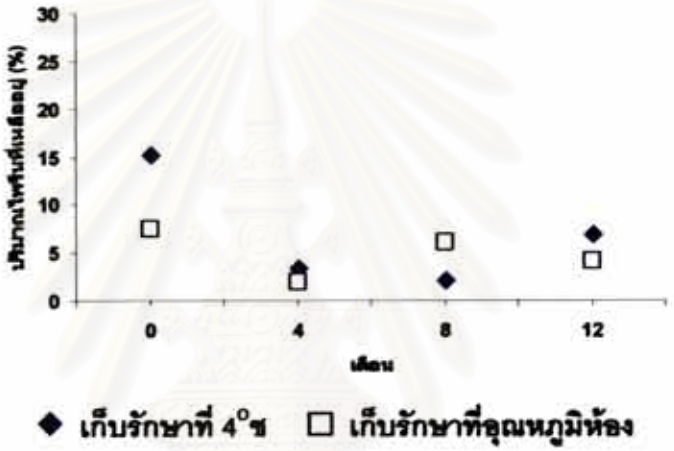
ปริมาณไพรีนในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

ปริมาณไพรีนในชุดทดลองที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย

รูปที่ 4.5 การย่อยสลายไพรีนในสเลอรีดิน และจำนวนกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK (เก็บรักษาในภาวะ ความชื้น 30 % มีไพรีน เก็บที่ 4 °ซ เป็นเวลา 8 (ก) และ12 (ข) เดือน) เป็นเวลา 10 วัน

จากรูปที่ 4.5 แสดงการย่อยสลายไพรีนในสเลอรีดินที่วันที่ 0 5 10 และอัตราการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาโดยเลี้ยงในเศษใบไม้ เก็บที่ภาวะความชื้น 30 % ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่ 4 °ซ ในเดือนที่ 8 และ 12 ปริมาณไพรีนในวันที่ 10 เหลืออยู่เท่ากับ 2.11 และ 6.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นว่าการย่อยสลายยังคงประสิทธิภาพได้ดีเมื่อเวลาผ่านไป 12 เดือน และพบว่าการเก็บในภาวะความชื้น 30 % ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่อุณหภูมิห้อง ก็ยังคงย่อยสลายไพรีนได้ดีเช่นกันเมื่อเวลาผ่านไป 12 เดือนแสดงในรูปที่ 4.6

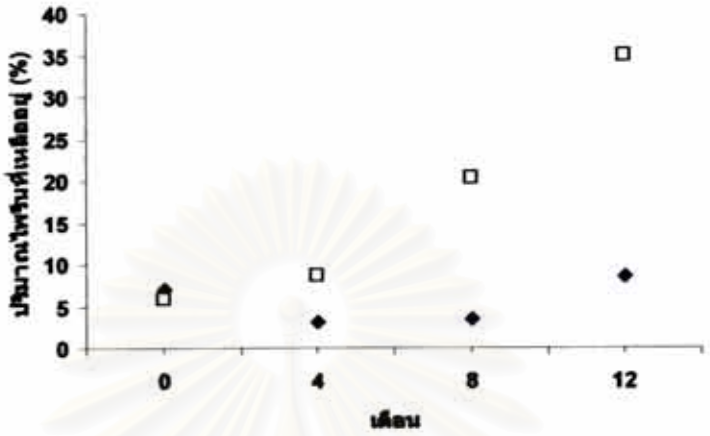


รูปที่ 4.6 เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในสเลอรีดิน ในวันที่ 10 ของการบ่ม เมื่อเก็บกล้าเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4°ซ โดยเก็บที่ภาวะความชื้น 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ ที่เวลา 12 เดือน

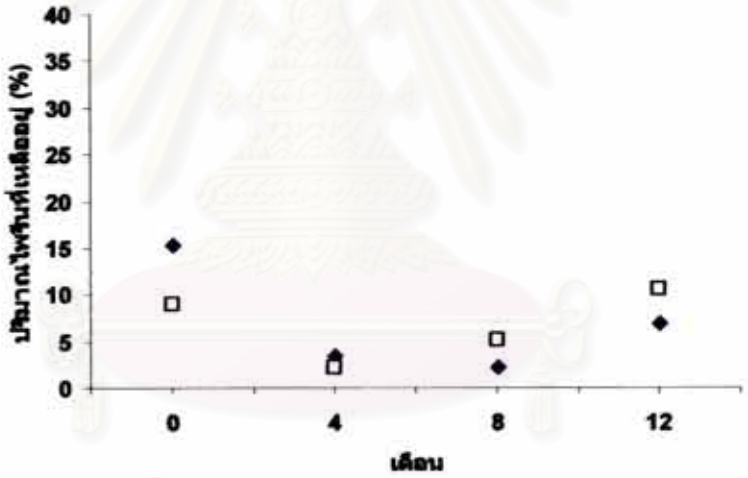
4.5.2 ผลของการมีและไม่มีไพรีนในการเก็บรักษากล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ ต่อความสามารถในการย่อยสลายไพรีน

ภาวะการเก็บรักษากลุ่ม STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้ที่ความชื้น 70% และ 30% ของค่าความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ที่มีไพรีนระหว่างการเก็บ สามารถย่อยสลายไพรีนได้ดีกว่าไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บซึ่งสอดคล้องกับผลของการอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK แสดงให้เห็นว่า การเติมไพรีนลงไปในกล้าเชื้อที่เก็บรักษา ทำให้กล้าเชื้อมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดีกว่าไม่เติมไพรีนดังแสดงในรูปที่ 4.7

ก) ภาวะการเก็บรักษาที่ความชื้น 70%ของค่าความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ



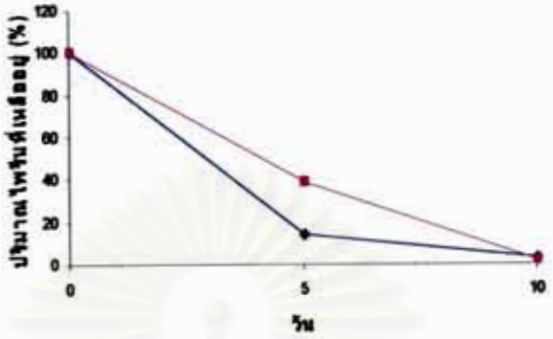
ข) ภาวะการเก็บรักษาที่ความชื้น 30%ของค่าความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ



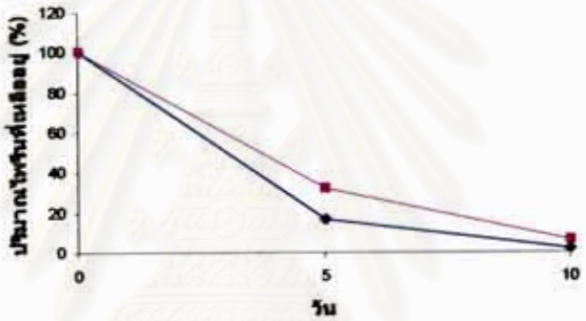
◆ มีไพรีนระหว่างการเก็บรักษา □ ไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บรักษา

รูปที่ 4.7 เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในสเลอรีดินในวันที่ 10 ของการบ่ม เมื่อมีและไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บกล้าเชื้อ ที่ความชื้น 70% (ก) และ30% (ข) ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ในเวลา 0 4 8 และ 12 เดือน

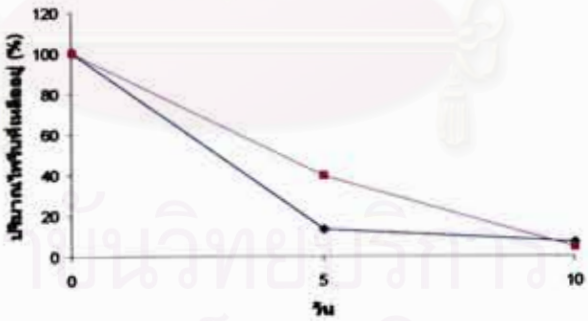
ก) เดือน 4



ข) เดือน 8



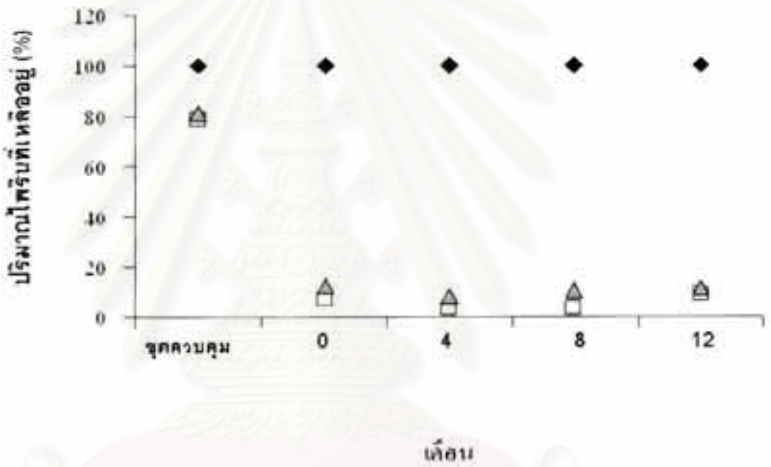
ค) เดือน 12



รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในสเลอรีดิน โดยกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้เก็บเป็นเวลา 4 เดือน (ก) 8 เดือน (ข) และ 12 เดือน (ค) ที่ภาวะความชื้น 30%ของค่าความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีน เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ และ อุณหภูมิห้อง

4.5.3 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษากล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ในศษใบไม้ ต่อความสามารถในการย่อยสลายไพรีน

จากผลข้างต้นพบว่า ภาวะการเก็บรักษากลุ่ม STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้ที่ความชื้น 30% ของค่าความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำที่มีไพรีน เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ และที่อุณหภูมิห้อง ให้การย่อยสลายไพรีนดีที่สุดเมื่อเทียบกับภาวะการเก็บอื่นๆ แต่จากรูปที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่า การเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้ เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ให้อัตราการย่อยสลายเร็วกว่าเก็บที่อุณหภูมิห้อง



◆ วันที่ 0 □ วันที่ 10 ของชุดทดลองที่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ที่เก็บในภาวะความชื้น 70% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ เก็บที่ 4 °ซ
△ วันที่ 10 ของชุดทดลองที่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ที่เก็บด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์

รูปที่ 4.9 แสดงเปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในสเลอรีดิน โดยกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ที่เก็บในภาวะความชื้น 70% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ เก็บที่ 4 °ซ และกล้าเชื้อที่เก็บด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ เมื่อเวลาผ่านไป 0 4 8 และ 12 เดือน

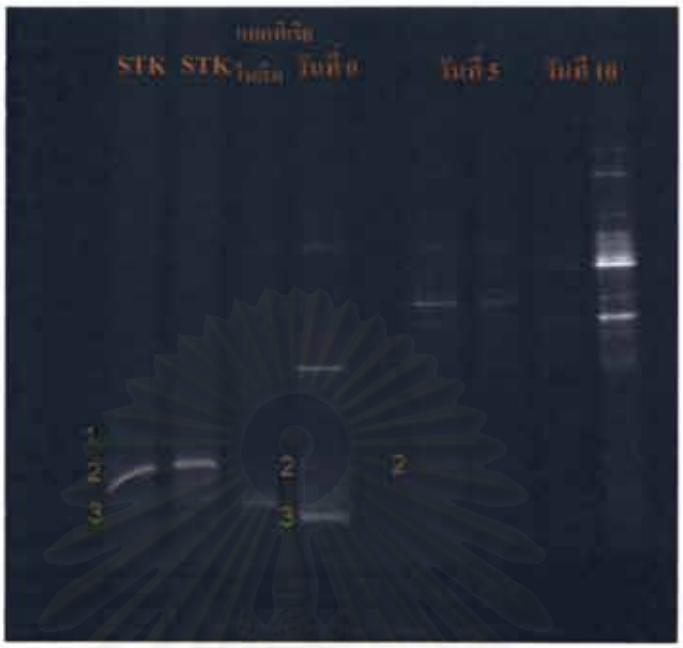
และจากผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ที่ความชื้น 70 % ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่ 4 °ซ ให้อัตราการย่อยสลายได้ดีกว่าการเก็บด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์แม้เวลาจะผ่านไป 12 เดือน แสดงในรูปที่ 4.9

4.6 ผลของการติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ในช่วงเวลาของการบำบัดด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

การติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ในช่วงเวลาของการบำบัด ได้ออกแบบชุดการทดลองเป็น 5 ชุดการทดลอง

1. กลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมเปรียบเทียบตำแหน่งของแบคทีเรียแต่ละชนิดของกลุ่มแบคทีเรีย STK บนพอลิอะคริลาไมด์เจล
2. การสลายตัวของไพรีนในสเลอรีดินไม่ปลอดเชื้อ
3. การสลายตัวของไพรีนในสเลอรีดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาในเศษใบไม้ วันที่ 0 ของการบำบัดในสเลอรีดิน
4. การสลายตัวของไพรีนในสเลอรีดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาในเศษใบไม้ วันที่ 5 ของการบำบัดในสเลอรีดิน
5. การสลายตัวของไพรีนในสเลอรีดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บรักษาในเศษใบไม้ วันที่ 10 ของการบำบัดในสเลอรีดิน

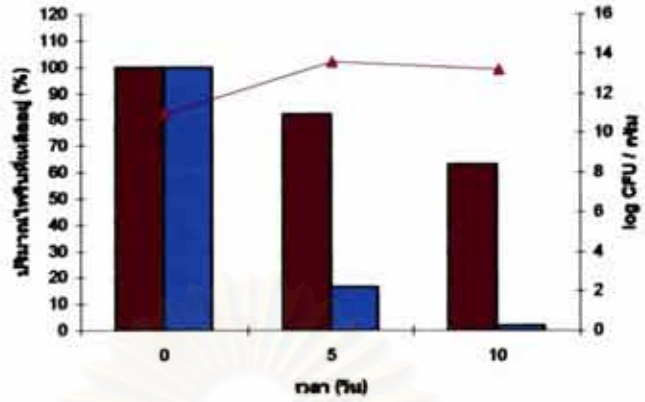
ติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียในช่วงเวลาการบำบัดในสเลอรีดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีน 100 ppm ทำได้โดยการสกัดดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ต่างๆจากตัวอย่างดิน ปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอแม่แบบให้เท่ากัน จากนั้นเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ซึ่งมีขนาดประมาณ 500 bp ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40% -70%denaturant ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้ แถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK ประกอบด้วยแถบที่ 1 2 และ 3 เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม ในช่วงการบำบัดของวันที่ 0 5 10 พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นตรงกับแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก คือแถบที่ 1 และ 2 จากรูปที่ 4.10 พบว่า ในวันที่ 0 ของการบำบัด กลุ่มแบคทีเรีย STK มีความโดดเด่นที่สุดและยังพบเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในดินตลอดช่วงเวลาของการทดลองในวันที่ 5 และ 10 ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในรูปที่ 4.12 ซึ่งยังคงพบโคโลนีของกลุ่มแบคทีเรีย STK ประกอบด้วย STK1 STK2 และSTK3 ที่มีลักษณะแตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ตลอดการทดลอง และสอดคล้องกับการสลายตัวของไพรีนในรูปที่ 4.11 ซึ่งในวันที่ 5 ของการบำบัด จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจากค่า log cfu / กรัมเศษใบไม้ เท่ากับ 10.94 เป็น 13.57 และลดลงในวันที่ 10 เป็น 13.21



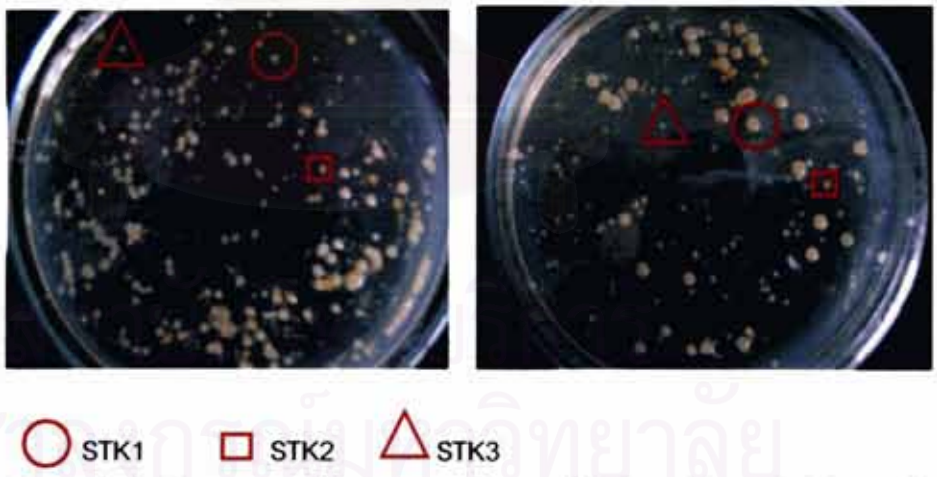
1 : STK1 2 : STK2 3 : STK3

รูปที่ 4.10 แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rDNA แสดงพลวัตรประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองการสลายตัวของไพรีนในสเลอรีดินไม่ปลอดเชื้อ ที่ผสมกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เวลาต่าง ๆโดยวิธี DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40%-70% denaturant

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.11 การเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่(%) ในสเลอรีดินที่ไม่ปลอดเชื้อ ที่ได้จากการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ ที่ภาวะความชื้น 30 % ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่ 4 °ซ เวลา 8 เดือน (นำมาติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ในช่วงเวลาของการบำบัดด้วยวิธี DGGE)



รูปที่ 4.12 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง LB ของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในการบำบัดสเลอรีดิน (อัตราส่วนดินต่อน้ำ เท่ากับ 1:8) โดยเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับเศษใบไม้ที่ภาวะความชื้น 30 % ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่ 4 °ซ เวลา 8 เดือน

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ทิมากร แสงดำ (2547) ได้คัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย STK จากใบมะขาม โดยใช้แผ่นพอลิเตตระฟลูออโรเอทธิลีน (PTFE) ที่เคลือบด้วยไพรีน เป็นผลให้กลุ่มแบคทีเรีย STK ใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต และมีสมบัติไฮโดรโฟบิกสูง ซึ่งกลุ่มแบคทีเรีย STK ประกอบด้วยแบคทีเรีย STK1 STK2 และ STK3 ที่มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียที่จัดอยู่ในจีนัส *Zoogloea* sp., *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. เมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรีย STKที่เลี้ยงในอาหารเหลวในห้องปฏิบัติการลงในดินธรรมชาติ เพื่อบำบัดการปนเปื้อนไพรีนโดยตรง กลุ่มแบคทีเรีย STK จะลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว เกิดจากกลุ่มแบคทีเรีย STK มีสมบัติไฮโดรโฟบิกสูงเป็นผลให้เชื้อไม่สามารถกระจายตัว เนื่องจากในระบบทดลองในดินเป็นสภาวะนิ่งไม่ได้มีการเขย่าตลอดเวลาดังเช่นการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีการเขย่าตลอดระยะเวลาของการทดลอง (ปิยะวรรณ เพชราภา, 2549) และกลุ่มแบคทีเรีย STK ไม่คุ้นเคยกับสภาพการเจริญในสภาวะการเลี้ยงในของแข็งเช่นดินธรรมชาติ และเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทาง Physical Chemical และ Biological ในดิน ส่งผลให้ไม่เกิดการย่อยสลายไพรีน วิธัญญา ขวเจริญพันธ์(2549) ได้ใช้วัสดุทางการเกษตรในการการย่อยสลายสารประกอบ PAHs พบว่าเมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ที่เติมไพรีนเข้มข้น 100 ppm ปรับความชื้นให้ได้ 70 % ของค่าความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ซ ในที่มืด เป็นเวลา 14 วัน พบว่า กลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วและย่อยสลายไพรีนได้ 50 % ของปริมาณไพรีนเริ่มต้น และเมื่อนำกล้าเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ใช้ในการบำบัดการปนเปื้อนไพรีนที่มีความเข้มข้น 100 ppm ในภาวะสเลอรีดินต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 8 พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถเพิ่มการรอดชีวิตและประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีน สามารถย่อยสลายไพรีนเหลือ 0.4% ในภาวะสเลอรีดิน และเมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ ที่มีไพรีน 100 ppm และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK ลดลงไม่ถึงครึ่งหนึ่งของจำนวนที่เติมลงไปตอนต้น และปริมาณไพรีนเหลืออยู่ในเศษใบไม้มีค่าเท่ากับ 4.12% กลุ่มแบคทีเรีย STK มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs จึงมีความสำคัญต่อการบำบัด PAHs ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ให้คงประสิทธิภาพจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นทั้งในด้านงานวิจัยและงานบำบัดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม วิธีทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) ซึ่งเป็นวิธีที่

ยอมรับว่ามีประสิทธิภาพในการเก็บรักษา จุลินทรีย์ สามารถเก็บจุลินทรีย์ได้ครั้งละมากๆ สามารถคงความมีชีวิตของจุลินทรีย์ได้ยาวนานถึง 50 ปีหรือมากกว่านี้ สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (Asa และคณะ, 2006) และให้ผลคุ้มค่าหากจุลินทรีย์นั้นเป็นจุลินทรีย์ที่จัดว่ามีคุณค่ามาก หรือจำเป็นต้องให้บริการแจกจ่ายจุลินทรีย์ให้หน่วยงานอื่นๆ ที่ห่างไกลออกไป แต่เป็นวิธีที่ค่อนข้างยากและใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง

การจะให้กลุ่มแบคทีเรียสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้นานจึงต้องมีการควบคุมปัจจัยที่จำเป็นในการเจริญ เช่น การจำกัดอากาศ อุณหภูมิ ความชื้น สารอาหาร เป็นต้น (Trivedi และคณะ ,2005) ในงานวิจัยนี้ศึกษาการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ที่ภาวะต่างๆ เปรียบเทียบกับการเก็บด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ ซึ่งถือว่าเป็นการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูง โดยใช้เวลา 12 เดือน เศษใบไม้ที่นำมาใช้ในการทดลอง ประกอบด้วยใบจามจุรี ใบหูกวาง ใบโพธิ์ และใบประดู่ผสมกัน เก็บเศษใบไม้ที่ร่วงหล่นมาจากบริเวณภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของเศษใบไม้ที่นำมาใช้ พบว่าเศษใบไม้มีลักษณะเป็นกรด อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส (C:N:P) เท่ากับ 100:4:0.6 ใกล้เคียงกับค่าที่เหมาะสม (100 : 15 :3) ต่อการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน (Zitrides, 1983; Riser-Robert, 1998) สำหรับดินที่นำมาใช้ในการทดสอบการอยู่รอดและความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของ STK นั้นเป็นดินที่ไม่มีการปนเปื้อนของสาร PAHs มาก่อน เก็บมาจากสวนผลไม้ ฝั่งธนบุรี กรุงเทพฯ เป็นลักษณะดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส (C:N:P) เท่ากับ 100:14.4:0.3 ใกล้เคียงกับค่าที่เหมาะสม 100:10:1 ต่อการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน (Sang-Hwan Leeและคณะ, 2006)

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการเพิ่มจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับเศษใบไม้ โดยปรับความชื้นเท่ากับ 70% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ซึ่งเป็นความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญ แบคทีเรียจะใช้เศษใบไม้เป็นที่อยู่อาศัย และเป็นแหล่งของสารอาหาร และเป็นการสร้างความคุ้นเคยให้กับกลุ่มแบคทีเรีย STK ก่อนที่จะเติมลงดินธรรมชาติ และยังเป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดทางชีวภาพ จากการทดลองเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับเศษใบไม้เป็นเวลา 14 วัน (วิธัญญา ชวเจริญพันธ์, 2549) พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK เพิ่มจาก 10^{12} CFU / กรัมของเศษใบไม้ เป็นประมาณ 10^{14} CFU / กรัมของเศษใบไม้ จะเห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK ใช้สารอาหารจากเศษใบไม้ในการเพิ่มจำนวน จากนั้นนำกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ได้มาเก็บรักษาที่ภาวะต่างๆ ได้แก่

1) ความชื้น 70%ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2) ความชื้น 70%ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ เก็บที่ 4 °ซ
3) ความชื้น 70%ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บ เก็บที่อุณหภูมิห้อง
4) ความชื้น 70%ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บ เก็บที่ 4 °ซ
5) ความชื้น 40%ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (ลดความชื้นจากปั๊มของเครื่อง freeze-dryer) มีไพรีนระหว่างการเก็บ เก็บที่อุณหภูมิห้อง
6) ความชื้น 40%ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ เก็บที่ 4 °ซ
7) ความชื้น 40%ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บ เก็บที่อุณหภูมิห้อง
8) ความชื้น 40%ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บ เก็บที่ 4 °ซ
9) ความชื้น 30%ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (ลดความชื้นจากปั๊มของเครื่อง freeze-dryer) มีไพรีนระหว่างการเก็บ เก็บที่อุณหภูมิห้อง
10) ความชื้น 30%ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ เก็บที่ 4 °ซ
11) ความชื้น 30%ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บ เก็บที่อุณหภูมิห้อง
12) ความชื้น 30%ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บ เก็บที่ 4 °ซ

ทุกภาวะมีการกำจัดอากาศออกให้เป็นสุญญากาศด้วยเครื่อง vacuum seal โดยเก็บลงในถุงอะลูมิเนียมเป็นเวลา 12 เดือน เปรียบเทียบกับการเก็บด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ ที่ใช้ 10 % ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น หลังจากผ่านกระบวนการเก็บที่ภาวะต่างๆ ทดสอบอัตราการอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK ด้วยวิธี viable plate count พบว่า ที่ภาวะความชื้น 40% และ 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ จำนวนเชื้อลดลงมากกว่าที่ภาวะความชื้น 70% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ เนื่องจากการลดความชื้นในการเก็บ โดยผ่านขั้นตอนทำให้แห้งแบบเยือกแข็งโดยเครื่อง freeze-dryer ส่งผลต่อการมีชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย STK และขั้นตอนการเก็บด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ทำให้จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK ลดลงมากที่สุด ซึ่งอาจเป็นเพราะปริมาณตั้งต้นของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ใช้มีค่า log CFU / มล. เท่ากับ 14.82 ซึ่งมีค่าสูงมาก ทำให้ 10 % ซูโครสที่ใช้เป็นสารป้องกันความเย็นไม่สามารถจับกับเซลล์ได้หมด เมื่อทดลองใช้กลุ่มแบคทีเรีย STK ตั้งต้นเท่ากับ 10^8 CFU / มล. พบว่าหลังผ่านขั้นตอนการไลโอฟิไลซ์ จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK ลดลงเหลือ 10^7 CFU / มล. ซึ่งเป็นการยืนยันว่าปริมาณกลุ่มแบคทีเรียSTK ที่มีค่า log CFU / มล. เท่ากับ 14.82 สูงเกินไป ดังนั้นการลดลงของจำนวนแบคทีเรียในการทำไลโอฟิไลซ์ที่ทำการทดลองนี้ จึงเกิดจากการใช้ปริมาณเซลล์ที่มากเกินไปในตอนต้น มิใช่เกิดจากขั้นตอนในการทำไลโอฟิไลซ์ เช่นเดียวกับงานของ Schoug และคณะ (2006) พบว่า ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งของ *Lactobacillus coryniformis* Si3 คือ 10^8-10^{10} CFU / มล. และที่

ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^{11} CFU / มล. ส่งผลต่อให้เกิดการลดลงของ water crystallization Costa และคณะ (2000) รายงานว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของเซลล์เริ่มต้นสำหรับทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง ไม่ควรต่ำกว่า 10^{8} CFU / มล. เนื่องจากเซลล์จำนวนมากตายระหว่างการเก็บ และพบว่าความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น สัมพันธ์กับสารป้องกันความเย็นที่ใช้ในการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เมื่อใช้ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 10^{10} CFU/ มล. ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์

เมื่อเวลา 0 4 8 และ 12 เดือนของการเก็บ ทดสอบอัตราการอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK ด้วยวิธี viable plate count พบว่าจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK จากการเก็บรักษาโดยเลี้ยงในเศษใบไม้ที่ภาวะต่างๆและโดยไลโอฟิไลซ์ลดลงทุกภาวะการเก็บ และการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ให้อัตราการรอดชีวิตที่น้อยกว่าวิธีไลโอฟิไลซ์ หลังจากการเก็บด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์เป็นเวลา 4 8 12 เดือนพบว่าจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ลดลงเท่ากับ 11.02 %13.34% และ17.63% ตามลำดับ ในภาวะการเก็บรักษากล้าเชื้อ STK ในใบไม้ที่ความชื้น 30% ของค่าความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีน และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ มีการรอดชีวิตใกล้เคียงกับไลโอฟิไลซ์ ซึ่งภาวะการเก็บนี้เป็นวิธีการเก็บกล้าเชื้อ STK ร่วมกับใบไม้ที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับภาวะอื่นๆ เมื่อเวลาผ่านไป 12 เดือน พบว่าจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บในภาวะความชื้น 40% และ 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีการรอดชีวิตสูงกว่าที่ภาวะความชื้น 70% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำแสดงในรูปที่ 4.3 เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไป 4 เดือนพบว่าการเก็บที่ภาวะความชื้น 70% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ เก็บที่อุณหภูมิห้อง ถุงอะลูมิเนียมมีลักษณะโป่งพอง สาเหตุอาจเกิดจากมีการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK เป็นผลให้มีการผลิตแก๊สภายในถุง เป็นการแสดงว่าความชื้นมีผลมากในการเก็บรักษา การมีความชื้นมากเพียงพอสำหรับการเจริญจะทำให้แบคทีเรียภายในถุงมีการเจริญ และระยะเวลาในการเก็บรักษาสั้นลง

การทดลองเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ เปรียบเทียบการไม่มีและมีไพรีน 100 ppm ระหว่างการเก็บรักษา พบว่าภาวะการเติมไพรีนระหว่างการเก็บ จำนวนเชื้อมีการรอดชีวิตที่สูงกว่าภาวะที่ไม่มีการเติมไพรีน และการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ เก็บที่ 4°ซ ให้อัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้อง สอดคล้องกับงานของ Trivedi และคณะ (2005) ศึกษาการสร้างกล้าเชื้อของแบคทีเรียสองชนิด คือ *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas corrugata* ที่ตรึงอยู่บนวัสดุพาหะ และเก็บภายใต้อุณหภูมิ 4 ° ซ และที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าจำนวนเซลล์ที่เก็บที่อุณหภูมิห้องลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับที่เก็บที่ 4 ° ซ เนื่องจากที่

อุณหภูมิ 4-10 ° ซ จะยับยั้งการแบ่งตัวและกิจกรรมต่างๆภายในเซลล์แบคทีเรีย เป็นผลให้เกิดการที่เซลล์ลดการใช้สารอาหาร (Van Shrevan, 1970)

อากาศเป็นปัจจัยหนึ่งในการเจริญของจุลินทรีย์ ในการทดลองเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ โดยทุกภาวะการเก็บรักษาถูกทำให้เป็นสภาพสุญญากาศ จากผลการทดลองพบว่า สภาพสุญญากาศส่งผลต่อการอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK น้อยกว่า ความชื้น และอุณหภูมิในการเก็บ Bozoglu และคณะ (1987) เปรียบเทียบความสามารถในการมีชีวิตของ *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* ที่เก็บในแก๊สไนโตรเจน และภายใต้สุญญากาศ พบว่าการเก็บใน glass vial ที่ถูกปิดผนึกให้ภายในเป็นสุญญากาศ หรือ ในแก๊สไนโตรเจน ให้ผลดีกว่าเก็บในภาวะที่มีอากาศ Nissen และคณะ (1996) เปรียบเทียบการเก็บเนื้อวัว โดยเปรียบเทียบภาวะการเก็บ การทดลองที่1 เก็บในสภาวะสุญญากาศ และ 100 % แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เก็บที่ 2 ° ซ หรือ 6 ° ซ การทดลองที่2 เก็บในสภาวะสุญญากาศ และแก๊สผสมระหว่าง คาร์บอนไดออกไซด์ และไนโตรเจน เก็บที่ -1 ° ซ หรือ 2 ° ซ พบว่าที่ความเข้มข้นสูงของ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และเก็บที่อุณหภูมิต่ำจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยเฉพาะ Pseudomonads และ *Brochothrix thermosphacta*. NAKAI และคณะ ศึกษาการเก็บรักษาจุลินทรีย์ด้วยถุงพลาสติก เมื่อเลี้ยง *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia colij Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae Penicillium roqueforti*, *Leueonostoc citrovorum*, *Acetobaeter aceti*, และ *Clostridium sporogenes* บนจานอาหารแข็ง ในจาน หลอดทดลอง และขวดแก้ว และเก็บใน ถุงพลาสติก 4.5-rail K202 ที่ภายในถุงมีสภาพเป็นแก๊สไนโตรเจน เก็บที่ 7.2 °ซ พบว่าสามารถคงความมีชีวิตของแบคทีเรียได้ถึง 24 เดือน นอกจากนี้ผลของการใช้วัสดุบรรจุภัณฑ์ต่างชนิดในการเก็บภายใต้สภาวะสุญญากาศยังมีผลต่อการยืดอายุในการเก็บรักษา

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไพรีน 100 พีพีเอ็ม ในสเลอรีดินที่ไม่ปลอดเชื้อ (อัตราส่วนดินต่อน้ำ เท่ากับ 1:8) พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เก็บด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ มีความสามารถย่อยสลายไพรีนได้น้อยกว่ากลุ่มแบคทีเรียที่เก็บโดยเลี้ยงในเศษใบไม้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกลุ่มแบคทีเรีย STK ซึ่งเลี้ยงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการก่อนที่จะนำมาไลโอฟิไลซ์ ยังไม่คุ้นเคยกับสภาพดินธรรมชาติ (Johnsen และคณะ, 2007) ซึ่งต่างกับกลุ่มแบคทีเรียที่เก็บในเศษใบไม้ซึ่งจะเกิดความเคยชินกับสภาพธรรมชาติ เมื่อลงดินจะเกิดการกระจาย โดยแบคทีเรียเกาะติดอยู่กับเศษใบไม้ จะได้รับส่งผ่านออกซิเจนในดินที่เพิ่มจากใบไม้ เศษใบไม้ช่วยป้องกันแบคทีเรียจากการถูกจับกินโดยโปโตซัว ช่วยป้องกันการแก่งแย่งอาหารระหว่างแบคทีเรีย

ท้องถิ่นกับแบคทีเรียต่างถิ่น และยังช่วยดูดซับไพรีนในดิน ทำให้แบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้และเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายของแบคทีเรียที่เติมลงไปในดินปนเปื้อนได้ ภาวะการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้ มีไพรีนระหว่างการเก็บรักษา ให้การย่อยสลายไพรีนได้ดีกว่าไม่มีไพรีนระหว่างการเก็บ และการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้ที่ความชื้น 70% 40% และ 30%ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ พบว่า การเก็บรักษาที่ภาวะความชื้น 30%ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ ให้การย่อยสลายไพรีนดีกว่าความชื้นอื่น จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า ภาวะการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้ที่ความชื้น 30% ของค่าความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนผสมอยู่ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ สามารถย่อยสลายไพรีนได้ดีที่สุด จะสามารถเก็บไว้ใช้ในการบำบัดได้นานไม่ต่ำกว่า 12 เดือน เนื่องจากการลดความชื้นเหลือ 25%-30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ และกำจัดอากาศออกระหว่างการเก็บ จะช่วยลดอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากน้ำและอากาศเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อกิจกรรมของอัตราเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองในการเก็บ STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้ที่ความชื้น 30% โดยมีไพรีนผสมอยู่ แต่เก็บที่อุณหภูมิห้อง สามารถย่อยสลายได้ดีรองลงมาจากการเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ และมีประสิทธิภาพดีกว่า STK ที่เก็บโดยไลโอฟิไลซ์ แต่ให้อัตราเร็วในการย่อยสลายไพรีนช้ากว่าเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ซึ่งจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ความชื้นมีผลต่อการเก็บรักษามากกว่าอุณหภูมิ ดังนั้นจากผลการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการเก็บเชื้อแบคทีเรียในอุณหภูมิห้องได้ โดยไม่ทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการเก็บในตู้ควบคุมที่อุณหภูมิ 4°ซ

เมื่อทำการติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียในช่วงเวลาการบำบัดในสเลอรีดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนเข้มข้น 100 มก / ลิตร ด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ขณะเดียวกันก็ทำการเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าแถบดีเอ็นเอ ของกลุ่มแบคทีเรีย STK มี 3 แถบ คือ 1 2 และ3 ในวันที่ 0 5 และ 10 ของการทดลองยังสามารถพบแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK นี้ปรากฏอยู่ แต่พบว่าในวันที่ 5 และ 10 แถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ตรวจพบไม่ชัดเจน อาจเนื่องมาจากในช่วงเวลาดังกล่าว กลุ่มแบคทีเรียในสเลอรีดินไม่ปลอดเชื้อที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้ อาจเป็นประชากรที่โดดเด่นกว่า ในขณะที่กลุ่มแบคทีเรีย STK อาจมีบางชนิดที่จำนวนลดลง และในวันที่ 10 ของการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดอื่นที่อยู่ในดินปรากฏเด่นชัดขึ้น อาจเกิดจากกลุ่มแบคทีเรีย STK ย่อยสลายไพรีนได้สารมัธยันตร์ ซึ่งปิยะวรรณ เพชราภา (2549) ได้รายงานว่ามีสารมัธยันตร์ถูกสร้างขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนทั้งในดิน และในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่เติม

ไพรีน คือกรดซาลิไซลิก ซึ่งแบคทีเรียในดินสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ และเมื่อพิจารณาจากลักษณะโคโลนีในวันที่ทำการทดลอง พบว่าโคโลนีของกลุ่มแบคทีเรีย STK ทั้ง 3 จีนัสยังคงปรากฏอยู่จนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง แสดงว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้สามารถคงความมีชีวิตอยู่ และมีบทบาทในการย่อยสลายไพรีนจนตลอดการทดลอง

จากการผลการศึกษาทั้งหมดที่ได้กล่าวมานั้น ทำให้ได้วิธีการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ ที่ภาวะความชื้น 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่ 4 °ซ ซึ่งสามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้นานถึง 12 เดือน เทียบเท่ากับการเก็บมาตรฐานอย่างวิธีไลโอฟิไลซ์ และยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนในสเลอรีดินไม่ปลอดเชื้อได้ดีกว่าการเก็บกล้าเชื้อด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ เนื่องจากเศษใบไม้ช่วยก่อให้เกิดการกระจายตัวของแบคทีเรียชนิด นอกจากนี้ ภาวะการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในเศษใบไม้ ที่ความชื้น 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนระหว่างการเก็บ และเก็บที่อุณหภูมิห้องให้ผลดีรองลงมาจากการเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ และใกล้เคียงกับวิธีไลโอฟิไลซ์ ดังนั้นจากผลการวิจัยนี้ สามารถนำวิธีการเก็บนี้ไปใช้ในการเก็บรักษาแบคทีเรีย โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ ซึ่งไม่ทำให้เสียค่าใช้จ่าย และง่ายต่อการขนส่ง และแบคทีเรียที่เลี้ยงในเศษใบไม้ยังคุ้นเคยต่อการเจริญในสภาวะของแข็ง ดังนั้นเมื่อนำไปย่อยสลายสารพิษในดิน แบคทีเรียนี้จึงไม่ต้องปรับตัวกับสภาพแวดล้อมใหม่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Vila, J., Lopez, Z., Sabate, J., Minguillon, C., Solanas, A. M., and Grifoll, M. 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. Strain AP1: Actions of the isolate on two- and three- ring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environment. Microbiology*. 67(12): 5497-5505.

Walter, U., Beyer, M., Klein, J., and Rehm, H. J. 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 34: 671-676.

Wilson, S.C., and Jones, K.C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). A Review *Environment Pollution*. 81:299-249.

Zanieri, L., Galvan, P., Checchini, L., Cincinelli, A., and Lepri, L. 2007. Polycyclic Aromatic hydrocarbons (PAHs) in human milk from Italian women : Influence of cigarette smoking and residential area. *Chemosphere*. 67: 1265 -1274.

Zitrides, T., 1983. Biodecontamination of spill site. *Pollution Engineering* 15, 25-27.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

ข้อเสนอแนะในงานวิจัย

จากผลการทดลองจะเห็นว่าการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK โดยสร้างกล้าเชื้อในเศษใบไม้ และลดปัจจัยการเจริญอย่าง ความชื้น และอากาศ จะยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนในสเลอรีดินได้ดีกว่าการเก็บด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ ซึ่งเป็นการเติมกล้าเชื้อลงไปโดยตรง เมื่อเวลาผ่านไป 12 เดือนประสิทธิภาพในการย่อยสลายและอัตรารอดชีวิตยังคงดีอยู่ ในงานวิจัยต่อไปจึงน่าจะทำการศึกษา ผลของการมีไพรีนระหว่างการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในเศษใบไม้ ต่อการอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK และเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษา เพื่อจะได้เห็นผลที่ชัดเจนยิ่งขึ้น การลดความชื้นในการเก็บรักษาในงานวิจัยนี้ทำได้ต่ำสุดคือ 30% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ เนื่องจากมีข้อจำกัดทางด้านเครื่องมือ ดั้งนั้นควรทำการหาเครื่องมือที่ช่วยลดความชื้นให้ต่ำกว่านี้ และทำการจำกัดปัจจัยในการเจริญของแบคทีเรียอื่นๆ อย่างเช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง สารอาหาร เป็นต้น เพื่อช่วยยืดระยะเวลาในการเก็บ และจากผลการทดลองพบว่าการเก็บกล้าเชื้อที่ภาวะความชื้น 70 % ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ มีไพรีนผสมอยู่ เก็บที่ 4 °ซ ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดีรองจากการเก็บที่ภาวะความชื้น 30 % ของค่าความจุสูงสุด แต่การเก็บรักษากล้าเชื้อที่อุณหภูมิ 4 °ซ อาจจะเป็นปัญหาต่อผู้ที่ต้องการเก็บเชื้อ ดังนั้นควรทำการทดลองเก็บเชื้อที่อุณหภูมิห้อง โดยใส่สารดูดความชื้นแทน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ทิมากร แสงดำ. 2547. การแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีสมบัติในการเกาะติดและย่อยสลายไพรีนจากปุ๋ยหมักใบพืชตระกูลถั่ว วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปิยะวรรณ เพชราภา. 2549. สารมัธยันต์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่แยกได้จากใบมะขาม Tamarindus india Linn วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิธัญญา ขวเจริญพันธ์. 2549. การสร้างกล้าเชื้อในวัสดุพาหะเพื่อเสริมการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย STKในดินที่ปนเปื้อนไพรีน วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รุจา สารคุณ. 2548. ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนในดิน วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2539. เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์ สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร.

สุพินดา ศิริวราศิลป์. 2545. การใช้ใบพืชตระกูลถั่วและพารามิเตอร์บางประการในการเสริมการย่อยสลายไพรีนในดิน วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เสาวลักษณ์ อ้นเมฆ. 2549. การสลายไพรีนและฟีแนนทรีนที่ปนเปื้อนในดินโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Asa, S., Johan, O., Johan, C., Johan, S., 2006. Freeze-drying of *Lactobacillus coryniformis* Si3—effects of sucrose concentration, cell density, and freezing rate on cell survival and thermophysical properties. *Cryobiology* . 53 : 119–127.

Bastiaens, L., Springeal, D., Wattiau, P., Harms, H., de Wachter, R., Verachtert, H., and Diels, L. 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(5):1834-1843.

Baver, J. E., and Capone, D. G. 1988. Effect of co-occuring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons marine sediment slurries. *Applied and Environmental Microbiolog*. 54: 1649-1655.

Boldrin, B., Tiehm, A. and Fritzsche, C. 1993. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene and pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:1927-1930.

Boonchan, S., Britz, M.L., and Stanley, G.A. 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungalbacterial cocultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1007-1019.

Bouchez, M., Blanchet, D., and Vandecasteele, J-P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain association : inhibition phenomena and cometabolism. *Applied. Microbiology and Biotechnology*. 43: 156-164.

Bozoglu, T.F., Ozilgen, M., Bakir, U., 1987. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme and Microbiology Technology* . 9:531–537.

Cerniglia, C.E. 1992. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*. 3: 351-368.

Charoenchang, N., Pinphanichakarn, P., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarn, S., and Juntongjin, K. 2003. Utilization of agricultural materials to enhance microbial

degradation of PAHs in soil. *Journal of Scientific Research Chulalongkorn University*. 28(special issue I): 1-13.

Churchill, S. A., Harper, J. P., and Churchill, P. F. 1999. Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 549-552.

Costa, E., Usall, J., Teixido, N., Garcia, N., Vinas, I., 2000. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze drying. *Journal of Applied Microbiology*. 89:793–800.

Costa, E., Usall, J., Teixido, N., Torres, R., Vinas, I., 2002. Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Journal of Applied Microbiology*. 92:873–878.

Daugulis, A. J., and McCracken, C. M. 2003 Microbial degradation of high and low molecular weight polyaromatic hydrocarbons in a two-phase partitioning bioreactor by two strains of *Sphingomonas* sp. *Biotechnology Letters* 25:1441-1444.

Dean-Ross, D., and Cerniglia, C.E. 1996. Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*. *Applied. Microbiology and Biotechnology*. 46: 307-312.

Doick, K. J., and Semple, K. T. 2003. The effect of soil: water ratios on the mineralization of phenanthrene: LNAPL mixtures in soil. *FEMS Microbiology Lett*ers. 220: 29-33.

Fu, M. H., and Alexander, M. 1995. Use of surfactants and slurrying to enhance the biodegradation in soil of compounds initially dissolved in nonaqueous-phase liquids. *Applied. Microbiology and Biotechnology*. 43: 551-558.

Gauthier, E., Déziel, E., Villemur, R., Juteau, P., Lépine, F., and Beaudet, R. 2003. Initial characterization of new bacteria degrading high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from a 2-year enrichment in a two-liquid-phase culture system. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 301-311.

Gibson, D. T., and Subramanian, V. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbon. In: Gibson, D. T. (Ed.). *Microbial Degradation of Organic Compounds*. Marcel Dekker, New York, pp. 181-252.

Gothrie, E. A., and Pfaender, F. K. 1998. Reduces pyrene bioavailability in microbially 79 active soils. *Environmental. Science & Technology*. 32(4): 501-508.

Hupe, K., Luth, J.-C., Heerenklage, J., and Stegmann, R. 1996. Enhancement of the Biological degradation of soils contaminated with oil by the addition of compost. *Acta. Biotechnologica*. 16(1): 19-30.

Iwamoto, T., Tani, K., Nakamura, K., Suzuki, Y., Kitagawa, M., Eguchi, M., and Nasu, M. 2000. Monitoring impact of *in situ* biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*. 32: 129-141.

Juhasz, A.L., Stanley, G.A., Davey, B., and Briyz, M.L. 1997. Evaluation of high molecular weight PAHs degradation by pyrene-enriched microbial community in incubate soil. In D.L.Wise(ed), *Global Environment Biotechnology*. pp.475-487.Great Britian:Kluwer Academic.

Juhasz, A.L., Stanley, G.A., Davey, B., and Briyz, M.L. 2000. Microbial degradation and Detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Letter in Applied .Microbiology*. 30: 396-401.

Kästner, M., Breuer-Jammali, M., and Mahro, B. 1994. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 41: 267-273.

Kästner, M., Streibich, S., Beyrer, M., Richnow, H. H., and Fretsche, W. 1999. Formation of bound residues during microbial degradation of (14C) anthracene in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 1834-1842.

Komukai-Nakamura, S., Sugiura, K., and Yamauchi-Inomata, Y., 1996. Construction of bacterial consortia that degrade arabian light crude oil. *Journal Fermentation bioengineering*. 82(6): 570-574.

Krishna, C. 2005. Solid-state fermentation systems – An overview. Critical Reviews in *Journal of Biotechnology*. 25: 1-30.

Miyamoto-Shinohara, Y., Imaizumi, T., Sukenobe, J., Murakami, Y., Kawamura, S., and Komatsu, Y. 2000. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology* . 41: 251–255.

Molina, M., Araujo, R., and Hodson, R. E. 1999. Cross-induction of pyrene and phenanthrene in a *Mycobacterium* sp. isolated from polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated river sediments. *Canadian Journal of Microbiology*. 45: 520-529.

Mueller, J. G., Chapman, P. J., and Pritchard, P. H. 1989. Action of fluoranthene utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 3085-3090.

Nieman, J. K. C., Kimball, D. O., McLean, J. E., Sims, R. C., Sims, J. L., Sorensen, D.L., and Rice, J. A. 1998. Humification of pyrene in contaminated soil during landfarming. Proceedings of the 1998 Conference on Hazardous Waste Research. pp. 252-260.

Pesenti– Barili, B., Ferdani, E., Mosti M., and Degli- innocenti, F. 1991. Survival of *Agrobacterium radiobacter* K84 on various carriers for crown gall. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(7): 2047-2051

Randerath, K., Zhou, G.-D., Randerath, E., Safe, S. H., and Donnelly, K. C. 1997. Comparative 32P-postlabeling analysis of exogenous and endogenous DNA adducts in mouse skin exposed to a wood-preserving waste extract, a complex mixture of polycyclic and polychlorinated chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 29: 372-378.

Rehmann, K., Noll, H. P., Steinberg, C. E., and Kettrup, A. A. 1998. Pyrene degradation by *Mycobacterium sp.* strain KR2. *Chemosphere*. 36: 2977-2992.

Riser-Robert, E., 1998. Remediation of Petroleum Contaminated Soil: Biological, Physical, and Chemical Processes. CRC Press LLC, Boca Raton, FL.

Sei, K., Asano, K., Tateishi, N., Mori, K., Ike, M., Kohno, T., and Fujita, M. 2000. Development of simple methods of DNA extraction from environmental samples for

monitoring microbial community based on PCR. *Japanese journal of water treatment biology*. 36(4): 193-204.

Straube, W. L., Jones-Meehan, J., Pritchard, P. H., and Jones, W. R. 1999. Bench-scale optimization of bioaugmentation strategies for treatment of soils contaminated with high molecular weight polyaromatic hydrocarbons. *Resources Conservation and Recycling*. 27: 27–37.

Trejo, M., and Quintero, R. 2000. Biorediation of contaminated soil. In Eugenia, J. O., Sanchez Gloria, and Elizabeth, H. (eds), pp. 179-189. Environmental biotechnology and cleaner bioprocess. London: Tayler and Francis Limited.

Trivedi, P., Pandey, A., Palni, L., M., S., 2005. Carrier-based preparations of plant growth-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21:941-945.

Trzesicka-Mlynarz, D.T., and Ward, O.P. 1996. Degradation of fluoranthrene in a soil matrix by indigenous and introduced bacteria. *Biotechnology Letter*s. 18: 181-186.

Van Dyke, M.I., and Prosser, J.I. 2000. Enhanced survival of *Pseudomonas fluorescens* in soil following establishment of inoculum in a sterile soil carrier. *Soil Biology & Biochemistry*. 32: 1377-1382.

Van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., and Zehnder, A.J.B. 1987. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Applied and Environment. Microbiology*. 53(8): 1893-1897.

Van Shrevan, D.A. 1970. Some factors affecting growth and survival of *Rhizobium* in soil peat cultures. *Plant and Soil*. 32:113–130.

Van Veen, J. A., Van Overbeek, L. S., and Van Elsas, J. D. 1997. Fate and activity of microorganism into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61:121-135.

Verstraete, W., and Devliegher, W. 1996. Formation of non-bioavailable organic residues in soil : Perspectives for site remediation. *Biodegradation*. 7: 471-485.

Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied.Chemistry*. 73(7): 1163 - 1172.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตน (tryptone)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 20 นาที

2. **อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง** Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ละลายวุ้น (Bacto Agar) 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 20 นาที

3. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM)

ก.

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	5.5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม

ข.

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.01	กรัม
เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$)	0.005	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	0.005	กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ละลายสารส่วน ก. ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ในส่วนของสารละลายส่วน ข. ทำการเตรียมแยกแต่ละชนิดแล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงเติมลงในอาหารส่วน ก. ที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. สารปฏิชีวนะ

ละลายนิสเตติน (Nystatin) 40 มิลลิกรัมใน ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ 1 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่อุณหภูมิ -20 °ซ

2. ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ Geneclean II Kit (Q-BIOgene, USA)

ประกอบด้วย

1. NaI
2. New Wash
3. TBE Modifier
4. Glassmilk

ก่อนใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลครั้งแรกให้เติม น้ำปลอดประจุ ปริมาตร 280 มิลลิลิตร และ เอธานอล 100% ปริมาตร 310 มิลลิลิตร ลงใน New Wash ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15-30 °ซ จนกว่าจะใช้ทำตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

3. สารละลาย 10% SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 °ซ ปริมาตร 80 มล. เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที (หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อครั้งแรกแล้วจะไม่สามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำได้อีกเพราะสารละลาย SDS จะเสียสภาพ)

4. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Trismabase ($C_4H_{11}NO_3$)	121.1	กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	42	มล.

ละลาย Trismabase ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

5. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$)	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

6. บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Tris-HCl	10.0	มิลลิโมลาร์
EDTA	1.0	มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 10 มล. เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 2 มล. เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. **บัฟเฟอร์** 50X Tris-acetate (TAE)

Tris base	242	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1	มล.
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100	มล.

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 20 นาที

8. **สารละลาย** CTAB/NaCl (10%CTAB **ใน** 0.7 M NaCl)

CTAB	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.7	โมลาร์

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}$ซ ปริมาตร 80 มล. จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 20 นาที

9. High extraction buffer

Tris-HCl, pH 8.0	250	มิลลิโมลาร์
สารละลาย EDTA, pH 8.0	50	มิลลิโมลาร์
สารละลายโซเดียมคลอไรด์	125	มิลลิโมลาร์
น้ำปลอดประจุ		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. **สารละลายฟีนอล** (phenol)

นำฟีนอลในรูปเกล็ดของแข็งมาหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 68 °ซ จากนั้นเติมผงไฮดรอกซีควิโนลีน ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% แล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง เป็น 8.0 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น ดูดชั้นฟีนอลมาวัดความเป็นกรด-ด่างให้ได้เท่ากับ 7.8 (ใช้ pH paper วัด) ถ้ายังไม่ได้ให้ดูดสารละลายชั้นบนทิ้งแล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0 ลงไปอีกครั้ง เขย่าให้เข้ากันทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆจนกระทั่งชั้นฟีนอลมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.8 สุดท้ายเติมบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายชั้นบนทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 ในอัตราส่วน 1:1 อีกครั้ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ในขวดสีชาที่ปิดฝาแน่น

11. **สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์**

ผสมสารละลายฟีนอลอิ่มตัวด้วย Tris-HCl เข้ากับคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เป็น 25 : 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

12. **สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์**

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

13. Loading dye

Bromphenolblue	0.025 %
ซูโครส	40 %

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

14. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

15. สารละลายโซเดียมอะซีเตท เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.2

ละลายโซเดียมอะซีเตท น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มล. นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มล. เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

16. สารละลายโปรตีเนสเค (proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผงโปรตีนเนสเคน้ำหนัก 20 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ

17. สารละลาย RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ

18. 70% เอธานอล

99% เอธานอล	700	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	300	มิลลิลิตร

19. **อะกาโรสเจลเข้มข้น** 1.0%

อะกาโรสเจล	1	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มิลลิลิตร

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน

20. 0% denaturing solution

40% อะคริลาไมด์/บิส	8.13	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	1	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร	50	มิลลิลิตร

21. 80% denaturing solution

40% อะคริลาไมด์/บิส	8.13	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	1	มิลลิลิตร
ฟอร์มาไมด์	16	มิลลิลิตร
ยูเรีย	16.82	กรัม
น้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร	50	มิลลิลิตร

22. **แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น** 10%

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

23. **สารละลายไพรีนในไดเมธิลซัลฟอกไซด์**

ชั่งไพรีน 0.1 กรัม ละลายในไดเมธิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 10 มล.ผสมด้วยเครื่องผสมจนผลึก PAHs ละลายหมด ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ –20 °ซ เติมลงในอาหารเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

24. สารไพรีนในอะซีโตน

ชั่งไพรีน 0.01 กรัม ละลายในอะซีโตนปริมาตร 10 มล. ผสมด้วยเครื่องผสมจนผลึก PAHs ละลายหมด กรองผ่านหัวกรองชนิด PTFE ขนาดรูกว้าง 0.2 ไมโครเมตร

หมายเหตุ ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ เนื่องจากอะซีโตนระเหยเร็วมาก และขณะเติมสาร PAHs ที่ละลายในอะซีโตนลงในดินควรทำอย่างรวดเร็วเพื่อไม่ให้อะซีโตนระเหยซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นเปลี่ยนแปลงได้

25. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล. ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น

26. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

27. สารละลาย Triton X-100 15%

Triton X-100	15	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	85	มล.

28. การเตรียม 20% (w/v) sucrose

ชั่ง sucrose 20 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร ให้นำไป sterile 110 องศาเซลเซียส 10 นาที

29. การหาค่าความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (Water Holding Capacity)

นำกระดาษกรองมาหาน้ำหนักกระดาษกรองเปียก โดยการวางกระดาษกรองลงบนตะแกรงที่อยู่ในถาดที่มีน้ำ

1.ปล่อยให้น้ำไหลซึมผ่านกระดาษกรองจนอิ่มตัว จากนั้นนำกระดาษกรองวางบนกระดาษทิชชูเพื่อซับน้ำส่วนเกินออก

2.นำกระดาษกรองที่อิ่มตัวด้วยน้ำไปชั่งนน้ำหนัก จดบันทึกค่ากระดาษกรองเปียก

3. นำกระดาษกรองที่ได้จาก2 ไปอบแห้งในตู้อบแห้งความร้อน 70 องศา

4. ชั่งน้ำหนักกระดาษกรองแห้ง แล้วนำไปเก็บในเดกซิเคเตอร์ ทำการชั่งน้ำหนักจนน้ำหนักที่ได้คงที่ จดบันทึกค่ากระดาษกรองแห้ง

5. นำเศษใบไม้ 1.0 กิโลกรัมวางบนกระดาษกรองที่ได้จาก 4 โดยที่กระดาษกรองวางอยู่บนตะแกรงที่อยู่ในถาดที่มีน้ำ

6. ปล่อยให้น้ำไหลซึมผ่านกระดาษกรองและเศษใบไม้จนอิ่มตัว จากนั้นนำกระดาษกรองที่มีใบไม้วางบนกระดาษทิชชูเพื่อซับน้ำส่วนเกินออก

7. นำกระดาษกรองที่มีใบไม้ที่อิ่มตัวด้วยน้ำจาก 6 ไปชั่งน้ำหนักจะได้ค่าน้ำหนักกระดาษกรองเปียกและเศษใบไม้ที่อิ่มตัว

8. คำนวณหาค่า % water holding capacity โดย

น้ำหนักใบไม้แห้ง = (น้ำหนักกระดาษกรองแห้ง+เศษใบไม้) – น้ำหนักกระดาษกรองแห้ง

น้ำหนักใบไม้อิ่มตัว = (น้ำหนักกระดาษกรองเปียก+เศษใบไม้ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ) – น้ำหนักกระดาษกรองเปียก

ดังนั้นน้ำหนักน้ำในใบไม้ที่อิ่มตัว = น้ำหนักใบไม้อิ่มตัว - น้ำหนักใบไม้แห้ง

$$\% \text{ water holding capacity} = \frac{\text{น้ำหนักน้ำในใบไม้ที่อิ่มตัว}}{\text{น้ำหนักใบไม้อิ่มตัว}} \times 100$$

30. การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง

นำชั่งเศษใบไม้ 1.5 กรัม เติมน้ำลงในเศษใบไม้พออิ่มตัว ใช้กระดาษลิตมัสวัดค่าความเป็นกรดด่าง

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร เกิดเมื่อวันศุกร์ที่ 29 ตุลาคม พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย