

การสลายไฟรึนในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับสารลดแรงตึงผิว
หรือแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิว



นางสาวกานต์วี แก้วขาว

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEGRADATION OF PYRENE IN OIL CONTAMINATED SOIL BY BACTERIAL
CONSORTIUM STK IN THE PRESENCE OF SURFACTANTS OR
SURFACTANT-PRODUCING BACTERIA



Miss Karnrawee Kaewkhao

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

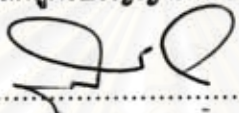
Chulalongkorn University

Academic Year 2007

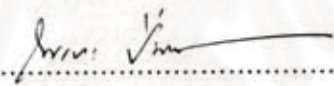
Copyright of Chulalongkorn University

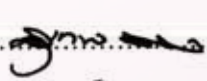
หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสลายไพรีนในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับสารลดแรงตึงผิวหรือแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิว
โดย	นางสาวกานต์วี แก้วขาว
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธีนิยวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา จันทร์ทองจีน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ นารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธีนิยวัน)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา จันทร์ทองจีน)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)


..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ)

กานต์วี แก้วขาว : การสลายไพรีนในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับ สารลดแรงตึงผิวหรือแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิว (DEGRADATION OF PYRENE IN OIL CONTAMINATED SOIL BY BACTERIAL CONSORTIUM STK IN THE PRESENCE OF SURFACTANTS OR SURFACTANT-PRODUCING BACTERIA).
 อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สุเทพ ธานีวัน, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.กาญจนา จันทองจีน,
 109 หน้า.

งานวิจัยนี้ศึกษาผลการนำกลุ่มแบคทีเรีย STK ซึ่งประกอบด้วย *Zoogloea* sp., *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. มาย่อยสลายไพรีนที่ปนเปื้อนในดิน ร่วมกับการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยทำการทดลองในระบบเลอริที่มีอัตราส่วนดินต่อน้ำ ตั้งแต่ 1:0-1:12 เติมไพรีน 1 มก. ต่อดิน 1 กรัม บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. และเชื้อ STK เริ่มต้น 10^8 cfu/มล. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที จากผลการทดลองพบว่าในระบบเลอริที่มีอัตราส่วนดินต่อน้ำตั้งแต่ 1:4-1:12 กลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถย่อยสลายไพรีนจนเหลือน้อยกว่า 1% ภายใน 7 วัน การเติมทั้งสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์, สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และ จุลินทรีย์สร้างสารลดแรงตึงผิว *Bacillus subtilis* BBK-1 ที่จำนวนเชื้อเริ่มต้น $5-20 \times 10^7$ cfu/มล. ในระบบเลอริดินต่อน้ำเท่ากับ 1:6 พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถย่อยสลายไพรีนได้มากกว่า 99% ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งปราศจากกลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถสลายไพรีนเพียง 4-38% นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมและไม่เติมสารลดแรงตึงผิวและแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวไม่มีผลต่อการสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK จาก การวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16s rDNA โดยวิธี DGGE ยืนยันพลวัตของประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่สามารถพบได้ตลอดการทดลอง 7 วัน

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....กานต์วี แก้วขาว.....
 สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ปีการศึกษา.....2550

4772594023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORD: BACTERIAL CONSORTIUM /SOIL SLURRY/ DGGE / BIODEGRADATION/
BIOSURFACTANT / PYRENE/

KARNRAWEE KAEWKHAO : DEGRADATION OF PYRENE IN OIL
CONTAMINATED SOIL BY BACTERIAL CONSORTIUM STK IN THE
PRESENCE OF SURFACTANTS OR SURFACTANT-PRODUCING
BACTERIA. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.SUTHEP THANIVAVARN,
Ph. D. THESIS COADVISOR : ASSOC.PROF.KANCHANA JUNTONGJIN,
Ph. D., 109 pp.

The present study employed bacterial consortium STK consisting of *Zoogloea* sp., *Stenotrophomonas* sp. and *Mesorhizobium* sp. to bioremediate pyrene contaminated soil in the presence or absence of biosurfactant. A 250 ml.-flask-containing soil slurry (1:0–1:12, soil:water) spiked with 1000 ppm pyrene was bioaugmented with STK consortium at 10^8 cfu/ml and incubated for 1 week at room temperature with agitation rate of 200 rpm. It was found that at 1:4-1:12 ; soil:water STK consortium degraded pyrene to less than 1% within 7 days. Effect of surfactant addition to a 1:6 soil slurry (w/v) which included Brij 35, a nonionic surfactant, surfactin at 15x APMC or *Bacillus subtilis* BBK-1 a surfactin producer (at $5-20 \times 10^7$ cfu/ml) on pyrene-degrading ability of STK consortium was studied. All surfactants tested including *B. subtilis* BBK-1 showed no significant difference in enhancing pyrene degrading ability of STK indicating all surface active agents had no synergistic or positive effect toward pyrene degradation by STK. However, more than 99% pyrene was degraded in the presence of STK whereas 4-38% degradation was obtained from the control which STK was absent. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR amplified 16S rDNA revealed STK as dominant species in all the systems tested.

Department Microbiology Student's signature..... *Karnraee Kaewkhao*
Field of study.. Industrial Microbiology Advisor's signature.. *Suthy Thanivarn*
Academic year 2007

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธานีวัน และรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา จันทองจีน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ วิชาการความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยขอ กราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่ได้ให้วิชาการ ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ โดยเฉพาะความรู้ด้านการนำเทคนิค PCR-DGGE เข้ามาใช้ ในงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และอาจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการและกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และ ให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน เป็นอย่างสูง ที่กรุณา อนุเคราะห์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 สำหรับงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณทิมากร แสงดำที่ให้ความอนุเคราะห์กลุ่มแบคทีเรีย STK สำหรับงานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาฯ ที่กรุณาให้ความรู้ และ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยในการดำเนินการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุก คนที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนการ วิจัย

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือตลอดจน ให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญรูป	ฏ
สัญลักษณ์ และคำย่อ	ฑ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ปรีทัศน์วรรณกรรม.....	4
2.1 การเข้าสู่ร่างกายของสาร PAHs.....	5
2.2 ไพรีน.....	6
2.3 การบำบัดไพรีนและสาร PAHs อื่นในสิ่งแวดล้อม.....	7
2.3.1 การบำบัดทางกายภาพ.....	8
2.3.2 การบำบัดทางเคมี.....	9
2.3.3 การบำบัดทางชีวภาพ.....	9
2.4 การบำบัด PAHs ในระบบสเลอรี.....	10
2.5 การย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรียบริสุทธิ์.....	11
2.6 การย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย.....	13
2.7 การเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดไพรีนโดยการเติมสารลดแรงตึงผิว.....	16
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	27
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	27
3.2 เคมีภัณฑ์.....	29
3.3 จุลินทรีย์.....	30
3.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	31
3.4.1 การเตรียมดิน ศึกษาลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดิน.....	31
3.4.2 ปริมาณน้ำต่อความสามารถในการย่อยสลายไพรีนในระบบสเลอรีโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	31

3.4.2.1	เตรียมกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	31
3.4.2.2	เตรียมดิน.....	32
3.4.2.3	เตรียมปริมาณน้ำแบบปลอดเชื้อ.....	32
3.4.3	การทดสอบประสิทธิภาพของการให้อากาศต่อการย่อยสลายไพลีนในระบบ สเลอรีโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยเปรียบเทียบดินปลอดเชื้อและดินไม่ ปลอดเชื้อที่ความเร็วรอบต่างๆ	33
3.4.4	การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน (Surfactin).....	34
3.4.5	การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิว.....	35
3.4.6	การเติมสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ต่อการย่อยสลายไพลีนในระบบสเลอรี โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยเปรียบเทียบดินปลอดเชื้อและดินไม่ปลอดเชื้อ... ..	35
3.4.7	การเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวเปรียบเทียบกับ การเติมสารลดแรง ตึงผิวชีวภาพในระบบสเลอรีต่อความสามารถในการย่อยสลายสารไพลีน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	36
3.4.8	ติดตามพลวัตประชากรแบคทีเรียในชุดการสลายไพลีนในดินไม่ปลอดเชื้อ โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ BBK-1 โดย Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).....	38
3.4.8.1	สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสเลอรีดินไม่ปลอดเชื้อ.....	38
3.4.8.2	สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK และ <i>B. subtilis</i> สาย พันธุ์ BBK-1.....	39
3.4.8.3	การทำดีเอ็นเอที่สกัดได้ให้บริสุทธิ์.....	40
3.4.8.4	ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ.....	41
3.4.8.5	เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	41
3.4.8.6	วิเคราะห์ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).....	43
บทที่ 4	ผลการวิจัย.....	44
4.1	ผลการเตรียมดิน การศึกษาลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของ ดิน.....	44
4.2	ปริมาณของน้ำต่อความสามารถในการย่อยสลายไพลีนในระบบสเลอรีโดยกลุ่ม แบคทีเรีย STK.....	45

4.2.1 การสลายสารไฟรีนในดินปลอดเชื้อ.....	45
4.2.2 การสลายสารไฟรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดินปลอดเชื้อ.....	46
4.3 ประสิทธิภาพของการให้อากาศต่อการสลายไฟรีนในระบบสเลอรีโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1:6 (กรัม/มล.).....	47
4.3.1 การย่อยสลายไฟรีนในระบบสเลอรีโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ความเร็วรอบต่างๆ.....	47
4.3.2 การเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดในระบบสเลอรีที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ความเร็วรอบต่างๆ.....	49
4.4 ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	52
4.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิว.....	53
4.5.1 ผลการหาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration, CMC).....	53
4.5.2 ผลการหาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ในสารละลายดิน (Apparent Critical Micelle Concentration, APMC).....	53
4.6 ผลของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ต่อการสลายไฟรีนในระบบสเลอรีโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ.....	54
4.6.1 การสลายไฟรีนในระบบสเลอรีที่มีกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดินปลอดเชื้อและดินไม่ปลอดเชื้อเมื่อเติม Brij 35.....	54
4.6.2 การเจริญของแบคทีเรียรวมในระบบสเลอรีที่มีกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดินปลอดเชื้อและดินไม่ปลอดเชื้อเมื่อเติม Brij 35.....	57
4.7 การเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวเทียบกับการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระบบสเลอรีต่อความสามารถในการย่อยสลายสารไฟรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	58
4.7.1 ผลการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคตินต่อความสามารถในการย่อยสลายไฟรีนในดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อในระบบสเลอรีโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	58
4.7.2 ผลของการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ BBK-1 ที่สร้างสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อยสลายสารไฟรีนในระบบสเลอรีทั้งในดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	61
4.8 พลวัตประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ในช่วงเวลาของการบำบัด.....	64

4.8.1 พลวัตประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองการสลายไฟรีนในสเลอริดิน ไม่ปลอดเชื้อ.....	65
4.8.2 พลวัตประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองการสลายไฟรีนในสเลอริดิน ไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	66
4.8.3 พลวัตประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองการสลายไฟรีนในสเลอริดิน ไม่ปลอดเชื้อ ที่ผสมกลุ่มแบคทีเรีย STK และ <i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ BBK-1.....	69
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	71
รายการอ้างอิง	77
ภาคผนวก	89
ภาคผนวก ก	90
ภาคผนวก ข	93
ภาคผนวก ค	99
ภาคผนวก ง.....	106
ภาคผนวก จ	106
ภาคผนวก ฉ.....	108
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	109

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ประเภทสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน	5
2.2 แสดงแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้.....	13
2.3 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	20
4.1 ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของดิน.....	44
4.2 สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิดและเซอร์แฟคติน.....	52
4.3 สรุปลสมบัติของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ และชีวภาพ.....	53
ค.1 ปริมาณไพรีนที่เหลือ (%) ในชุดควบคุมปัจจัยทางกายภาพ ที่อัตราส่วนดิน:น้ำต่างๆ.	99
ค.2 ปริมาณไพรีนที่เหลือ (%) หลังบ่มร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่อัตราส่วนดิน:น้ำต่างๆ.....	100
ค.3 ปริมาณไพรีนที่เหลือ (%) ในสเลอริดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ความเร็วรอบต่างๆ.....	101
ค.4 ปริมาณไพรีนที่เหลือ (%) ในสเลอริดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อเมื่อเติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	102
ค.5 ปริมาณไพรีนที่เหลือ (%) ในสเลอริดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อเมื่อเติมเซอร์แฟคตินร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	103
ค.6 ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ BBK-1 ที่ความเข้มข้นเซลล์ต่างๆต่อการย่อยสลายไพรีนในสเลอริดินปลอดเชื้อที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK	104
ค.7 ผลของการเติม <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ BBK-1 ที่ความเข้มข้นเซลล์ต่างๆต่อการย่อยสลายไพรีนในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	105

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างไฟรีน.....	7
2.2 ลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	16
2.3 การเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวและค่าของความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ก่อให้เกิดไมเซลล์ ซึ่งเรียกว่าจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ หรือ CMC.....	17
4.1 ผลการลดลงของไฟรีนเนื่องจากปัจจัยทางกายภาพในดินปลอดเชื้อ.....	46
4.2 ผลการย่อยสลายสารไฟรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดินปลอดเชื้อ.....	47
4.3 เปรียบเทียบปริมาณไฟรีนในสเลอริดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ความเร็ว 150, 200 และ 250 รอบ/นาที	48
4.4 การเจริญในสเลอริดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อเมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ความเร็ว 150, 200 และ 250 รอบ/นาที.....	50
4.5 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน.....	52
4.6 ปริมาณไฟรีนที่เหลือ (%) ในสเลอริดินปลอดเชื้อที่เติมและไม่เติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	55
4.7 ปริมาณไฟรีนที่เหลือ (%) ในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อที่เติมและไม่เติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	56
4.8 เปรียบเทียบการเจริญในสเลอริดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อเมื่อเติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	57
4.9 ปริมาณไฟรีนที่เหลือ (%) ในสเลอริดินปลอดเชื้อที่เติมและไม่เติม surfactin ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	59
4.10 ปริมาณไฟรีนที่เหลือ (%) ในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อที่เติมและไม่เติม surfactin ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	60
4.11 ผลของการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ BBK-1 ที่สร้างสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อยสลายสารไฟรีนในสเลอริดินปลอดเชื้อโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	61
4.12 ผลของการเติมแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ BBK-1 ที่สร้างสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อยสลายสารไฟรีนในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	62

รูปที่

4.13 ปริมาณไฟรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอริดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อที่เติมและไม่เติม BBK-1 (10^7 CFU/มล.) ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	63
4.14 แถบขึ้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rDNA แสดงพลวัตประชากรแบคทีเรียในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมไฟรีนที่เวลาต่างๆ โดยวิธี DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40 – 70% denaturant.....	66
4.15 การเจริญและปริมาณไฟรีนที่เหลือ (%) ในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อ.....	66
4.16 แถบขึ้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rDNA แสดงพลวัตประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองการสลายตัวของไฟรีนในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อ ที่ผสมกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เวลาต่างๆ โดยวิธี DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40 – 70% denaturant.....	68
4.17 การเจริญและปริมาณไฟรีนที่เหลือ (%) ในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	68
4.18 แถบขึ้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rDNA แสดงพลวัตประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองการสลายตัวของไฟรีนในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อ ที่ผสมกลุ่มแบคทีเรีย STK และ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ BBK-1 ที่เวลาต่างๆ โดยวิธี DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40 – 70% denaturant.....	70
4.19 การเจริญและปริมาณไฟรีนที่เหลือ (%) ในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK และ <i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ BBK-1.....	70
ง.1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไฟรีนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย GC-FID.....	106
จ.1 แสดงค่า CMC สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Brij 35.....	106
จ.2 แสดงค่า CMC สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน.....	107
จ.3 เปรียบเทียบค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Brij 35.....	107
จ.4 เปรียบเทียบค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน.....	108
ฉ.1 เครื่องวัดค่าแรงตึงผิว.....	108

สัญลักษณ์ และคำย่อ

°ซ = องศาเซลเซียส

% = เปอร์เซ็นต์

มก. = มิลลิกรัม

มล. = มิลลิลิตร

มม. = มิลลิเมตร

ซม. = เซนติเมตร

ชม. = ชั่วโมง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ความเสื่อมโทรมของสภาวะแวดล้อมส่วนใหญ่มีผลมาจากมนุษย์และวิถีการดำรงชีพของมนุษย์ มนุษย์ก่อมลพิษในสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น การทิ้งขยะลงบนท้องถนน การต่อท่อน้ำทิ้งในบ้านลงท่อระบายน้ำสาธารณะโดยไม่ผ่านระบบบำบัด การทิ้งของเสียลงสู่แม่น้ำลำคลอง การใช้สารเคมีที่มีพิษในการเกษตรกรรมมากเกินไป การเผาและการตัดไม้ทำลายป่า และการทิ้งกากของเสียอันตรายสู่สถานที่สาธารณะ เป็นต้น สิ่งต่างๆเหล่านี้ก่อมลพิษในสิ่งแวดล้อมในรูปแบบมลพิษทางอากาศ ทางน้ำและทางดิน

มลพิษ หมายถึง สภาวะของสภาพแวดล้อมที่มีองค์ประกอบไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ประโยชน์ แต่กลับเป็นพิษ หรือเป็นอันตรายต่อสุขภาพ หรือก่อให้เกิดความรำคาญแก่มนุษย์ เช่น อากาศที่มีแก๊สต่างๆ ที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ ดินที่มีการสะสมของยาฆ่าแมลงศัตรูพืชสูง น้ำที่มีคราบน้ำมัน เป็นต้น สารที่เป็นต้นเหตุที่ทำให้เกิดมลพิษเรียกว่าสารมลพิษ (กรมควบคุมมลพิษ, 2548)

สารมลพิษ คือ มลพิษหรือสารวัตถุอื่นใดก็ตามที่สร้างอันตรายหรือความเปลี่ยนแปลงอันไม่เป็นที่พึงพอใจให้กับสิ่งมีชีวิตต่อประชากร ชุมชน หรือระบบนิเวศ เกินกว่าสภาพที่จะสามารถพบโดยทั่วไปในสิ่งแวดล้อม

มลพิษทางอากาศ (air pollution) หมายถึง สภาวะอากาศที่มีสารเจือปนอยู่ในปริมาณที่สูงกว่าระดับปกติเป็นเวลานานพอที่จะทำให้เกิดอันตรายแก่มนุษย์ สัตว์ พืช หรือทรัพย์สินต่างๆ อาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เช่น ฝุ่นละอองจากลมพายุ ภูเขาไฟระเบิด แผ่นดินไหว ไฟไหม้ป่า แก๊สธรรมชาติ อากาศเสียที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ กรณีที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์ ได้แก่ มลพิษจากท่อไอเสียของรถยนต์ จากโรงงานอุตสาหกรรม จากกระบวนการผลิต จากกิจกรรมด้านการเกษตร จากการระเหยของแก๊สบางชนิด ซึ่งเกิดจากขยะมูลฝอยและของเสีย เป็นต้น

โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเจริญเติบโตทางด้านเศรษฐกิจอย่างรวดเร็วจากภาคเกษตรกรรมมาเป็นภาคอุตสาหกรรม กรุงเทพมหานครซึ่งเป็นศูนย์กลางของแหล่งธุรกิจและความเจริญมีจำนวนประชากรเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ผลที่ตามมาคือความต้องการในการเดินทางและการขนส่งมากขึ้น ปัญหาจราจรติดขัด นับวันจะทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น ทำให้มีการเผาผลาญน้ำมันมากขึ้น การสันดาปของน้ำมันเชื้อเพลิงที่ไม่สมบูรณ์และการปลดปล่อยสารมลพิษทางท่อไอเสียก่อ

ปัญหามลพิษทางอากาศที่รุนแรงกว่าในบริเวณที่มีการจราจรคล่องตัว สารมลพิษที่ปลดปล่อยสู่บรรยากาศที่เกิดจากการคมนาคมขนส่ง ได้แก่ แก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ ออกไซด์ของไนโตรเจน สารประกอบไฮโดรคาร์บอน ฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน สารตะกั่วและแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ นอกจากนี้มลพิษทางอากาศเกิดได้จากภาคอุตสาหกรรม โดยการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงในกระบวนการผลิต ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพอากาศและสุขภาพของประชาชนในชุมชน นอกจากอากาศแล้วพบว่าดินเป็นแหล่งรองรับของเสีย รองรับมลสารต่างๆจากอากาศ จากกิจกรรมในชีวิตประจำวันของมนุษย์ โดยดินจะทำหน้าที่ในการดูดซับมลสารต่างๆ ซึ่งเป็นการลดมลพิษจากอากาศ แต่หากดินได้รับมลสารมากเกินไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งมลสารที่ย่อยสลายไม่ได้ ปัญหามลพิษทางดินจะเกิดขึ้น หนึ่งในมลสารที่จัดเป็นของเสียอันตรายคือสารจำพวก ปิโตรเลียมผลิตภัณฑ์และของเสียจากสารกลุ่มนี้ ของเสียประเภทนี้มีส่วนประกอบของสารอินทรีย์หลายชนิด หนึ่งในจำนวนนี้คือสารประกอบกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) ซึ่งเป็นสารที่ย่อยสลายยากโดยธรรมชาติ สารจำพวกนี้บางชนิดสามารถก่อมะเร็งและก่อการกลายพันธุ์ได้ ดังนั้นความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการบำบัดสาร PAHs ในดินจึงเป็นสิ่งจำเป็นและมีความสำคัญ (กรมควบคุมมลพิษ, 2542)

การบำบัดโดยวิธีทางชีวภาพ (bioremediation) เป็นการกำจัดสารประกอบอินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยจุลินทรีย์จะย่อยสลายสารให้มีความเป็นพิษ หรืออันตรายน้อยลง (Wilson และ Jones, 1993) สามารถใช้วิธีนี้ในการบำบัดปัญหาในสิ่งแวดล้อมซึ่งรวมถึงการบำบัดความเป็นพิษของสาร PAHs การย่อยสลายสารพิษด้วยจุลินทรีย์เป็นกระบวนการที่นิยมใช้ในการลดการปนเปื้อนของสารต่างๆรวมถึง PAHs ในดินและตะกอนดิน หากการย่อยเกิดอย่างสมบูรณ์ (mineralization) จะได้คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และพลังงานใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นสิ่งที่เป็นที่ต้องการมากที่สุด อย่างไรก็ตามการสลาย PAHs บางชนิดอาจเป็นการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างบางส่วน (partial transformation) กระบวนการย่อยสลายอาจเกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว หรือโดยกลุ่มของจุลินทรีย์ (Gibson และ Subramanian, 1984)

การบำบัดทางชีวภาพสามารถทำได้โดยการเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่น (exogenous microorganisms) ที่มีสมบัติย่อยสลาย PAHs ลงในดินบริเวณนั้นได้ (bioaugmentation) แต่จุลินทรีย์ต่างถิ่นมักอยู่รอดได้น้อย เนื่องจากต้องแข่งขันเจริญกับจุลินทรีย์ท้องถิ่น (Wilson และ Jones, 1993) ในมุมมองการกระตุ้นให้จุลินทรีย์ท้องถิ่น (indigenous microorganisms) ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนให้มีประสิทธิภาพ (biostimulation) อาจเพิ่มกิจกรรมในการย่อยสลายได้ดีขึ้น ซึ่งทำได้โดยการเติมสารอาหารลงไปในดิน เช่น ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส (Atlas, 1991) หรือสารอินทรีย์ (Cerniglia, 1993) และปรับภาวะให้เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์

รุจา สารคุณ (2548) พบว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ชนิดไร้ประจุ Brij 35 Tween 80 และ Triton X-100 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสาร PAHs ในสเลอรี่ดินได้ดีเมื่อทำงานร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่คัดเลือกได้จากปุ๋ยหมักใบมะขาม ที่ประกอบด้วยแบคทีเรียที่จัดอยู่ในจีนัส *Zoogloea* sp., *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. (ทิมากร แสงดำ, 2547) และไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK เนื่องจากสามารถทำให้กลุ่มแบคทีเรีย STK เจริญได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวและพบว่าการย่อยสลาย PAHs ในวัฏภาคดินมากกว่าวัฏภาคน้ำ ซึ่งอาจเกิดจากสารลดแรงตึงผิวช่วยให้แบคทีเรียยึดติดกับอนุภาคดินที่มี PAHs ทำให้ลดระยะทางการแพร่ของ PAHs ให้สั้นลง โดยทำให้เซลล์ของแบคทีเรียมีสมบัติไม่ชอบน้ำ (Tang และคณะ, 1998; Poeton และคณะ, 1999) และทำให้แบคทีเรียนำสารเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าแบคทีเรียที่อยู่ในรูปอิสระ (Bastean และคณะ, 2000) หรือการสัมผัสกับไมเซลล์โดยตรงด้วย cell envelope ร่วมกับการเกิด membrane fusion (Miller และ Bartha, 1989) รวมทั้งการที่กลุ่มแบคทีเรีย STK มีสมบัติไม่ชอบน้ำสูง จึงคาดว่ามีความสำคัญในการนำสารประกอบที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำเข้าสู่เซลล์ได้ (ทิมากร แสงดำ, 2547)

เพื่อให้ทราบและเข้าใจวิธีการย่อย PAHs ในดิน งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการย่อยสลายสารไพรีนซึ่งเป็นตัวแทนการย่อยสลายสาร PAHs ในตัวอย่างดิน โดยทำในระบบสเลอรี่ที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ร่วมกับการเติมสารลดแรงตึงผิวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อย และปรับภาวะให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญและการสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไพรีนในดิน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์หรือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพหรือแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถทราบและได้วิธีการสลายไพรีนในดินด้วยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เสริมการทำงานด้วย สารจำพวกลดแรงตึงผิว ทั้งชนิดสังเคราะห์, ชนิดชีวภาพ และจุลินทรีย์ที่สร้างสารประเภทนี้ สำหรับใช้เป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์บำบัดสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ต่อไป

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบปนเปื้อนกระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในแหล่งน้ำ ดิน และ อากาศ ซึ่งสารนี้มีโครงสร้างของคาร์บอนและไฮโดรเจนรวมกันเป็นวงอะโรมาติกเบนซีนมาเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง (linear) เป็นมุมงอ (angular) หรือเป็นกลุ่ม (cluster) ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวมีส่วนทำให้สารประกอบแต่ละชนิดมีความคงทนแตกต่างกันไป สามารถแบ่ง PAHs ตามโครงสร้างทางเคมีได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight PAHs, LMW PAHs) ซึ่งเป็นสารที่มีวงแหวนเบนซีนน้อยกว่า 4 วง และ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight PAHs, HMW PAHs) ซึ่งมีวงแหวนเบนซีนตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป (Kanaly และ Harayama, 2000) การจัดเรียงตัวของวงเบนซีนในโครงสร้างทางเคมีของ PAHs มีส่วนทำให้ PAHs แต่ละชนิดมีความคงทนต่อการสลายแตกต่างกัน โดยสารที่เรียงตัวเป็นเส้นตรงจะมีความคงทนต่อการสลายน้อยกว่าที่เรียงตัวเป็นมุมงอและเรียงตัวเป็นกลุ่ม ตามลำดับ (Blumer, 1976)

สาร PAHs พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมโดยมีแหล่งกำเนิดต่างๆ เช่น จากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิลที่ไม่สมบูรณ์ จากกระบวนการอุตสาหกรรม การเผาไหม้เชื้อเพลิงของกิจกรรมต่างๆ ได้แก่ รถยนต์ การเผาขยะมูลฝอย การผลิตกระแสไฟฟ้าโดยใช้ถ่านหินเป็นเชื้อเพลิง แหล่งกำเนิดจากธรรมชาติ เช่น ไฟป่า เป็นต้น จากกิจกรรมต่างๆเหล่านี้ของมนุษย์ทำให้สาร PAHs แพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมและอาจเป็นผลเสียต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ อีกทั้งยังมีผลกระทบต่อระบบนิเวศในธรรมชาติอีกด้วย

ตัวอย่างสารประกอบ PAHs ที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม (Sofia และคณะ, 2007) ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ประเภทสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

สองวงเบนซีน	สามวงเบนซีน	สี่วงเบนซีน	ห้าวงเบนซีน	หกวงเบนซีน
Naphthalene	Biphenylene	Fluoranthene	Benzo(b)fluoranthene	Benzo(g,h,i)perylene
2-Methylnaphthalene	Acenaphthylene	Pyrene	Benzo(k)fluoranthene	Indeno(c,d)pyrene
1-Methylnaphthalene	Acenaphthene	Chrysene	Benzo(e)pyrene	
2,6-Dimethylnaphthalene	Fluorene	Benzo(a)anthracene	Benzo(a)pyrene	
2,3,5-Trimethylnaphthalene	Anthracene		Perylene	
	Phenanthrene		Dibenz(a,c)anthracene	
	1-Methylphenanthrene			

2.1 การเข้าสู่ร่างกายของสาร PAHs

สาร PAHs เข้าสู่ร่างกายได้ 3 ทางคือ

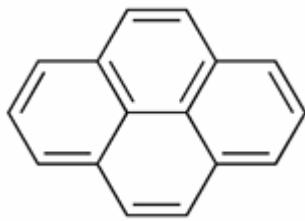
1. ทางจมูก มนุษย์เราได้รับสาร PAHs เข้าสู่ร่างกายได้โดย การสูดดมเอาควันบุหรี่ หรือ อากาศที่เป็นมลพิษเข้าไป (Lin และคณะ, 2001) ผลคือละอองของสารพิษปะปนเข้าไปกับลมหายใจ ซึ่งก่อให้เกิดอาการเจ็บป่วยแบบเรื้อรังตามมา
2. ทางปาก เข้าสู่ร่างกายโดยการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อน PAHs เช่น อาหารประเภท ผัด หรือทอดที่ใช้ความร้อนสูง หรืออาหารที่ไหม้ (Perfetti และคณะ, 1992; Saxton และคณะ, 1993) หรืออาจจะเข้าปากโดยความสะเพร่า เช่น ใช้มือที่เปื้อนสาร PAHs หยิบอาหารเข้าปาก เป็นต้น

3. ทางผิวหนัง เกิดจากการสัมผัสหรือจับต้องสาร PAHs และบุคคลที่มีความเสี่ยงต่อการสัมผัสกับสาร PAHs คือบุคคลที่อยู่ในพื้นที่อุตสาหกรรมต่างๆ (Thakker และคณะ, 1985; Dipple และคณะ, 1990) เนื่องจากพบการแพร่กระจายของสาร PAHs ในบริเวณอุตสาหกรรมมากกว่า บริเวณนอกอุตสาหกรรม และหากเป็นอุตสาหกรรมประเภทที่เป็นแหล่งกำเนิดของสาร PAHs ตามที่กล่าวมาแล้ว ความเข้มข้นของสาร PAHs ที่ปนเปื้อนก็ยิ่งมาก (Wilson และ Jones, 1993)

เนื่องจาก PAHs เป็นสารที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagens) เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogens) เป็นสารที่ทำให้ทารกในครรภ์มีรูปร่างผิดปกติ (teratogens) (International Agency for Research an cancer [IARC], 1983) ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์ได้พยายามหาแนวทางที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารพิษกลุ่มนี้ หนึ่งในวิธีการที่ใช้คือกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (bioremediation) โดยการใช้ประโยชน์จากความสามารถของจุลินทรีย์มาสลายสารพิษให้มีความเป็นพิษลดลงหรือหมดไป (Mueller และคณะ, 1990a) ปรากฏการณ์ในการลดพิษของ PAHs จะต้องอาศัยผลของปฏิกริยาร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ และสภาพแวดล้อมอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ แสง น้ำ ออกซิเจน รวมถึงการเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่น (exogenous microorganism) ที่มีคุณสมบัติย่อยสลาย PAHs ลงในดินบริเวณนั้น (bioaugmentation) หรืออาจกระตุ้นให้จุลินทรีย์ท้องถิ่น (indigenous microorganisms) ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนมีประสิทธิภาพและเพิ่มกิจกรรมในการย่อยสลายสาร PAHs ในบริเวณนั้นได้สูงขึ้น (biostimulation) การลดความเป็นพิษของจุลินทรีย์สามารถเกิดขึ้นได้สองลักษณะคือ การต้านความเป็นพิษ (resistance) และการทนทานต่อความเป็นพิษ (tolerance) ซึ่งเป็นวิธีที่ดีกว่าการบำบัดทางเคมี การฝังกลบ และการเผาที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ค่าใช้จ่ายต่ำ (Lee, 1995) และไม่ก่อให้เกิดสารพิษชนิดใหม่ที่มีอันตรายมากกว่าเดิม เนื่องจากจุลินทรีย์ใช้สารพิษเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน ในการทดลองนี้ได้คัดเลือกสารไพรีน ซึ่งเป็น PAHs ที่มีโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 4 วงเชื่อมต่อกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.1

2.2 ไพรีน (Pyrene)

ไพรีน (Pyrene) หรือชื่อทางเคมีว่า เบนโซ(ดี,อี,เอฟ)ฟีแนนทรีน (benzo[d,e,f]phenanthrene) เป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งในกลุ่มสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ประกอบด้วยวงเบนซีน 4 วงเชื่อมต่อกัน มีหมายเลขสากลทางเคมี (Cas Number) 129-00-0 (Verschueren, 1997)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างไพรีน (Cerniglia, 1992)

สูตรโมเลกุล $C_{16}H_{10}$ (Verschueren, 1997)

น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 202.26 กรัมต่อโมล (Verschueren, 1997)

การละลายในน้ำ 0.13 มก.ต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 °ซ และ 140 นาโนกรัมต่อมล.ที่ 30 °ซ (Jimenez และ Bartha, 1996)

ความถ่วงจำเพาะ 1.271 ที่ 23 °ซ (Verschueren, 1997)

อุณหภูมิหลอมเหลว 151 - 156 °ซ (Verschueren, 1997)

อุณหภูมิกลายเป็นไอ 360 - 404 °ซ (Verschueren, 1997)

ความดันไอ 6.85×10^{-7} มม.ปรอท ที่อุณหภูมิ 20 °ซ (Verschueren, 1997)

เป็นผลึกสีขาว หรือ สีเหลือง (Patnaik, 1992)

ละลายในน้ำมันพาราฟิน 25 มก.ต่อมล. (Jimenez และ Bartha, 1996)

มีค่าครึ่งชีวิตในดินและตะกอนดิน 19.4-630 วัน (Daugulis และ McCracken, 2003)

2.3 การบำบัดไพรีนและสาร PAHs อื่นในสิ่งแวดล้อม

เมื่อไพรีนและสาร PAHs เข้าสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งจัดเป็นมลสาร (Pollutant) มักจะสะสมอยู่ในดิน ตะกอนดิน น้ำ ฝุ่นละออง พืช และอากาศ โดยจะเกาะติดอยู่ในอนุภาคของดิน ตะกอนดิน หรือฝุ่น ซึ่งสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้โดยขบวนการต่าง ๆ ซึ่งการสะสมอยู่ในดินนั้นก่อให้เกิดปัญหามลพิษของดิน ซึ่งเกิดจากการทำลายหรือเกิดการถดถอยของคุณภาพหรือคุณลักษณะของสภาวะใดสภาวะหนึ่ง ที่เกิดจากมลสาร ที่ก่อให้เกิดมลภาวะ ดินเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กเมื่อเกิดการปนเปื้อน สามารถฟุ้งกระจายไปในอากาศ ก่อให้เกิดปัญหามลพิษทางอากาศ ในขณะเดียวกันดินเป็นแหล่งรองรับของเสีย รองรับมลสารต่างๆ จากอากาศ จากน้ำ จากกิจกรรมในชีวิตประจำวันของมนุษย์ (กรมควบคุมมลพิษ, 2548) ดินทำหน้าที่ในการดูดซับมลสารต่างๆ ซึ่งเปรียบได้กับการลดมลพิษ หากดินทำหน้าที่ในการรับมลสารต่างๆ มากเกินไป โดยเฉพาะอย่างยิ่ง มลสารที่ย่อยสลายไม่ได้ ปัญหามลพิษทางดินจะเกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลเสียต่อสุขภาพเกินกว่าระดับที่ปลอดภัยต่อ

สุขภาพของมนุษย์ได้ ในการบำบัดมลพิษทางดินนั้นมิได้หลายวิธี เช่นการบำบัดทางกายภาพ ทางเคมีและทางชีวภาพ (Cerniglia, 1992) โดยรวมสามารถแยกได้ดังนี้

2.3.1 การบำบัดทางกายภาพ

- **การระเหย (Volatization)** สาร PAHs ที่ปนเปื้อนในน้ำและอยู่ที่ผิวน้ำจะมีอัตราการระเหยสูงกว่าสาร PAHs ที่อยู่ที่ผิวดิน จากการศึกษาพบว่าสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะมีอัตราการระเหยได้สูงกว่าสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Ashok และ Saxena, 1995)
- **การแตกสลายโดยแสง (Photodegradation)** กลไกการย่อยสลายจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและปริมาณความเข้มข้นของแสง (Reyes และคณะ, 1998) รวมถึงการใช้รังสีต่างๆ เช่น รังสีแกมมา (Melcher และคณะ, 2002)
- **การดูดซับ (Sorption)** สาร PAHs เป็นสารที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) มีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำ จึงถูกดูดซับติดกับอนุภาคของดินหรือตะกอน (organic matter) ได้อย่างแน่นหนา สาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะเกาะติดแน่นเป็นเวลานานกว่าสาร PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (Chin และคณะ, 1997) หากมีการปนเปื้อนของสาร PAHs ในดินเป็นเวลานาน ดินจะสามารถดูดซับสารปนเปื้อนนั่นไว้ โดยการดูดซึมและแทรกอยู่ระหว่างชั้นน้ำตามช่องว่างภายในอนุภาคดิน ทำให้สารปนเปื้อนถูกชะละลายออกมาได้น้อยและหากสารปนเปื้อนจับกับอนุภาคดินโดยอาศัยพันธะทางเคมี จะทำให้สารถูกชะออกมาได้ยากยิ่งขึ้นทำให้สารอยู่ในรูป bound residue ซึ่ง bound residue ที่เกิดขึ้นนี้ทำให้จุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตในดินนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยกว่าในรูปแบบอื่นๆ (Verstraete และ Devliegher, 1996)
- **การสะสมในสิ่งมีชีวิต (Bioaccumulation)** เมื่อสาร PAHs ปนเปื้อนอยู่ในวัฏภาคไหนซึ่งมีสิ่งมีชีวิตอยู่ ก็จะมีการสะสมเข้าไปในสิ่งมีชีวิตในวัฏภาคนั้นๆได้ สาร PAHs บางชนิดมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ เช่น ไพรีนมีความเป็นพิษต่อ mysid shrimp และหอยสองฝา พีแนทรีนมีความเป็นพิษต่อแพลงตอน ไล้เดียนทะเลเป็นต้น (Spehar และคณะ, 1999) สำหรับสิ่งมีชีวิตบนบกได้แก่ พืช สัตว์ สามารถสะสมแอนทราซีนและเกิดความเป็นพิษได้ (Mitchell และคณะ, 1988) อะซีแนพรีนมีความเป็นพิษต่อไล้เดียนดินมาก (Neuhauser และคณะ, 1985)

2.3.2 การบำบัดทางเคมี

- **การใช้ก๊าซโอโซน** โอโซนเป็นสารออกซิไดซ์ที่แรง จึงใช้เพื่อแตกโมเลกุลสารประกอบอินทรีย์ได้ พบว่าประสิทธิภาพยังไม่ดีนัก ลดได้เฉพาะสาร PAHs โมเลกุลต่ำ แต่จะเป็นการดีหากใช้ร่วมกับการใช้จุลินทรีย์ (Nam และ Kukor, 2000)
- **การใช้สารเคมี** อนุพันธ์ของสารเคมีที่มีสมบัติเกิดอนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl (OH[•]) radicals) จะสามารถแตกสลายสาร PAHs ได้เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) (Nadarajah และคณะ, 2002)

2.3.3 การบำบัดทางชีวภาพ เทคโนโลยีในการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพมีหลายวิธีดังต่อไปนี้ (Trejo และ Quintero, 2000)

- **Bioaugmentation** เป็นวิธีที่มีการเติมจุลินทรีย์ที่ทดสอบแล้วว่ามีความมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษลงไปในบริเวณที่มีการปนเปื้อน
- **Biostimulation** เป็นวิธีที่มีการเติมสารอาหารหรือปัจจัยต่างๆที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ลงไปในบริเวณที่มีการปนเปื้อนเพื่อกระตุ้นให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นมีการเพิ่มจำนวนและมีกิจกรรมในการย่อยสลายสารพิษได้ดีขึ้น
- **Biofilters** เป็นวิธีที่มีการใช้คอลัมน์ยาวที่มีจุลินทรีย์อยู่ภายในเพื่อบำบัดสารปนเปื้อนที่กระจายออกสู่บรรยากาศ
- **Bioreactor** เป็นวิธีการย่อยสลายในถังหมัก
- **Bioventing** เป็นวิธีการบำบัดแหล่งที่ปนเปื้อนโดยมีการให้อากาศและให้สารอาหารเพื่อกระตุ้นการเจริญและกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ประจำถิ่น
- **Composting** เป็นวิธีการบำบัดโดยใช้ออกซิเจนและอุณหภูมิสูงร่วมกับการเติมปุ๋ยหมักหรือวัสดุทางการเกษตรเพื่อเป็นวัสดุค้ำจุนการเจริญของจุลินทรีย์
- **Landfarming** เป็นวิธีการบำบัดแหล่งที่มีการปนเปื้อนโดยการขุดดินหรือปั้มน้ำขึ้นมาแล้วปล่อยให้มีการย่อยสลายของจุลินทรีย์แบบใช้อากาศ (aerobic)

การบำบัดโดยวิธีทางชีวภาพ (bioremediation) เป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดความเป็นพิษของสาร PAHs และกากของเสียอันตรายอื่นๆ โดยการย่อยสลายสารพิษด้วยจุลินทรีย์เพื่อต้องการให้จุลินทรีย์ย่อยสลายสารเคมีหรือสาร PAHs ให้มีความเป็นพิษลดลง ซึ่งกระบวนการย่อยสลายอาจเกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวหรือโดยกลุ่มของจุลินทรีย์ (Gibson และ Subramanian,

1984) ข้อดีของการบำบัดสาร PAHs ด้วยวิธีนี้ คือ เป็นกระบวนการทางธรรมชาติที่ไม่เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม มักมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธีการบำบัดอื่นๆ และช่วยสลายสารพิษนี้ได้รวดเร็วกว่าการสลายเองโดยธรรมชาติ (Kästner และคณะ, 1995) ซึ่งการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์เป็นกระบวนการสำคัญในการกำจัดหรือลดความเป็นพิษของสาร PAHs ได้เป็นอย่างดี ความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs พบในจุลินทรีย์ทุกกลุ่มทั้ง แบคทีเรีย รา ไชยาโนแบคทีเรีย และสาหร่ายเซลล์เดียว โดยจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มจะมีกลไกเฉพาะและแตกต่างกันในการย่อยสลายสาร PAHs (Watanabe, 2001) อย่างไรก็ตาม การบำบัดวิธีดังกล่าวจะประสบความสำเร็จได้ต้องคำนึงถึงปัจจัยแวดล้อมหลายประการ อาทิเช่น ชนิดและสมบัติของสารปนเปื้อน อุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง ปริมาณออกซิเจนที่สามารถนำไปใช้ ความชื้น สารอาหาร เป็นต้น (Guo และคณะ, 2005) รวมถึงการเติมสารลดแรงตึงผิว จะช่วยเพิ่มการละลายสารไฮโดรคาร์บอน ทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น ปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์โดยตรง

2.4 การบำบัด PAHs ในระบบสเลอรี

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นการบำบัดไพลินโดยวิธีทางชีวภาพและเพิ่มกิจกรรมในการย่อยสลายโดยการทำให้ระบบสเลอรีดินเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างจุลินทรีย์กับไพลิน การเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสดังกล่าวเกิดจากดินแตกตัวทำให้ PAHs เคลื่อนไปยังวัฏภาคน้ำอย่างรวดเร็ว รวมทั้งยังเพิ่มการเคลื่อนที่ของจุลินทรีย์อีกด้วย (Doick และ Semple, 2003) มีรายงานวิจัยหลายเรื่องที่ศึกษาเกี่ยวกับการย่อยสลายสาร PAHs ในระบบสเลอรีดินเพื่อเพิ่มความสามารถต่อการย่อย ดังนี้

Labare และ Alexander (1995) ทดลองบำบัดดินปนเปื้อน PAHs แบบสเลอรีด้วยอัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:1 (กรัม/มล.) พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญ และการย่อยสลายพีแนนทรีนได้ดีขึ้นจาก 4.4% เป็น 36.9% ภายใน 34 วัน เมื่อเติม dibutyl phthalate เป็นซัพสเตรตร่วม เช่นเดียวกับรายงานของ Fu และ Alexander (1995) ที่ทำการบำบัด PAHs ในสเลอรีดินด้วยอัตราส่วน 1:10 สามารถเพิ่มการย่อยได้มากกว่าการไม่เติมน้ำลงในระบบ

Lee และคณะ (2001) ศึกษาการบำบัด PAHs ในดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันถ่านหิน (coal tar) ในระบบสเลอรีด้วยอะซิโตนและเอทานอล ทำการทดลองในถังปฏิกรณ์ (bioreactor) อัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:15 (กรัม/มล.) โดยรวมพบว่าการย่อยสลาย PAHs ที่มีวงเบนซีน 2-3 วง มีอัตราการย่อยสลายมากถึง 90% ภายในระยะเวลา 14 วัน สำหรับ PAHs ที่มีวงเบนซีน 4 วง มีอัตราการย่อยสลายน้อยกว่า และ PAHs ที่มีวงเบนซีน 5-6 วง พบอัตราการย่อยสลายน้อยมากประมาณ 25% ภายในระยะเวลา 35 วัน

Doick และ Semple (2003) ศึกษาการย่อยสลายพีแนทรีนที่มีความเข้มข้น 10 มก.ต่อลิตร โดย *Pseudomonas* sp. ร่วมกับการเติมน้ำมันที่มีความเข้มข้น 0%, 0.01% และ 0.05% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเพื่อใช้เป็นขั้วสเตรตร่วมโดยแบคทีเรียเพื่อเพิ่มการย่อยสลายพีแนทรีน และทดสอบที่อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:5 กรัมต่อมล. แบคทีเรียนี้สามารถเปลี่ยนพีแนทรีนที่ติดฉลากด้วย ^{14}C ให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ในรูป $^{14}\text{CO}_2$ เมื่อแบคทีเรียเจริญในสภาวะที่มีน้ำมันเป็นขั้วสเตรตร่วม ซึ่งการย่อยสลายพีแนทรีนขึ้นอยู่กับปริมาณของน้ำมันและอัตราส่วนดินต่อน้ำที่เหมาะสม โดยพบว่าอัตราการย่อยจะเกิดขึ้นได้ดีในช่วงอัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1:2, 1:3 และ 1:5 และการเติมน้ำมัน 0.05% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะช่วยเพิ่มอัตราการย่อย โดยเฉพาะที่ 1:2 และ 1:3 (ดิน:น้ำ) มีอัตราการย่อยมากที่สุด

รุจา สารคุณ (2548) ศึกษาการย่อยสลายฟลูออรีน พีแนทรีน และไพรีน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในระบบสเลอรีที่มีอัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:8 (กรัม/มล.) ร่วมกับการเติมสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ พบว่าการเติม Brij 35 สามารถเพิ่มการย่อยสลายฟลูออรีนได้ดีกว่าสารลดแรงตึงผิวอื่นๆ

2.5 การย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรียบริสุทธิ์

จุลินทรีย์ในธรรมชาติใช้กระบวนการเมตาบอลิซึมหลายแบบในการย่อยสลายสารประกอบทางธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่มีมนุษย์สร้างขึ้น รวมทั้งสาร PAHs การปรับตัวของจุลินทรีย์เพื่อมีความสามารถในการย่อยสลายสารดังกล่าวได้อาจเกิดขึ้นโดยมีการชักนำให้สร้างเอนไซม์ที่จำเป็นหรือการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนซึ่งเป็นผลทำให้จุลินทรีย์สามารถพัฒนาวิถีเมตาบอลิซึมขึ้นมาใหม่เพื่อใช้ในการย่อยสลายสาร PAHs ได้ (Madson, 1998) จุลินทรีย์แต่ละกลุ่มจะมีกลไกการย่อยสลายสาร PAHs แตกต่างกันไป

มีรายงานวิจัยหลายเรื่องที่ศึกษาเกี่ยวกับการย่อยสลายไพรีนโดยใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน หรือการย่อยสลายแบบวิถีโคเมตาบอลิซึม (Boldrin และคณะ, 1993; Geiselbrecht และคณะ, 1998 และ Walter และคณะ, 1991) ถึงแม้ไพรีนไม่ได้ก่อให้เกิดมะเร็ง แต่มีรายงานว่าไพรีนสามารถกระตุ้นเบนโซ(เอ)ไพรีนให้ก่อมะเร็งได้ (cocarcinogenic potential) (USEPA, 1979) และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นเซลล์สร้างเม็ดสีผิวได้ (Iwata และคณะ, 1981) ไพรีนจะทนทานต่อการเข้าย่อยสลายของแบคทีเรียภายใต้สภาวะไร้อากาศ และโดยทั่วไปไพรีนจะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ภายใต้สภาวะมีอากาศ (Pothuluri และคณะ, 1992)

การย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรียบริสุทธิ์จะได้เซลล์เพิ่มมากขึ้นและได้น้ำกับคาร์บอนไดออกไซด์ หากมีการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ (Cerniglia, 1992 ; Wilson และ Jones, 1993) โดยปกติแบคทีเรียจะย่อยสลายสารที่ละลายน้ำได้ง่ายกว่าสารที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นการย่อยสลายสาร PAHs ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ แบคทีเรียทั่วไปจะไม่สามารถย่อยสลายสารนี้ได้ แต่มีแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้นที่สามารถสร้างเอนไซม์ต่างๆ ที่ใช้ในการย่อยสลายสาร PAHs เพื่อจะนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ส่วนใหญ่แบคทีเรียสายพันธุ์เดียวจะสามารถย่อยสลายสาร PAHs น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ที่ประกอบไปด้วยวงเบนซีน 2-3 วง แบคทีเรียมีกลไกนำสาร PAHs ไปใช้ โดยเข้าทำปฏิกิริยากับสารโดยการสัมผัสโดยตรงกับผลิตภัณฑ์ PAHs แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ซึ่งจะเพิ่มการละลายน้ำของสาร PAHs ช่วยให้แบคทีเรียสัมผัสกับสาร PAHs ได้ง่ายขึ้น ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นที่ผนังเซลล์ เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยชั้นฟอสโฟไลปิด ดังนั้น PAHs จะถูกส่งผ่านผนังเซลล์โดยการแพร่ (passive diffusion) โดยไม่ใช้พลังงานจากเซลล์ (Bugg และคณะ, 2000) เมื่อสาร PAHs เข้าสู่เซลล์ เอนไซม์แรกๆ ที่เริ่มการย่อยสลายคือ ออกซิจีเนส กระบวนการต่างๆ จะดำเนินอย่างต่อเนื่องจนได้คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และพลังงานที่ใช้ในการเจริญของแบคทีเรีย โดยดังที่กล่าวมาข้างต้น กระบวนการดังกล่าวจะเกิดอย่างสมบูรณ์ ต้องอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด

จากรายงานวิจัยที่ผ่านมา มีการคัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์ที่ย่อยสลายสาร PAHs จากตัวอย่างดิน น้ำ หรือตะกอนดินในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนสารประกอบในกลุ่มนี้ โดยพบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ส่วนใหญ่มีทั้งกลุ่มที่เป็นแกรมบวกเช่น *Mycobacterium* sp. *Nocardia* sp. และกลุ่มที่เป็นแกรมลบ เช่น *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp. และ *Sphingomonas* sp. เป็นต้น ตัวอย่างแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายไพรีนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (mineralization) สรุปไว้ในตารางที่ 2.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 แสดงแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้

แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
<i>Rhodococcus</i> sp. สายพันธุ์ UW1	Walter และคณะ (1991)
<i>Gordona</i> sp. สายพันธุ์ BP9	Kästner และคณะ (1994)
<i>Rhodococcus</i> sp. สายพันธุ์ S Pyr Na 1	Bouchez และคณะ (1995)
<i>Aureobacterium</i> สายพันธุ์ S Ant Mu 3	Bouchez และคณะ (1995)
<i>Mycobacterium flavescens</i>	Dean-Ross และ Cerniglia (1996)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> สายพันธุ์ VUN10,010	Boonchan และคณะ (2000)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> สายพันธุ์ VUN10,003	Juhasz และคณะ (2000)
<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ AP1	Vila และคณะ (2001)
<i>Mycobacterium gilvum</i> สายพันธุ์ B1	Gauthier และคณะ (2003)
<i>Mycobacterium esteraromaticum</i> สายพันธุ์ B21	Gauthier และคณะ (2003)
<i>Porphyrobacter</i> สายพันธุ์ B51	Gauthier และคณะ (2003)

พบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์ต่างๆ จะสามารถย่อยสลายสาร PAHs ได้หลายชนิด เนื่องจากออกซิจีเนส เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสับสเตรตได้หลายชนิด (broad specificity enzyme) ซึ่งถือว่าเป็นลักษณะที่ดี เพราะในสิ่งแวดล้อมมีการปนเปื้อนสาร PAHs หลายชนิด (Baver และ Capone, 1988 ; Stringfellow และ Aitken, 1995)

2.6 การย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย

นอกจากแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้ ยังมีกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้เช่นกัน ตามปกติในสิ่งแวดล้อมที่ถูกปนเปื้อนนั้นโดยเฉพาะดินหรือตะกอนดินต่างๆ ที่นำมาคัดแยกแบคทีเรียที่ใช้ไพรีนได้ แบคทีเรียในแหล่งนั้นๆ จะมีการทำงานแบบอาศัยซึ่งกันและกันอยู่แล้ว โดยปกติสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะถูกย่อยสลายได้ยากโดยจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว การย่อยสลายโดยกลุ่มจุลินทรีย์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs ให้ดียิ่งขึ้น ที่สำคัญยังทำให้เกิดการย่อยสลายสาร PAHs ได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) ซึ่งกระบวนการย่อยสลายโดยกลุ่มจุลินทรีย์ มีความสำคัญต่อการย่อยสลายสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ดังต่อไปนี้

Bouchez และคณะ (1995) ได้ใช้แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ SNaPKa1 ที่สามารถใช้แนพทาลีนได้และ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ SPheNa1 ที่สามารถใช้พีแนทรีนได้ เมื่อเติมเชื้อทั้งสองในภาวะที่มีแนพทาลีนและพีแนทรีน พบว่าสามารถลดแนพทาลีนได้หมดและลดพีแนทรีนได้ 83 % แม้ว่าแนพทาลีนจะมีพิษต่อสายพันธุ์ SPheNa1 ก็ตาม และเมื่อใช้ *Rhodomonas* sp. สายพันธุ์ SFltNa1 ร่วมกับ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ SPheNa1 ที่สามารถใช้พีแนทรีนและฟลูออแรนทีนได้ทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อเติมรวมกันพบว่ามีประสิทธิภาพการย่อยทั้งพีแนทรีนและฟลูออแรนทีนสูงชันอย่างมาก คาดว่าการย่อยสาร PAHs ตามสภาวะจริงของสิ่งแวดล้อม (รวมกันมากกว่า 1 ชนิด) จะเกิดการทำงานร่วมกันของกลุ่มแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่นอย่างมีประสิทธิภาพสมบูรณ์

Boonchan และคณะ (2000) ศึกษาการย่อยสลายสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงได้แก่ เบนโซ[เอ]แอนทราซีน, เบนโซ[เอ]ไพรีน และไดเบนโซ[เอ,เอช]แอนทราซีน โดยแบคทีเรีย *Stenotrophomonas maltophilia* สายพันธุ์ VUN 10,010, กลุ่มแบคทีเรียสายพันธุ์ VUN 10,009 และรา *Penicillium janthinellum* สายพันธุ์ VUO 10,201 พบว่า *P. janthinellum* สายพันธุ์ VUO 10,201 ไม่สามารถย่อยสลายสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงได้อย่างสมบูรณ์ สามารถย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนได้เป็นสารมัธยันตร์ที่ไม่สามารถย่อยสลายต่อไปได้ แต่เมื่อนำ *S. maltophilia* สายพันธุ์ VUN10,010 มาเลี้ยงร่วมกับราชชนิดนี้ในอาหาร basal salts medium (BSM) ที่มีเบนโซ[เอ]ไพรีน พบการเจริญของแบคทีเรียและเกิดการย่อยสลายเบนโซ(เอ)ไพรีนได้อย่างสมบูรณ์ สำหรับเบนโซ[เอ]แอนทราซีน และไดเบนโซ[เอ,เอช]แอนทราซีน สามารถเกิดการย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อนำกลุ่มแบคทีเรียสายพันธุ์ VUN 10,009 หรือ *S. maltophilia* สายพันธุ์ VUN 10,010 มาเลี้ยงร่วมกับรา *P. janthinellum* สายพันธุ์ VUO 10,201 เช่นเดียวกัน

Juhasz และคณะ (2000) รายงานว่า *Pseudomonas cepacia* สายพันธุ์ VUN 10,001 VUN 10,002 และ VUN 10,003 สามารถย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน ไดเบนซ์ [เอ,เอช] แอนทราซีน และไครซีน ที่มีโครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีน 5, 6 และ 4 ตามลำดับ เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงานได้

Kanally และคณะ (2002) พบว่าการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของกลุ่มจุลินทรีย์ *Ralstonia eutropha*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Mycobacterium ratibonense*, *Rhodanobacter lindaniclasticus* RP555, *Rhodanobacter* sp. สายพันธุ์ BPC1, *Burkholderia* sp. และ *Sphingobacterium* sp.

Ambrosoli และคณะ (2005) ได้ทดสอบการย่อยสลายไบฟีนิล, ฟลูออรีน, พีแนทรีน และไพรีนในดินโดยกลุ่มแบคทีเรียจากดินบริเวณนาข้าว โดยทำการทดสอบภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ก่อนการทดสอบการย่อยสลาย PAHs กลุ่มแบคทีเรานั้นต้องนำมาเลี้ยงในสภาวะไร้ออกซิเจน

ออกซิเจนเป็นเวลา 20 วัน ก่อนนำไปย่อยในดินตัวอย่างซึ่งแบ่งออกเป็น 6 ลักษณะ คือ ดินในสภาวะที่มีออกซิเจน (H_2O) ซึ่งมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน, ดินในสภาวะไร้ออกซิเจน (NO_3) ซึ่งมีไนเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอน, ดินในสภาวะที่มีออกซิเจนและมีการเติมอะซิเตท ($H_2O+acetate$), ดินในสภาวะไร้ออกซิเจนและมีการเติมอะซิเตท ($NO_3+acetate$), ดินในสภาวะที่มีออกซิเจนและมีการเติมกลูโคส ($H_2O+glucose$) และดินในสภาวะไร้ออกซิเจนและมีการเติมกลูโคส ($NO_3+ glucose$) พบว่าการย่อยสลาย PAHs ทั้งหมดเกิดขึ้นได้ดีและมีค่าใกล้เคียงกันในทุกสภาวะที่ทำการทดสอบทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยจะพบว่าในสภาพไร้ออกซิเจนอัตราการย่อยสลายมีมากกว่าที่มีออกซิเจนและพบว่าไบฟิโนลดถูกย่อยสลายได้มากกว่าสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอื่นเนื่องจากไบฟิโนลมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและมีความสามารถในการละลายน้ำสูง จุลินทรีย์จึงสามารถนำไปใช้ได้ง่าย นอกจากนี้พบว่าเมื่อมีการเติมกลูโคสและอะซิเตท ซึ่งเป็นโคเมตาบอลิซึมจะช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายสาร PAHs เหล่านี้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

Guo และคณะ (2005) ได้พบกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง มีความสามารถใช้พีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอนและเป็นแหล่งพลังงาน กลุ่มแบคทีเรียที่พบนี้ ได้แก่ *Rhodococcus* (HCCS), *Sphingomonas* (MWFG) และ *Paracoccus* (SPNT) ซึ่งคัดแยกได้จากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน ในการทดสอบการย่อยสลาย PAHs ได้มีการนำพีแนนทรินร่วมกับฟลูออรีนในอาหารเหลว พบว่าพีแนนทรินและฟลูออรีนถูกย่อยสลายได้หมดภายใน 7 วัน

Yu และคณะ (2005) ศึกษาการย่อยสลายฟลูออรีน พีแนนทริน และไพรีนที่นำมาวมกัน โดยกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน ได้แก่ *Rhodococcus* sp., *Acinetobacter* sp. และ *Pseudomonas* sp. โดยทดสอบการย่อยสลายภายใต้สภาวะที่เป็นตะกอนดินและดินในระบบสเลอรี พบว่ากลุ่มแบคทีเรียนี้สามารถย่อยสลายฟลูออรีน พีแนนทริน ได้ 100% หลังจากการเจริญของเชื้อได้ 4 สัปดาห์ ในสภาวะที่เป็นตะกอนดินสำหรับดินในระบบสเลอรีพบว่าการย่อยสลายฟลูออรีน พีแนนทริน มีมากกว่าในสภาวะที่เป็นตะกอนดิน อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการย่อยสลายไพรีนนั้นช้ากว่า ฟลูออรีน พีแนนทริน ทั้งนี้เนื่องจากกลุ่มแบคทีเรียมีความสามารถใช้ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำได้ก่อน

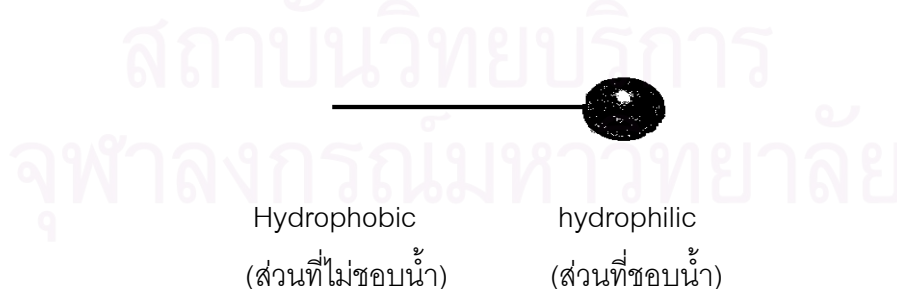
Ruberto และคณะ (2006) ทดสอบการย่อยสลายพีแนนทรินในดินที่เก็บมาจากทวีปแอนตาร์กติกา ซึ่งเป็นทวีปที่มีอากาศหนาวและดินบริเวณนี้เป็นดินที่ขาดแร่ธาตุและสารอาหาร และมีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารปนเปื้อนน้อย เมื่อทดสอบการย่อยสลายพีแนนทรินที่มีความเข้มข้นสูง (1744 ppm) โดยทำการทดสอบการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรียที่ทนต่ออุณหภูมิต่ำ (a psychrotolerant PAH-degrading bacterial consortium) และมีการเติม

แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนร่วมกับการเติมสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Brij 700) พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการย่อยสลายพีแนทรีนได้ 46.6% ภายใน 56 วัน ซึ่งอัตราการย่อยสลายมีมากกว่าชุดที่ไม่มีเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนร่วมกับการเติมสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ในการทดลองได้ทำในสภาวะเดียวกับทวีปแอนตาร์กติกา (Antarctic environmental conditions) ซึ่งจากผลการทดลองมีความเป็นไปได้ว่าในอนาคตสามารถบำบัดสารปนเปื้อนได้ที่อุณหภูมิต่ำโดยอาศัยการย่อยสลายทางชีวภาพทั้งวิธีการเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่น (bioaugmentation) ที่ทนต่ออุณหภูมิต่ำและมีความสามารถในการย่อยสลายร่วมกับการเติมแหล่งสารอาหาร (biostimulation)

ทิมากร แสงดำ (2547) ได้คัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย STK จากปุ๋ยหมักใบมะขาม โดยกลุ่มแบคทีเรียประกอบด้วยแบคทีเรียที่จัดอยู่ในจีนัส *Zoogloea* sp., *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. สามารถย่อยสลายไพรีนได้หมดภายในเวลา 8 วัน ที่ความเข้มข้นของไพรีนเริ่มต้น 100 มก.ต่อลิตร และสามารถใช้สาร PAHs อื่นได้อีกหลายชนิด ได้แก่ พีแนทรีน ไดเบนโซฟูแรน อะซีแนฟทีน อะซีแนฟทีน รวมทั้งสามารถย่อยสลายแอนทราซีน และฟลูออรีนได้เล็กน้อย

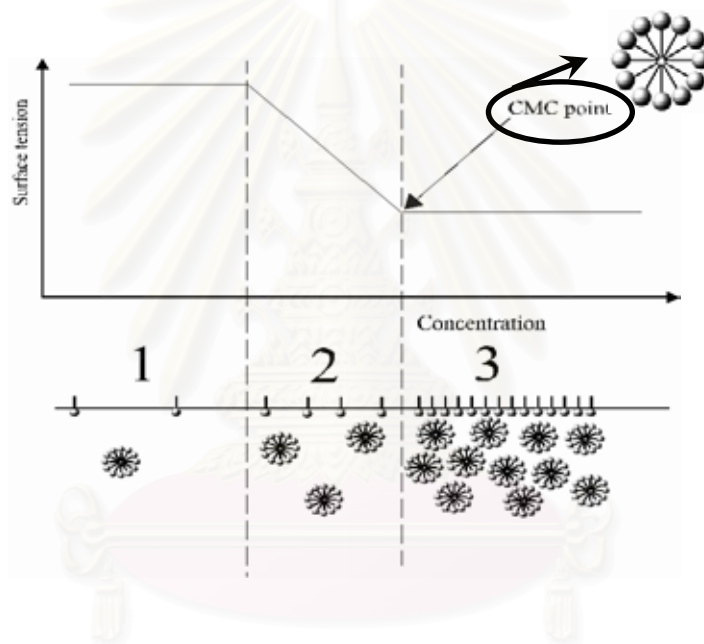
2.7 การเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดไพรีนโดยการเติมสารลดแรงตึงผิว

สารลดแรงตึงผิว เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มี 2 ส่วนสำคัญ คือ ส่วนที่มีประจุ (มีขั้ว) กับส่วนที่ไม่มีประจุ (ไม่มีขั้ว) ซึ่งมีคุณสมบัติชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ตามลำดับดังรูปที่ 2.2 จากผลการทดลองที่ผ่านมา พบว่ามีบางชนิดที่สามารถเพิ่มการละลายของไพรีนและสาร PAHs อื่นได้มากขึ้น ดังรายงานของ Madsen และ Kristensen (1997) เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยไพรีนในดินปนเปื้อนได้เกิน 50% ในเวลา 42 วัน โดยเติม non-ionic surfactant ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อกรัมของดินในขณะที่บางชนิดยับยั้งการลดไพรีน แต่ส่งเสริมการการเจริญของจุลินทรีย์โดยรวม ยกเว้นจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้ (degraders) (Carmichael และ Pfaender, 1997)



รูปที่ 2.2 ลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Cooper, 1980)

เมื่อสารลดแรงตึงผิวอยู่ในตัวทำละลายเช่น น้ำ จะเกิดการรวมตัวกันเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) โดยจะหันเอาส่วนที่ชอบน้ำไว้ด้านนอก และส่วนที่ชอบไขมันไว้ด้านใน แสดงดังรูปที่ 2.3 ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้สารลดแรงตึงผิวเกิดการรวมตัวเป็นไมเซลล์ เรียกว่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ Critical Micelle Concentration (CMC) ซึ่งจะมีค่าจำเพาะสำหรับสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด โครงสร้างไมเซลล์ในน้ำจะอยู่ตัวเนื่องจากแรงดึงดูดระหว่างหมู่ไฮโดรคาร์บอนซึ่งอยู่ด้านในของไมเซลล์ แรงนี้เรียกว่า hydrophobic interaction การเกิดโครงสร้างในรูปไมเซลล์ทำให้สารลดแรงตึงผิวละลายน้ำได้ และสามารถลดแรงตึงผิวระหว่างชั้น (phase) ของสารที่มีขั้วแตกต่างกันได้ เช่น ราคาน้ำมันกับน้ำ



รูปที่ 2.3 การเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวและค่าของความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ที่ก่อให้เกิดไมเซลล์ ซึ่งเรียกว่าจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ หรือ CMC (Cheng และ Wong, 2006)

2.7.1 ชนิดสารลดแรงตึงผิว สามารถแบ่งสารลดแรงตึงผิวเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

2.7.1.1 สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Synthetic surfactants)

เป็นสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่ผลิตได้จากปิโตรเลียม เช่น แอกอฮอล์ อัลคิลเบนซีน อัลคิลฟีนอล หรือผลิตจากวัตถุดิบธรรมชาติเช่น ได้จากน้ำมันพืช น้ำมันสัตว์ ไขมัน กรดไขมัน และแอลกอฮอล์ คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น โดยผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ตัวอย่าง

ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ คือดีเทอร์เจนท์ (detergent) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการทำมา
สะอาด โดยมีส่วนประกอบหลักเป็นสารลดแรงตึงผิว (Clint, 1992) สามารถจำแนกชนิดของสาร
ลดแรงตึงผิว โดยอาศัยความแตกต่างในโครงสร้างของโมเลกุล ได้ดังนี้

- 1.1 Anionic surfactants (สารลดแรงตึงผิวประจุลบ)
- 1.2 Cationic surfactants (สารลดแรงตึงผิวประจุบวก) นิยมใช้ในงานที่เกี่ยวข้องกับผ้า และ
ในครีมขนาดผม
- 1.3 Zwitterionic surfactants หรือ Amphoteric surfactants เป็นสารลดแรงตึงผิวที่
โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยทั้งประจุลบ และประจุบวก สารประกอบกลุ่มนี้ให้
ความละมุนต่อผิวหนังมากกว่าสารลดแรงตึงผิวประจุลบ และระคายเคืองตาน้อยมาก
จึงนิยมใช้กับแชมพูเด็ก
- 1.4 Non-ionic surfactants เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ไร้ประจุ
- 1.5 Combination surfactants คือสารลดแรงตึงผิวที่รวมเอา non-ionic และกลุ่ม
anionic เข้าไว้ด้วยกันเช่น alkyl ethoxy sulphate

2.7.1.2 สารลดแรงตึงผิวธรรมชาติ (natural surfactant)

สารลดแรงตึงผิวสามารถพบได้ในธรรมชาติ ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป และมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต เช่น ในเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ฟอสโฟลิปิดนี้จะทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิวในเยื่อเซลล์ ในน้ำมันไขมันส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์ แต่มีจำนวนน้อยที่อยู่ในรูปฟอสโฟลิปิด และ ไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ช่วยให้ไขมันชั้นในนมเสถียร ในระหว่างกระบวนการย่อยอาหารไขมันจะถูกทำให้เป็นอิมัลชัน โดยฟอสโฟลิปิด หรือโมโนกลีเซอไรด์ จากนั้นเอนไซม์ไลเปส (lipase) จากตับอ่อนจะย่อยไตรกลีเซอไรด์ ที่อยู่ในรูปของอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil/water) อิมัลชันนี้จะถูกเปลี่ยนให้เป็นไขมันอิสระและโมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งทั้งสองเป็นสารลดแรงตึงผิวที่แรง และสามารถเกิดไมเซลล์ร่วมกับเกลือน้ำดี ได้เป็นไขมันละลายง่าย (solubilised fat) ที่จำเป็นซึ่งสามารถผ่านผนังลำไส้ได้ เกลือน้ำดี ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวนี้จะผลิตขึ้นในตับและนำไปเก็บไว้ในถุงน้ำดี สารลดแรงตึงผิวที่พบในระบบเลือด ได้แก่ ซีรัมอัลบูมินซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารก่ออิมัลชันที่ดี สารลดแรงตึงผิวที่ได้จากธรรมชาติอื่นๆ เช่น อคาเซีย (acacia) เจลาติน (gelatin) ลานอลิน (lanolin) ขี้ผึ้ง (beewax) เลซิธิน (lecithin) ไสโคลเดกซ์ตริน (cyclodextrin) และแซฟโฟนิน (saponin) เป็นต้น (Clint, 1992)

2.7.1.3 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant)

จุลินทรีย์ทั้งโปรคาริโอต และยูคาริโอต สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ (Lang, 2002) สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ มักจะเป็นพวกไขมัน (lipids) สมบัติของสารลดแรงตึงผิวเหล่านี้ เป็นผลมาจากการรวมกันของควมมีขั้วไว้ในโมเลกุลเดี่ยวกับความไม่มีขั้วหรือส่วนที่ไม่ละลายน้ำจะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทั่วไปตัวอย่างเช่น สายโซ่ไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมัน ความมีขั้วหรือกลุ่มที่ละลายน้ำ ได้แก่ กลุ่มที่ทำหน้าที่เอสเทอร์ และแอลกอฮอล์ของไขมัน ฟอสเฟตที่ส่วนประกอบของฟอสโฟลิปิด และน้ำตาลของไกลโคลิปิด (Cooper และ Zajic, 1980)

จุลินทรีย์สามารถผลิตได้ทั้งสารลดแรงตึงผิวที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากและน้อย ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะเป็นพวกไกลโคลิปิด หรือ เพพติดีลิปิด (ไลโปเพพไทด์) สารพวกไกลโคลิปิด ได้แก่ ทรีฮาโลส และ ไคโครีนโนมายคอคเลต ซอโฟโรลิปิด และ แรมโนลิปิด สารพวก เพพติดีลิปิด ได้แก่ เซอแฟคติน วิสคอกซิน และ พอลิมิกซิน ที่มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียได้ สำหรับสารลดแรงตึงผิวที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก จะเป็นสารพวก แอมฟิฟิลิก ไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ ไลโปโปรตีน หรือเป็นสารประกอบเหล่านี้รวมกัน (combination) (Rosenberg และ Ron, 1999)

ตัวอย่างชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สรุปไว้ในตารางที่ 2.3

ซึ่งสามารถจัดจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เป็น 5 ประเภท ดังต่อไปนี้ (Banat, 1995; Catherine, 2005)

3.1 ไกลโคลิปิด (Glycolipids) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตหรือน้ำตาลเชื่อมต่อกับไขมัน เช่น แรมโนลิปิด (Rhamnolipids) ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* ซอโฟโรลิปิด (Sophorolipids) ผลิตโดย *Torulopsis* sp. ทรีฮาโลลิปิด (Trehalolipids) ผลิตโดย *Rhodococcus erythropolis* และไกลโคลิปิด (Glycolipids) ผลิตโดย *Alcanivorax borkumensis*

3.2 ไลโปเพพไทด์ (lipopeptides) และ ไลโปโปรตีน (lipoproteins) ประกอบด้วยกรดอะมิโนเชื่อมต่อกับไขมัน เช่น ไคเคนนิซิน (lichenysin) ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* เซอร์แฟคติน (surfactin) ผลิตโดย *B. subtilis* ซับทิลิซิน (subtilisin) ผลิตโดย *B. subtilis* เซอร์ราเวตติน (serrawettin) ผลิตโดย *Serratia marcescens* อาร์โทรแฟคติน (arthrofactin) ผลิตโดย *Arthrobacter* sp. และ สเตรปโตแฟคติน (streptofactin) ผลิตโดย *Streptomyces tendae*

3.3 กรดไขมัน (Fatty acids) และ ไขมัน (Neutral lipids) เช่น รูบิเวตติน R1 (rubiwettin R1) ผลิตโดย *Serratia rubidaea* และออร์นินีนลิปิด (ornithinelipids) ผลิตโดย *Pseudomonas rubescens*

3.4 ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) ประกอบด้วยฟอสเฟต เชื่อมต่อกับกรดไขมัน และกลีเซอรอล เช่น ฟอสฟาทีดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) ผลิตโดย *Thiobacillus thiooxidans* ฟอสฟาทีดิลไคโนสิทอล (phosphatidylinositol) ผลิตโดย *T. thiooxidans* และ ฟอสฟาติก แอซิด (phosphatidic acid) ผลิตโดย *T. thiooxidans*

3.5 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactants) เป็นสารประกอบโปรตีนของพอลิแซ็กคาไรด์อื่นๆ (polysaccharide-protein complexes) เช่น อิมัลชัน (emulsan) ผลิตโดย *Acinetobacter calcoaceticus* อลาซาน (alasan) ผลิตโดย *A. radioresistaens* และ ไบโอดีสเพอร์ซัน (biodispersan) ผลิตโดย *A. calcoaceticus*

ตารางที่ 2.3 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Emeritus, 2001)

จุลินทรีย์	ชนิดของสารลดแรงตึงผิว
<i>Torulopsis bombicola</i>	Glycolipid (sophorose lipid)
<i>Torulopsis petrophilum</i>	Glycolipid and/or protein
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glycolipid (rhamnose lipid)
<i>Arthrobacter</i>	Glycolipid
<i>Bacillus subtilis</i>	lipoprotein (surfactin)
<i>Arthrobacter paraffineus</i>	Sucrose and fructose glycolipids
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	rhamnose lipid
<i>Candida tropicalis</i>	Polysaccharide-fatty acid complex
<i>Corynebacterium lepus</i>	Corynomycolic acids
<i>Acinetobacter</i> sp. HO1-N	Fatty acids, mono-and diglycerides
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Rag-1	Lipoheteropolysaccharide (Emulsan)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 2CAC	Whole cells (lipopeptide)
<i>Candida lipolytica</i>	liposan (mostly carbohydrate)

2.7.2 ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการบำบัดสารพิษในดิน

ดินเป็นแหล่งที่อยู่ของสิ่งมีชีวิตที่มีความซับซ้อนและมีความหลากหลายทางด้านปัจจัยทางเคมีและกายภาพ ซึ่งมีผลต่อการนำสารประกอบอินทรีย์ที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิกไปใช้ประโยชน์โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน (Straube และคณะ, 2003) โดยการปนเปื้อนสาร PAHs หรือสารประกอบอินทรีย์ในดินมีรูปแบบการอยู่รวมกันภายในอนุภาคดินที่แตกต่างกัน หากมีการปนเปื้อนของสาร PAHs ในดินเป็นเวลานาน ดินจะสามารถดูดซับสารปนเปื้อนนั่นไว้ โดยการดูดซึมและแทรกอยู่ระหว่างชั้นน้ำตามช่องว่างภายในอนุภาคดิน ทำให้สารปนเปื้อนถูกชะละลายออกมาได้น้อยและหากสารปนเปื้อนจับกับอนุภาคดินโดยอาศัยพันธะทางเคมี จะทำให้สารถูกชะออกมาได้ยากยิ่งขึ้น มีรายงานจำนวนมาก บ่งชี้ว่าแบคทีเรียหลายชนิดมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่มีสารเคมีที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิก ซึ่งโดยทั่วไปการนำสารประกอบเหล่านี้ไปใช้ในการเจริญอาจจะไม่เหมาะสมหรือง่ายนัก จากหลักฐานทางการทดลองและทฤษฎีแสดงให้เห็นว่า การย่อยสลายสาร PAHs จำเป็นต้องอาศัยกลไกต่างๆ ของแบคทีเรียเพื่อช่วยส่งเสริมการนำสารไปใช้ประโยชน์ (Wick และคณะ, 2002) ได้แก่ระบบการนำสารผ่านเข้าเซลล์ที่มีสัมพรรคภาพสูง (high-affinity uptake systems) ความสามารถในการยึดเกาะกับซับสเตรตที่เป็นของแข็ง การสร้างและปลดปล่อยสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเหล่านี้สามารถทำให้เกิดอิมัลชันที่เสถียร ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าการเกิดอิมัลชันที่เสถียรนั้นจะทำให้แบคทีเรียสามารถยึดเกาะติดกับพื้นผิวของสารประกอบสารไม่ชอบน้ำได้อย่างแข็งแรง ทำให้เพิ่มความสามารถในการบำบัดสารโดยชีวภาพได้ (Rosenberg และ Rosenberg, 1981) หนึ่งในวิธีการบำบัดสารพิษโดยทางชีวภาพที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิว (Biostimulation) ซึ่งเป็นการกระตุ้นเสริมให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินนั้นมีการเจริญ และมีความสามารถในการสลายสารพิษได้ดีขึ้น โดยเพิ่มการละลายสารไฮโดรคาร์บอน ทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Haigh, 1996) จากกลไกดังกล่าวสามารถเพิ่มการละลายน้ำของสาร PAHs โดยช่วยให้แบคทีเรียสัมผัสกับสาร PAHs ได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการย่อยสลายโดยชีวภาพด้วยการควบคุมสภาวะแวดล้อมในดินเพื่อให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายอาจทำได้โดยการควบคุม pH และอัตราส่วน C:N:P การเติมปุ๋ยขาว สารอาหาร หรือปุ๋ยตามความเหมาะสม การควบคุมความชื้นในดิน การให้อากาศ การควบคุมอุณหภูมิ และการรักษาระดับของอุณหภูมิให้คงที่ รวมถึงการเติมสารลดแรงตึงผิว เพื่อช่วยเพิ่มการละลายสารไฮโดรคาร์บอนเพื่อที่แบคทีเรียจะสามารถจะย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Zhang และ Miller, 1992)

Tiehm (1994) พบว่าความสามารถในการละลายของ PAHs จะขึ้นกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำของสารลดแรงตึงผิว โดยสารลดแรงตึงผิวที่มีส่วนที่ไม่ชอบน้ำมากกว่าจะมีความสามารถในการ

ละลายได้มากกว่าสารลดแรงตึงผิวที่มีส่วนที่ไม่ชอบน้ำน้อยกว่า และการทดลองของ Lui และคณะ (1995) พบว่า Brij 30 จะถูกย่อยสลายไปพร้อมๆ กับการสลายของแนพธาซีน แต่ Triton X-100 จะไม่ถูกสลายไปด้วย

Margesin และ Schinner (1999) ทดลองการบำบัดน้ำมันดีเซลด้วยวิธีทางชีวภาพโดยเติมโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า SDS ที่ความเข้มข้นต่ำ (50-100 mg/l⁻¹) สามารถเพิ่มอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพได้ ในทางตรงกันข้าม SDS ที่ความเข้มข้นสูง (500-1000 mg/l⁻¹) จะยับยั้งการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

Pinto และ Moore (2000) พบว่า Tween 80 สามารถชะ PAHs ที่มีวงแหวน 4-5 วง ออกจากดินได้ และส่งเสริมให้มีการย่อยสลายในวัฏภาคน้ำโดยจุลินทรีย์ และมีรายงานว่า เมื่อเติมเซอร์แฟคตินที่ยังไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (crude surfactin) ที่มีความเข้มข้นมากกว่าค่า CMC สามารถส่งเสริมการย่อยสลายสารประกอบแอมติกไฮโดรคาร์บอนได้ 41% (Olivera และคณะ, 2000)

Vipulanandan และ Ren (2000) เปรียบเทียบการใช้สารลดแรงตึงผิวในการละลายสาร PAHs ด้วยแรมโนลิปิด โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) และ Triton X-100 พบว่าแรมโนลิปิด (10 มก./ลิตร) สามารถเพิ่มการละลายแนพธาซีน (30 มก./ลิตร) ได้มากกว่า SDS 30 เท่า แต่จะใช้เวลาในการย่อยสลายโดยวิธีชีวภาพเป็นเวลา 40 วัน ในขณะที่ Triton X-100 (10 มก./ลิตร) ใช้เวลาในการย่อยสลาย 100 ชั่วโมง เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะถูกใช้ไปเป็นแหล่งคาร์บอนก่อนจะเกิดการย่อยสลายแนพธาซีน

Straube และคณะ (2003) ใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* strain 64 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถย่อยสลายสาร PAHs ร่วมกับการเติมสารอาหาร (biostimulation/bioaugmentation) เพื่อเพิ่มอัตราการย่อยสลายสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดิน พบว่าสาร PAHs ลดลง 87% และ เบนโซ[เอ]ไพรีน ลดลง 67% และเมื่อขยายขนาดการทดลอง พบว่าสาร PAHs ลดลง 86% และ เบนโซ[เอ]ไพรีน ลดลง 87% ในเวลา 16 เดือน เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีการสร้างสารลดแรงตึงผิว ก่อให้เกิดการย่อยสลายสาร PAHs โดยชีวภาพขึ้น

Zhao และคณะ (2005) ทดสอบการรวมกันของสารลดแรงตึงผิว 2 ชนิด คือ 1. สารลดแรงตึงผิวประจุลบ (anionic) ได้แก่ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) และ สารลดแรงตึงผิวที่ไร้ประจุ (nonionic) ได้แก่ Triton X-100, Tween 80 และ Brij 35 ต่อการย่อยสลายพีแนนทรีน เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวทั้ง 2 ชนิดมารวมกัน พบว่าช่วยส่งเสริมความสามารถในการละลายของพีแนนทรีนได้ตามลำดับ SDS-TW80 > SDS-Brij35 > SDS-TX100 ทำให้มีการย่อยสลายในวัฏภาคน้ำโดยจุลินทรีย์ได้หมดภายใน 96 ชั่วโมง และการรวมกันของสารลดแรงตึงผิวทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่มีผลกระทบต่อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพีแนนทรีน

Cheng และ Wong (2006) ทดสอบความสามารถในการชะพีแนทรีนและไฟรีนออกจากดิน ในระบบสเลอรีเมื่อเติม Tween 80 และสารประกอบอินทรีย์ที่ได้จากปุ๋ยคอก (DOM) พบว่าเมื่อเติมทั้ง Tween 80 และ DOM ช่วยเพิ่มความสามารถในการชะพีแนทรีนและไฟรีนออกจากดินมาสู่วัฏภาคน้ำ ได้มากกว่าการเติม Tween 80 เพียงอย่างเดียว โดยเพิ่มความสามารถในการชะพีแนทรีนและไฟรีน ได้เพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่า และ 8 เท่า ตามลำดับ

Danyue และคณะ (2007) พบว่าสารลดแรงตึงผิวที่มีผลกระทบต่อจุลินทรีย์ได้แก่ non-ionic surfactants (Tween 80, Brij30, 10LE and Brij35) < anionic surfactants (LAS) < cationic surfactants (TDTMA) ความเป็นพิษต่อแบคทีเรียอาจเนื่องมาจากสูตร โครงสร้างทางโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวที่เป็นสาย กล่าวคือความเป็นพิษน้อยลงเมื่อโครงสร้าง ทางโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวที่มีสายยาวมากขึ้น นอกจากนี้พบว่าการเจริญของแบคทีเรีย เพิ่มขึ้นเมื่อเติมพีแนทรีนและ LAS (≤ 10 mg./l) ซึ่งแบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและ แหล่งพลังงาน อย่างไรก็ตามอัตราการย่อยสลายพีแนทรีนจะลดลงเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวที่มีความเข้มข้น 5–40 mg./l ดังนั้นการเติมสารลดแรงตึงผิวไม่ได้ช่วยเพิ่มการขนส่งโมเลกุลของพีแนทรีนไปยังวัฏภาคน้ำ แต่แบคทีเรียสามารถใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นแหล่งสารอาหารได้

นภดล สว่างนาวัน (2547) ทดลองเติมแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิว *P. aeruginosa* สายพันธุ์ A 41 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ในการย่อยสลายน้ำมันดิบใน อาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% ด้วย *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 พบว่า *P. aeruginosa* สายพันธุ์ A 41 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 สามารถส่งเสริมการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดิบโดย *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 ได้หมดภายในระยะเวลา 3 วัน สำหรับการเติมแรมโนลิปิด และเซอร์แฟคติน พบว่ามีประสิทธิภาพในการส่งเสริมย่อยสลายน้ำมันดิบใกล้เคียงกันที่ความเข้มข้นสูงกว่า เท่ากับและน้อยกว่าค่า CMC และมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยแบคทีเรียสูงกว่า TritonX-100 และ เคมีเทค 307 ตามลำดับ

รุจา สารคุณ (2548) ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Brij 35 และ SDS) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (แรมโนลิปิดที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ A41 และเซอร์แฟคติน ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK1) และแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (*P. aeruginosa* สายพันธุ์ A41 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1) ต่อการย่อยสลาย PAHs โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในระบบสเลอรีที่อัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:8 (กรัม/มล.) พบว่าการเติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถเพิ่มอัตราการสลายฟลูออรีน พีแนทรีน และไฟรีน ได้ถึง 98.53%, 98.67% และ 98.87% ตามลำดับ ในขณะที่การไม่เติมสารนี้ มีอัตราการสลาย 62.09%, 60.5% และ 48.21% ตามลำดับ และ พบว่าการเติม SDS แรมโนลิปิด เซอร์แฟคติน

P. aeruginosa สายพันธุ์ A41 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ไม่ส่งเสริมการย่อยสลาย พีแนนทรีน และไพรีน ในแง่ของความสามารถในการชะ PAHs ออกจากดิน พบว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Brij 35 และ SDS สามารถชะฟลูออรีน พีแนนทรีน และไพรีน ออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำได้มากกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สำหรับการเติม *P. aeruginosa* สายพันธุ์ A41 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ลงในระบบ พบว่าสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวได้เล็กน้อยระหว่างการทดลอง โดยทำให้มีค่าแรงตึงผิวของสารละลายดินลดลงจาก 60 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 47 และ 45 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามลำดับ ทำให้มีการชะฟลูออรีน พีแนนทรีน และไพรีนออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำได้

จากสมบัติของสาร PAHs ที่มีความสามารถละลายน้ำได้น้อย และมีการเกาะตัวอย่างรวดเร็วกับตะกอนที่ถูกฝังอยู่ในดิน ทำให้ยากต่อการที่จุลินทรีย์เข้าไปสัมผัสและนำมาใช้ในการเจริญ ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการบำบัดสารนี้ในดิน ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นการบำบัดไพรีนโดยวิธีทางชีวภาพและเพิ่มกิจกรรมในการย่อยสลายโดยการทำให้ระบบสเลอริดินเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างจุลินทรีย์กับไพรีนรวมทั้งการเติมสารลดแรงตึงผิวเพื่อเพิ่มการละลายของสาร PAHs ในน้ำ และทำให้มีอัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้น (Arostein และ Alexander, 1993; Cuny และคณะ, 1999; Guerin และ Jones, 1988a, 1988b; Jimenez และ Bartha, 1996; Tiehm, 1994; Van Hamme และ Ward, 1999)

ในการวิจัยเลือกศึกษาไพรีน ซึ่งเป็นสารประกอบ PAHs ที่กลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถย่อยสลายได้ดี นอกจากนั้นไพรีนยังเป็นตัวแทนสารประกอบ PAH ที่มีมวลโมเลกุลสูงซึ่งละลายน้ำได้น้อยทำให้มีความทนทานต่อการย่อยสลาย (Trzesicka-Mlymarz และ Ward, 1996)

นอกจากนี้ในระหว่างการทดลอง ได้ติดตามพลวัตประชากรของกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชากรแบคทีเรียระหว่างการบำบัดทางชีวภาพ ตัวอย่างงานวิจัยที่เกิดขึ้นมีอยู่มากมาย ซึ่งจะได้ยกตัวอย่างงานวิจัยบางส่วนพอสังเขป ดังต่อไปนี้

Cindy และคณะ (2000) ได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียในดินที่ได้จากภาคเกษตรกรรม 6 แห่ง โดยใช้เทคนิค PCR-DGGE โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของแบคทีเรียบริเวณ 16S rDNA ซึ่งพบว่าจากตัวอย่างดินทั้งหมด 6 แห่งมีเพียง 1 แห่งที่มีการปนเปื้อน PAHs (700 mg kg^{-1}) ซึ่งดินบริเวณนั้นมีความหลากหลายของประชาคมแบคทีเรียน้อยกว่าตัวอย่างดินภาคเกษตรกรรมที่เหลืออีก 5 แห่ง

Andreoni และคณะ (2004) ศึกษาความแตกต่างของประชาคมแบคทีเรียที่มีอยู่ในดินปนเปื้อน PAHs ทั้ง 3 แหล่ง ได้แก่ ดินจากประเทศเบลเยียม, ดินจากประเทศเยอรมันและดินภาคเกษตรกรรมจากประเทศอิตาลี ซึ่งดินทั้ง 3 แหล่งมีระดับการปนเปื้อนที่แตกต่างกัน โดยใช้เทคนิค PCR-DGGE โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของแบคทีเรียบริเวณ 16S rDNA พบว่าดินจากประเทศเบลเยียมที่มีการปนเปื้อน PAHs ไม่นาน (medium-term) มีความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียมากที่สุดและดินจากประเทศเยอรมันที่มีการปนเปื้อน PAHs เป็นเวลายาวนาน (long-term) พบว่ามีความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียที่น้อยที่สุดเนื่องจากจุลินทรีย์บริเวณนี้มีเอนไซม์ในการย่อยเพียงเล็กน้อย สำหรับดินภาคเกษตรกรรมจากประเทศอิตาลีไม่พบการปนเปื้อนของ PAHs นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากดินประเทศเบลเยียม ได้แก่ *Achromobacter xylosoxidans* (100%), *Methylobacterium* sp. (99%), *Rhizobium galegae* (99%), *Rhodococcus aetherovorans* (100%), *Stenotrophomonas acidaminiphila* (100%), *Alcaligenes* sp. (99%) and *Aquamicrobium defluvii* (100%) มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพีแนทรีนได้สูง

Niannian และคณะ (2004) ได้ติดตามประชาคมแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคโดยใช้เทคนิค DGGE โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของแบคทีเรียบริเวณ 16S rDNA ด้วย primer สากัล (A universal primer PCR ,UPPCR) โดยวิธีนี้สามารถตรวจหาเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคได้อย่างรวดเร็ว และพบว่าแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคนั้นมี 6 สายพันธุ์ที่พบได้ในอุตสาหกรรมการประมง (*Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis*, *Providencia rettgeri* และ *Aeromonas sobria*)

Pattanasupong และคณะ (2004) ได้ติดตามประชาคมแบคทีเรียที่สามารถย่อยยาฆ่าแมลงโดยใช้เทคนิค DGGE พบว่าในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย จะพบว่ามีกลุ่มแบคทีเรียมีแถบของดีเอ็นเอบางมากที่ pH ต่ำ และฟอสเฟตที่ความเข้มข้นน้อย แต่เมื่อปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการย่อยสลายทำให้กลุ่มแบคทีเรียมีแถบของดีเอ็นเอที่เข้มข้น

Xia และคณะ (2005) ได้นำกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถใช้แอมโมเนียในการเจริญ (ammonia-oxidizing bacteria) มาสกัด DNA รวมถึงเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของแบคทีเรียบริเวณ 16S rDNA ก่อนนำมาวิเคราะห์ส่วนของ 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR-DGGE โดยกลุ่มแบคทีเรียนี้คัดแยกได้จากตะกอนจากบ่อบำบัด (activated sludge) 2 แบบ คือ chemical bioflocculation process และ chemical coagulation process พบว่าความหลากหลายของกลุ่มแบคทีเรียใน chemical bioflocculation process นั้นมีมากกว่ากลุ่มแบคทีเรียใน chemical coagulation process

Hesham และคณะ (2006) ทดสอบการย่อยสลาย PAHs ในระบบสเลอรีโดยกลุ่มยีสต์ ได้แก่ *Candida* sp., *Pichia* sp., *Rhodotorula* sp. และ *Sporidiobolus* sp. ยีสต์กลุ่มนี้คัดแยกมาจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันและมีการใช้ฟิแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนนี้ พบว่ายีสต์กลุ่มนี้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs ได้ทั้งโมเลกุลต่ำและโมเลกุลสูง โดยภายใน 6 สัปดาห์สามารถย่อย PAHs ที่โมเลกุลต่ำได้ 89.3-98.6% และย่อย PAHs ที่โมเลกุลสูงได้ 66.3-89.4% และมีการใช้เทคนิค DGGE ติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์ โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีสต์บริเวณ 26S ribosomal DNA (rDNA) พบว่า *Candida maltosa* และ *Pichia guilliermondii* มีความโดดเด่นมากที่สุด รองลงมาคือ *Rhodotorula dairenensis* ซึ่งมีแถบ DNA ที่บางมาก นอกจากนี้ระหว่างการศึกษาทดลองไม่สามารถพบ *Sporidiobolus salmonicolor* และ *Pichia anomala*

ประโยชน์ของเทคนิค DGGE ดังที่กล่าวมานี้ สามารถทำให้นักวิทยาศาสตร์ และวิศวกรทางชีวภาพเข้าใจโครงสร้าง ชนิด และปริมาณของแบคทีเรียว่าเป็นอย่างไร มากหรือน้อยต่างกันแค่ไหนในระดับอนุวิทยา นอกจากนี้สาย DNA ที่ถูกแยกแล้วบน DGGE gel สามารถถูกตัดหรือสกัด (Excise) ไปหาลำดับเบสเพื่อตรวจสอบว่าเป็นชนิดใด

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องชั่งรุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan ประเทศญี่ปุ่น
4. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO Laminar flow รุ่น BVT-124 ของบริษัท International Scientific Supply ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson ประเทศฝรั่งเศส
6. หัวกรอง ชนิด PTFE ขนาดความกว้างของรู 0.20 รุ่น DISMIC 13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha ประเทศญี่ปุ่น
7. กระจกชีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิเมตร ของบริษัท Nissho Nipro ประเทศญี่ปุ่น
8. เครื่องปั่นผสม (vortex mixture) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industry ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS400 ของบริษัท Decan Ultrasonics ประเทศอังกฤษ
10. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น Hereaus type B 5050 E ของบริษัท Hereaus ประเทศเยอรมัน
11. เครื่องคัดกรองขนาดดิน ขนาดความกว้างของรู 1.18 มิลลิเมตร รุ่น O.S.K. 119 standard Sieve ของบริษัท Okawa Seiki ประเทศญี่ปุ่น
12. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น Innova 2300 ของบริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ -20°C ของบริษัท Sanyo Electric ประเทศญี่ปุ่น
14. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys20 ของบริษัท Thermo spectonic ประเทศญี่ปุ่น
15. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น Sorvall[®] Biofuge Stratos ของบริษัท Heraeus ประเทศญี่ปุ่น

16. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N-100 ของบริษัท Eyela ประเทศญี่ปุ่น
17. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น digital water bath SB-1000 ของบริษัท Eyela ประเทศญี่ปุ่น
18. เครื่องทำความเย็น (cooling) รุ่น CCA-1110 ของบริษัท Eyela ประเทศญี่ปุ่น
19. เครื่องดูดอากาศ (aspirator) รุ่น A3-S ของบริษัท Eyela ประเทศญี่ปุ่น
20. เครื่องวัดแรงตึงผิว (ring tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท Krüss ประเทศเยอรมัน
21. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
 - Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา
22. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)
 - Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-2 Advance ประเทศญี่ปุ่น
 - Mini Sub-Cell GT agarose gel electrophoresis systems ของบริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา
23. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -70°C รุ่น REVCO ULT 1786 ของบริษัท Forma Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
24. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20°C รุ่น MDF-U536D ของบริษัท Sanyo Electric ประเทศญี่ปุ่น
25. ชุดเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC)
 - เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น 6890N ของบริษัท Agilent Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID)
 - คอลัมน์ (column) ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร หน้า 0.25 ไมโครเมตร ภายในเคลือบด้วย เฟนนิล เมทิล ซิโลเซน ความเข้มข้น 5 % (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane
 - เข็มฉีดยาขนาดเล็ก (microsynges) ขนาด 10 ไมโครลิตร
 - แก๊สไฮโดรเจนชนิด ultra high purity ของบริษัท Thai Industrial Gas (TIG)
 - แก๊สไนโตรเจนชนิด ultra high purity ของบริษัท Thai Industrial Gas (TIG)
 - แก๊สฮีเลียมชนิด ultra high purity ของบริษัท Thai Industrial Gas (TIG)
 - อากาศ (air zero) ชนิด ultra high purity ของบริษัท Thai Industrial Gas (TIG)

3.2 เคมีภัณฑ์

1. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท IUI ประเทศญี่ปุ่น
4. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
6. แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) บริษัท BDH Chemicals ประเทศออสเตรเลีย
7. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA ประเทศฝรั่งเศส
8. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals ประเทศออสเตรเลีย
9. แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA ประเทศฝรั่งเศส
10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
11. เมทานอล (CH_3OH) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
12. เอซิลอะซีเตต ($\text{CH}_3\text{COO}_2\text{H}_5$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
13. ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
14. ไดเอทิลอีเทอร์ ($(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
15. อะซีโตน (CH_3COCH_3) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
16. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮไดรรัส (Anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
17. ไซโคลเฮกซามิด (Cyclohexamide) ของบริษัท Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
18. เฟอริกคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท May & Baker ประเทศอังกฤษ
19. แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท AJEX Chemicals ประเทศออสเตรเลีย
20. Triton X-100 ของบริษัท Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
21. Brij 35 ของบริษัท Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
22. ชุด Glass powder for Recovery of DNA EASYTRAP™ Ver.2 ของบริษัท TAKARA ประเทศญี่ปุ่น
23. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
24. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenolblue) ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมนี
25. โปรตีนเนสเค (Proteinase K) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
26. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
27. Taq DNA polymerase ของบริษัท New England Biolabs ประเทศสหรัฐอเมริกา

28. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท New England Biolabs ประเทศสหรัฐอเมริกา
29. 100 base pair DNA ladder ของบริษัท New England Biolabs ประเทศสหรัฐอเมริกา
30. โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ ของบริษัท Operon Biotechnologies GmbH ประเทศเยอรมนี
31. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), (C₄H₁₁NO₃) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
32. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂·2H₂O) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
33. SDS (sodium dodecyl sulfate), (C₁₂H₂₅OSO₃) ของบริษัท Nacal Tesque ประเทศญี่ปุ่น
34. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), [(C₁₆H₃₂N(CH₃)₃)Br] ของบริษัท TCI-EP ประเทศญี่ปุ่น
35. Geneclean II Kit ของบริษัท Q-BIOgene ประเทศสหรัฐอเมริกา
36. Formamide (Deionized) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
37. 40% Acrylamide/Bis solution, 37.5:1 (2.6% C) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
38. Urea ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
39. Ammonium persulfate ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
40. TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
41. 50xTAE ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
42. Dye solution ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
43. Ethidium bromide solution เข้มข้น 10 มก./มล. ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3 จุลินทรีย์

ในงานวิจัยนี้มีการใช้กลุ่มแบคทีเรีย และแบคทีเรียบริสุทธิ์ ดังนี้

แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
กลุ่มแบคทีเรีย STK	ทิมากร แสงดำ (2547)
<i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ BBK-1	นิรันดร์ รุ่งสว่าง (2542)

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 การเตรียมดิน ศึกษาลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดิน

เก็บตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันเครื่องจากเครื่องสูบน้ำบริเวณที่ทำการเพาะปลูกพืช ต.ทุ่งขวาง อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม ชุดดินลึกจากผิวน้ำดินประมาณ 15 ซม. แยกเศษใบไม้และหินออก ตรวจสอบการปนเปื้อนสาร PAHs โดยการสกัดและวิเคราะห์ด้วย GC-FID โดยนำดิน 2 กรัมใส่ในขวดแก้ว เต็มอินอร์มอล-เฮกเซน 4 มล. และ Triton X-100 ความเข้มข้น 15% ปริมาตร 1.5 มล. วางในเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเก็บในตู้แช่เย็นอุณหภูมิต่ำ -20°C ชำมคืนเพื่อให้ส่วนน้ำกลายเป็นน้ำแข็ง จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส เพื่อกำจัดน้ำ และนำมากรองเก็บสารละลายโดยกรองผ่านโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส กรองด้วยหัวกรอง PTFE เก็บใส่หลอด GC เก็บตัวอย่างที่สกัดได้ที่อุณหภูมิต่ำ -20°C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ปริมาณสารด้วย Gas Chromatography (GC)

นำดินหนึ่งส่วนไปวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างดิน ส่งวิเคราะห์ที่ฝ่ายวิจัยดิน กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มีรายละเอียดในการวิเคราะห์ดังนี้ วิเคราะห์ลักษณะเนื้อดิน ค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส สารอินทรีย์ (organic matter) และความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (maximum water holding capacity) ส่วนดินที่เหลือนำมาคัดกรอง โดยใช้เครื่องคัดกรองขนาดดินเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.18 มิลลิเมตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ 4°C จนกว่าจะทำการทดลอง และเมื่อเริ่มต้นทดลองจะนำออกมาไว้ที่อุณหภูมิต่ำห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนที่จะนำมาใช้ในการทดลอง

3.4.2 ปริมาณน้ำต่อความสามารถในการย่อยสลายไพรีนในระบบเลอริโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK

3.4.2.1 เตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิต่ำ 30°C เป็นเวลา 8 วัน หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิต่ำ 4°C นาน 10 นาที นำส่วนเซลล์แบคทีเรียมาล้างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ปั่นเหวี่ยงในสภาวะเดิม โดยทำตามขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง นำส่วนเซลล์มาแขวนลอยในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % นำเซลล์แขวนลอยมาวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 ซึ่งจะมีเชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^9 CFU/มล. นำเซลล์แขวนลอยที่ปรับความ

เข้มข้นแล้วมาเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้แบคทีเรียใช้อาหารสะสมที่เหลืออยู่ในเซลล์ให้หมดไป (ทิมากร แสงดำ, 2547)

3.4.2.2 ชั่งดินน้ำหนัก 4 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C 45 นาที 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 คืน นำดินที่เตรียมไว้เติมไฟรีน ละลายในอะซีโตน ที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของไฟรีนเป็น 1000 มก./ลิตร เติมไฟรีน 1 มิลลิกรัมต่อดินแห้ง 1 กรัม ผสมให้เข้ากัน คลายฝาออกตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 16 ชั่วโมงเพื่อให้อะซีโตนระเหย (Brinch และคณะ, 2002)

3.4.2.3 เตรียมปริมาณน้ำปลอดเชื้อที่แตกต่างกันโดยให้มีอัตราส่วนดินต่อน้ำ ดังนี้ 1:0, 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10 และ 1:12 ใช้ดินปลอดเชื้อ 4 กรัม ซึ่งมีการเติมไฟรีนเรียบร้อยแล้วตามข้อ 3.4.2.2 จากนั้นเติมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK (resting cell) จำนวน 10^9 CFU/มล. ลงไปในทุกชุดการทดลอง จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทุกชุดทำการทดลอง 2 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่วันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 สกัดและวิเคราะห์หาปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ในวัฏภาคดิน และน้ำด้วย GC-FID โดยเก็บตัวอย่างดินเหลวนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนน้ำออกจากดิน นำดิน 4 กรัมใส่ในขวดแก้ว เติมนอร์มอล-เฮกเซน 8 มล. และ Triton X-100 ความเข้มข้น 15% ปริมาตร 3 มล. วางในเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเก็บในตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 °C ซ้ำมคีนเพื่อให้ส่วนน้ำกลายเป็นน้ำแข็ง จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส เพื่อกำจัดน้ำ และนำมากรองเก็บสารละลายโดยกรองผ่านโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส กรองด้วยหัวกรอง PTFE เก็บใส่หลอด GC สำหรับส่วนน้ำ 2 มล. เติมนอร์มอล-เฮกเซน 2 มล. และ Triton X-100 ความเข้มข้น 15% ปริมาตร 0.4 มล. วางในเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเก็บในตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 °C ซ้ำมคีน จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้แยกชั้น แยกส่วนเฮกเซนใส่หลอดใหม่ เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส เพื่อกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ ตั้งทิ้งให้ตกตะกอน แล้วกรองสารละลายด้วยหัวกรอง PTFE ใส่หลอด GC เก็บตัวอย่างที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะวิเคราะห์ปริมาณสารด้วย Gas Chromatography (GC) ที่มี detector ชนิด Flame Ionized Detector (FID) โดยกำหนดสภาวะ ดังนี้

อุณหภูมิของคอลัมน์	80	องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ Injector	280	องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ Detector	250	องศาเซลเซียส
อัตราการไหลเท่ากับ	9.52	psi
ปริมาณสารที่ฉีด	1	ไมโครลิตร

แต่ละเวลามีชุดการทดลองดังนี้

ชุดทดลอง เป็นชุดที่เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อในอัตราส่วนของน้ำที่แตกต่างกันในดิน ปลอดเชื้อที่มีสารไพรีนและเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

ชุดควบคุมที่ 1 ถึง ชุดควบคุมที่ 9 เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายสารไพรีน เนื่องจากปัจจัยทางกายภาพ (abiotic degradation) ที่มีอัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:0, 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, และ 1:12 แต่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของการให้อากาศต่อการย่อยสลายไพรีนในระบบ สเลอริโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยเปรียบเทียบดินปลอดเชื้อและดินไม่ปลอดเชื้อที่ ความเร็วรอบต่างๆ

3.4.3.1 ชั่งดินน้ำหนัก 4 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ชุดหนึ่งนำไปนึ่งฆ่า เชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ 45 นาที 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 คืน ส่วนอีกชุดเป็นชุดดินไม่ปลอดเชื้อ นำ ดินที่เตรียมไว้เติมไพรีนที่ละลายในอะซีโตนกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของไพรีนเป็น 1000 มก./ลิตร เติมไพรีน 1 มิลลิกรัม ต่อดินแห้ง 1 กรัม ผสมให้เข้ากัน คลายฝาออกตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 16 ชั่วโมงเพื่อให้อะซีโตนระเหย (Brinch และคณะ, 2002)

3.4.3.2 เตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ลงในอาหารตามข้อ 3.4.2.1 จากนั้น เตรียมน้ำแบบปลอดเชื้อ เติมน้ำลงในดินปลอดเชื้อ และไม่ปลอดเชื้อ 4 กรัม ซึ่งมีการเติมไพรีน เรียบร้อยแล้วจากข้อ 3.4.3.1 จากนั้นเติมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ปริมาตร 1 มล. จนได้ปริมาตร สุทธิ 24 มล. (อัตราส่วนดิน:น้ำ เท่ากับ 1:6) หลังจากเติมเชื้อลงไปในสเลอริดินจะได้ปริมาณเชื้อ เริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU ต่อดินเหลว 1 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150, 200 และ 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทุกชุดทำการทดลอง 2 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่

วันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 สกัดและวิเคราะห์หาปริมาณไฟรีนที่เหลืออยู่ในวัฏภาคดิน และนำด้วย GC-FID (ตามข้อ 3.4.2.3) แต่จะเวลาจะมีชุดการทดลองดังนี้

ชุดทดลอง เป็นชุดที่เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อในดินที่มีไฟรีน และเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150, 200 และ 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง

ชุดควบคุมที่ 1 เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายไฟรีนในสเลอริดินปลอดเชื้อ เนื่องจากปัจจัยทางกายภาพ (abiotic degradation) แต่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

ชุดควบคุมที่ 2 เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายไฟรีนในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อ เนื่องจากจุลินทรีย์ในดิน (biodegradation) แต่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

3.4.3.3 ศึกษาการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count โดยนำตัวอย่างมาเจือจางให้เหมาะสมด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 % นำมา 100 ไมโครลิตรเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB บ่มเชื้อ 30 °ซ เป็นเวลา 5 วันแล้วนับจำนวนโคโลนี

3.4.4 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน (Surfactin)

เตรียมหัวเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 (นรินทร์ รุ่งสว่าง, 2542) ลงบนอาหารแข็ง NA เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 24 ชม. เชื้อเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว LB ดัดแปลง (ภาคผนวก ก.) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3% ปริมาตร 50 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 13 ชม. แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 2.5 ถ้ายเชื้อ 4% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเหลว LB ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3% ที่เตรียมไว้ 3 ลิตร แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อที่เวลา 48 ชม. นำมาปั่นแยกเซลล์ ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ได้ส่วนน้ำใสที่ปลอดเซลล์ นำไปทดสอบค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว จากนั้นนำส่วนน้ำใสนี้ มาตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มัล จนมีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2 ที่ใช้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °ซ. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนตะกอนที่ได้ล้างในน้ำกลั่นที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2 โดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นนำส่วนตะกอนมาสกัด โดยใช้กรวยแยกด้วยเมธานอล เขย่าเป็นเวลา 3 นาที ที่ใช้ให้แยกชั้น ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วจึงนำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มากำจัด

น้ำออกโดยใช้โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส นำตัวทำละลายอินทรีย์ที่ปราศจากน้ำ ไประเหยแห้ง สูญญากาศ ควบคุมอุณหภูมิที่ 65 °ซ. จะได้สารซึ่งมีลักษณะเหนียวหนืด มีสีเหลืองน้ำตาล จากนั้นจึงนำไประเหยแห้งที่อุณหภูมิห้อง ในโถดูดความชื้น เป็นเวลา 4-5 วัน จะได้เซอร์แฟคตินที่บริสุทธิ์บางส่วนมีสีเหลือง

3.4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิว

3.4.5.1 หาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration, CMC) นำสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ 10 มล. ส่วนเซอร์แฟคตินที่ผลิตได้ จากข้อ 3.4.4 ซึ่งน้ำหนัก 5 มก. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. ปั่นผสมสารให้เข้ากัน หาค่า CMC ด้วยการเจือจางสารลดแรงตึงผิวในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่างๆ นำไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวกับค่า log ของเปอร์เซ็นต์ความเจือจาง (log percent dilution) เพื่อหาค่า CMC (Duvnjak และคณะ, 1982)

3.4.5.2 หาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ในสารละลายดิน (Apparent Critical Micelle Concentration, ACMC) ดัดแปลงจากวิธีของ Sun และ Puri (1997) โดยเติมสารละลายเจือจางสารลดแรงตึงผิวในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ ชนิดละ 8 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดบรรจุดินปลอดเชื้อที่ไม่มีสาร PAHs 1 กรัม (อัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:6) เขย่า 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ดินตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนน้ำใสไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวกับค่า log ของเปอร์เซ็นต์ความเจือจาง (log percent dilution) เพื่อหาค่า ACMC

3.4.6 การเติมสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ต่อการย่อยสลายไพรีนในระบบสเลอรี โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยเปรียบเทียบดินปลอดเชื้อและดินไม่ปลอดเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ลงในอาหารตามข้อ 3.4.2.1 จากนั้นเตรียม Brij 35 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่คัดเลือกได้แบบปลอดเชื้อโดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายมากกว่าค่า ACMC 15 เท่า (ค่า ACMC เท่ากับ 300 มก./ต่อลิตร) โดยคำนวณเพื่อใช้สำหรับเติมลงในน้ำกลั่น ลงในดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อที่เติมไพรีน โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของไพรีนเป็น 1000 มก./ลิตร ตามข้อ 3.4.3.1 จากนั้นเติมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ปริมาตร 1 มล. จนได้ปริมาตรสุทธิ 24 มล. (อัตราส่วนดิน:น้ำ เท่ากับ 1:6) นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200

รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทุกชุดทำการทดลอง 2 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่วันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 สกัดและวิเคราะห์หาปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในวัฏภาคดิน และน้ำด้วย GC-FID ตามข้อ 3.4.2.3 และศึกษาการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียตามข้อ 3.4.3.3 แต่จะเวลาจะมีชุดการทดลองดังนี้

ชุดทดลอง เป็นชุดที่เติมสารละลาย Brij 35 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 เท่า ของค่า ACMC ลงในดินปลอดเชื้อและดินไม่ปลอดเชื้อที่เติมไพรีน และเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง

ชุดควบคุมที่ 1 เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายสารไพรีนในสเลอริดินปลอดเชื้อที่เติมสารละลาย Brij 35 แต่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพื่อตรวจสอบการลดลงของไพรีนเนื่องจากปัจจัยทางกายภาพ

ชุดควบคุมที่ 2 เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายสารไพรีนในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อที่เติมสารละลาย Brij 35 แต่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพื่อตรวจสอบการลดลงของไพรีนเนื่องจากจุลินทรีย์ในดิน

ชุดควบคุมที่ 3 เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายสารไพรีนในสเลอริดินปลอดเชื้อที่เกิดจากปัจจัยทางกายภาพที่ไม่เติมทั้งสารละลาย Brij 35 และกลุ่มแบคทีเรีย STK

ชุดควบคุมที่ 4 เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายสารไพรีนในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อที่เกิดจากจุลินทรีย์ในดิน ที่ไม่เติมทั้งสารละลาย Brij 35 และกลุ่มแบคทีเรีย STK

ชุดควบคุมที่ 5 เป็นชุดควบคุมเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียวทั้งในสเลอริดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ

3.4.7 การเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวเปรียบเทียบกับ การเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระบบสเลอริ ต่อความสามารถในการย่อยสลายสารไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK

3.4.7.1 เตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ลงในอาหารตามข้อ 3.4.2.1 จากนั้นเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคตินแบบปลอดเชื้อ ด้วยความเข้มข้นเท่ากับ 15 เท่าของค่า ACMC (ค่า ACMC เท่ากับ 300 มก.ต่อลิตร) โดยคำนวณเพื่อใช้สำหรับเติมลงในน้ำกลั่น ลงในดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ 4 กรัม และมีการเติมสารไพรีนเรียบร้อยแล้วจากข้อ 3.4.3.1 จากนั้นเติมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ปริมาตร 1 มล. จะได้ปริมาตรสุทธิ 24 มล. (อัตราส่วนดิน:น้ำ เท่ากับ 1:6) นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

ทุกชุดทำการทดลอง 2 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่วันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 สกัดและวิเคราะห์หาปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ในวัฏภาคดิน และน้ำด้วย GC-FID โดยมีชุดการทดลองดังนี้

ชุดทดลองที่ 1 เป็นชุดเติมสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ทั้งในสเลอริดีนปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ

ชุดควบคุมที่ 1 เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายสารไพรีนในสเลอริดีนปลอดเชื้อที่เติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เนื่องจากปัจจัยทางกายภาพ

ชุดควบคุมที่ 2 เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายสารไพรีนในสเลอริดีนไม่ปลอดเชื้อที่เติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เนื่องจากจุลินทรีย์ในดิน

ชุดควบคุมที่ 3 เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายสารไพรีนในสเลอริดีนปลอดเชื้อที่ไม่เติมทั้งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและกลุ่มแบคทีเรีย STK เนื่องจากปัจจัยทางกายภาพ

ชุดควบคุมที่ 4 เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายสารไพรีนในสเลอริดีนไม่ปลอดเชื้อที่ไม่เติมทั้งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและกลุ่มแบคทีเรีย STK เนื่องจากจุลินทรีย์ในดิน

ชุดควบคุมที่ 5 เป็นชุดควบคุมเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียวทั้งในสเลอริดีนปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ

3.4.7.2 เตรียมหัวเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 (นिरันดร รุ่งสว่าง, 2542) ลงบนอาหารแข็ง NA เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 24 ชม. เชื้อเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว LB ดัดแปลง (ภาคผนวก ก.) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3% นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 10 นาที นำส่วนเซลล์แบคทีเรียมาล้างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ปั่นเหวี่ยงในสภาวะเดิม โดยทำตามขั้นตอนที่ 2 ครั้ง นำส่วนเซลล์มาแขวนลอยในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % นำเซลล์แขวนลอยมาวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 ซึ่งจะมีเชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^{10} CFU/มล. นำเซลล์แขวนลอยที่ปรับความเข้มข้นแล้วมาเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม. (จุฬา สารคุด, 2548)

3.4.7.3 เตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ลงในอาหารตามข้อ 3.4.2.1 จากนั้นเติมหัวเชื้อของแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิว *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ทำให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นสุดท้ายในระบบสเลอริเป็น 1.0×10^7 , 5.0×10^7 , 1.0×10^8 , 1.5×10^8 และ 2.0×10^8 CFU/มล.

(1, 5, 10, 15 และ 20 เท่า ของเชื้อเริ่มต้น 10^7 CFU/มล.) ลงไปแทนการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เปรียบเทียบกับผลการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย และความสามารถในการย่อยสลายไพรีนเมื่อเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไป เตรียมการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.4.7.1 โดยมีชุดการทดลองดังนี้

ชุดทดลองที่ 2 เป็นชุดที่เติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิว *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ทั้งในสเลอริดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ

ชุดควบคุมที่ 1 เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายสารไพรีนในสเลอริดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อที่เติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ *B. Subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 แต่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

ชุดควบคุมที่ 2 เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายสารไพรีนในสเลอริดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อที่ไม่เติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 และกลุ่มแบคทีเรีย STK

ชุดควบคุมที่ 3 เป็นชุดควบคุมเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียวทั้งในสเลอริดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ

3.4.8 ติดตามพลวัตประชากรแบคทีเรียในชุดการสลายไพรีนในดินไม่ปลอดเชื้อโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เติม *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 โดย Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

จากชุดการทดลองที่ 3.4.7 ในชุดทดลองที่ 2 เป็นชุดที่เติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิว *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK จึงเลือกนำ BBK-1 ที่มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^7 CFU/มล. มาติดตามพลวัตประชากรแบคทีเรียในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อที่มีไพรีนเมื่อเติมร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

3.4.8.1 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อ

สกัดชุดการทดลองตัวอย่างสเลอริดินดัดแปลงตามวิธีของ Sei และคณะ (2000) นำตัวอย่างดินสเลอริ 200 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครพิวจ์ เติม High DNA extraction buffer 440 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) เติมโปรตีนเนสเค (proteinase K) 20 มก./มล. (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเติม 10% SDS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมง โดยกลับหลอดไปมาทุก 20 นาที

จากนั้นนำมาสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) 2 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสขึ้นบน ถ่ายลงหลอดไมโครพิพจีใหม่ และเติมคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) (ภาคผนวก ข) เท่ากับปริมาตรของส่วนน้ำใส ผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที

ดูดส่วนน้ำใสขึ้นบน ถ่ายลงหลอดไมโครพิพจีใหม่ เติม 3 ไมลาร์ โซเดียมอะซิเตต (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใส และเติมเอธานอลสัมบูรณ์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด นำไปเยือกแข็งที่ -80°C นาน 15 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอธานอลที่เย็นจัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ระบายเอธานอลออกจากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ 4°C จนกว่าจะใช้

3.4.8.2 สกัดจีโนมดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK และ *B. subtilis* BBK-1

สกัดจีโนมดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยถ่ายเชื้อที่เลี้ยงอยู่ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) ถ่ายเชื้อปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครพิพจี นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เพื่อแยกเซลล์เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 567 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นดูดลง จากนั้นเติม 10% SDS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และโปรตีนเนสเค (Proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของโปรตีนเนสเคใน 0.5% SDS) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 5 ไมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย (ประมาณ 0.7-0.8 มิลลิลิตร) ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/

ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้ติดส่วนตะกอนไปด้วย) จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาณที่เท่ากับ ปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์ม/ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาจนกระทั่งตะกอนขาวของดีเอ็นเอปรากฏ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของไอโซโพรพานอลทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 70% เอทานอล (ภาคผนวก ข) ที่เย็นจัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆเทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอใน บัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

3.4.8.3 การทำดีเอ็นเอที่สกัดได้ให้บริสุทธิ์

เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1% (ภาคผนวก ข) ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 1 เท่า เทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหัวเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัวประมาณ 20 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่าให้ท่วมเหนืออะกาโรสเจล 2-3 มม. นำสารละลายดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตรมาผสมกับสีติดตามความเข้มข้น 10 เท่าปริมาตร 5 ไมโครลิตรหยอดลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอีเลคโตรโฟรีซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วย สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) นาน 1 นาที แล้วล้าง ออกด้วยน้ำปลอดประจุ นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV)

ตัดส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอจากเจล และทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย DNA EASYTRAP™ Ver.2 (TAKARA BIO INC ประเทศญี่ปุ่น) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยนำเจลที่ตัดได้ ใส่ลงในหลอดไมโครพิวจ์ และซังน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจลโดยหักออกจากน้ำหนักหลอดเปล่า เติม NaI ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 55 °ซ เขย่าทุก 1 นาที เป็นเวลา 5 นาที จนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมด เติม glass milk โดยถ้าปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ ทั้งหมดน้อยกว่า 500 ไมโครลิตร จะใช้ glass milk ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ถ้าปริมาตรอยู่ในช่วง 500 -1000 ไมโครลิตร จะใช้ glass milk ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นผสมเบาๆให้เป็นเนื้อ

เดียวกันทุก 1 นาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอจับกับ glass milk ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 5 วินาที เทส่วนน้ำใสออก แล้วเติมสารละลาย new wash ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นดูตกลงเบาๆ เพื่อล้าง glass milk นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 5 วินาที ดูดส่วนน้ำใสออก ล้างด้วยสารละลาย new wash และปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งหนึ่ง ดูดส่วนน้ำใสออกจนหมด ระบายแห้งที่อุณหภูมิ 55 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ น้ำ และเอธานอลซึ่งเป็นส่วนผสมของสารละลาย new wash ระบายหมด ละลายตะกอนด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที ดูดส่วนน้ำใสที่มีดีเอ็นเออยู่เก็บไว้ในหลอดไมโครพิวจ์ใหม่ เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ 4 °ซ จนกว่าจะใช้

3.4.8.4 ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (Sambrook และ Russell, 2001)

นำดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) เพื่อปรับความเข้มข้นของแม่แบบสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ให้เท่ากันทุกหลอดของแต่ละชุดการทดลอง โดยคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

$$\text{ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

3.4.8.5 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย

โพลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีดังนี้

1. EUB f933 GC มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ

5'-GCG

ACAAGCGGTGGAGCATGTGG-3' (Kawai และคณะ, 2002) และ

2. EUB r1387 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ

5'-GCCCCGGGAACGTATTCACCG-3' (Kawai และคณะ, 2002)

โดยใช้ไพรเมอร์ EUB f933 ซึ่งมี GC clamp เชื่อมต่อบริเวณ 5' และ EUB r1387 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR มีความยาวประมาณ 500 bp โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาเป็นดังนี้

- 10X <i>Taq</i> DNA polymerase buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X <i>Taq</i> DNA polymerase buffer)	5 ไมโครลิตร
- สารละลาย F933 GC primer ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร
- สารละลาย R1387 primer ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร
- เอนไซม์ <i>Taq</i> polymerase (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 x <i>Taq</i> polymerase)	0.25 ไมโครลิตร

ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมไว้ประมาณ 200 ng ปรับปริมาตรน้ำด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดมีปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศและเก็บส่วนผสมทั้งหมดในน้ำแข็ง หลังจากนั้นดำเนินการปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) (Biorad ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

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

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ซึ่งทำโดยเตรียม อะกาโรสเข้มข้น 1.2% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ TAE 1 เท่า (ภาคผนวก ข) เทลงในแบบพิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 20 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทปบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายเอ็นเอกับสีติดตาม หยุดดีเอ็นเอและหยุดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส Mupid ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 (Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.4.8.6 วิเคราะห์ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

ใช้อุปกรณ์ของ DCode™ system (Bio-Rad Laboratories Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา) ในการวิเคราะห์ DGGE โดยเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 40 – 70% (ภาคผนวก ข) (100% denaturant ประกอบด้วย 7 M urea และ 40% formamide) ซึ่งทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant โดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ เมื่อทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant ลงในชุดแซนวิชเตรียมเจลแล้ว เสียบหัวลงไประหว่างกระจกแซนวิช โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้พอลิอะคริลาไมด์เจลแข็งตัว นำชุดเจลแซนวิชใส่ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ 1xTAE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 7 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนจนอุณหภูมิประมาณ 55 °C ผสมผลิตภัณฑ์ PCR กับสีติดตามหยุดลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 30 โวลต์ ที่ 55 °C นาน 15 นาที จากนั้นใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ที่ 60 °C นาน 10 ชั่วโมง ย้อมพอลิอะคริลาไมด์เจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) นาน 15 นาที และล้างสีย้อมด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ 2 ครั้งครั้งละ 5 นาที แล้วนำไปดูด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One Version 4.4.1 (Bio-Rad, USA.) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการเตรียมดิน การศึกษาลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของดิน

ดินที่นำมาใช้ในการทดลองเก็บจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันเครื่องใกล้บริเวณเครื่องสูบน้ำจาก ต.ทุ่งขวาง อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม เป็นดินที่มีลักษณะของการปนเปื้อนคราบน้ำมันเครื่อง เมื่อนำไปสกัด และวิเคราะห์หาปริมาณ PAHs พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของสารดังกล่าว ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของดิน โดยฝ่ายวิจัยดิน กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตร และสหกรณ์ ให้ผลดังตาราง 4.1 และจะนำดินนี้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของดิน

คุณสมบัติ	ค่าการวิเคราะห์
ลักษณะดิน	ดินร่วน
ค่าความเป็นกรด ต่าง	8.1
ค่าความจุการอุ้มน้ำ (%)	42.20
ปริมาณสารอินทรีย์ (%)	2.99
ปริมาณคาร์บอน (%)	1.734
ปริมาณไนโตรเจน (%)	0.150
ปริมาณฟอสฟอรัส (ppm)	341
ปริมาณโพแทสเซียม (ppm)	640
ปริมาณแคลเซียม (ppm)	3655
ปริมาณแมกนีเซียม (ppm)	675
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน	11.56

4.2 ปริมาณของน้ำต่อความสามารถในการย่อยสลายไพรีนในระบบสเลอรีโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK

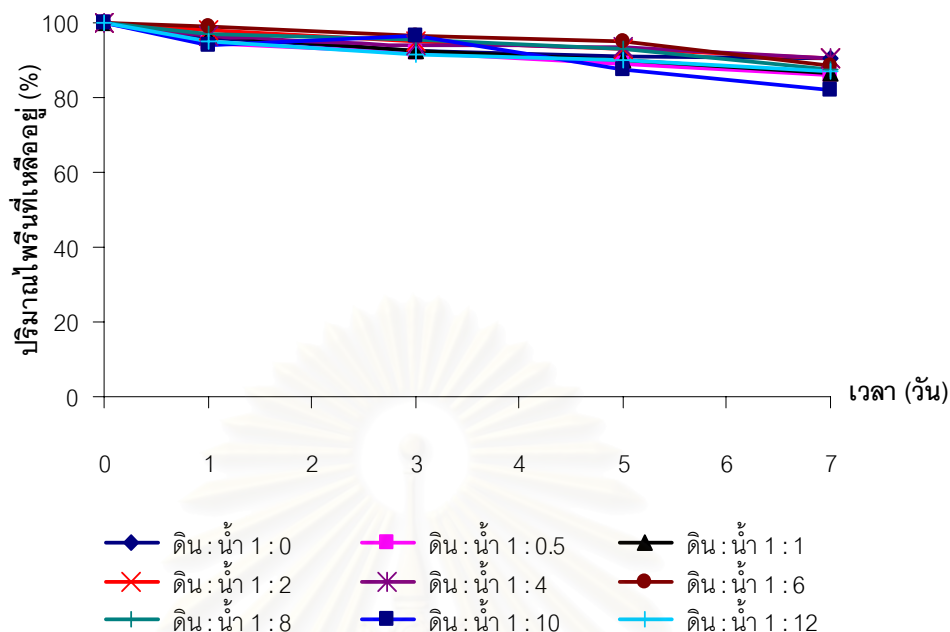
เนื่องจากกลุ่มแบคทีเรีย STK มีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิก ดังนั้นในการย่อยสลายสาร PAHs ในดินจึงต้องทำให้ดินอยู่ในรูปของสเลอรี โดยมีน้ำเป็นส่วนประกอบเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างจุลินทรีย์กับ PAHs รวมทั้งยังเพิ่มการเคลื่อนที่ของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามการเติมน้ำต้องมีความเหมาะสม เนื่องจากในเนื้อดินออกซิเจนจะอยู่ในช่องว่างอนุภาคดิน ซึ่งอาจกลายเป็นสภาพไร้ออกซิเจนได้หากการแพร่ของออกซิเจนถูกจำกัดเมื่อมีปริมาณน้ำมากเกินไป ยากต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่ต้องอาศัยออกซิเจนในการทำงาน ดังนั้นในการทดลองนี้ได้หาปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK

4.2.1 การสลายสารไพรีนในดินปลอดเชื้อ

การทดลองทำโดยการปรับปริมาณน้ำให้มีอัตราส่วน ดินปลอดเชื้อ : น้ำปลอดเชื้อ เป็น 1:0, 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10 และ 1:12 ตามลำดับ เติมน้ำมันลงไป (1 mg./g.ดิน) จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลือในดิน วันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 คุณสมบัติของการบ่มที่อุณหภูมิห้อง อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที พบว่าอัตราการสลายไพรีนในระบบเหล่านี้ซึ่งเป็นผลทางกายภาพเกิดช้ามากตลอดการทดลอง (รูปที่ 4.1) แม้ในวันที่ 7 ปริมาณไพรีนก็ยังคงลดลงน้อยมาก ที่ทุกๆ อัตราส่วน โดยมีปริมาณไพรีนเหลืออยู่มากกว่า 80% ทั้งสิ้น (ภาคผนวก ค. ตารางที่ ค.1) ดังนั้นปริมาณน้ำต่อดินในสเลอรีจึงไม่มีผลต่อปริมาณไพรีนที่เหลือในระบบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

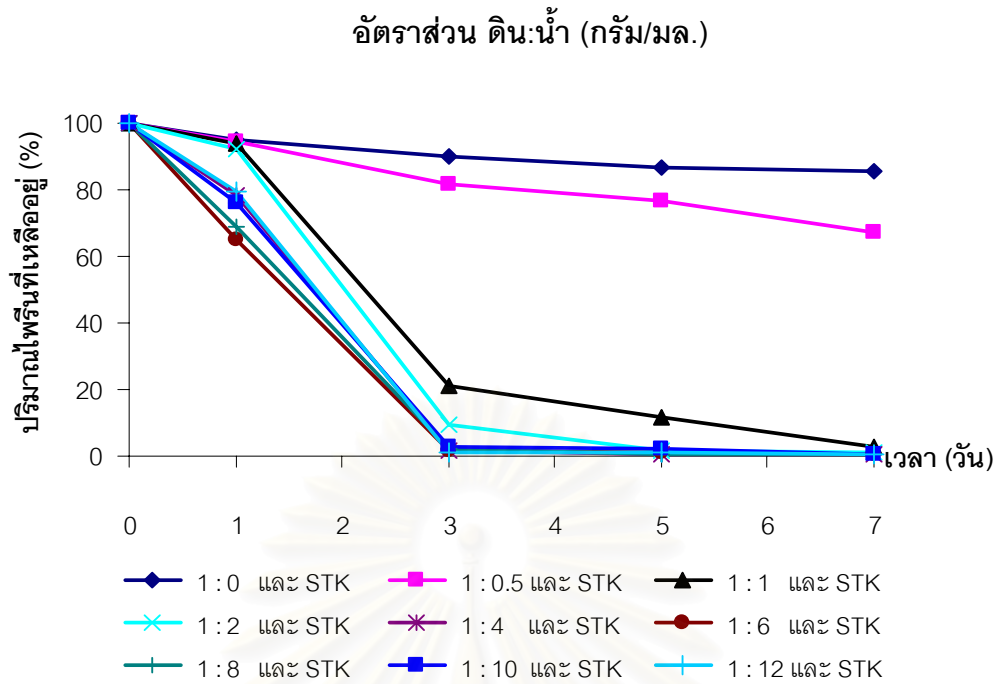
อัตราส่วน ดิน:น้ำ (กรัม/มล.)



รูปที่ 4.1 ผลการลดลงของไพรีนเนื่องจากปัจจัยทางกายภาพในดินปลอดเชื้อ

4.2.2 การสลายสารไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดินปลอดเชื้อ

เมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK (เชื้อเริ่มต้น 10^8 CFU ต่อดินเหลว 1 มล.) ลงไปในตัวอย่างดินปลอดเชื้อที่มีไพรีนในปริมาณเดียวกันแล้ววิเคราะห์ปริมาณไพรีนในวันและสภาวะเดียวกันกับชุดควบคุม (ข้อ 4.2.1) พบว่าปริมาณไพรีนมีการลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยชุดการทดลองที่มีอัตราส่วนดิน:น้ำ เท่ากับ 1:0 และ 1:0.5 พบว่าอัตราการสลายโดยกลุ่มแบคทีเรียนี้เกิดขึ้นช้ากว่าชุดการทดลองอื่นและมีอัตราการสลายน้อยมากตลอดการทดลอง โดยในวันสุดท้ายของการทดลองพบปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 85.41% และ 67.37% ตามลำดับ (รูปที่ 4.2) สำหรับชุดที่มีอัตราส่วนดิน:น้ำ เท่ากับ 1:1-1:12 พบว่าในวันที่ 3 ของการทดลอง มีปริมาณไพรีนเหลือต่ำกว่า 30% โดยเฉพาะชุดที่ 1:4-1:12 (ดิน:น้ำ) พบปริมาณไพรีนอยู่ในช่วง 1.36%-2.95% และเมื่อพิจารณาปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในวันสุดท้ายของการทดลอง อัตราส่วนดินต่อน้ำตั้งแต่ 1:2-1:12 พบว่าทั้งหมดมีปริมาณไพรีนเหลือไม่เกิน 0.87% บ่งชี้ว่าปริมาณของน้ำในดินมีผลต่อการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยพบว่าเมื่อปริมาณน้ำเพิ่มขึ้นการย่อยสลายเพิ่มขึ้นด้วยการย่อยสลายจะไม่เพิ่มขึ้นเมื่อมีน้ำในปริมาณที่เหมาะสมต่อการย่อยโดยกลุ่มแบคทีเรียนี้ ดังนั้นการย่อยสลายเกิดได้ดีเมื่อมีปริมาณน้ำที่เหมาะสมและควรมีอัตราส่วนดินต่อน้ำตั้งแต่ 1:4 เป็นต้นไป จากผลการทดลองนี้ พบว่าในวันสุดท้ายที่อัตราส่วน 1:6 มีไพรีนเหลือต่ำกว่าชุดอื่น ดังนั้นจึงเลือกใช้ที่อัตราส่วนนี้ ศึกษาการสลายไพรีนในการทดลองขั้นต่อไป

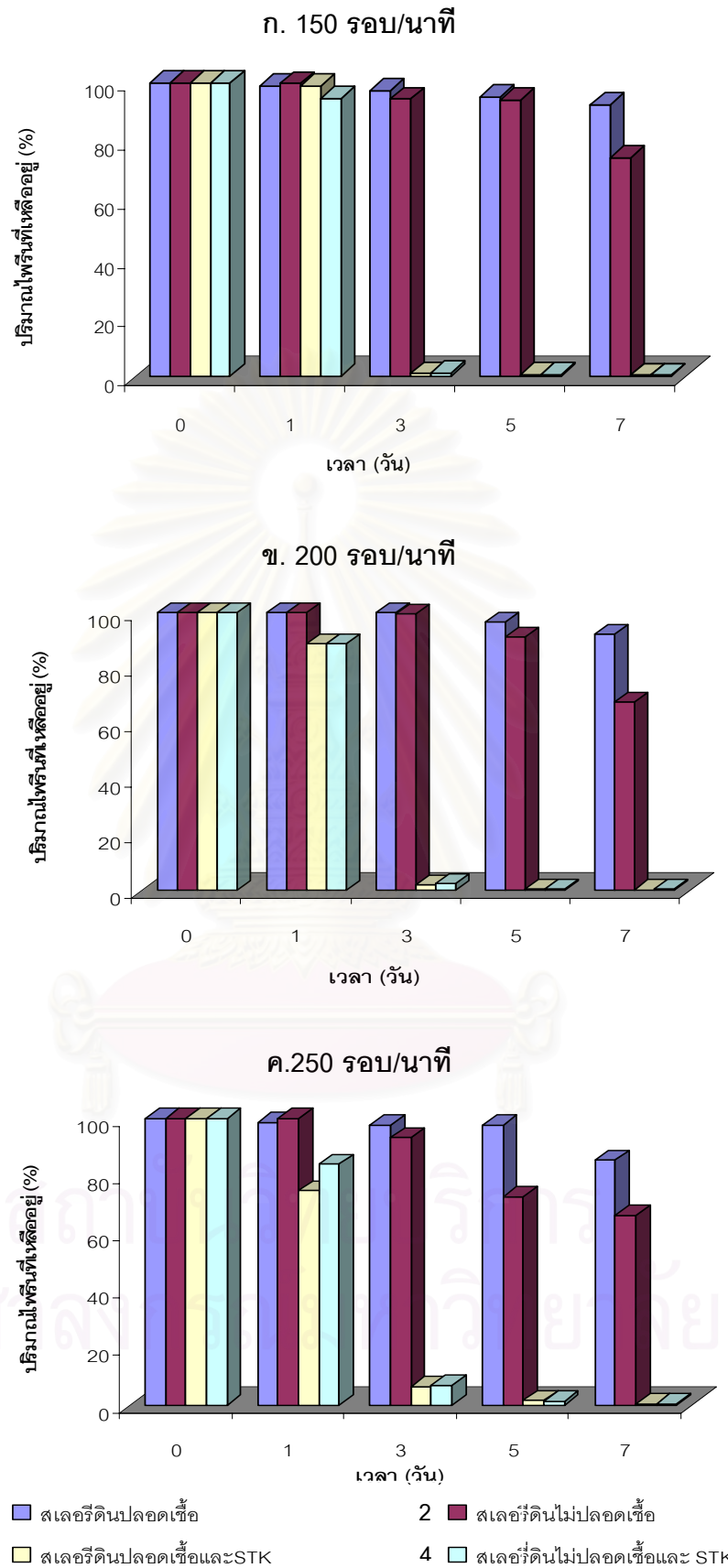


รูปที่ 4.2 ผลการย่อยสลายสารไฟรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดินปลอดเชื้อ

4.3 ประสิทธิภาพของการให้อากาศต่อการสลายไฟรีนในระบบสเลอริโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1:6 (กรัม/มล.)

4.3.1 การย่อยสลายไฟรีนในระบบสเลอริโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ความเร็วรอบต่างๆ

การย่อยสลายไฟรีนในสเลอริดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อที่เติมไฟรีนที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิกรัม/ดิน 1 กรัม ให้อากาศโดยการแปรอัตราการเขย่าขวดเลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบ 150, 200 และ 250 รอบ/นาที แล้ววิเคราะห์ปริมาณไฟรีนในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 พบว่าชุดควบคุม การลดลงของไฟรีนเป็นไปอย่างช้ามากตลอดการทดลอง ทั้งสเลอริดินปลอดเชื้อ (ระบบที่ 1) และไม่ปลอดเชื้อ (ระบบที่ 2) โดยในวันที่ 7 ที่ 250 รอบ/นาที มีไฟรีนเหลืออยู่น้อยที่สุด โดยเฉพาะระบบที่ 2 มีไฟรีนน้อยกว่าระบบที่ 1 ให้ผลเช่นเดียวกันทั้ง 3 ความเร็วรอบ (รูปที่ 4.3 ก. 150 รอบ/นาที, 4.3 ข. 200 รอบ/นาที, 4.3 ค. 250 รอบ/นาที) สำหรับการสลายไฟรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK (เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU ต่อดินเหลว 1 มล.) ในชุดสเลอริดินปลอดเชื้อ (ระบบที่ 3) และไม่ปลอดเชื้อ (ระบบที่ 4) พบว่าในวันที่ 3 มีอัตราการย่อยสลายไฟรีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับวันที่ 1 ทั้งสองระบบ โดยที่ 150 รอบ/นาที มีปริมาณไฟรีนเหลืออยู่น้อยที่สุดในขณะที่ 250 รอบ/นาที มีปริมาณไฟรีนเหลือมากที่สุด ทั้งนี้เริ่มพบการสลายตั้งแต่วันที่ 1 และลดลงอย่างรวดเร็ว



รูปที่ 4.3 เปรียบเทียบปริมาณไฟรีนในสลอเตอร์ดินปลอดภัยและไม่ปลอดภัยร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที (ก.), 200 รอบ/นาที (ข.) และ 250 รอบ/นาที (ค.)

ในวันที่ 3 จนหมดหรือเหลือน้อยมากในวันที่ 5 และ 7 การใช้เชื้อ STK ไม่ว่าจะใช้กับดินปลอดหรือไม่ปลอดเชื้อ STK ทำงานได้ดี โดยเห็นได้ตั้งแต่วันที่ 1 ที่ระบบ 1 และ 2 พบไฟรีนลดลงน้อยมาก ในขณะที่ ระบบ 3 และ 4 เริ่มมีการลดลงของไฟรีน โดยการเขย่าแรงมีการลดลงมากกว่าการเขย่าน้อย แสดงว่าช่วงแรกต้องการออกซิเจนสำหรับเอนไซม์ออกซิจีเนสในการทำงาน ในขณะที่หลังจากวันที่ 1 คือ วันที่ 3 การลดลงของไฟรีนที่ $150 > 200 > 250$ รอบ/นาที่ การทำงานของ STK นั้นถ้าใช้อากาศมากไป (250 รอบ/นาที่) กลับสู่ที่มีอากาศน้อยกว่า (150 รอบ/นาที่) ไม่ได้ แสดงว่าระดับออกซิเจนไม่ต้องมีมากก็เพียงพอต่อการทำงานโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK เช่นที่ 150 รอบ/นาที่ทำงานได้ดี

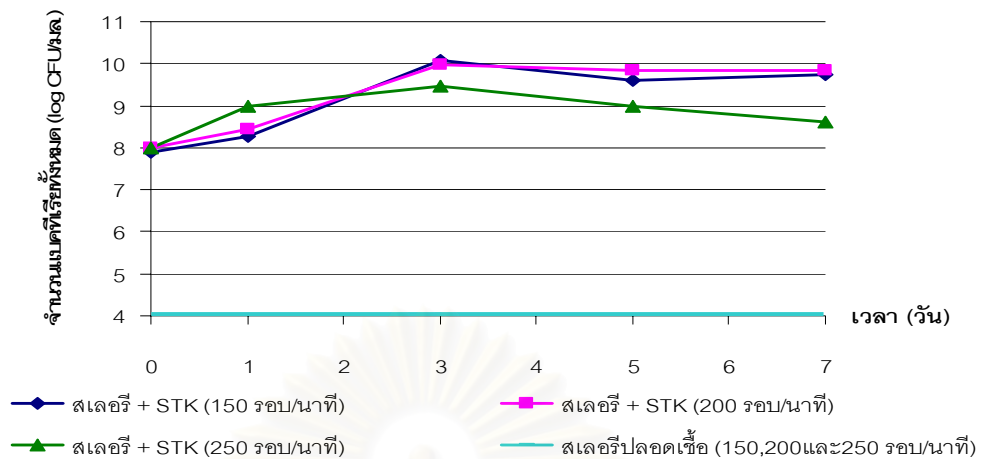
เนื่องจากชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เมื่อพิจารณาในวันที่ 7 ปริมาณไฟรีนที่ 200 รอบ/นาที่ มีค่าน้อยที่สุดและใกล้เคียงที่ 150 รอบ/นาที่ ดังนั้นความเร็วรอบในการเขย่าระหว่าง 150–200 รอบ/นาที่ ก็เพียงพอสำหรับการสลายไฟรีน จากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกใช้ความเร็วรอบในการเขย่าที่ 200 รอบ/นาที่ เพื่อศึกษาการสลายไฟรีนในการทดลองขั้นต่อไป

4.3.2 การเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดในระบบเลอริที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ความเร็วรอบต่างๆ

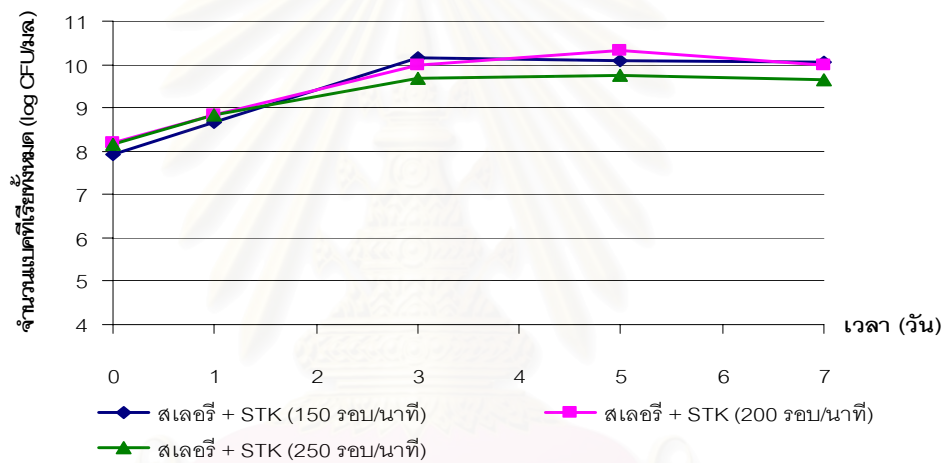
การย่อยสลายไฟรีนในชุดสเลอริดินปลอดเชื้อ ที่ความเร็ว 150, 200 และ 250 รอบ/นาที่ ที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK พบว่าในวันที่ 1 ปริมาณไฟรีนลดลงเพียงเล็กน้อย น่าจะเป็นระยะที่แบคทีเรียอยู่ในระยะปรับตัว (lag phase) และอัตราการเขย่าที่ 150, 200 และ 250 รอบ/นาที่ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด มีจำนวนเพิ่มขึ้นจากประมาณ 8 log CFU ต่อมล. เป็น 8.26, 8.44 และ 9 log CFU ต่อมล.ตามลำดับ หลังจากนั้นในวันที่ 3 ไฟรีนได้ลดลงอย่างรวดเร็ว และการเจริญสอดคล้องกับปริมาณไฟรีนที่ลดลง กล่าวคือ การเจริญของแบคทีเรียทั้งหมด จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 1 พบจำนวนแบคทีเรียเพิ่มเป็น 10.07, 9.98 และ 9.48 log CFU ต่อมล.ตามลำดับ และจำนวนแบคทีเรียเริ่มลดลงในวันที่ 5 ดังรูปที่ 4.4 ก.

สำหรับการย่อยสลายไฟรีนในชุดสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ทั้ง 3 ความเร็วรอบให้ผลการทดลองคล้ายกับชุดสเลอริดินปลอดเชื้อ กล่าวคือ เริ่มต้นมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดประมาณ 8 log CFU ต่อมล. หลังจากนั้นพบว่าในวันที่ 1 มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบจากวันที่ 0 ซึ่งในวันนี้มีจำนวนแบคทีเรีย 8.66, 8.84 และ 8.83 log CFU ต่อมล.ตามลำดับ การเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 ของการทดลอง พบว่าจำนวนแบคทีเรียเพิ่มเป็น 10.17, 9.97 และ 9.68 log CFU ต่อมล.

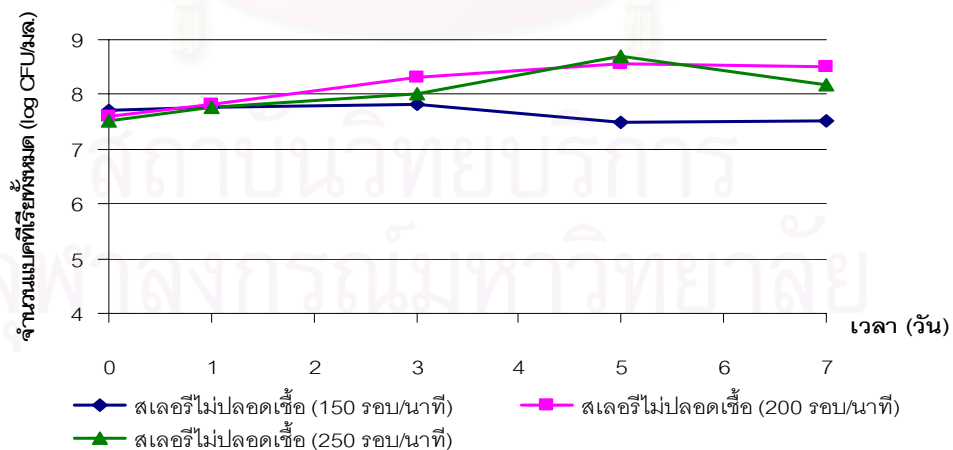
ก. จำนวนแบคทีเรียในชุดสเลอริดินปลอดเชื้อที่เติม STK



ข. จำนวนแบคทีเรียในชุดสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อที่เติม STK



ค. จำนวนแบคทีเรียในชุดสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อ



รูปที่ 4.4 การเจริญในสเลอริดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อเมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ความเร็ว 150, 200 และ 250 รอบ/นาที่ (ก. จำนวนแบคทีเรียในชุดสเลอริปลอดเชื้อ + STK, ข. จำนวนแบคทีเรียในชุดสเลอริไม่ปลอด + STK และ ค. จำนวนแบคทีเรียในชุดสเลอริไม่ปลอดเชื้อ)

ตามลำดับ ซึ่งตรงกับการย่อยสลายไฟรีนที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว จำนวนแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นในช่วงต้นของการทดลอง จากนั้นจึงเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) และลดลงในช่วงปลายของการทดลอง ดังรูปที่ 4.4 ข. ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียในดินนั้นค่อนข้างมีจำนวนคงที่ (รูปที่ 4.4 ค.) เช่นเดียวกับปริมาณไฟรีนที่เหลืออยู่ในชุดควบคุมซึ่งมีอัตราการย่อยสลายช้ามาก ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในรูปที่ 4.3

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดเมื่อเขย่าที่ความเร็ว 150, 200 และ 250 รอบ/นาที่ ในชุดการย่อยสลายไฟรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในสเลอริพลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ พบว่าทั้ง 3 ความเร็วรอบมีแนวโน้มคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ทั้งชุดสเลอริพลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ เริ่มต้นมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดประมาณ $8 \log$ CFU ต่อมล. และวันที่ 1 มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเพียงเล็กน้อย ซึ่งพบว่าในวันเดียวกันแบคทีเรียอยู่ในระยะปรับตัว และการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียทั้งหมดจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นในวันที่ 3 ซึ่งตรงกับการย่อยสลายไฟรีนที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วโดยหลังจากวันที่ 3 จะเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียในดินนั้นมีจำนวนค่อนข้างคงที่ ดังรูปที่ 4.4 ก., ข. และ ค.

โดยการเจริญของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ทั้งชุดสเลอริพลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย โดยที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที่ จะพบจำนวนแบคทีเรียน้อยที่สุด และที่ความเร็ว 150 และ 200 รอบ/นาที่ พบจำนวนแบคทีเรียมากที่สุดและใกล้เคียงกัน ดังนั้นความแตกต่างของความเร็วรอบในการเขย่ามีผลต่อการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงเล็กน้อย ซึ่งกลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถเจริญได้ดีและใกล้เคียงกันทุกความเร็วรอบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ในงานวิจัยนี้ต้องการเพิ่มอัตราการสลายไพลีนให้กับกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังนั้นในขั้นตอนนี้ได้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK1 เพื่อนำไปทดลองในขั้นการสลายไพลีนโดยสารลดแรงตึงผิวร่วมกับ STK

4.4.1 ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน (Surfactin)

ผลิตเซอร์แฟคตินโดย *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ตามวิธีของนิรันดร์ รุ่งสว่าง (2542) สามารถผลิตได้ 1.5 กรัม/ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ น้ำเลี้ยงเชื้อมีค่าแรงตึงผิว 30 มิลลินิวตันต่อเมตร และเซอร์แฟคตินกึ่งบริสุทธิ์มีค่าแรงตึงผิว 32 มิลลินิวตันต่อเมตร เซอร์แฟคตินที่ได้มีสีเหลือง ดังรูป 4.5 และสามารถเปรียบเทียบสมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ดังแสดงในตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.5 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน

ตารางที่ 4.2 สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิดและเซอร์แฟคติน

สมบัติของสาร	เซอร์แฟคติน (Surfactin)
1.ผลผลิต (กรัมต่อลิตร) (น้ำหนักสารต่อปริมาตรน้ำเลี้ยงเชื้อ)	1.5
2.ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อ (มิลลินิวตันต่อเมตร)	30
3.ค่าแรงตึงผิวของสารกึ่งบริสุทธิ์ (มิลลินิวตันต่อเมตร)	32

4.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิว

4.5.1 ผลการหาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration, CMC)

สารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้ในการวิจัยนี้มี 2 ชนิด ได้แก่ Brij 35 และเซอร์แฟคติน นำไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยการเจือจางสารลดแรงตึงผิวในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่างๆ และวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิว และค่า \log ของเปอร์เซ็นต์ความเจือจาง (log percent dilution) จากนั้นหาค่า CMC ได้จากกราฟ (Duvnjak และคณะ, 1982) ผลการวัดค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ และชีวภาพ ดังแสดงในภาคผนวก จ. และสามารถสรุปสมบัติของสารลดแรงตึงผิวดังตาราง 4.3

ตารางที่ 4.3 สรุปสมบัติของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ และชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิว	ค่าแรงตึงผิว (มิลลินิวตันต่อเมตร)	ค่า CMC (มก.ต่อลิตร)
Brij-35	44.2	160
เซอร์แฟคติน	31.9	180

4.5.2 ผลการหาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ในสารละลายดิน (Apparent Critical Micelle Concentration, ACMC)

โดยดัดแปลงจากวิธีของ Sun และ Puri (1997) สามารถหาค่า ACMC ได้จากกราฟดังแสดงในภาคผนวก จ. และสามารถเปรียบเทียบค่า ACMC และค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิว ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิว

สารลดแรงตึงผิว	ค่า CMC (มก.ต่อลิตร)	ค่า ACMC (มก.ต่อลิตร)	ACMC/CMC (เท่า)
Brij 35	160	300	1.88
เซอร์แฟคติน	180	300	1.66

จากการศึกษาพบว่าค่า ACMC จะมีค่ามากกว่าค่า CMC โดยกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ชนิดไร้ประจุ Brij 35 มีค่า ACMC มากกว่าค่า CMC 1.88 เท่าตามลำดับ สำหรับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน มีค่า ACMC มากกว่าค่า CMC 1.66 เท่าตามลำดับ

4.6 ผลของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ต่อการสลายไพรีนในระบบสเลอรีโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ

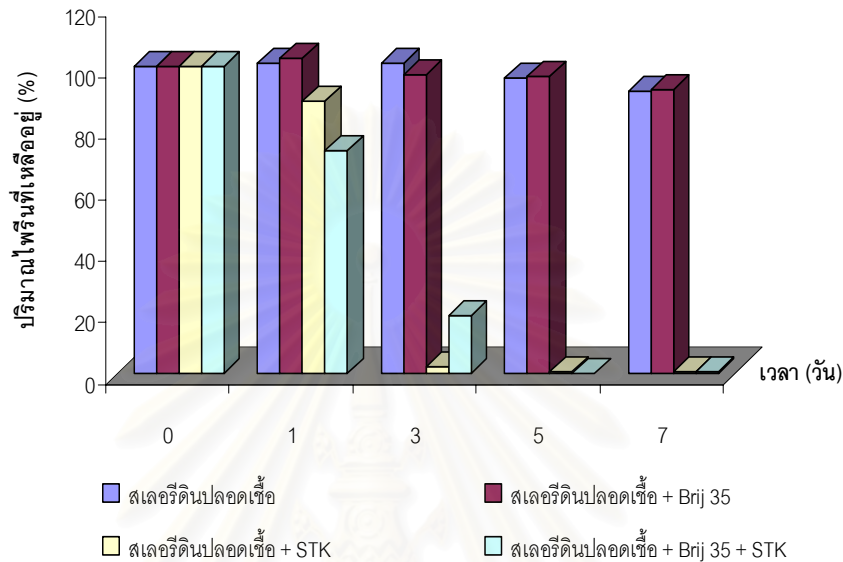
การทดลองนี้ได้คัดเลือกสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ชนิดไร้ประจุ ได้แก่ Brij 35 มาทำการทดลองการย่อยสลายไพรีน โดยพิจารณาจากความสามารถในการชะ PAHs ออกสู่สิ่งแวดล้อมน้ำและการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK ซึ่ง Brij 35 ไม่มีผลกระทบด้านลบต่อการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK เนื่องจากสามารถทำให้กลุ่มแบคทีเรีย STK เจริญได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิว (รจจา สารคุณ, 2548) โดยชุดการทดลองเติม Brij 35 ที่ความเข้มข้นมากกว่าค่า ACMC 15 เท่า (ค่า ACMC เท่ากับ 300 มก.ต่อลิตร) ลงในดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อที่เติมไพรีน ที่อัตราส่วนดิน (กรัม) ต่อปริมาตร (มิลลิลิตร) เท่ากับ 1 ต่อ 6 แล้ววิเคราะห์ปริมาณไพรีนในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 ที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4.6.1 การสลายไพรีนในระบบสเลอรีที่มีกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดินปลอดเชื้อและดินไม่ปลอดเชื้อเมื่อเติม Brij 35

ภายใต้ระบบที่ใช้ พบว่าปริมาณไพรีนลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 ทั้งระบบที่มีและปราศจาก Brij 35 ที่ความเข้มข้นมากกว่าค่า ACMC 15 เท่า พบว่ามีปริมาณไพรีนเหลือ 15.83% และ 2.35% ในชุดสเลอรีไม่ปลอดเชื้อ (รูปที่ 4.7 ก.) และ 18.81% และ 1.96% ในชุดสเลอรีปลอดเชื้อ (รูปที่ 4.6 ก.) ตามลำดับ โดยชุดที่เติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK จะมีปริมาณไพรีนเหลืออยู่มากกว่าชุดที่ไม่เติม Brij 35 จากรูปเห็นได้ว่า Brij 35 ช่วยเพิ่มการสลายไพรีนโดย STK ในวันที่ 1 ของทั้งสองชุด เพราะ Brij 35 สามารถชะไพรีนออกมาสู่สิ่งแวดล้อมน้ำได้ (รูปที่ 4.6 ข. และรูปที่ 4.7 ข.) ทำให้กลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถใช้ไพรีนได้ง่าย จากนั้นกลับไม่เป็นผลดีต่อการสลายในวันที่ 3 และในช่วงวันดังกล่าว ชุดสเลอรีไม่ปลอดเชื้อพบไพรีนในดินน้อยกว่าชุดสเลอรีปลอดเชื้อ อย่างไรก็ตามพบว่า ในวันที่ 5 และ 7 ของการทดลอง ทั้งสองชุดที่เติมและไม่เติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK มีปริมาณไพรีนเหลืออยู่น้อยมากและใกล้เคียงกัน ซึ่ง STK สามารถสลายไพรีนได้หมดในช่วงสุดท้ายของการทดลอง และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติม Brij 35 อย่าง

เดียว พบว่าทั้งสองชุดมีปริมาณไพรินลดลงน้อยมากตลอดการทดลอง และชุดสเลอรีไม่ปลดเชื้อ พบไพรินเหลืออยู่น้อยกว่าชุดสเลอรีปลดเชื้อ (รูปที่ 4.6 ก. และรูปที่ 4.7 ก.)

ก. ปริมาณไพรินที่เหลือ (%) ในสเลอรีปลดเชื้อ (วัฏภาคดิน+วัฏภาคน้ำ)

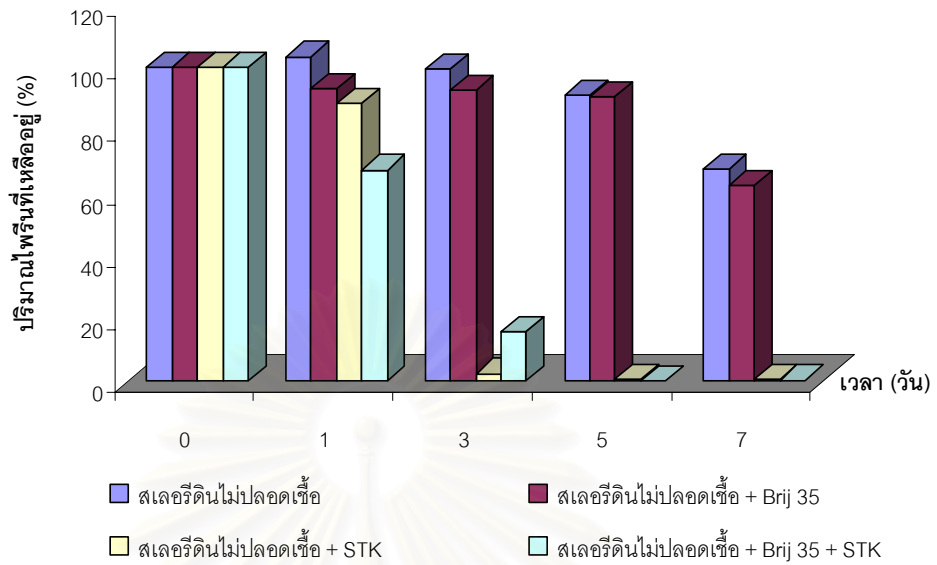


ข. ปริมาณไพรินที่เหลือ (%) ในสเลอรีปลดเชื้อ (วัฏภาคน้ำ)

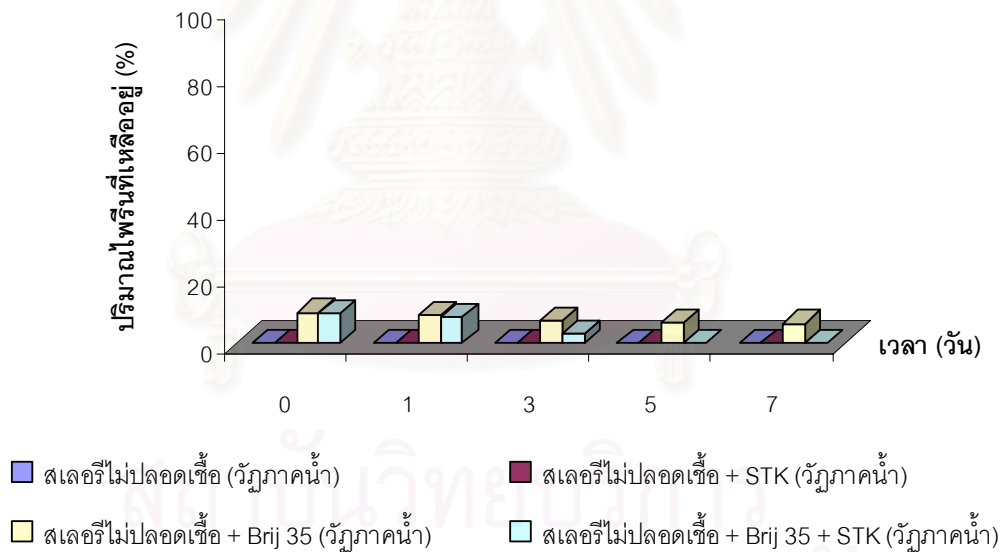


รูปที่ 4.6 ปริมาณไพรินที่เหลือ (%) ในสเลอรีดินปลดเชื้อที่เติมและไม่เติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK (ก. วัฏภาคดินรวมกับวัฏภาคน้ำ และ ข. วัฏภาคน้ำ)

ก. ปริมาณไฟรินที่เหลือ (%) ในสเลอรี่ไม่ปลอดเชื้อ (วัฏภาคดิน+วัฏภาคน้ำ)



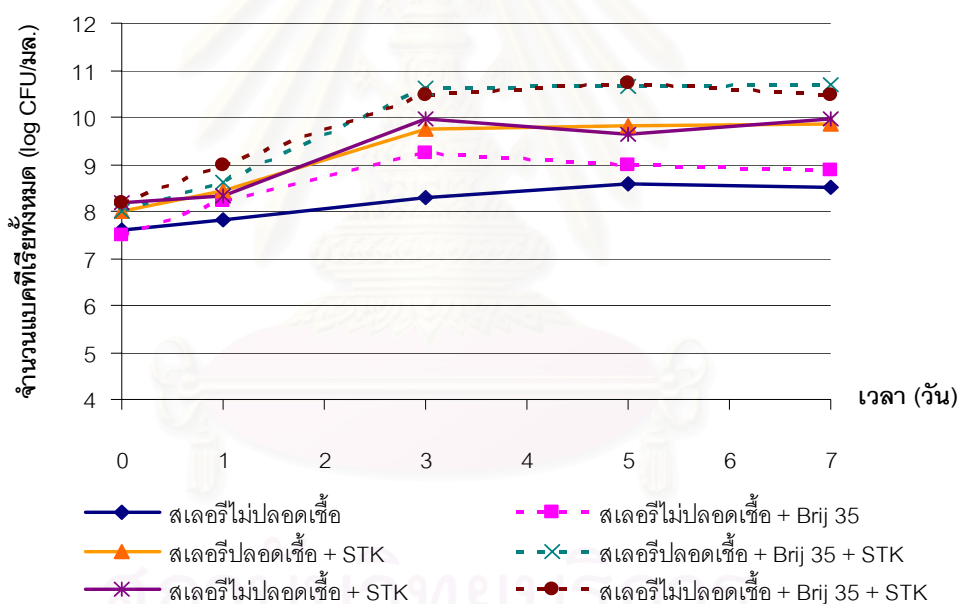
ข. ปริมาณไฟรินที่เหลือ (%) ในสเลอรี่ไม่ปลอดเชื้อ (วัฏภาคน้ำ)



รูปที่ 4.7 ปริมาณไฟรินที่เหลือ (%) ในสเลอรี่ดินไม่ปลอดเชื้อที่เติมและไม่เติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK (ก. วัฏภาคดินร่วมกับวัฏภาคน้ำ และ ข. วัฏภาคน้ำ)

4.6.2 การเจริญของแบคทีเรียรวมในระบบเลอริที่มีกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดินปลอดเชื้อและดินไม่ปลอดเชื้อเมื่อเติม Brij 35

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดในชุดสเลอริปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อที่มีการเติมและไม่เติม Brij 35 ร่วมกับ STK พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของชุดที่เติม Brij 35 มีการเจริญมากกว่าชุดที่ไม่เติม เช่นเดียวกับชุดควบคุมสเลอริไม่ปลอดเชื้อ ที่มีการเจริญของแบคทีเรียมากกว่าชุดที่ไม่เติม Brij 35 ลงไปในระบบ จากผลการทดลองในสเลอริทั้งสองชุด (ปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ) ที่เติมและไม่เติม Brij 35 พบว่าแบคทีเรียในช่วงแรกมีการเจริญเพียงเล็กน้อย ซึ่งอัตราการย่อยสลายไพลินในช่วงแรกก็มีน้อยเช่นกัน (รูปที่ 4.6 และ รูปที่ 4.7) หลังจากนั้นการเจริญของแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้นในวันที่ 3 ของการทดลอง ซึ่งตรงกับการย่อยสลายไพลินที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และการเจริญของแบคทีเรียจะมีจำนวนคงที่ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบการเจริญในสเลอริดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อเมื่อเติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

ดังนั้นรูปแบบการเจริญของแบคทีเรียที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ รุจา สารคุณ, 2548 ที่สนับสนุนว่า Brij 35 สามารถทำให้กลุ่มแบคทีเรีย STK เจริญได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่เติมสารนี้ และกล่าวได้ว่าการเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ในสเลอริดินมี

ประสิทธิภาพค่อนข้างดี เนื่องจากสามารถย่อยสลายไพรีนได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 3 วัน ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ในวันสุดท้ายของการทดลองก็ตาม

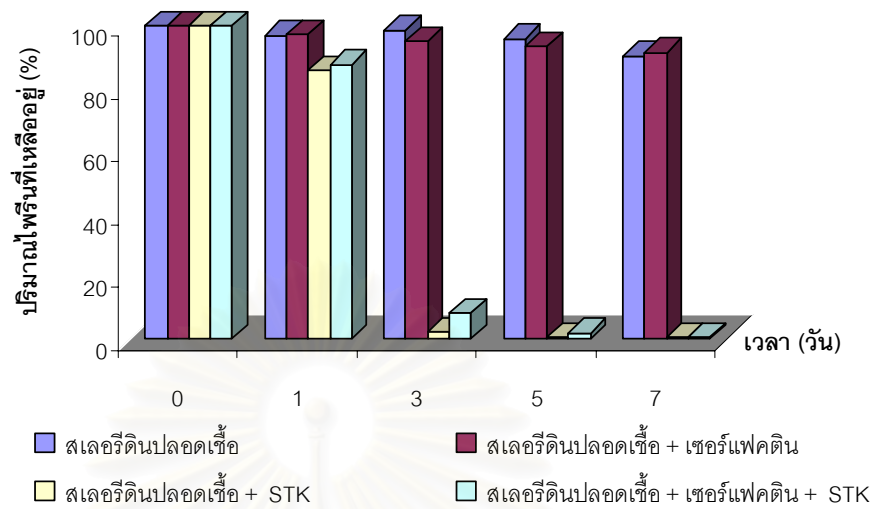
4.7 การเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวเทียบกับการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระบบสเลอรีต่อความสามารถในการย่อยสลายสารไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK

4.7.1 ผลการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคตินต่อความสามารถในการย่อยสลายไพรีนในดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อในระบบสเลอรีโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK

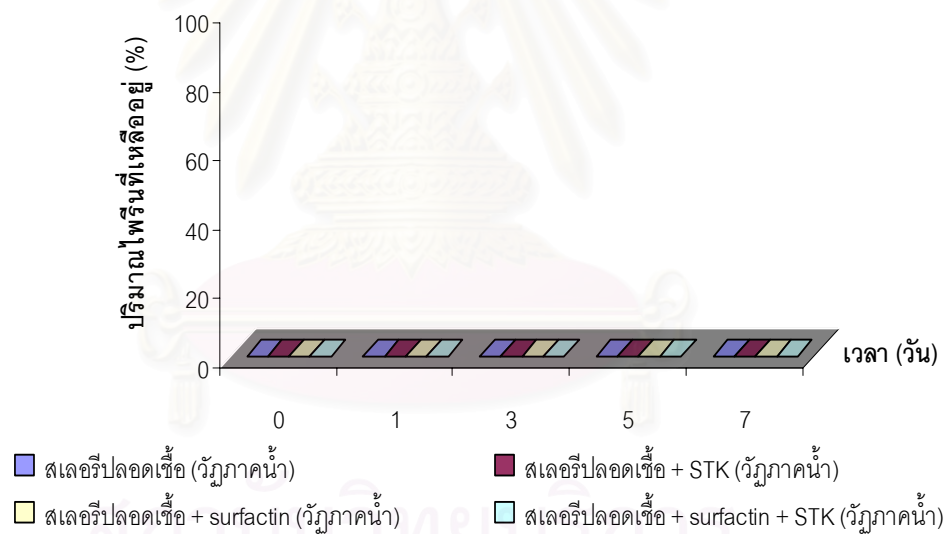
ปริมาณเซอร์แฟคตินที่ผลิตโดย *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ที่ใช้ในการทดลองนี้ พิจารณาจากความสามารถในการชะ PAHs ออกสู่สิ่งแวดล้อม (จุฬา สารคุณ, 2548) โดยเติมลงในดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อที่มีไพรีนให้มีความเข้มข้นมากกว่า ACMC 15 เท่า (ค่า ACMC เท่ากับ 300 มก.ต่อลิตร) โดยชุดการทดลองให้มีอัตราส่วน ดิน (กรัม) ต่อปริมาตร (มิลลิลิตร) เท่ากับ 1 ต่อ 6 แล้ววิเคราะห์ปริมาณไพรีนในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 ที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง

จากผลการทดลองการสลายไพรีนในระบบสเลอรีเมื่อเติมเซอร์แฟคตินร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK พบว่าไพรีนค่อยๆลดลงจนถึงวันที่ 3 ซึ่งไพรีนลดลงมากยิ่งขึ้นทั้งในสเลอรีปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ โดยเหลืออยู่ 8.25% และ 6.85% ตามลำดับ (รูปที่ 4.9 ก.และรูปที่ 4.10 ก.) ในขณะที่เดียวกันชุดที่เติมเฉพาะ STK พบไพรีน 2.39% และ 1.93% ตามลำดับ โดยทุกชุดการทดลองที่มี STK อยู่ในระบบ พบไพรีนในดินน้อยมากในวันที่ 5 และ 7 ทั้งสเลอรีปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ จากรูปเห็นได้ว่าเซอร์แฟคตินไม่ช่วยเพิ่มการสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ของทั้งสองชุด และไม่สามารถชะไพรีนออกมาสู่สิ่งแวดล้อมได้ (รูปที่ 4.9 ข. และรูปที่ 4.10 ข.)

ก. ปริมาณไฟรินที่เหลือ (%) ในสเลอริพลอดเชื้อ (วัฏภาคดิน+วัฏภาคน้ำ)

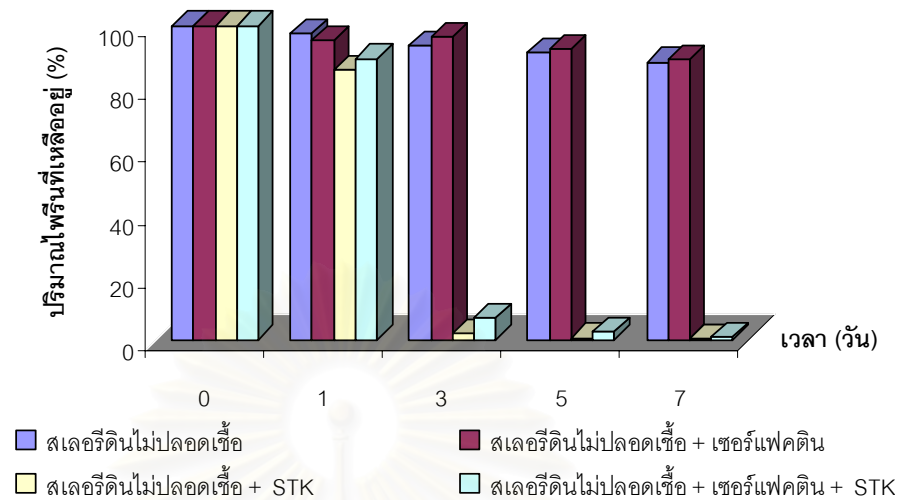


ข. ปริมาณไฟรินที่เหลือ (%) ในสเลอริพลอดเชื้อ (วัฏภาคน้ำ)

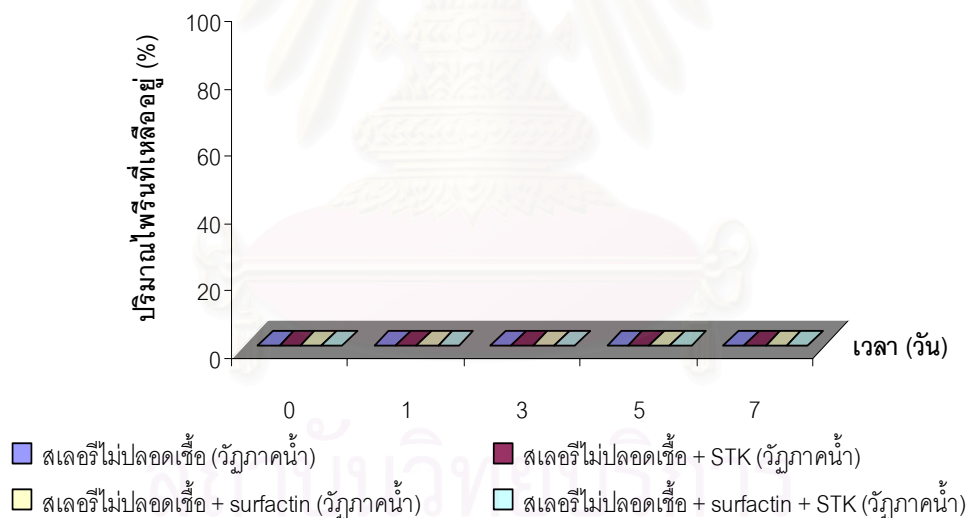


รูปที่ 4.9 ปริมาณไฟรินที่เหลือ (%) ในสเลอริดินพลอดเชื้อที่เติมและไม่เติมเซอร์แฟคตินร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK (ก. วัฏภาคดินรวมกับวัฏภาคน้ำ และ ข. วัฏภาคน้ำ)

ก. ปริมาณไขมันที่เหลือ (%) ในสเลอรีไม่ปลดเชื้อ (วัฏภาคดิน+วัฏภาคน้ำ)



ข. ปริมาณไขมันที่เหลือ (%) ในสเลอรีไม่ปลดเชื้อ (วัฏภาคน้ำ)

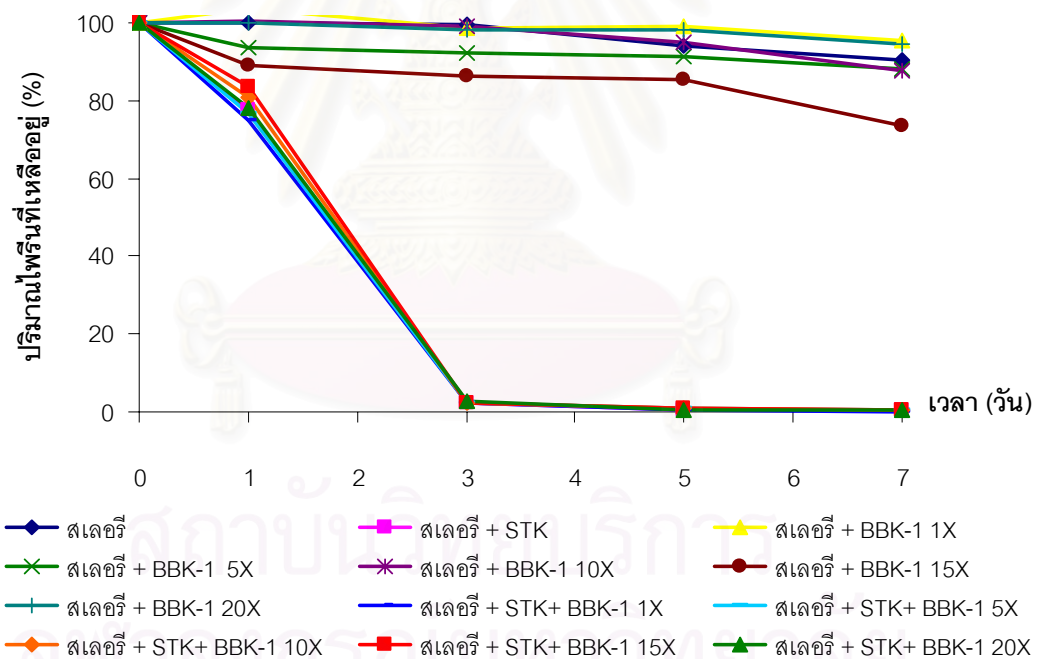


รูปที่ 4.10 ปริมาณไขมันที่เหลือ (%) ในสเลอรีดินไม่ปลดเชื้อที่เติมและไม่เติม surfactin ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK (ก. วัฏภาคดินรวมกับวัฏภาคน้ำ และ ข. วัฏภาคน้ำ)

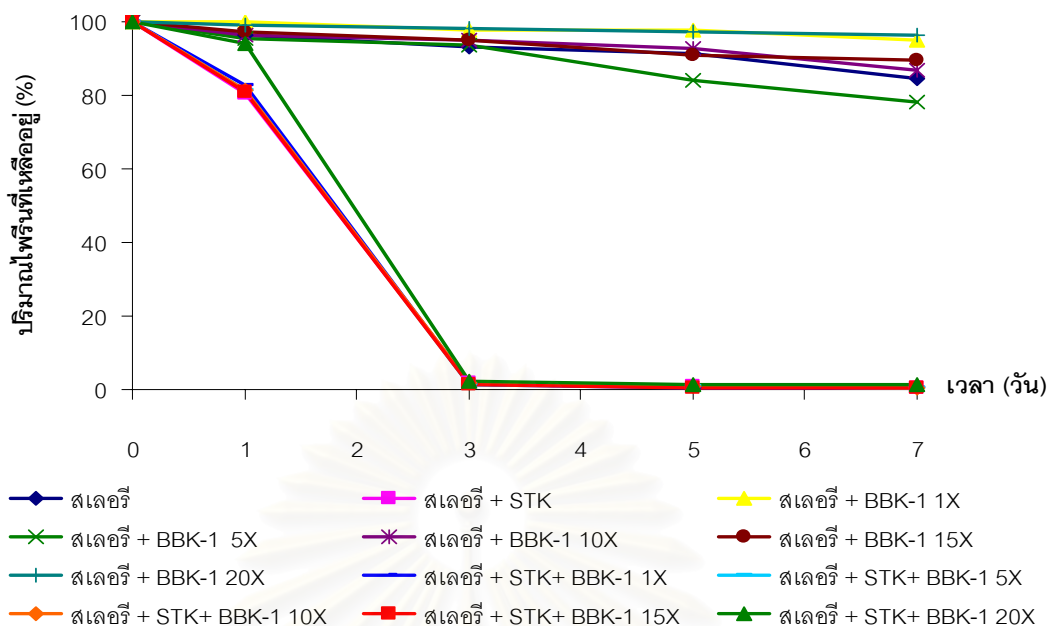
จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเติมเซอร์แฟคตินซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสลายไขมันโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียนี้สามารถทำงานได้ดีโดยไม่ต้องเติมสารนี้

4.7.2 ผลของการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ที่สร้างสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อยสลายสารไพรีนในระบบสเลอริทั้งในดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK

การสลายไพรีนในชุดที่เติม *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1, 5, 10, 15 และ 20 เท่าของปริมาณเชื้อ 10^7 CFU/มล.) ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK พบว่าไพรีนเริ่มลดลงในช่วงแรกของการทดลอง จนกระทั่งในวันที่ 3 ไพรีนลดลงอย่างรวดเร็ว โดยทุกชุดการทดลองใน สเลอริปลอดเชื้อที่เติม BBK-1 และ STK สามารถตรวจพบไพรีนอยู่ในช่วง 2.10% - 2.67% และในสเลอริไม่ปลอดเชื้อมีปริมาณไพรีนอยู่ในช่วง 1.19% - 2.16% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียว ในชุดนี้พบไพรีนในสเลอริปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อเท่ากับ 2.39% และ 1.93% ตามลำดับ และหมดไปในวันที่ 5 และ 7 หรือมีไพรีนในระดับน้อยมากเหมือนกันทุกชุดการทดลองที่มีการเติม STK ร่วมด้วย (รูปที่ 4.11 และรูปที่ 4.12)



รูปที่ 4.11 ผลการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ที่สร้างสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อยสลายสารไพรีนในสเลอริดินปลอดเชื้อโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK (BBK-1 1X เท่ากับ 10^7 CFU/มล.)

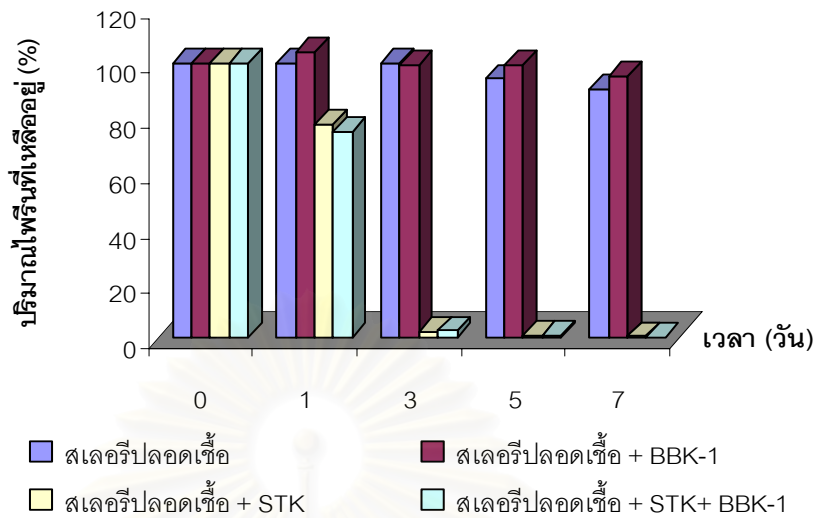


รูปที่ 4.12 ผลของการเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ที่สร้างสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อยสลายสารไฟรีนในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK (BBK-1 1X เท่ากับ 10^7 CFU/มล.)

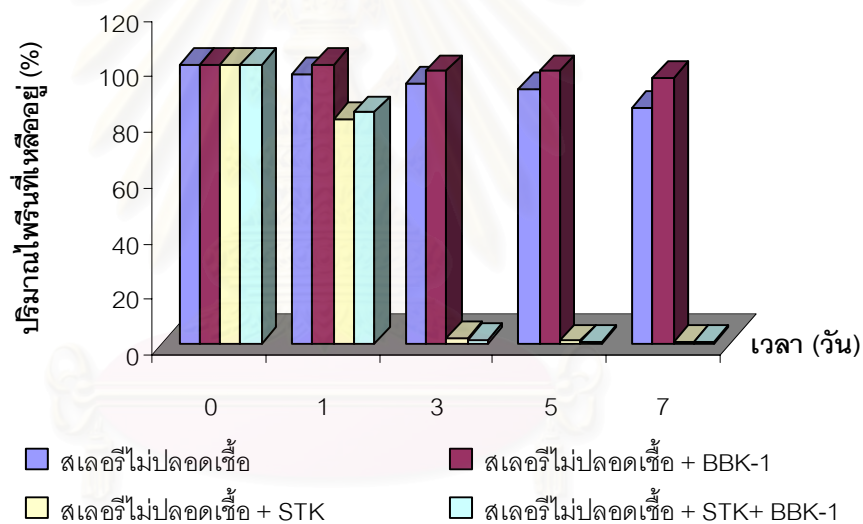
เมื่อพิจารณาการสลายไฟรีนในชุดที่เติม *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 อย่างเดียวที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างกัน พบว่าตลอดช่วงของการบำบัด อัตราการสลายไฟรีนไม่คงที่ แม้ว่าจะเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียก็ไม่สามารถเพิ่มการสลายได้ โดยการสลายไฟรีนที่พบได้ในช่วงของการบำบัด พบว่าส่วนใหญ่ น่าจะเกิดจากการทำงานของกลุ่มแบคทีเรีย STK ทั้งในสเลอริปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ

จึงนำผลการทดลองในชุดที่เติม *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ที่มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น 10^7 CFU/มล. ที่ได้จากรูปที่ 4.11 และรูปที่ 4.12 เป็นตัวแทนในการเปรียบเทียบการสลายไฟรีนในดินร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK (รูปที่ 4.13)

ก. สเลอรีปลอดเชื้อ



ข. สเลอรีไม่ปลอดเชื้อ



รูปที่ 4.13 ปริมาณไฟรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีดินปลอดเชื้อ (ก.) และไม่ปลอดเชื้อ (ข.) ที่เติมและไม่เติม BBK-1 (10^7 CFU/มล.) ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

จากรูปที่ 4.13 อัตราการย่อยสลายไฟรีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 ในชุดที่เติม BBK-1 และ STK โดยชุดสเลอรีปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อมีปริมาณไฟรีนเหลืออยู่ 2.43% และ 1.33% ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันชุดที่เติมเฉพาะ STK พบไฟรีน 2.39% และ 1.93% ตามลำดับ เนื่องจาก BBK-1 ไม่มีส่วนช่วยในการสลายไฟรีนเมื่อเติมร่วมกับ STK ดังกล่าวข้างต้นในขั้นตอนต่อไป จึงนำ BBK-1 เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^7 CFU/มล.นำไปเป็นตัวแทนในการ

ติดตามพลวัตประชากรแบคทีเรีย ในสเลอรีไม่ปลอดเชื้อเมื่อเติมร่วมกับ STK เพื่อศึกษาผลกระทบต่อบัคทีเรียในดินเมื่อเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่น

4.8 พลวัตประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ในช่วงเวลาของการบำบัด

การติดตามพลวัตประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ในช่วงเวลาของการบำบัด ได้ออกแบบการศึกษาเป็นชุดการทดลอง 5 ชุดดังนี้

1. การสลายตัวของไฟรีนในสเลอรีดินไม่ปลอดเชื้อ
2. การสลายตัวของไฟรีนในสเลอรีดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK
3. การสลายตัวของไฟรีนในสเลอรีดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK และ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK-1
4. กลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมเปรียบเทียบตำแหน่งของแบคทีเรียแต่ละชนิดของกลุ่มแบคทีเรีย STK บนพอลิอะครีลาไมด์เจล
5. *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมเปรียบเทียบตำแหน่งของแบคทีเรีย บนพอลิอะครีลาไมด์เจล

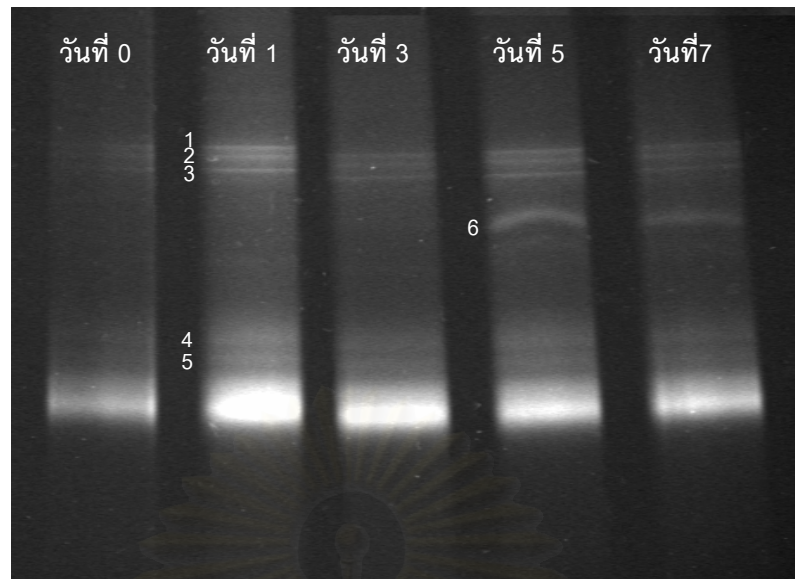
การติดตามพลวัตประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ในช่วงเวลาของการบำบัด ทำได้ โดยการสกัดดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ต่างๆจากตัวอย่างดิน ปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอแม่แบบให้เท่ากัน จากนั้นเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ซึ่งมีขนาดประมาณ 500 bp ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

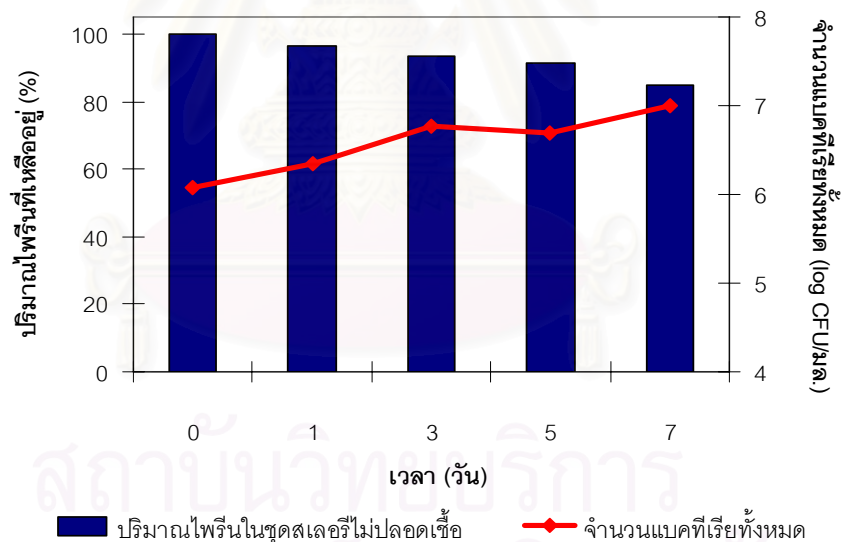
4.8.1 พลวัตประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองการสลายไฟรีนในสเลอร์ดินไม่ปลอดเชื้อ

การติดตามพลวัตประชากรแบคทีเรียในสเลอร์ดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับไฟรีน เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียในดินในช่วงเวลาของการบำบัด ด้วยเทคนิค DGGE ในพอลิอะครีลาไมด์เจลที่มี 40 - 70% denaturant พบว่า มีแถบดีเอ็นเอที่เด่นชัดจำนวน 6 แถบในโปรไฟล์ของ DGGE ในวันที่ 0-3 ของการทดลองพบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 5 แถบ ดีเอ็นเอที่เด่นชัดพบ 3 แถบ คือ 1, 2 และ 3 สำหรับแถบดีเอ็นเอที่ 4 และ 5 ไม่สามารถเห็นได้อย่างเด่นชัดซึ่งแถบดีเอ็นเอทั้ง 5 แถบนี้สามารถพบได้ในโปรไฟล์ของ DGGE จนสิ้นสุดการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าแถบดีเอ็นเอที่ 6 ปรากฏขึ้นมาในวันที่ 5 และ 7 ของการทดลอง (รูปที่ 4.14)

เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรที่ได้กับผลการสลายตัวของของไฟรีนจะเห็นว่าตลอดการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไฟรีนและจำนวนประชากรแบคทีเรียในสเลอร์ดินไม่ปลอดเชื้อเพียงเล็กน้อย โดยปริมาณไฟรีนที่เหลือทุกๆวันที่ทดสอบ มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก อยู่ระหว่าง 84-97% โดยในวันที่ 7 มีปริมาณไฟรีนเหลือ 84.6% สอดคล้องกับจำนวนประชากรแบคทีเรียซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง ดังรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.14 แถบขึ้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rDNA แสดงพลวัตประชากรแบคทีเรียในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมไพรินที่เวลาต่างๆ โดยวิธี DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40 – 70% denaturant



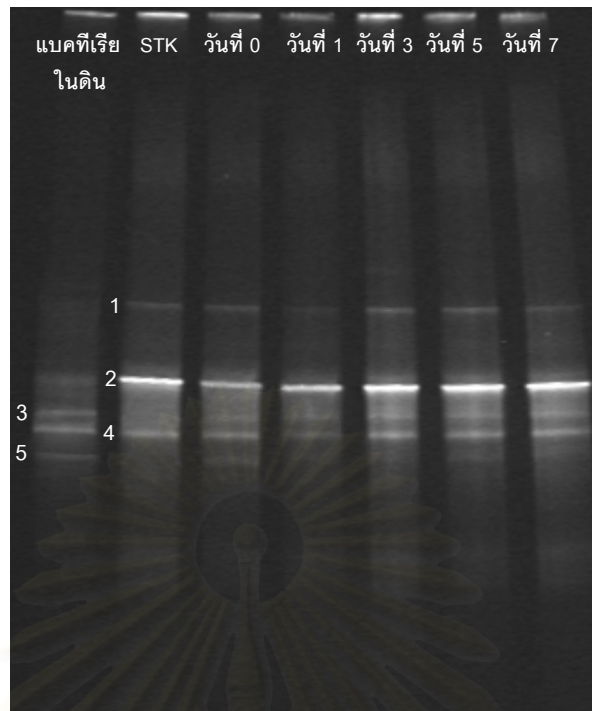
รูปที่ 4.15 การเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณไพรินที่หลุด (%) ในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อ

4.8.2 พลวัตประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองการสลายไพรินในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกลุ่มแบคทีเรีย STK

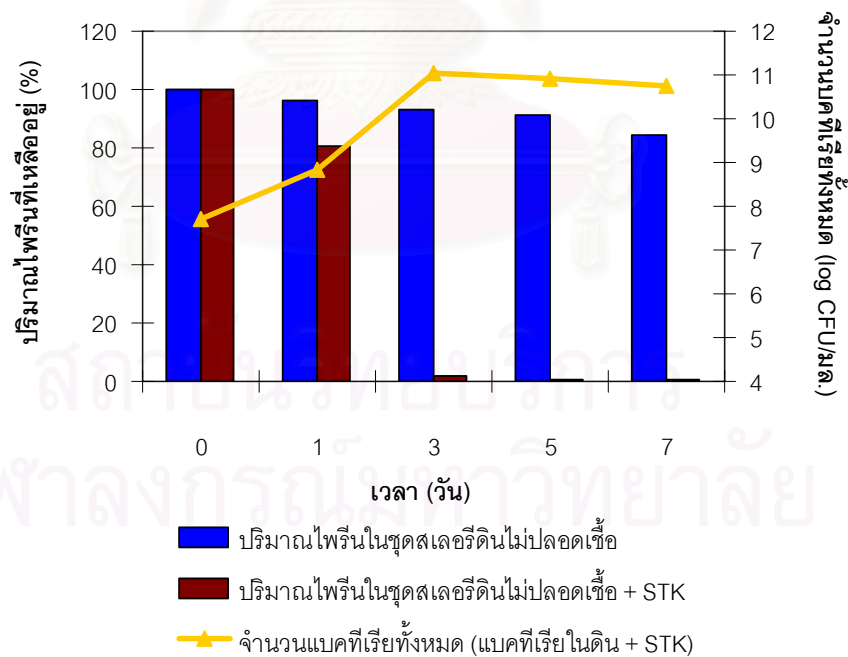
การติดตามพลวัตประชากรแบคทีเรียและการสลายไพรินของชุดการทดลองในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อ ที่ผสมกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยเทคนิค DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่

มี 40 - 70% denaturant พบว่าในช่วงการบำบัดมีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 5 แถบ โดย 3 แถบ คือ แถบที่ 1, 2 และ 4 พบว่ามีตำแหน่งตรงกับแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก โดยวันที่ 3, 5 และ 7 ของการทดลองพบว่า แถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่เด่นชัดมากกว่าวันที่ 0 และ วันที่ 1 โดยเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่ 2 มีความโดดเด่นมากที่สุด รองลงมาคือแถบดีเอ็นเอที่ 4 และ 1 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถพบแถบดีเอ็นเอแถบที่ 3 และ 5 ซึ่งมีตำแหน่งตรงกับแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียในดิน โดยแถบดีเอ็นเอแถบที่ 3 สามารถพบได้จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง นอกจากนี้ แถบที่ 5 สามารถพบได้ในวันที่ 0 ของการทดลอง และหายไปในวันที่ 3 ของการทดลอง และจะปรากฏอีกครั้งในวันที่ 5 และ 7 (รูปที่ 4.16)

เมื่อเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK ที่อยู่ในดินมีความโดดเด่นที่สุดในวันที่ 3 ของการทดลอง และในวันที่ 5 และ 7 กลุ่มแบคทีเรีย STK ยังคงมีความโดดเด่นใกล้เคียงกับวันที่ 3 ของการทดลอง และยังคงพบเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในดินตลอดช่วงเวลาของการทดลอง และพบเชื้อแบคทีเรียจากในดินเองตลอดการทดลองจางกว่าของกลุ่มแบคทีเรีย STK ซึ่งสอดคล้องกับการสลายตัวของของไพลินที่พบว่าวันที่ 3 เป็นวันที่ปริมาณไพลินมีอัตราการลดลงสูงสุด ซึ่งมีไพลินเหลืออยู่ 1.93% และหมดไปในวันที่ 5 และ 7 ของการทดลอง (รูปที่ 4.17)



รูปที่ 4.16 แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rDNA แสดงพลวัตประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลอง การสลายตัวของไฟรีนในสเลอวีดินไม่ปลอดเชื้อ ที่ผสมกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เวลาต่างๆ โดยวิธี DGGG ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40 – 70% denaturant

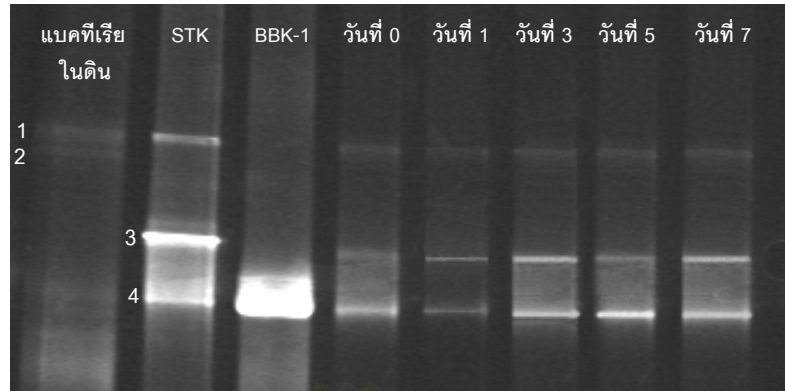


รูปที่ 4.17 การเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณไฟรีนที่เหลือ (%) ในสเลอวีดินไม่ปลอดเชื้อ ที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

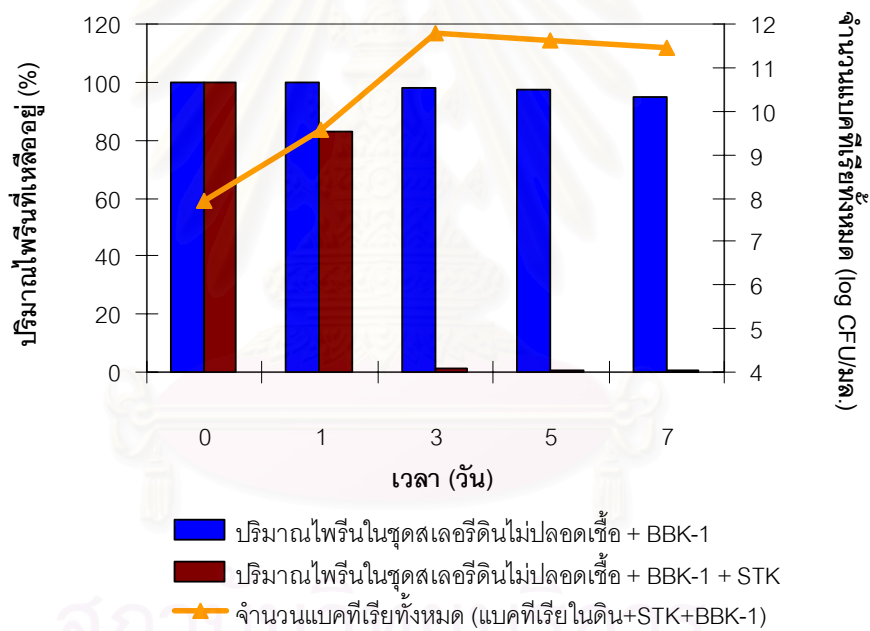
4.8.3 พลวัตประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองการสลายไฟรีนในสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกลุ่มแบคทีเรีย STK และ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK-1

การติดตามพลวัตประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองสเลอริดินไม่ปลอดเชื้อผสมกับไฟรีน, กลุ่มแบคทีเรีย STK และ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 เพื่อดูพลวัตประชากรของแบคทีเรียทั้งหมดที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาของการบำบัด ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40 - 70% denaturant เมื่อเริ่มต้นการทดลองพบว่า มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 3 แถบ คือแถบที่ 1, 3 และ 4 พบว่ามีตำแหน่งตรงกับแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก ในวันที่ 3 พบว่าแถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่เด่นชัดขึ้นมาและมีความเด่นชัดใกล้เคียงกันกับวันที่ 5 และ 7 โดยในวันที่ 3 ของการทดลองแถบดีเอ็นเอที่ 3 และ 4 มีความเข้มมากที่สุดและใกล้เคียงกัน และแถบดีเอ็นเอที่ 1 จางที่สุด ในขณะที่วันที่ 5 ของการทดลอง แถบดีเอ็นเอที่ 4 มีความโดดเด่นมากที่สุด รองลงมาคือแถบดีเอ็นเอที่ 3 และ 1 ตามลำดับ นอกจากนี้แถบดีเอ็นเอที่ 4 ที่พบได้ในช่วงของการบำบัด นอกจากจะตรงกับแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK แล้ว ยังตรงกับแถบดีเอ็นเอของ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ 4 ที่พบได้ในช่วงของการบำบัดอาจจะเป็นแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 และในช่วงของการบำบัดสามารถพบแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียในดินคือแถบดีเอ็นเอที่ 1 ซึ่งยังตรงกับแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK อีกด้วย (รูปที่ 4.18)

เมื่อเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK ที่อยู่ในดินมีความโดดเด่นที่สุดในวันที่ 3 ของการทดลอง และในวันที่ 5 และ 7 กลุ่มแบคทีเรีย STK ยังคงมีความโดดเด่นใกล้เคียงกับวันที่ 3 ของการทดลอง และยังคงพบเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในดินตลอดช่วงเวลาของการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการสลายตัวของของไฟรีนที่พบว่าวันที่ 3 เป็นวันที่ปริมาณไฟรีนมีอัตราการลดลงสูงสุด ซึ่งมีไฟรีนเหลืออยู่ 1.33% และหมดไปในวันที่ 5 และ 7 ของการทดลอง (รูปที่ 4.19)



รูปที่ 4.18 แถบชั้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rDNA แสดงพลวัตประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองการสลายตัวของไฟรในสเลอวีดินไม่ปลอดเชื้อ ที่ผสมกลุ่มแบคทีเรีย STK และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ที่เวลาต่างๆ โดยวิธี DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40 – 70% denaturant



รูปที่ 4.19 การเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณไฟรที่เหลือ (%) ในสเลอวีดินไม่ปลอดเชื้อ ที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK และ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK-1

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ศึกษาการเติมสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์และชีวภาพร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไพรีนในดิน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากไบโมาซามาที่ใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ (ทิมากร แสงดำ, 2547) ประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *Zoogloea* sp., *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. สำหรับดินที่นำมาใช้ในการทดลองนั้นเป็นดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันเครื่องใกล้บริเวณเครื่องสูบน้ำจาก ต.ทุ่งขวาง อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม เมื่อทดสอบด้วย GC-FID แล้วไม่พบสาร PAHs ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากในระหว่างขั้นตอนการเตรียมดินที่มีการตากแห้งนั้นมีการระเหยของสาร PAHs ออก เมื่อวิเคราะห์ลักษณะเนื้อดินพบมีลักษณะร่วน มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส (C:N:P) เท่ากับ 173:15:3 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมของการบำบัด PAHs ใกล้เคียงกับที่รายงานไว้โดย รุจา สารคุณ (2548) ที่มีอัตราส่วนเท่ากับ 123:10:2 และรายงานของ Hupe และคณะ (2001) ที่มีอัตราส่วนเท่ากับ 100:8:2 และรายงานของ Lee และคณะ (2001) ที่มีอัตราส่วนเท่ากับ 100:10:2 จึงนำดินนี้มาทำให้ปนเปื้อนไพรีน เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

จากการทดสอบหาปริมาณน้ำที่เหมาะสมในสเลอรี่ดินเพื่อสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK พบว่าการย่อยสลายไพรีนแปรผันตามปริมาณน้ำที่เพิ่ม โดยที่ปริมาณน้ำสูง ปริมาณของไพรีนที่เหลือในสเลอรี่จะยิ่งลดลง อย่างไรก็ตามเมื่อปริมาณน้ำมีถึงจุดหนึ่งที่เหมาะสมแล้ว จะไม่สามารถเพิ่มอัตราการย่อยสลายได้อีก ในการทดลองพบว่าอัตราส่วนดิน:น้ำที่เหมาะสมในการย่อยสลายไพรีนอยู่ในช่วง 1:4 - 1:12 (กรัม/มล.) โดยเฉพาะอัตราส่วนดิน:น้ำ 1:4 และ 1:6 (กรัม/มล.) ให้ปริมาณไพรีนเหลือน้อยกว่าชุดอื่นๆ แม้ว่าปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ทั้ง 2 ชุดนี้ มีค่าไม่ต่างกับชุดอื่นมากนัก Doick และ Semple (2003) รายงานว่าการย่อยสลายพีแนทรีนที่ความเข้มข้น 100 ppm โดย *Pseudomonas* sp. ในช่วงของการทดลอง 10 วัน พบว่าการย่อยสลายเกิดขึ้นได้ดีที่อัตราส่วนดิน:น้ำตั้งแต่ 1:2-1:5 โดยเฉพาะที่อัตราส่วน 1:2 มีการย่อยมากที่สุด ดังนั้นน้ำมีบทบาทในการบำบัดสาร PAHs โดยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างจุลินทรีย์กับ PAHs การเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสดังกล่าวเกิดจากการแตกตัวของดินทำให้ PAHs เคลื่อนไปยังวัฏภาคน้ำได้ รวมทั้งเพิ่มการเคลื่อนที่ของจุลินทรีย์ได้ด้วย (Ortega และ Alexander, 1994) และสอดคล้องกับรายงานของ Fu และ Alexander (1995) ที่บำบัด PAHs ในสเลอรี่ดินด้วยอัตราส่วน 1:10 พบว่าสามารถเพิ่มการย่อย

สลายพีแนทรีนได้ และรายงานของ Labare และ Alexander (1995) พบว่าการย่อยสลายพีแนทรีนในระบบสเลอรีที่เติม dibutyl phthalate จะเพิ่มขึ้นจาก 4.4% เป็น 36.9%

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของการให้อากาศต่อการย่อยสลายไพรีนในดินในระบบสเลอรีอัตราส่วน ดิน:น้ำ เท่ากับ 1:6 (กรัม/มล.) โดยนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150, 200 และ 250 รอบ/นาที พบว่าในวันที่ 3 ของการทดลอง ทั้งชุดสเลอรีดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ ที่ 150 รอบ/นาที มีปริมาณไพรีนเหลืออยู่น้อยที่สุด คือ 0.91% และ 1.04% ตามลำดับ ส่วนที่ 200 รอบ/นาที มีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 1.96% และ 2.35% ตามลำดับ และที่ 250 รอบต่อนาที มีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 6.39% และ 6.83% ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณมากกว่าที่ความเร็ว 150 และ 200 รอบ/นาที สาเหตุที่การใช้ความเร็ว 250 รอบ/นาที มีไพรีนเหลือมากที่สุด อาจเนื่องมาจากที่ความเร็วรอบนี้ STK เข้าสู่ระยะ stationary phase เร็วขึ้น ทำให้แบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็วและใช้ไพรีนได้มากในช่วงต้นของการทดลองและในช่วงท้ายจำนวนแบคทีเรียเริ่มลดลง ทำให้ไพรีนเหลือมากกว่าที่ความเร็วรอบอื่น หรืออาจเกิดจากขั้นตอนในการบำบัดที่ใช้ขวดรูปชมพู่เมื่อใช้ที่ความเร็วรอบสูงๆ ทำให้ไพรีนสามารถเกาะติดบริเวณขอบของขวดได้สูงกว่าที่ความเร็วรอบอื่นทำให้ไพรีนติดอยู่ที่ข้างขอบของขวด จึงไม่สามารถนำไพรีนออกมาสกัดได้ทั้งหมด และเมื่อพิจารณาชุดที่ไม่ปลอดเชื้อมีไพรีนเหลือน้อยกว่าชุดที่ปลอดเชื้อ ทั้งสามความเร็วรอบ ลักษณะที่คล้ายกันนี้อาจเกิดจากจุลินทรีย์ในดินตามธรรมชาติมีความสามารถในการย่อยสลายสารไพรีนได้บ้าง โดยบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารดังกล่าว จุลินทรีย์อาจมีการปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดในสภาวะที่มีการปนเปื้อนสารดังกล่าวทั้งทางด้านขนาด โครงสร้าง สรีระวิทยาและพันธุกรรม (Ridgeway และคณะ, 1990) การปรับตัวดังกล่าวอาจมีส่วนช่วยให้จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถย่อยสลายสารประกอบไพรีนได้ โดยกลไกการย่อยสลายอาจเป็นการย่อยสลายเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญของเซลล์ หรือการย่อยสลายแบบไม่สมบูรณ์ โดยอาศัยกลไกการเกิดโคเมตาบอลิซึม (catabolism) (Bastean และคณะ, 2000)

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดในชุดการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในสเลอรีดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ ที่ความเร็ว 150, 200 และ 250 รอบ/นาที พบว่าการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในชุดสเลอรีปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ ทั้ง 3 ความเร็วรอบมีแนวโน้มคล้ายคลึงกัน โดยในวันที่ 0 ของการทดลอง มีจำนวนแบคทีเรียประมาณ $8 \log$ CFU ต่อมล. ในวันที่ 1 มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียเพียงเล็กน้อย โดยแบคทีเรียอยู่ในระยะปรับตัว (lag phase) แล้วการเจริญจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นในวันที่ 3 สอดคล้องกับการสลายไพรีนที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยจากนั้นเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ และจำนวนแบคทีเรียในดินนั้นก็มีความคงที่และการย่อยสลายเกิดในอัตราที่ต่ำ นอกจากนี้การเพิ่มความเร็วยังเพิ่มปริมาณออกซิเจน ไม่มีผลต่อการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK เมื่อพิจารณาการเจริญในชุดสเลอรี

ไม่ปลอดเชื้อ พบว่าแบคทีเรียในดินไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK จำนวนแบคทีเรียมีปริมาณใกล้เคียงกับชุดควบคุม กล่าวคือ ไม่เกิดภาวะการแข่งขันระหว่าง จุลินทรีย์ต่างถิ่นกับจุลินทรีย์ที่อยู่ประจำถิ่น (indigenous microorganisms) และจุลินทรีย์ต่างถิ่นสามารถอยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมนั้นๆ (Vidali, 2001)

เมื่อทดสอบการสลายไพรีนในระบบสเลอรีที่เติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK โดย รุจา สารคุณ (2548) ได้รายงานว่ไพรีนถูกชะจากดินสู่วัฏภาคน้ำสูงสุดโดยใช้ Brij 35 ที่ความเข้มข้นมากกว่าค่า ACMC 15 เท่า ดังนั้นจึงใช้ความเข้มข้นนี้มาทดสอบการย่อย พบว่าในวันที่ 3 ชุดสเลอรีปลอดเชื้อที่เติม Brij 35 ร่วมกับ STK ชะลอการสลายไพรีนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่เติม STK อย่างเดียว ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่กลุ่มแบคทีเรีย STK มีการปรับตัวและสามารถใช้ Brij 35 เป็นแหล่งคาร์บอนก่อนจะเกิดการย่อยสลายไพรีนได้ ซึ่ง Brij 35 อาจถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่า (Deschênes และคณะ, 1996 ; Tiehm และคณะ, 1997) หรืออาจเกิดจากการยับยั้งเนื่องจากสมบัติของสารลดแรงตึงผิวเอง ที่มีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิพาติก (amphipatic structure) ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว และไม่มีขั้ว จึงทำให้สารลดแรงตึงผิวรวมตัวอยู่บริเวณผิวประจันระหว่างวัฏภาคน้ำ และวัฏภาคสาร PAHs (West และ Harwell, 1992) ทำให้จุลินทรีย์เข้าไปสัมผัสกับ PAHs ได้ยากขึ้น ส่งผลให้มีการย่อยสลายได้น้อยลง (Ortega-Calvo และ Alexander, 1994) สอดคล้องกับรายงานของ รุจา สารคุณ (2548) ที่พบว่าการเติม Brij 35 เกิดการสลาย PAHs ช้ากว่าการไม่เติมสารนี้และไม่มีผลด้านลบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามอัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้นในวันที่ 5 และวันที่ 7 โดยมีปริมาณไพรีนเหลือน้อยมากใกล้เคียงกับชุดควบคุม และผลนี้พบเช่นเดียวกันในกรณีของสเลอรีไม่ปลอดเชื้อนั่นคือการเติม Brij 35 ที่ความเข้มข้นมากกว่าค่า ACMC 15 เท่า ไม่ช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยการย่อยของวันที่ 3 เกิดน้อยกว่าชุดควบคุมและประสิทธิภาพในการย่อยมีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุมในช่วงท้ายของการทดลอง นอกจากนี้ปริมาณไพรีนในสเลอรีไม่ปลอดเชื้อในวันที่ 3 ถึง 7 มีค่าน้อยกว่าในสเลอรีปลอดเชื้อแสดงว่าเชื้อที่ปนเปื้อนในดินสามารถย่อยไพรีนได้บ้าง

จากการทดลองผลกระทบด้านการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK พบว่า Brij 35 ไม่มีผลด้านลบต่อกลุ่มแบคทีเรีย STK และแบคทีเรียในดิน ซึ่งจำนวนแบคทีเรีย STK และแบคทีเรียในดินมีการเพิ่มจำนวนมากกว่าชุดที่ไม่มีการเติม Brij 35 สอดคล้องกับการทดลองของรุจา สารคุณ (2548) พบว่าเมื่อเติม Brij 35 การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK จะเพิ่มจำนวนมากกว่าชุดควบคุม

สำหรับสารลดแรงตึงผิวซีวภาพ (เซอร์แฟคติน) ที่อัตราส่วน 1:6 (กรัม/มล.) ที่ความเข้มข้นมากกว่าค่า ACMC 15 เท่า ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK พบว่าเซอร์แฟคตินไม่ช่วยให้เกิดการย่อยสลายไพรีน ทั้งในสเลอรีปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย

STK เพียงอย่างเดียว โดยพบว่าในวันที่ 3 ถึง วันที่ 7 ยังคงมีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ในดินมากกว่า ชุดควบคุม เช่นเดียวกับรายงานของรุจา สารคุณ, 2548 ที่พบว่าในวันสุดท้ายของการทดลองของ ชุดที่เติมเซอร์แฟคตินและ STK ปริมาณไพรีนเหลือ 18.81% ซึ่งมากกว่าชุดที่เติม STK เพียงอย่างเดียว ซึ่งมีไพรีน 1.99% เป็นไปได้ว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK มีการปรับตัวและสามารถใช้เซอร์แฟคติน และสารอาหารที่มีอยู่ในดินเป็นแหล่งพลังงาน และคาร์บอนก่อนการใช้ PAHs (Marcoux และ คณะ, 2000; Maslin และ Maier, 2000)

ผลจากการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ในช่วงวันที่ 3, 5 และ 7 พบว่าไม่ช่วยเพิ่มการย่อยสลายไพรีน โดยให้ผลการย่อยสลายใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียว โดยเฉพาะเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ให้มากขึ้นกลับพบว่าไม่สามารถเพิ่มอัตราการย่อยสลายไพรีนได้ ทั้งในสเลอริพลอดเชื้อและไม่พลอดเชื้อ ซึ่งอัตราการสลายไพรีนในสเลอริไม่พลอดเชื้อมีมากกว่าในสเลอริพลอดเชื้อ อย่างไรก็ตาม ค่าที่ได้มีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย

จากสมบัติของสาร PAHs ที่มีความสามารถละลายน้ำได้น้อย ทำให้จุลินทรีย์เข้าไปสัมผัสและนำสาร PAHs มาใช้ในการเจริญได้ยาก ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการบำบัดสารนี้ในดิน ดังนั้นการเติมสารลดแรงตึงผิวสามารถเพิ่มการละลายของสาร PAHs ในน้ำ ส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ง่ายขึ้น และทำให้มีอัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้น (Guerin และ Jones, 1988a, 1988b; Arostein และ Alexander, 1993; Tiehm, 1994; Jimenez และ Bartha, 1996; Cuny และคณะ, 1999; Van Hamme และ Ward, 1999)

ผลการติดตามพลวัตประชากรกลุ่มแบคทีเรียที่อยู่ในสเลอริดินไม่พลอดเชื้อที่ปนเปื้อนสารไพรีน โดยใช้เทคนิค DGGE พบว่าโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในดินมีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE น้อย (รูปที่ 4.14) จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าแบคทีเรียในดินอย่างเดียวแทบจะไม่มีส่วนช่วยในการสลายไพรีนหรือมีส่วนช่วยในการย่อยได้เพียงเล็กน้อย โดยแถบดีเอ็นเอที่เห็นชัดและสามารถพบได้ตลอดการทดลองนั้นน่าเป็นผลมาจากแบคทีเรียใช้สารอาหารที่มีอยู่ในดินเป็นแหล่งพลังงาน และคาร์บอนแทนการใช้ PAHs (Marcoux และคณะ, 2000; Maslin และ Maier, 2000) และในช่วงท้ายของการทดลองพบแถบดีเอ็นเอชนิดใหม่โดดเด่นขึ้นมาอีกครั้ง แสดงว่าอาจมีแบคทีเรียบางชนิดปรับตัวเพื่อให้เคยชินกับสารพิษในดินได้

การเตรียมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพื่อนำไปใช้ในการบำบัดไพรีนในระบบสเลอริ โดยใช้เทคนิค DGGE พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก มีแถบดีเอ็นเอที่เห็นเด่นชัด 3 แถบด้วยกัน ซึ่งตรงกับที่ ทิมากร แสงดำ (2547) ได้รายงานการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย STK จากโคมะขาม ว่าประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 ชนิด เมื่อติดตามพลวัตประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ในช่วงของการบำบัด โดยอาศัย DGGE โปรไฟล์ของ

แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวน 16S DNA จากผลการทดลองตรวจสอบการย่อยสลายไฟรีน พิสูจน์ให้เห็นว่า กลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถย่อยสลายสารไฟรีนที่ปนเปื้อนในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด และเมื่อติดตามพลวัตรประชากรของแบคทีเรียในดินที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ลงไปในช่วงเวลาของการบำบัดด้วยเทคนิค DGGE พบว่าโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในชุดการทดลองมีความหลากหลายมากขึ้น โดยพบทั้งแถบดีเอ็นเอจากกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เติมลงไปและแถบดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่มีอยู่ในดิน จากผลของ DGGE จะเห็นว่าวันที่ 3, 5 และ 7 ของการทดลองมีแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับแถบดีเอ็นเอจากกลุ่มแบคทีเรีย STK โดดเด่นที่สุดคือแถบดีเอ็นเอที่ 1, 2 และ 4 ตามลำดับ โดยเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่ 2 ซึ่งมีความโดดเด่นมากที่สุด (รูปที่ 4.16) ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลตรวจสอบการย่อยสลายไฟรีน โดยพบว่าวันที่ 3 ของการทดลองมีอัตราการสลายสารไฟรีนเกิดขึ้นมากที่สุดด้วย และปริมาณไฟรีนจะหมดได้ภายในวันที่ 5 และ 7 ในช่วงของการบำบัดสามารถพบแถบดีเอ็นเอที่ 3 และ 5 ซึ่งตรงกับแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียในดิน จากผลการทดลองตรวจสอบการย่อยสลายไฟรีนโดยแบคทีเรียในดิน แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในดินช่วยให้เกิดการสลายไฟรีนในดินปนเปื้อนเพียงเล็กน้อย และแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียในดินที่โดดเด่นในช่วงของการทดลองนั้นน่าเป็นผลมาจากแบคทีเรียใช้อาหารที่มีในดินเพื่อการเจริญ และในช่วงต้นและท้ายของการทดลองพบแถบดีเอ็นเอที่ 5 โดดเด่นขึ้นมาเป็นบางวัน แสดงว่าอาจมีแบคทีเรียบางชนิดปรับตัวเพื่อให้เคยชินกับสารพิษในดินได้

จากนั้นได้นำกลุ่มแบคทีเรีย STK ผสมกับ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 เพื่อนำไปใช้ในการบำบัดไฟรีนในดินในสถานะสเลอรีในช่วงเวลาของการทดลอง โดยใช้เทคนิค DGGE พบว่าสามารถพบแถบดีเอ็นเอที่เห็นเด่นชัด 3 แถบที่ตรงกับกลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถพบได้จนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยเฉพาะในวันที่ 3, 5 และ 7 ของการทดลอง พบว่าแถบดีเอ็นเอมีความโดดเด่นมากที่สุดโดยเฉพาะอย่างยิ่งแถบดีเอ็นเอที่ 4 มีความโดดเด่นมากที่สุด รองลงมาคือแถบดีเอ็นเอที่ 3 และแถบดีเอ็นเอที่ 1 จางที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าแถบดีเอ็นเอที่ 4 นอกจากจะตรงกับแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK แล้วยังพบว่าแถบดีเอ็นเอนี้ยังตรงกับแถบดีเอ็นเอของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 (รูปที่ 4.18) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก วิธี DGGE ที่ใช้พอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40 – 70% denaturant อาจไม่เหมาะสมในการแยกแถบดีเอ็นเอของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 และแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK ออกจากกันได้อย่างชัดเจน เนื่องจากเปอร์เซ็นต์ของพอลิอะคริลาไมด์เจลที่ใช้อาจกว้างเกินไป ดังนั้นควรปรับเปอร์เซ็นต์ของพอลิอะคริลาไมด์ให้แคบลงอาจช่วยในการแยกแถบดีเอ็นเอได้ดีขึ้น

จากผลการทดลองตรวจสอบการย่อยสลายไฟรีน ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น พิสูจน์ให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียวสามารถย่อยสลายไฟรีนที่ปนเปื้อนในสเลอรีของชุดการทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยในวันที่ 3 และ 7 ของการทดลองมีปริมาณไฟรีน

เหลืออยู่ 1.93% และ 0.55% ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเติม *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 (ปริมาณแบคทีเรีย 10^7 CFU/มล.) อย่างเดียว ไม่สามารถย่อยสลายไพรีนที่ปนเปื้อนในสเลอรี่ได้ และเมื่อติดตามพลวัตประชากรของแบคทีเรียในดินที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK และ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ต่อการย่อยสลายไพรีน พบว่าสามารถพบแถบดีเอ็นเอจากกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เติมลงไปได้อย่างชัดเจน สอดคล้องกับผลตรวจสอบการย่อยสลายไพรีน โดยพบว่าวันที่ 3 มีอัตราการสลายเกิดขึ้นมากที่สุดด้วย สำหรับแถบดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่มีอยู่ในดิน และแถบดีเอ็นเอจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ไม่สามารถเห็นได้อย่างชัดเจน ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK คือกลุ่มประชากรหลัก ซึ่งน่าจะเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน โดยแบคทีเรียในดินและ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 แทบจะไม่มีส่วนช่วยในการสลายไพรีนที่ปนเปื้อนในดินได้

ในงานวิจัยนี้จึงเป็นแนวทางเบื้องต้นสำหรับศึกษาการใช้แบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิว รวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถอยู่รอดได้ในบริเวณดินที่ปนเปื้อนและไม่ทำให้สูญเสียความสามารถในการย่อยสลายสารพิษไป และการนำเทคนิค PCR-DGGE เข้ามาช่วย ทำให้ทราบถึงแนวโน้มจำนวนและความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารไพรีน เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ และเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดสาร PAHs ในดินได้ต่อไปในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กรมควบคุมมลพิษ. 2542. รายงานสถานการณ์สิ่งแวดล้อม พ.ศ.2542. กรุงเทพมหานคร. ที่พรีนติ้ง กรุ๊ป.
- กรมควบคุมมลพิษ. 2548. ของเสียอันตราย. สรุปสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย พ.ศ. 2548. กรุงเทพมหานคร. ที่พรีนติ้ง กรุ๊ป.
- ทิมากร แสงดำ. 2547. การแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีสมบัติในการเกาะติดและย่อยสลายไพรีนจากปุ๋ยหมักใบพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นภดล สว่างนาวิน, เรือเอก. 2547. ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทรายทะเลที่ปนเปื้อนคราบน้ำมัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิรันดร์ รุ่งสว่าง. 2542. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK1. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รุจา สารคุณ. 2548. ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนในดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Ambrosoli, R., Petruzzelli, L., Minati, J.L., and Marsan, F. A. 2005. Anaerobic PAH degradation in soil by a mixed bacterial consortium under denitrifying conditions. Chemosphere. 60:1231-1236.
- Andreoni, V., Cavalca, L., Rao, M. A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Dell'Amico, E., Colombo, M., and Gianfreda, L. 2004. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. Chemosphere. 57:401-412.

- Arostein, B. N., and Alexander, M. 1993. Effect of a non-ionic surfactant added to the soil surface on the biodegradation of aromatic hydrocarbons within the soil. Appl. Environ. Microbiol. 39:386-390.
- Ashok, B. T. and Saxena, S. 1995. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons-a review. J. Sci. Ind. Res. 54:443-451.
- Atlas, M.R. 1991. Microbial hydrocarbon degradation : Bioremediation of oil spills. J. Chem. Tech. Biotechnol. 52:149-156.
- Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidan, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. 1999. Current Protocols in Molecular Biology. 4th ed. John Wiley & Sons, New York.
- Banat, I. M. 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation. Bioresour. Technol. 51:1-12.
- Bastean, 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. Appl. Environ. Microbiol. 66(5): 1834-1843.
- Baver, J. E., and Capone, D. G. 1988. Effect of co-occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries. Appl. Environ. Microbiol. 54:1649-1655.
- Blumer, M. 1976. Polycyclic aromatic compounds in nature. Sci. Am. 234(3):34-45.
- Boldrin, B., Tiehm, A., and Fritzsche, C. 1993. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene and pyrene by a *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 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 fungal-bacterial cocultures. Appl. Environ. Microbiol. 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. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:156-164.

- Brinch, U. C., Ekelund, F., and Jacobsen, C. S. 2002. Method for spiking soil sample with organic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 68:1808-1816.
- Bugg, T., Foght, J. M., Pickard, M. A., and Gray, M. R. 2000. Uptake and active efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* LP6a. Appl. Environ. Microbiol. 66:5387-5392.
- Carmichael, L. M., and Pfaender, F. K. 1997. The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. Biodegradation 8:1-13.
- Catherine, N. M. 2005. Environmental applications for biosurfactants. Environ. Pollut. 133:183-198.
- Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3:351-368.
- Cerniglia, C. E. 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Curr. Opin. Biotechnol. 4:331-338.
- Cheng, K. Y., and Wong, J. W. C. 2006. Combined effect of nonionic surfactant Tween 80 and DOM on the behaviors of PAHs in soil-water system. Chemosphere. 62 (11):1907-1916.
- Chin, Y-P., Aiken, G. R., and Danielsen, K. M. 1997. Binding of pyrene to aquatic and commercial humic substances: The role of molecular weight and aromatic. Environ. Sci. Technol. 31:1630-1635.
- Cindy, H., Nakatsu, Vigdis, T., and Lise, O. 2000. Soil Community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. Soil Sci. Society of America J. 64:1382-1388.
- Clint, J. H. 1992. Micelle formation. Surfactant aggregation, pp. 82-129. New York: Chapman and Hall.
- Cooper, D.G., and Zajic, J. E. 1980. Surface active compounds from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26:229-256.
- Cuny, P., Faucet, J., Acquaviva, M., Bertrand, J.-C., and Gilewicz, M. 1999. Enhanced biodegradation of phenanthrene by a marine bacterium in the presence of a synthetic surfactant. Lett. Appl. Microbiol. 29:242-245.
- Danyue, J., Xia, J., Xin, J., and Ziqing, O. 2007. Effects of concentration, head group,

- and structure of surfactants on the degradation of phenanthrene. J. Hazardous Materials. 144:215-221.
- 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. Biotechnol. Lett. 25:1441-1444.
- Dean-Ross, D., and Cerniglia, C. E. 1996. Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46:307-312.
- Deschênes, L., Lafrance, P., Villeneuve, J. -P., and Samson, R. 1996. Adding SDS and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants inhibits PAH biodegradation in a weathered creosote-contaminated soil. Appl. Environ. Microbiol. 46:368-646.
- Dipple, A., Cheng, S.C., and Bigger, C.A.H. 1990. Polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens. In: Pariza, M.W., Aeschbacher, H.U., Felton, J.S. and Sato, S. (Eds) Mutagens and Carcinogens in the Diet, pp. 109-127.
- Doick, K. J., and Semple, K. T. 2003. The effect of soil:water ratios on the mineralization of phenanthrene: LNAPL mixtures in soil. FEMS Microbiol. Lett. 220:29-33.
- Duvnjak, Z., Cooper, D. G., and Kosaric, N. 1982. Production of surfactant by *Arthrobacter paraffineus* ATCC19558. Biotechnol. Bioeng. 24:165-175.
- Emeritus. 2001. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. Food Technol. Biotechnol. 39(4):295-304.
- Fu, M. H., and Alexander, M. 1995. Use of surfactants and slurring to enhance the biodegradation in soil of compounds initially dissolved in nonaqueous-phase liquids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:551-558.
- Gauthier, E., Déziel, E., Villemur, R., Juteu, 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. J. Appl. Microbiol. 94:301-311.
- Geiselbrecht, A. D., Hedlund, B. P., Tichi, M. A., and Stanley, J. T. 1998. Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH)-degrading *Cycloclasticus* strains from the Gulf of Mexico and comparison other PAH degradation ability with that of Puget Sound *Cycloclasticus* strains. Appl. Environ. Microbiol. 64:4703-4710.

- Gibson, D. T., and Subramanian, V. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: Gibson, D. T. (Ed.). Microbial Degradation of Organic Compounds. Marcel Dekker, New York, pp. 181-252.
- Guerin, W. F., and Jones, G. E. 1988a. Two-stage mineralization of phenanthrene by estuarine enrichment cultures. Appl. Environ. Microbiol. 54:929-936.
- Guerin, W. F., and Jones, G. E. 1988b. Mineralization of phenanthrene by *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 54:937-944.
- Guo, C.L., Zhou, H.W., Wong, Y.S., and Tam, N.F.T. 2005. Isolation of PAHs degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. Marine Pollut. Bull. 51:1054-1061.
- Haigh, S. D. 1996. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. Sci. Environ. 185:161-170.
- Hesham, A. E. L., Sardar, K., Lin, X., Zhang, Y., Wang, Z., and Yang, M. 2006. Application of PCR-DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil. Centre National De La Recherche Scientific. 23:879-887.
- Hupe, K., Koning, M., Luth, J.-C., Heerenklage, J., and Stegmann, R. 2001. Optimisation of microbial soil treatment. In: R. Stegmann, G. Brunner, W. Calmono and G. Matz, (eds.), Treatment of contaminated soil, pp. 342-353. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- IARC (International agency for research on cancer). 1983. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 32:431-445.
- Iwata, K., Inui, N., and Takeuchi, T. 1981. Induction of active melanocytes in mouse skin by skin carcinogens: A new method for the detection of skin carcinogens. Carcinogenesis. 2:589-594.
- Jimenez, I. Y., and Bartha, R. 1996. Solvent-augmented mineralization of pyrene by a *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 62(7):2311-2316.
- Juhasz, A. L., Britz, M. L., and Stanley, G. A. 2000. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. Lett. Appl. Microbiol. 30:396-401.

- Kanally, R. A., and Harayama, S. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. Bacteriol. J. 182:2059-2097.
- Kanally, R. A., Harayama, S., and Watanabe, K. 2002. *Rhodanobacter* sp. strain BPC1 in a benzo[a]pyrene-mineralizing bacterial consortium. Appl. Environ. Microbiol. 68(12):5826–5833.
- 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). Appl. Microbiol. Biotechnol. 41:267-273.
- Kästner, M., Lotte, S., Herrenklage, J., Breuer-Jammali, M., Stegmana, R., and Mahro, B. 1995. Fate of C-label anthracene and hexadecane in compost manured soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:1128-1135.
- Kawai, M., Matsutera, E., Kanda, H., Yamaguchi, N., Tani, K., and Nasu, M. 2002. 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing process by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 68:699-700.
- Labare, M. P., and Alexander, M. 1995. Enhanced mineralization of organic compounds in non-aqueous phase liquids. Environ. Toxicol. Chem. 14:257-265.
- Lang, S. 2002. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). Curr. Opin. Coll. Interface. Sci. 7:12-20.
- Lee, S. 1995. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. US Patent 5,427,944.
- Lee, P.H., Ong, S.K., Golchin, J., and Nelson, G.L. 2001. Use of solvents to enhance PAH biodegradation of coal tar-contaminated soils. Water Res. 35(16):3941-3949.
- Lin, T. C., Chang, F. H., Hsieh, J. H., Chao, H. R., and Chao, M. R. 2001. Environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and total suspended particulates in a Taiwanese temple. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 67:332-338.
- Lui, Z., Jacobson, A. M., and Luthy, R. G. 1995. Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant systems. Appl. Environ. Microbiol. 61(1):145-151.

- Madson, E. L. 1998. Epistemology of environmental microbiology. Environ. Sci. Technol. 32(4):429-439.
- Madsen, T., and Kristensen, P. 1997. Effects of bacterial inoculation and nonionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16(4):631-637.
- Marcoux, J., Deziel, E., Villemur, R., Lepine, F., Bisailon, J.-G., and Beaudet, R. 2000. Optimization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons' degradation in two-liquid-phase bioreactor. J. Appl. Microbiol. 88:655-662.
- Margesin, R., and Schinner, F. 1999. Biodegradation of diesel oil by cold-adapted microorganisms in presence of sodium dodecyl sulfate. Chemosphere. 38:3463-3472.
- Maslin, P., and Maier, R. M. 2000. Rhamnolipid-enhanced mineralization of phenanthrene by indigenous microbial populations in organic-metal co-contaminated soils. Bioremed. J. 4:295-308.
- Melcher, R. J., Apitz, S. E., and Hemmingsen, B. B. 2002. Impact of irradiation and polycyclic aromatic hydrocarbon spiking in microbial populations in marine sediment for future aging and biodegradability studies. Appl. Environ. Microbiol. 68(6):2858-2868.
- Miller, R. M., and Bartha, R. 1989. Evidence from liposome encapsulation for transport-limited microbial metabolism of solid alkanes. Appl. Environ. Microbiol. 55: 269-274.
- Mitchell, R. L., Burchett, M. D., Pulkownik, A., and McCluskey, L. 1988. Effects of environmentally hazardous chemicals on the emergence and early growth of selected Australian plants. Plant Soil. 112:195-199.
- Mueller, J.G., Chapman, P.J., Blattmann, B.O., and Pritchard, P.H. 1990a. Isolation and Characterization of a fluoranthene utilizing strain of *Pseudomonas paumobilis*. Appl. Environ. Microbiol. 56:1079-1086.
- Mueller, J.G., Chapman, P.J., and Pritchard, P.H. 1990b. Action of fluoranthene-utilising bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. Appl. Environ. Microbiol. 55:3085-3090.

- Nadarajah, N., Hamme, J. B. Pannu, J., Sungh, A., and Ward, O. 2002. Enhanced transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons using a combined Fenton's reagent, microbial treatment and surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 540-544.
- Nam, K., and Kukor, J. J. 2000. Combined ozonation and biodegradation for remediation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Biodegradation. 11:1-9.
- Neuhauser, E. F., Loehr, R. C., Malecki, M. R., Milligan, D. L., and Durkin, P. R. 1985. The toxicity of selected organic chemicals to the earthworm *Eisenia fetida*. J. Environ. Qual. 14:383-388.
- Niannian, J., Bo, P., Guizhong, W., Sanying, W., and Xuanxian, P. 2004. Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. J. Microbiological Methods. 57:409-413.
- Olivera, N.L., Commendatore, M.G., Moran, A.C., and Esteves, J.L. 2000. Biosurfactant enhanced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge wastes. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 25:70-73.
- Ortega-Calvo, J.J., and Alexander, M. 1994. Roles of bacterial attachment and spontaneous partitioning in the biodegradation of naphthalene initially present in non-aqueous-phase liquids. Appl. Environ. Microbiol. 60:2643-2646.
- Patnaik, P. 1992. A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances. pp. 429-445. New York: Van Nortrand Reinhold.
- Pattanasupong, A., Hiroyasunagase, N., Eiko, S., Yasuhisa, H., Kazumasa, H., Katsuji, T., Masao, N., and Kazuhisa M. 2004. Degradation of carbendazim and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by immobilized consortium on loofa sponge. J. Biosci. Bioengineer. 98:28 -33.
- Perfetti, G.A., Nyman, P.J., Fisher, S., Joe, F.L., and Diachenko, G.W. 1992. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in seafood by liquid chromatography with fluorescence detection. J. AOAC Int. 75:872-877.
- Pinto, L., and Moore, M. 2000. Release of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils by surfactant and remediation of this effluent by *Penicillium* sp. Environ. Toxicol. Chem. 19:1741-1748.

- Poeton, T. Stensel, H., and Strand, S. 1999. Biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by marine bacteria: Effects of solid phase on degradation kinetics. Water. Res. 33:868-880.
- Pothuluri, J.V., Heflich, R.H., Fu, P.P., and Cerniglia, C.E. 1992. Fungal metabolism and detoxification of fluoranthene. Appl. Environ. Microbiol. 58:937-941.
- Reyes, C., Sigman, M. E., Arce, R., Barbas, J. T., and Dabestani, R. 1998. Photochemistry of acenaphthene at a silica gel/air interface. J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. 122:277-283.
- Ridgeway, H. F., Safarik, J., Phipps, D., Carl, P., and Clark, D. 1990 Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. Appl. Environ. Microbiol. 56:3565-3575.
- Rosenberg, E., and Ron, E. Z. 1999. High and low-molecular-mass microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52:154-162.
- Rosenberg, M., and Rosenberg, E. 1981. Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. J. Bacteriol. 148:51-57.
- Ruberto, L. A. M., Vazquez, S. C., Curtosi, A., Mestre, M. C., Pelletier, E. , and Mac Cormack, W. P. 2006. Phenanthrene biodegradation in soils using an antarctic bacterial consortium. Bioremediation J. 10(4):191-201.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 3rd edition. Cold spring harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saxton, W.L., Newton, R.T., Rorberg, J., Sutton, J., and Johnson, L.E. 1993. Polycyclic aromatic hydrocarbons in seafood from the Gulf of Alaska following a major crude oil spill. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 51:515-522.
- Sei, K., Asono, 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 J. Water Treatment Bio. 36:193-204.
- Sofia, J., Ylva, P., Sofia, F., Bert van, B., Staffan, L., Peter, H., and Mats, T. 2007. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in contaminated soils by Fenton's reagent: A multivariate evaluation of the importance of soil characteristics and PAH properties. J. of Hazardous Materials. 149(1):86-96

- Spehar, R. L., Poucher, S., Brooke, L. T., Hansen, D. J., Champlin, D., and Cox, D. A. 1999. Comparative toxicity of fluoranthene to freshwater and saltwater species under fluorescent and ultraviolet light. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 37:496-502.
- Straube, W. L., Nestler, C. C., Hansen, L. D., Ringleberg, D., Pritchard, P. J., and Jones-Meehan, J. 2003. Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulation and bioaugmentation. Acta Biotechnol. 2-3:179-196.
- Stringfellow, W., and Aitken, M. D. 1995. Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading *Pseudomonads*. Appl. Environ. Microbiol. 61:357-362.
- Sun, X., and Puri, R. K. 1997. Surfactant-enhanced solubility and mobility of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. Proceedings of the 12th Annual Conference on Hazardous Waste Research, pp. 140-157. USA.
- Tang, W., White, J., and Alexander, M. 1998. Utilization of sorbed compounds by microorganisms specifically isolated for that purpose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:117-121.
- Thakker, D.R., Yagi, H., Wood, A.W., Conney, A.H., and Jerina, D.M. 1985. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Metabolic activation to ultimate carcinogens. In: Anders, M.W. (Ed) Bioactivation of Foreign Compounds, pp. 177-242.
- Tiehm, A. 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. Appl. Environ. Microbiol. 60:258-263.
- Tiehm, A., Stieber, M., Werner, P., and Frimmel, F. H. 1997. Surfactant-enhanced mobilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant soil. Environ. Sci. Technol. 31:2570-2576.
- Trejo, M., and Quintero, R. 2000. Bioremediation of contaminated soil. In J. O. Eugenia, Sanchez Gloria, and H. Elizabeth, (Eds.). pp. 179-189. Environ. Biotechnol. Cleaner Bioprocess. London: Tayler and Francis Limited.
- Trzesicka – Mlynarz, D.T. and Ward, O.P. 1996. Degradation of fluoranthene in a soil matrix by indigenous and introduced bacteria. Biotechnol Lett. 18:181-186.

- United State Environmental Protection Agency (USEPA). 1979. Health effects. Health assessment document for polycyclic organic matter. pp. 232-248. Washington, D.C.:Office of Research and development, U.S. Environmental Protection Agency.
- Van Hamme, J. D., and Ward, O. P. 1999. Influence of chemical surfactants on the biodegradation of crude oil by a mixed bacterial culture. Can. J. Microbiol. 45: 130-137.
- Verschueren, K. 1997. Handbook of environmental data on organic chemicals. 596-599. New York: Thompson publishing.
- 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 Appl. Chem. 73(7):1163–1172.
- Vila, J., LÓpez, Z., Sabaté, J., MinguillÓn, 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. Appl. Environ. Microbiol. 67(12):5497-5505.
- Vipulanandan, C., and Ren, X. 2000. Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant. J. Environ. Engineer. 126:629-634.
- Walter, U., Beyer, M., Klein, J., and Rehm, H. J. 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp.UW1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34:671-676.
- Watanabe, K. 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. Curr. Opin. Biotechnol. 12:2637-2641
- West, C. C., and Harwell, J. H. 1992. Surfactants and subsurface remediation. Environ. Sci. Technol. 26:2324-2330.
- Wick, L. Y., de Munain, A. R., Springael, D., and Harms, H. 2002. Responses of *Mycobacterium* sp. LB501T to the low bioavailability of solid anthracene. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58:378-385.
- Wilson, S. C., and Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). Environ. Pollut. 81:229-249.
- Xia, S., Shi, Y., Fu, Y., and Ma, X. 2005. DGGE analysis of 16S rDNA of ammonia-oxidizing bacteria in chemical-biological flocculation and chemical coagulation

systems. Appl. Microbiol. Biotechnol. 69(1):99-105.

Yu, S.H., Ke, L., Wong, Y.S., and Tam, N.F.Y. 2005. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediment. Environ. International. 38:149–154.

Zhang, Y., and Miller, R. M. 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). Appl. Environ. Microbiol. 58:3276-3282.

Zhao, B., Zhu, L., Li, W., and Chen, B. 2005. Solubilization and biodegradation of phenanthrene in mixed anionic-nonionic surfactant solutions. Chemosphere. 58:33-40.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM)

ก.	แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
	ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	5.5	กรัม
	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม
ข.	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01	กรัม
	เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม
	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม

ซึ่งสารส่วน ก. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 จากนั้นนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายในส่วน ข. ที่เตรียมแยกแต่ละชนิดและทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ลงในอาหารที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM (CFMM agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเหลว CFMM ละลายผงวุ้น 15 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มล. ลงไปในสารละลายส่วน ก. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 ก่อนนำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้จนได้อุณหภูมิ 50-60 °ซ จึงเติมน้ำกลั่นในส่วน ข. ที่ปราศจากเชื้อแล้วก่อนนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

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

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.0 ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แต่ละลายผงวุ้น 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มล. ลงไปในอาหารก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

อาหารเหลวกำหนดสูตร (Define medium) 1 ลิตร

น้ำมันปาล์ม	20.0	มล.
แอมโมเนียมไนเตรท ($\text{NH}_4 \text{NO}_3$)	4.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.4	กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4)	0.5	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.53	มก.
คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.284	มก.
แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.71	มก.
โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.7	มก.
ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.9	มก.
เฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4.3	มก.
โคบอลต์คลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.1	มก.
อีดีทีเอ (EDTA)	200.0	มก.

แคลเซียม-แพนโททีเนต (Calcium Pantothenate)	1.176	มก.
ไบโอติน (Biotin)	5.88	ไมโครกรัม
กรดโฟลิก (Folic acid)	5.88	ไมโครกรัม
อินโนซิทอล (Inositol)	0.588	ไมโครกรัม
ไนอาซิน (Niacin)	1.176	ไมโครกรัม
กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (<i>p</i> -Aminobenzoic acid)	0.588	มก.
ไพโรดอกซิน-ไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine-HCl)	1.176	มก.
ไรโบฟลาวิน (Riboflavin)	0.588	มก.
ไทอามีน-ไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl)	1.176	มก.
ไดไฮเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	14.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 7.5 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน สำหรับสารละลายวิตามินได้แก่ แคลเซียม-แพนโททีเนต ไบโอติน กรดโฟลิก อินโนซิทอล ไนอาซิน กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก ไพโรดอกซิน-ไฮโดรคลอไรด์ ไรโบฟลาวิน ไทอามีน-ไฮโดรคลอไรด์ แต่ ละสารแยกกัน ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง

อาหารเหลว LB ดัดแปลงสำหรับ *Bacillus subtilis* BBK 1 1 ลิตร

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	2.0	กรัม
ซูโครส (Sucrose)	5.0	กรัมสารสกัด
จากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	30.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 7.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารละลาย PAHs ในไดเมทิลซัลฟอกไซด์

ชั่งไพลิน 0.1 กรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 1.0 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจน ผง PAHs ละลายหมด ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรู กว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เดิมลงใน อาหารเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

สารละลายมาตรฐานของ PAHs ในเฮกเซน

ชั่งไพลิน 0.1 กรัม ละลายสารมาตรฐานในเฮกเซนปริมาตร 10 มล. ผสมจนสารละลาย เป็นเนื้อเดียวกัน กรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บ รักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์ ปริมาณ PAHs ด้วยวิธี GC-FID

ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ GeneClean II Kit (Q-BIOgene ประเทศสหรัฐอเมริกา)

ประกอบด้วย

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

ก่อนใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลครั้งแรกให้เติม น้ำปลอดประจุ ปริมาตร 280 มิลลิลิตร และ เอทานอล 100% ปริมาตร 310 มิลลิลิตร ลงใน New Wash ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่ อุณหภูมิ $15-30^{\circ}\text{C}$ จนกว่าจะใช้ทำตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

สารละลาย 10% SDS

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

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. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

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

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

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. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

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. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

สารละลาย CTAB/NaCl (10%CTAB ใน 0.7 M NaCl)

CTAB	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.7	โมลาร์

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 °C ปริมาตร 80 มล. จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

High extraction buffer

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

สารละลายฟีนอล (phenol)

นำฟีนอลในรูปเกล็ดของแข็งมาหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 68 °C จากนั้นเติมผงไฮดรอกซีควิโนลีน ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% แล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 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 ลงไปอีกครึ่ง 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 °C ในขวดสีชาที่ปิดฝาแน่น

สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

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

สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

Loading dye

Bromphenolblue	0.025 %
ซูโครส	40 %

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

สารละลายไซเตียมอะซีเตท เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.2

ละลายไซเตียมอะซีเตท น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มล. นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มล. เติม

น้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

สารละลายโปรตีนเนสเค (proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

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

สารละลาย RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

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

70% เอทานอล

99% เอทานอล	700	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	300	มิลลิลิตร

อะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0%

อะกาโรสเจล	1	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มิลลิลิตร
หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน		

0% denaturing solution

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

80% denaturing solution

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

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10%

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

สารละลายไพรีนในไดเมทิลซัลฟอกไซด์

ชั่งไพรีน 0.05 กรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 1.0 มล. ผสมด้วยเครื่องผสมจนผลึก PAHs ละลายหมด ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เติมนลงในอาหารเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

สารละลายไพรีนในอะซีโตน

ชั่งไพรีน 25 มิลลิกรัม ละลายในอะซีโตนปริมาตร 50 มล. ผสมด้วยเครื่องผสมจนผลึก PAHs ละลายหมด กรองผ่านหัวกรองชนิด PTFE ขนาดรูกว้าง 0.2 ไมโครเมตร

หมายเหตุ ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ เนื่องจากอะซีโตนระเหยเร็วมาก และขณะเติมสาร PAHs ที่ละลายในอะซีโตนลงในดินควรทำอย่างรวดเร็วเพื่อไม่ให้อะซีโตนระเหยซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นเปลี่ยนแปลงได้

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

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

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. หนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที

สารละลาย Triton X-100 15%

Triton X-100	15	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	85	มล.

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงปริมาณไพรีนที่เหลือ (%) ในระบบสเลอรี

ตารางที่ ค.1 ปริมาณไพรีนที่เหลือ (%) ในชุดควบคุมปัจจัยทางกายภาพ ที่อัตราส่วนดิน:น้ำต่างๆ

อัตราส่วนดิน : น้ำ (ชุดควบคุม)	ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ (%)				
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
1 : 0	100.00	95.96	92.61	91.01	90.34
1 : 0.5	100.00	94.41	92.02	89.06	85.78
1 : 1	100.00	96.39	92.54	90.06	86.38
1 : 2	100.00	98.00	95.12	92.90	90.31
1 : 4	100.00	96.39	94.11	93.42	90.72
1 : 6	100.00	98.91	96.51	95.02	88.47
1 : 8	100.00	97.09	95.49	93.07	87.28
1 : 10	100.00	93.94	96.29	87.43	81.90
1 : 12	100.00	95.21	91.55	89.77	86.86

ตารางที่ ค.2 ปริมาณไฟรินที่เหลือ (%) หลังบ่มร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่อัตราส่วนดิน:น้ำ
ต่างๆ

อัตราส่วนดิน :น้ำ	เติม STK	ปริมาณไฟรินที่เหลืออยู่ (%)				
		วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
1 : 0	+	100.00	94.90	89.74	86.74	85.41
1 : 0.5	+	100.00	94.30	81.47	76.70	67.37
1 : 1	+	100.00	93.88	21.12	11.56	2.69
1 : 2	+	100.00	92.04	9.42	1.89	0.87
1 : 4	+	100.00	78.57	1.84	0.64	0.61
1 : 6	+	100.00	64.92	1.46	0.90	0.42
1 : 8	+	100.00	68.94	2.09	0.65	0.49
1 : 10	+	100.00	75.84	2.95	2.40	0.55
1 : 12	+	100.00	79.60	1.36	1.04	0.59

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค.3 ปริมาณไพลินที่เหลือ (%) ในสเลอรี่ดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ความเร็วรอบต่างๆ

ปริมาณไพลินที่เหลืออยู่ (%)					
ตัวอย่างดิน	ความเร็ว 150 รอบ/นาที				
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
สเลอรี่ปลอดเชื้อ	100.00	98.74	97.19	95.19	92.43
สเลอรี่ไม่ปลอดเชื้อ	100.00	99.6	94.33	93.83	74.59
สเลอรี่ปลอดเชื้อ + STK	100.00	98.62	0.91	0.66	0.41
สเลอรี่ไม่ปลอดเชื้อ + STK	100.00	94.63	1.04	0.63	0.49
ตัวอย่างดิน	ความเร็ว 200 รอบ/นาที				
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
สเลอรี่ปลอดเชื้อ	100.00	101.46	101.29	96.54	92.06
สเลอรี่ไม่ปลอดเชื้อ	100.00	103.54	99.55	91.15	67.71
สเลอรี่ปลอดเชื้อ + STK	100.00	88.82	1.96	0.52	0.25
สเลอรี่ไม่ปลอดเชื้อ + STK	100.00	88.62	2.35	0.58	0.35
ตัวอย่างดิน	ความเร็ว 250 รอบ/นาที				
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
สเลอรี่ปลอดเชื้อ	100.00	98.48	97.73	97.58	85.36
สเลอรี่ไม่ปลอดเชื้อ	100.00	101.22	93.29	72.6	66.13
สเลอรี่ปลอดเชื้อ + STK	100.00	74.69	6.39	1.52	0.53
สเลอรี่ไม่ปลอดเชื้อ + STK	100.00	84.07	6.83	1.26	0.5

ตารางที่ ค.4 ปริมาณไฟรินที่เหลือ (%) ในสเลอริดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อเมื่อเติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

ตัวอย่างดิน (วัฏภาคดิน)	ปริมาณไฟรินที่เหลืออยู่ (%)				
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
สเลอริปลอดเชื้อ	100.00	101.46	101.29	96.54	92.06
สเลอริปลอดเชื้อ + Brij 35	91.74	94.16	90.80	89.41	85.06
สเลอริปลอดเชื้อ + STK	100.00	88.82	1.96	0.52	0.25
สเลอริปลอดเชื้อ + Brij 35 + STK	91.52	65.34	15.17	0.60	0.21
สเลอริไม่ปลอดเชื้อ	100.00	103.54	99.55	91.15	67.71
สเลอริไม่ปลอดเชื้อ + Brij 35	90.75	85.13	85.91	84.20	56.41
สเลอริไม่ปลอดเชื้อ + STK	100.00	88.62	2.35	0.58	0.35
สเลอริไม่ปลอดเชื้อ + Brij 35 + STK	90.84	59.66	12.96	0.43	0.15
ตัวอย่างดิน (วัฏภาคน้ำ)	ปริมาณไฟรินที่เหลืออยู่ (%)				
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
สเลอริปลอดเชื้อ	0	0	0	0	0
สเลอริปลอดเชื้อ + Brij 35	8.26	8.62	6.90	7.61	7.40
สเลอริปลอดเชื้อ + STK	0	0	0	0	0
สเลอริปลอดเชื้อ + Brij 35 + STK	8.48	7.28	3.64	0.00	0.00
สเลอริไม่ปลอดเชื้อ	0	0	0	0	0
สเลอริไม่ปลอดเชื้อ + Brij 35	9.25	8.29	6.89	6.35	5.90
สเลอริไม่ปลอดเชื้อ + STK	0	0	0	0	0
สเลอริไม่ปลอดเชื้อ + Brij 35 + STK	9.16	7.72	2.87	0.00	0.00

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค.5 ปริมาณไฟรินที่เหลือ (%) ในสเลอรี่ดินปลูกดเชื้อและไม่ปลูกดเชื้อเมื่อเติมเซอร์แฟคดินร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

ตัวอย่างดิน (วิภูภาคดิน)	ปริมาณไฟรินที่เหลืออยู่ (%)				
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
สเลอรี่ปลูกดเชื้อ	100.00	96.9	98.6	95.87	90.46
สเลอรี่ปลูกดเชื้อ + เซอร์แฟคดิน	100.00	97.26	95.14	93.51	91.54
สเลอรี่ปลูกดเชื้อ + STK	100.00	85.78	2.39	0.52	0.45
สเลอรี่ปลูกดเชื้อ + เซอร์แฟคดิน + STK	100.00	87.55	8.25	1.87	0.58
สเลอรี่ไม่ปลูกดเชื้อ	100.00	97.44	93.61	91.54	88.42
สเลอรี่ไม่ปลูกดเชื้อ + เซอร์แฟคดิน	100.00	95.21	96.38	92.36	89.36
สเลอรี่ไม่ปลูกดเชื้อ + STK	100.00	85.94	1.93	0.58	0.39
สเลอรี่ไม่ปลูกดเชื้อ + เซอร์แฟคดิน+STK	100.00	89.54	6.85	2.36	0.87
ตัวอย่างดิน (วิภูภาคน้ำ)	ปริมาณไฟรินที่เหลืออยู่ (%)				
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
สเลอรี่ปลูกดเชื้อ	0	0	0	0	0
สเลอรี่ปลูกดเชื้อ + เซอร์แฟคดิน	0	0	0	0	0
สเลอรี่ปลูกดเชื้อ + STK	0	0	0	0	0
สเลอรี่ปลูกดเชื้อ + เซอร์แฟคดิน + STK	0	0	0	0	0
สเลอรี่ไม่ปลูกดเชื้อ	0	0	0	0	0
สเลอรี่ไม่ปลูกดเชื้อ + เซอร์แฟคดิน	0	0	0	0	0
สเลอรี่ไม่ปลูกดเชื้อ + STK	0	0	0	0	0
สเลอรี่ไม่ปลูกดเชื้อ + เซอร์แฟคดิน+STK	0	0	0	0	0

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค.6 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ที่ความเข้มข้นเซลล์ต่างๆต่อการย่อยสลายไฟรีนในสเลอริดินปลดเชื้อที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK (แสดงปริมาณไฟรีนที่เหลือ (%))

ตัวอย่าง ดินปลดเชื้อ	BBK-1 ($X=10^7$ CFU/มล.)	STK	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
สเลอริ	-	-	100.00	99.99	99.60	94.01	90.46
สเลอริ	-	+	100.00	77.55	2.39	0.52	0.45
สเลอริ	1X	-	100.00	103.54	98.78	99.26	95.25
สเลอริ	5X	-	100.00	93.56	92.27	91.40	88.10
สเลอริ	10X	-	100.00	100.58	98.87	94.98	87.59
สเลอริ	15X	-	100.00	89.00	86.16	85.61	73.39
สเลอริ	20X	-	100.00	100.00	97.99	97.98	94.70
สเลอริ	1X	+	100.00	74.92	2.43	0.60	0.15
สเลอริ	5X	+	100.00	76.79	2.42	0.76	0.50
สเลอริ	10X	+	100.00	80.67	2.38	0.77	0.42
สเลอริ	15X	+	100.00	83.62	2.10	0.80	0.38
สเลอริ	20X	+	100.00	77.94	2.67	0.64	0.40

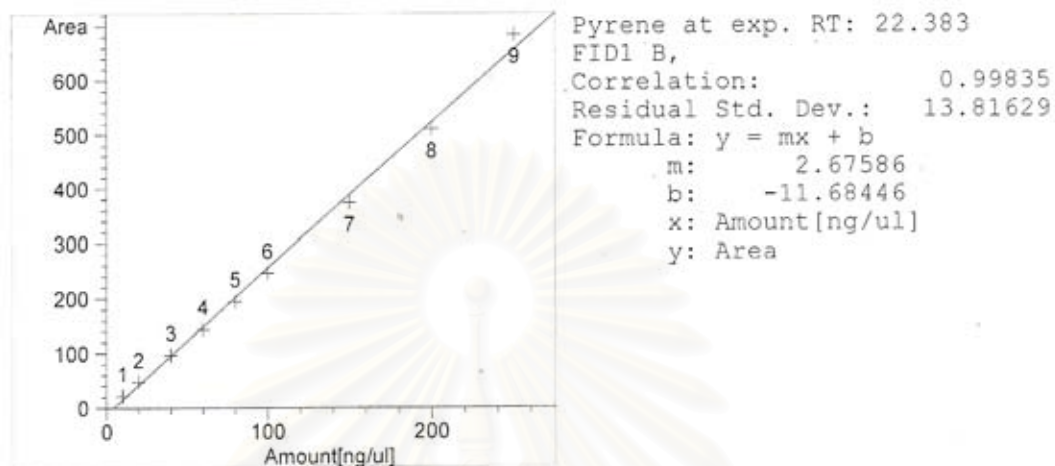
ตารางที่ ค.7 ผลของการเติม *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ที่ความเข้มข้นเซลล์ต่างๆต่อการย่อยสลายไฟรีนในสเลอริดินไม่ปลดเชื้อที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK (แสดงปริมาณไฟรีนที่เหลือ (%))

ตัวอย่าง ดินไม่ปลดเชื้อ	BBK-1 ($X=10^7$ CFU/มล.)	STK	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
สเลอริ	-	-	100.00	96.45	93.37	91.42	84.6
สเลอริ	-	+	100.00	80.34	1.93	0.87	0.55
สเลอริ	1X	-	100.00	99.95	97.76	97.65	95.11
สเลอริ	5X	-	100.00	95.35	93.73	84.13	78.19
สเลอริ	10X	-	100.00	96.54	94.93	92.95	86.68
สเลอริ	15X	-	100.00	97.27	94.81	90.81	89.55
สเลอริ	20X	-	100.00	99.00	97.99	97.39	96.47
สเลอริ	1X	+	100.00	82.87	1.33	0.68	0.39
สเลอริ	5X	+	100.00	81.52	1.19	1.12	0.43
สเลอริ	10X	+	100.00	81.48	1.94	0.75	0.35
สเลอริ	15X	+	100.00	80.88	1.49	0.64	0.41
สเลอริ	20X	+	100.00	94.15	2.16	1.17	1.14

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

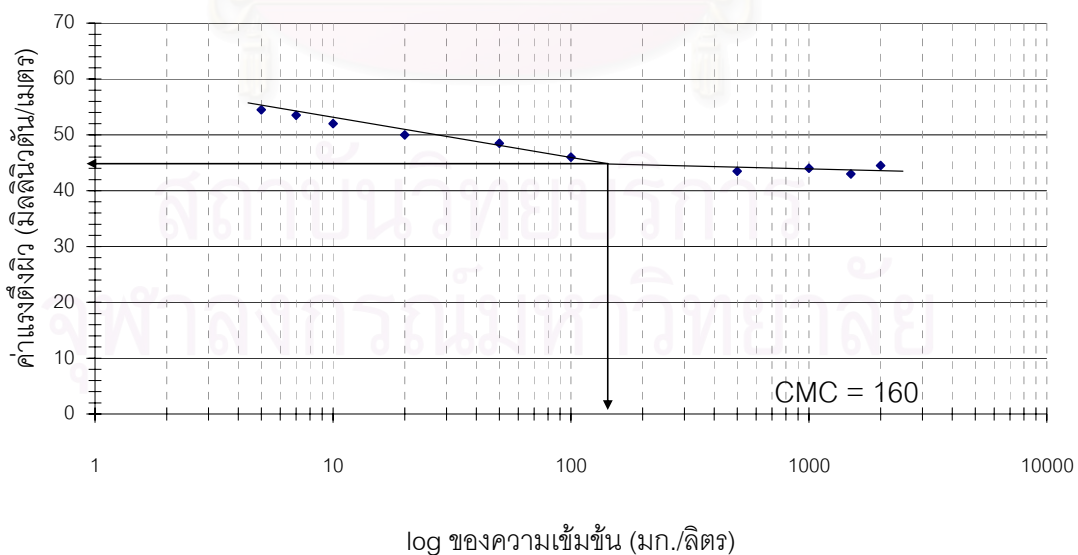
กราฟมาตรฐานไพรีน



รูปที่ ง.1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไพรีนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยGC-FID

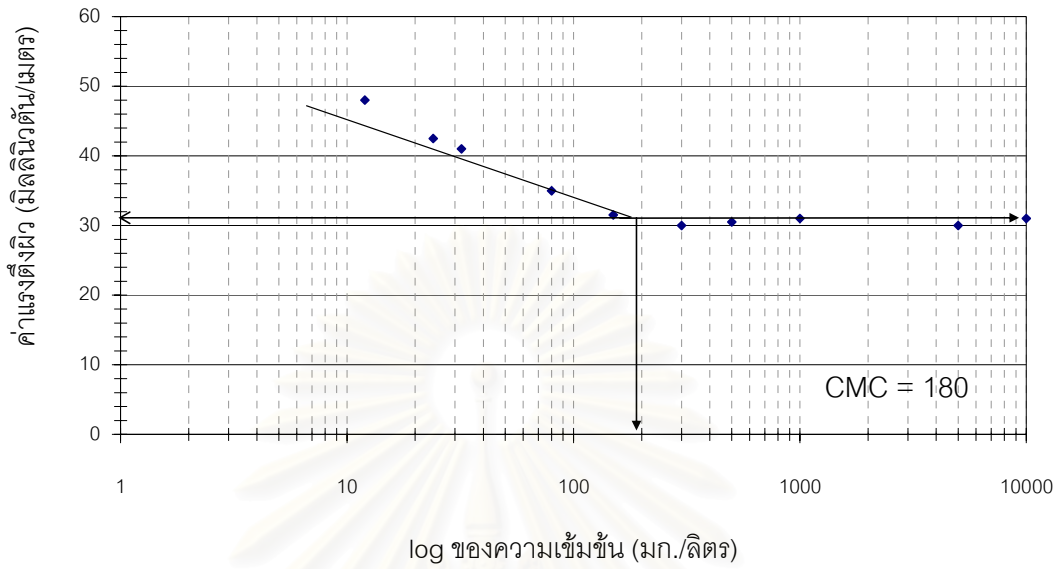
ภาคผนวก จ

Brij 35



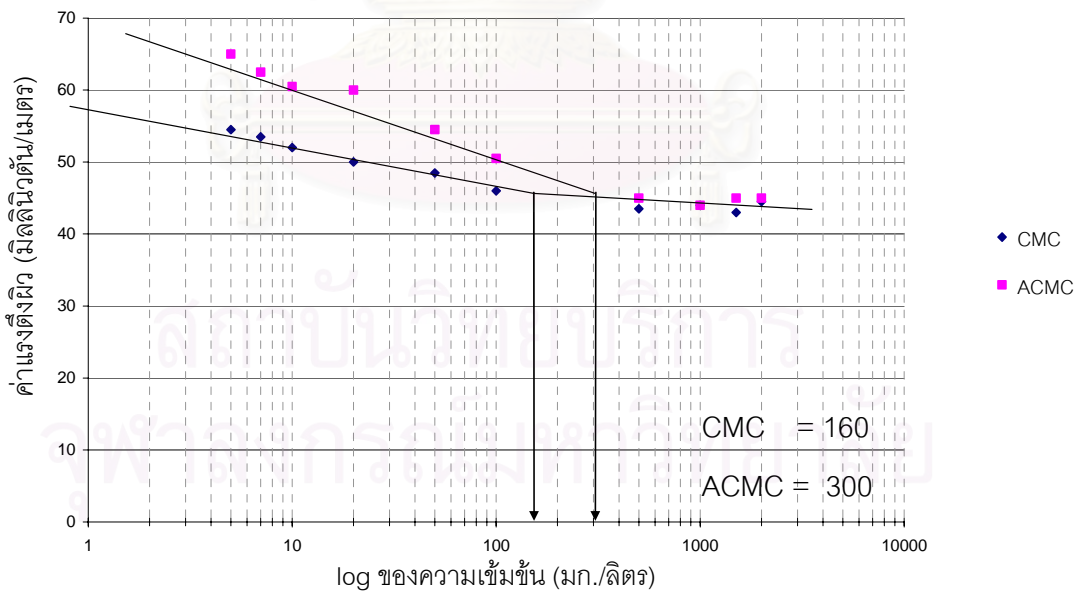
รูปที่ จ.1 แสดงค่า CMC สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Brij 35

เซอร์แฟคติน



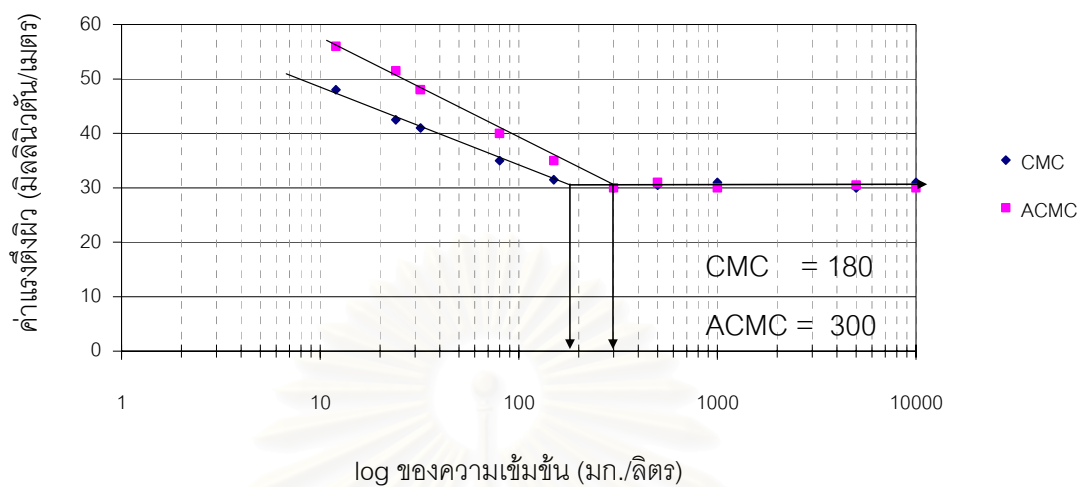
รูปที่ ๑.2 แสดงค่า CMC สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน

Brij 35



รูปที่ ๑.3 เปรียบเทียบค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Brij 35

เซอร์แฟคติน



รูปที่ ๑.4 เปรียบเทียบค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน

ภาคผนวก จ



รูปที่ จ.1 เครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (ring tensiometer)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกานต์รวี แก้วขาว เกิดเมื่อวันที่ 18 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2524 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2546 และศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย