

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของไบจามจรีและดินที่ใช้ในการทดลอง

ไบจามจรีที่นำมาใช้ในการทดลองนี้เก็บมาจากบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีลักษณะใบแห้งสีน้ำตาลที่ร่วงหล่นบนพื้นดิน ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของไบจามจรีที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ได้มาจาก ฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของไบจามจรีที่นำมาใช้ในการทดลอง

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

หมายเหตุ * วิเคราะห์โดยฝ่ายวิจัยดิน กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

** วิเคราะห์โดย ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดินที่ใช้ในการทดลองเก็บมาจากบริเวณเนินเขาในป่าเขาใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา เป็นลักษณะดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ ตรวจสอบ PAHs ในดินโดยการสกัดและวิเคราะห์ด้วยวิธี GC แล้วไม่พบว่ามีสารปนเปื้อนสารประกอบ PAHs

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

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดิน

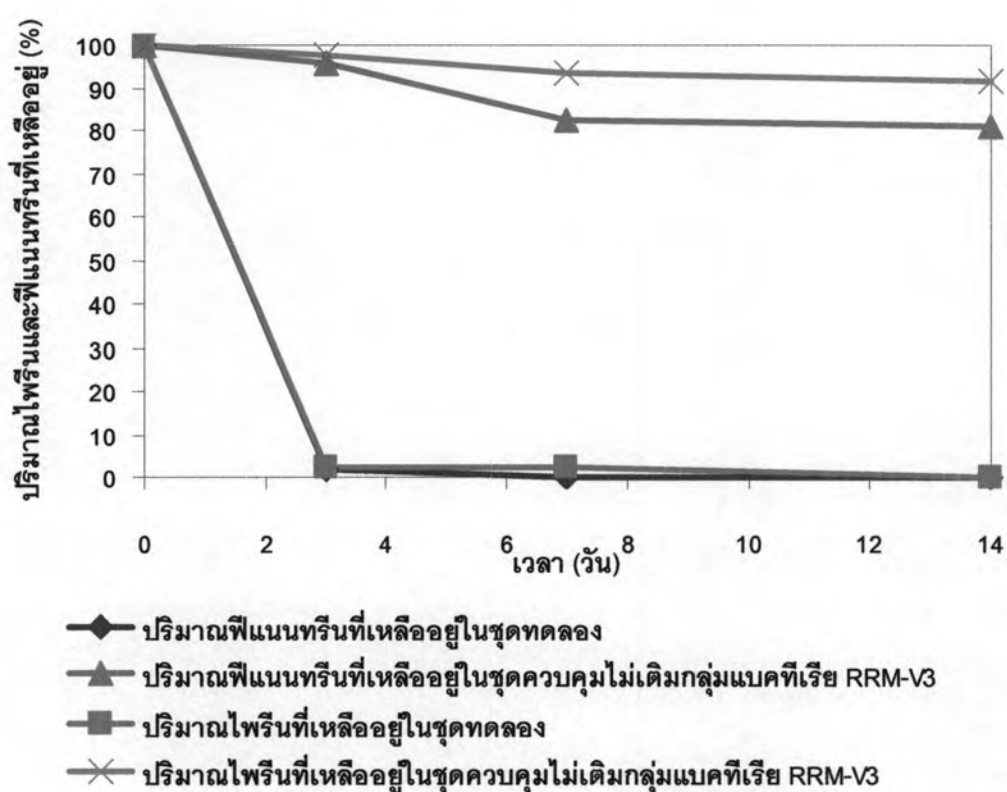
พารามิเตอร์	ผลการวิเคราะห์
ลักษณะดิน	ดินผสม
ค่าความเป็นกรด ต่าง	5.5*
ค่าความจุการอุ้มน้ำ (%)	75.48*
ปริมาณสารอินทรีย์ (%)	13.10**
ปริมาณคาร์บอน (%)	7.62**
ปริมาณไนโตรเจน (%)	0.43**
ปริมาณฟอสฟอรัส (%)	0.12**
ปริมาณโพแทสเซียม (%)	0.87**
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน	17.72**

หมายเหตุ * วิเคราะห์โดยฝ่ายวิจัยดิน กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

** วิเคราะห์โดย ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2 การย่อยสลายไฟรินและฟีแนนทรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM

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

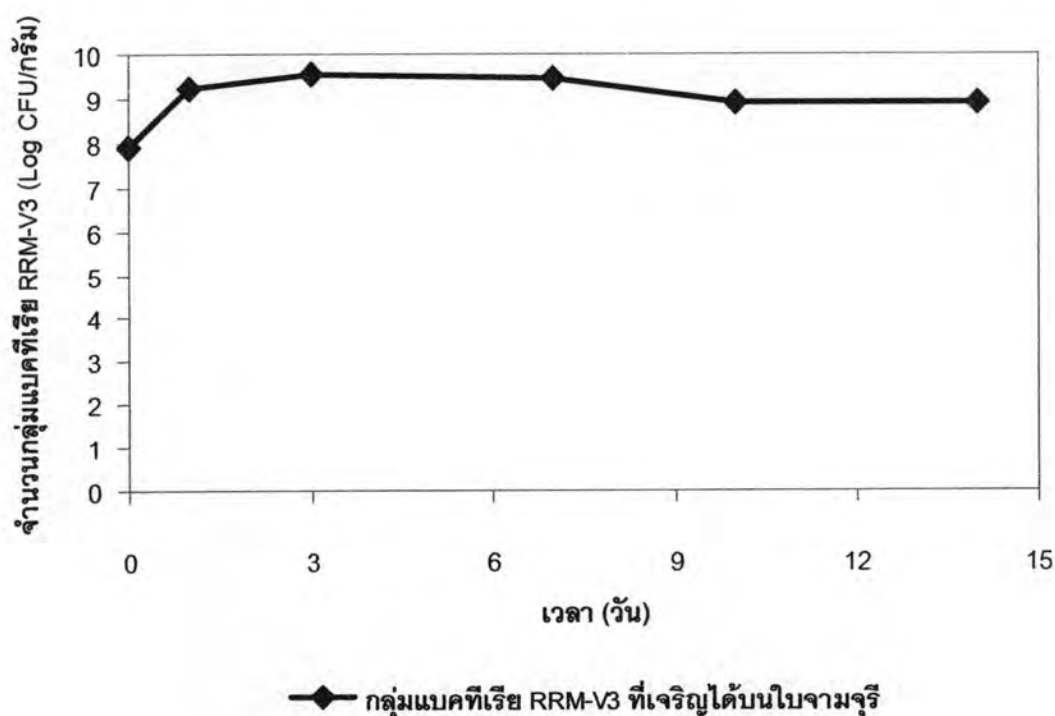


รูปที่ 4.1 การย่อยสลายไฟรินและฟีแนนทรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM

4.3 การเตรียมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนใบจามจุรีปลอดเชื้อ

นำใบจามจุรีปลอดเชื้อที่ปรับความชื้นและความเป็นกรดต่างแล้วมาผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ $8 \log \text{ CFU}$ ต่อกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างที่วันที่ 0, 1, 3, 7, 10, และ 14 เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่อยู่รอดได้ในใบจามจุรี บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB

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



รูปที่ 4.2 การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนใบจามจุรี

4.4 เปรียบเทียบการย่อยสลายไพรีนและพีแนนทรีนในดินโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมโดยวิธีต่างๆ

การเตรียมหัวเชื้อที่ใช้ในการทดลอง มี 3 ชนิด ดังนี้

- ก. หัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนใบจามจุรี
- ข. หัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในน้ำดิน
- ค. หัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM

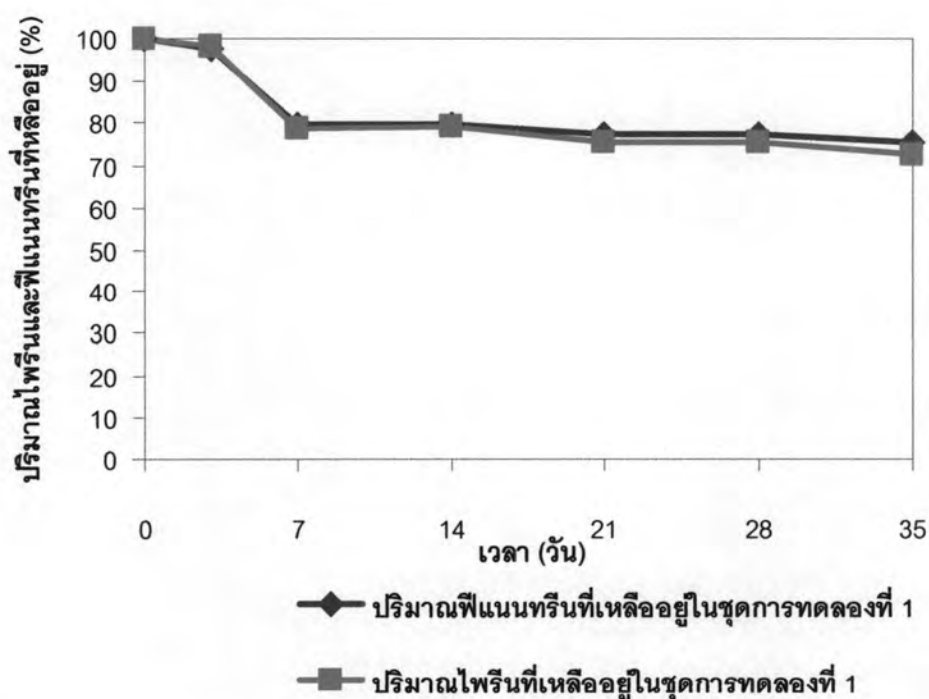
เปรียบเทียบการย่อยสลายไพรีนและพีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมโดยวิธีต่างๆ โดยแบ่งออกเป็น 7 ชุด ได้แก่

- ชุดการทดลองที่ 1 ดินปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและพีแนนทรีน เป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาการสลายของ PAHs เมื่อปราศจากปัจจัยทางชีวภาพจากดิน
- ชุดการทดลองที่ 2 ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและพีแนนทรีน เป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาการสลายของ PAHs เมื่อมีปัจจัยทางชีวภาพจากดิน
- ชุดการทดลองที่ 3 ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและพีแนนทรีน และใบจามจุรีปลอดเชื้อ เป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาผลของใบจามจุรีต่อจุลินทรีย์ในดินที่สามารถสลาย PAHs ได้
- ชุดการทดลองที่ 4 ดินปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและพีแนนทรีน และผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนใบจามจุรีปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาเฉพาะความสามารถของกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนใบจามจุรีต่อการย่อยสลายของ PAHs
- ชุดการทดลองที่ 5 ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและพีแนนทรีน และหัวเชื้อที่เตรียมบนใบจามจุรีตามข้อ ก.
- ชุดการทดลองที่ 6 ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและพีแนนทรีน และหัวเชื้อที่เตรียมในน้ำดินตามข้อ ข.
- ชุดการทดลองที่ 7 ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและพีแนนทรีน และหัวเชื้อที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ตามข้อ ค.

4.4.1 การสลายตัวของไพรีนและพีแนนทรินในดินปลอดเชื้อในชุดการทดลองที่ 1

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

ผลการทดลองพบว่า ปริมาณไพรีนและพีแนนทรินลดลงจากวันแรกจนในวันที่ 35 ของการทดลองตรวจพบปริมาณไพรีนและพีแนนทรินที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองเท่ากับ 72.51 และ 75.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.3) และตลอดการทดลองไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB



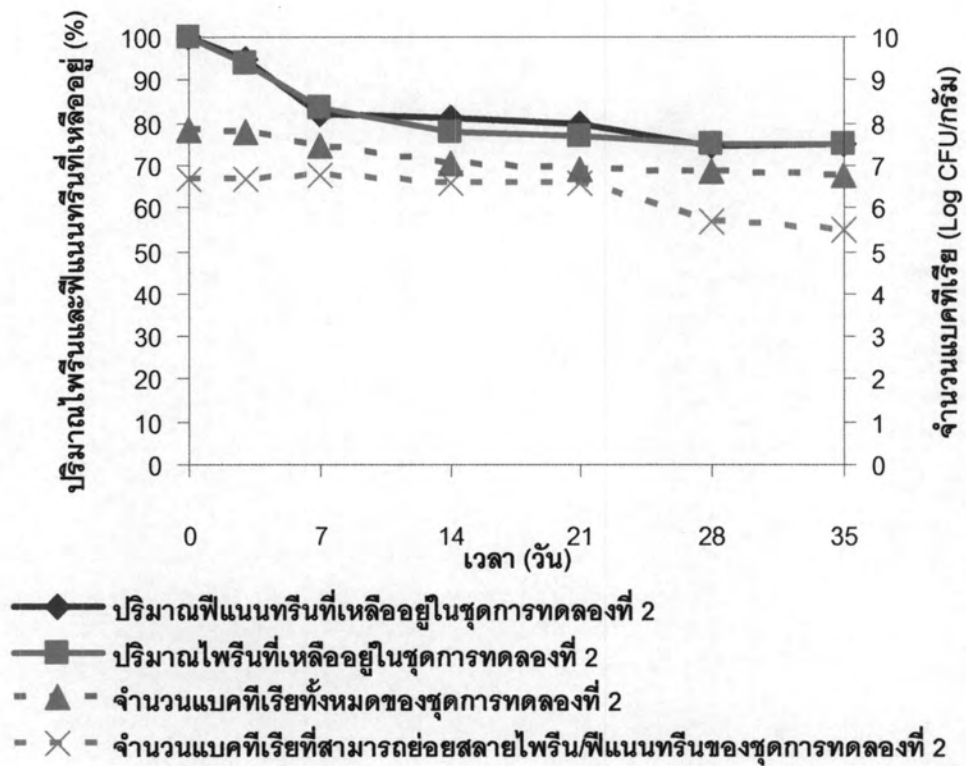
รูปที่ 4.3 ปริมาณไพรีนและพีแนนทรินที่เหลืออยู่ในดินปลอดเชื้อของชุดการทดลองที่ 1

4.4.2 การสลายตัวของไพรีนและพีแนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อในชุดการทดลองที่ 2

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

ผลการทดลองพบว่า ปริมาณไพรีนและพีแนทรีนลดลงจนในวันที่ 35 ของการทดลองตรวจพบปริมาณไพรีนและพีแนทรีนที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองเท่ากับ 74.97 และ 74.99 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในดิน วันที่ 0 มีค่าเท่ากับ 7.83 log CFU ต่อกรัม และจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/พีแนทรีน มีค่าเท่ากับ 6.69 log CFU ต่อกรัม จำนวนแบคทีเรียลดลงเรื่อยๆ จนถึงสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 35 จะมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 6.76 และจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/พีแนทรีน มีค่าเท่ากับ 5.5 log CFU ต่อกรัม (รูปที่ 4.3)

จะเห็นว่าปริมาณไพรีนและพีแนทรีนที่ลดลงนี้ไม่มีความแตกต่างกับชุดการทดลองในดินปลอดเชื้อ แสดงว่าปัจจัยทางชีวภาพในดินที่ใช้ในการทดลองน่าจะไม่มีผลต่อการสลายตัวของไพรีนและพีแนทรีนที่ปนเปื้อนในดิน



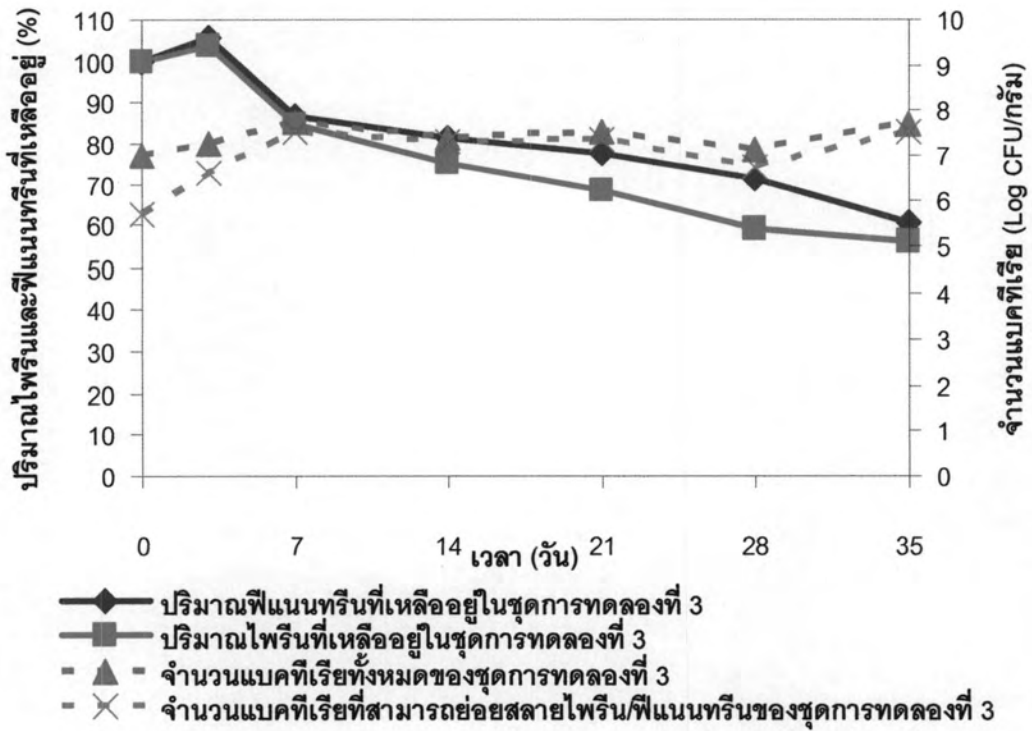
รูปที่ 4.4 ปริมาณไฟรีนและฟิแนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในดินไม่ปลอดเชื้อของชุดการทดลองที่ 2

4.4.3 การสลายตัวของไพรีนและพีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อที่เติมไบจามจุรีปลอดเชื้อในชุดการทดลองที่ 3

ชุดการทดลองที่ 3 ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและพีแนนทรีน และไบจามจุรีปลอดเชื้อ เพื่อศึกษาผลของไบจามจุรีต่อจุลินทรีย์ในดินที่สามารถสลายสารประกอบ PAHs ได้ ทำการทดลองโดยผสมดินไม่ปลอดเชื้อกับไบจามจุรีปลอดเชื้อที่ปรับความชื้นและความเป็นกรดต่างแล้ว จากนั้นนำไปผสมกับสารละลายไพรีนและพีแนนทรีนความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 0, 3, 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน

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

แสดงว่าไบจามจุรีที่เติมลงไปน่าจะมีผลให้แบคทีเรียในดินรวมทั้งแบคทีเรียในดินที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและพีแนนทรีน สามารถเจริญและใช้สารประกอบ PAHs ทั้ง 2 ชนิดได้ และไบจามจุรีทำให้ไพรีนและพีแนนทรีนถูกปล่อยออกมาจากดินมากขึ้นในวันที่ 3 ดังจะเห็นได้จากปริมาณไพรีนและพีแนนทรีนเหลืออยู่ มีมากกว่าในวันแรกของการทดลอง



รูปที่ 4.5 ปริมาณไฟรีนและพีแนนทรินที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในดินไม่ปลอดเชื้อที่เติมไบโຈามจรีปลอดเชื้อของชุดการทดลองที่ 3

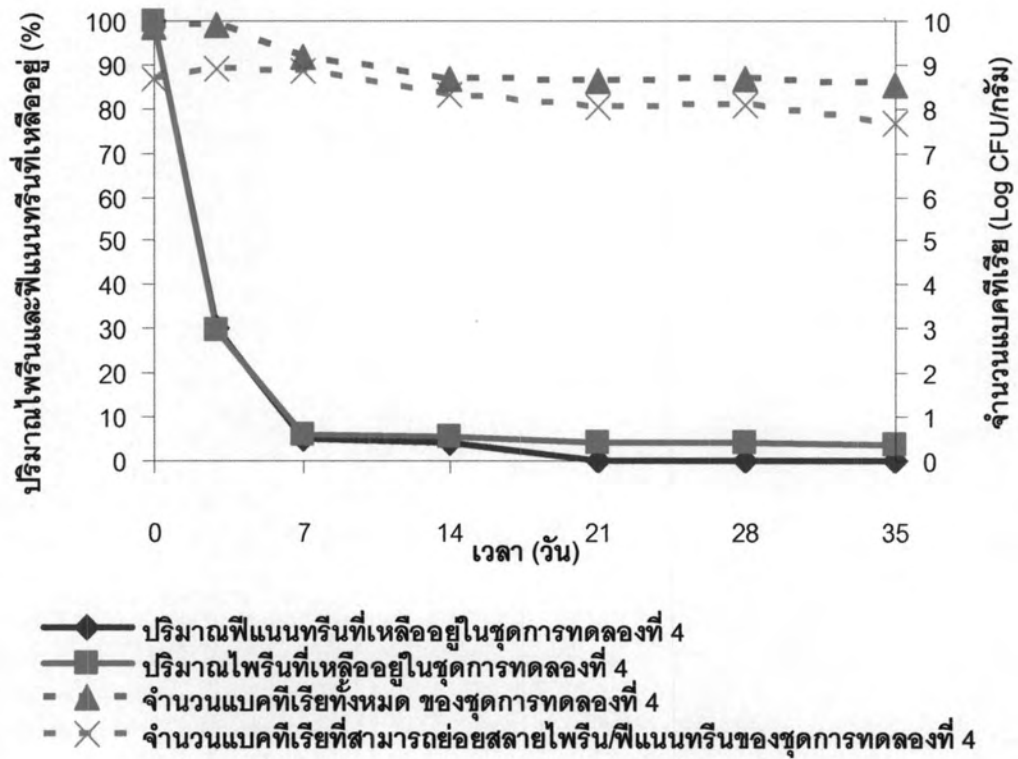
4.4.4 การสลายตัวของไพรีนและพีแนนทรีนในดินปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนไบโจามจุรีปลอดเชื้อ (ชุดการทดลองที่ 4)

ชุดการทดลองที่ 4 ใช้ดินปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและพีแนนทรีน และผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนไบโจามจุรีเป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาเฉพาะความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนไบโจามจุรีต่อการย่อยสลายของสารประกอบ PAHs ในดิน ทำการทดลองโดยใช้ดินปลอดเชื้อที่ปรับความชื้นและความเป็นกรดต่างแล้ว ผสมกับสารละลายไพรีนและพีแนนทรีน ความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. และผสมกับกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนไบโจามจุรีปลอดเชื้อมาแล้ว 3 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 0, 3, 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน

ผลการทดลอง พบว่า ปริมาณไพรีนและพีแนนทรีนลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 3 ของการทดลองมีปริมาณไพรีนและพีแนนทรีนที่เหลืออยู่เท่ากับ 29.59 และ 29.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และลดลงจนไพรีนเหลือเพียง 3.61 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 35 ในขณะที่ปริมาณพีแนนทรีนลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ในวันที่ 21 ของการทดลอง

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

แสดงว่าหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมในไบโจามจุรีเมื่อเติมในลงดินปนเปื้อนแล้ว จะรอดชีวิตได้และย่อยสลายไพรีนและพีแนนทรีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 4.6 ปริมาณไฟรีนและฟิแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในดินปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนไบจามจุรีปลอดเชื้อ (ชุดการทดลองที่ 4)

4.4.5 การสลายตัวของไพรีนและพีแนนทรินในดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนไบโจามจุรีปลอดเชื้อ (ชุดการทดลองที่ 5)

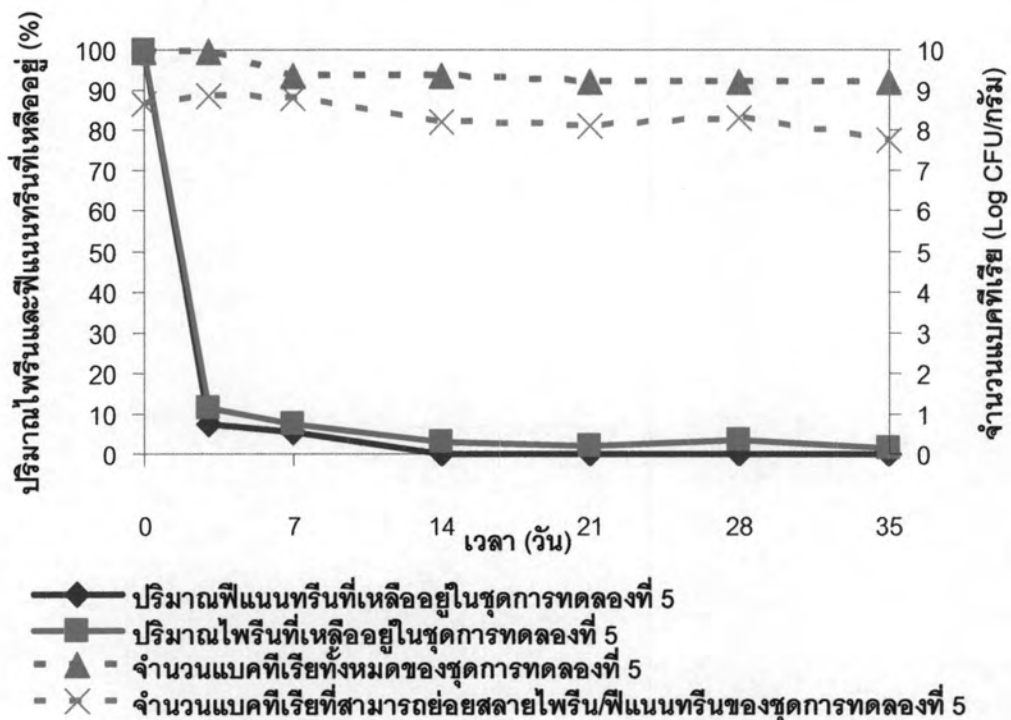
ชุดการทดลองที่ 5 ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและพีแนนทริน และผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนไบโจามจุรี เพื่อศึกษาการรอดชีวิตและความสามารถในการย่อยสลายสารพิษของหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนไบโจามจุรีเมื่อเติมลงในดินตามธรรมชาติที่สารพิษที่ปนเปื้อนอยู่ ทำการทดลองโดยใช้ดินไม่ปลอดเชื้อที่ปรับความชื้นและความเป็นกรดต่างแล้ว ผสมกับสารละลายไพรีนและพีแนนทริน ความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. และผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนไบโจามจุรีปลอดเชื้อมาแล้ว 3 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 0, 3, 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน

ผลการทดลองพบว่า ปริมาณไพรีนและพีแนนทรินลดลงอย่างรวดเร็วมาก ในวันที่ 3 ของการทดลองตรวจพบปริมาณไพรีนและพีแนนทรินที่เหลืออยู่เพียง 11.25 และ 7.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในวันที่ 14 ปริมาณพีแนนทรินลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ ส่วนปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่เพียง 1.68 เปอร์เซ็นต์ ที่วันที่ 35

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

จะเห็นว่าการเติมหัวเชื้อ RRM-V3 ที่เลี้ยงบนไบโจามจุรีลงในดินไม่ปลอดเชื้อ ปริมาณไพรีนและพีแนนทรินในดินลดลงอย่างมากและรวดเร็วกว่าในชุดการทดลองที่ 4 ซึ่งใช้ดินปลอดเชื้อ แสดงว่าเชื้อในดินก็มีส่วนช่วยย่อยสลายสารประกอบ PAHs เช่นกัน นอกจากนี้ไบโจามจุรีจะช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายไพรีน/พีแนนทรินและเป็นแหล่งอาหารให้แก่กลุ่มเชื้อแบคทีเรีย RRM-

V3 แล้ว ยังอาจมีส่วนช่วยส่งเสริมความสามารถของแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีอยู่ในดินได้อีกทางหนึ่งด้วย



รูปที่ 4.7 ปริมาณไฟรีนและฟิแวนทรินที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อ (ชุดการทดลองที่ 5)

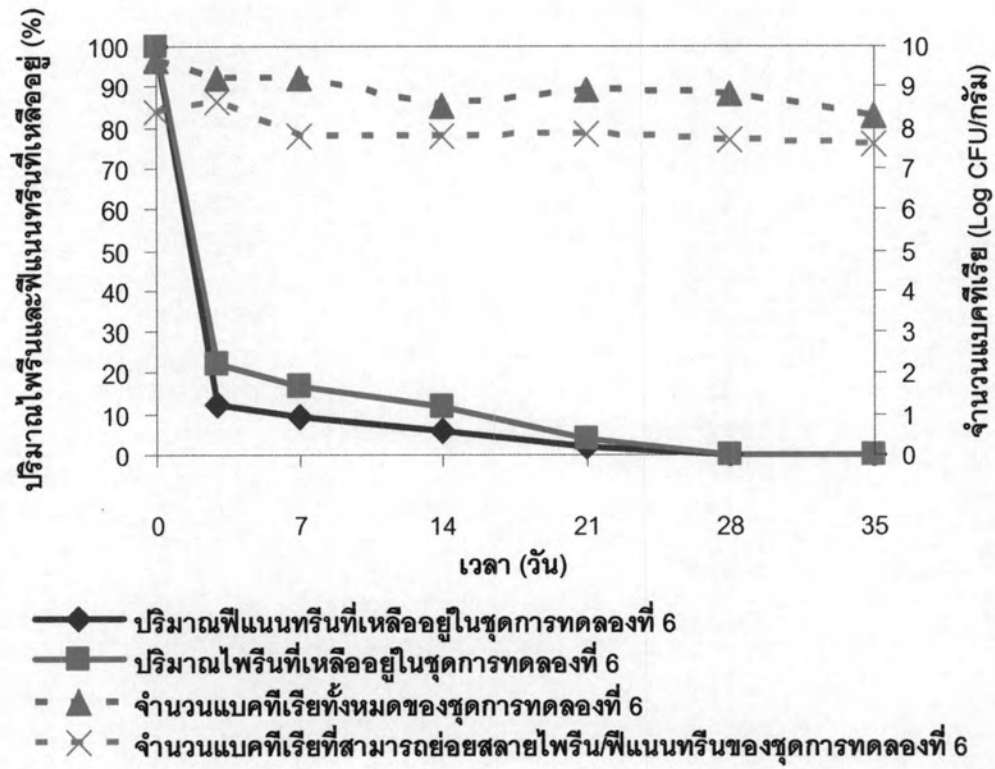
4.4.6 การสลายตัวของไฟรินและพีแนนทรินในดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในน้ำดินปลอดเชื้อ (ชุดการทดลองที่ 6)

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

ผลการทดลองพบว่า การสลายตัวของไฟรินและพีแนนทรินเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยวันที่ 3 ของการทดลองตรวจพบปริมาณไฟรินและพีแนนทรินที่เหลืออยู่เท่ากับ 22.21 และ 12.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้น PAHs ปริมาณพีแนนทรินลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ในวันที่ 28 ในขณะที่วันที่ 35 ของการทดลองพบว่ามีปริมาณไฟรินเหลืออยู่เพียง 0.03 เปอร์เซ็นต์

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

แสดงว่าการเตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยการเลี้ยงในน้ำดินมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไฟรินและพีแนนทรินได้น้อยกว่าหัวเชื้อที่เตรียมบนใบจามจุรีในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งดูจากความเร็วในการย่อยสลาย จะเห็นว่าหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนใบจามจุรี ทำให้ไฟรินและพีแนนทรินลดลงได้เร็วกว่า



รูปที่ 4.8 ปริมาณไฟรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในน้ำดินปลอดเชื้อ (ชุดการทดลองที่ 6)

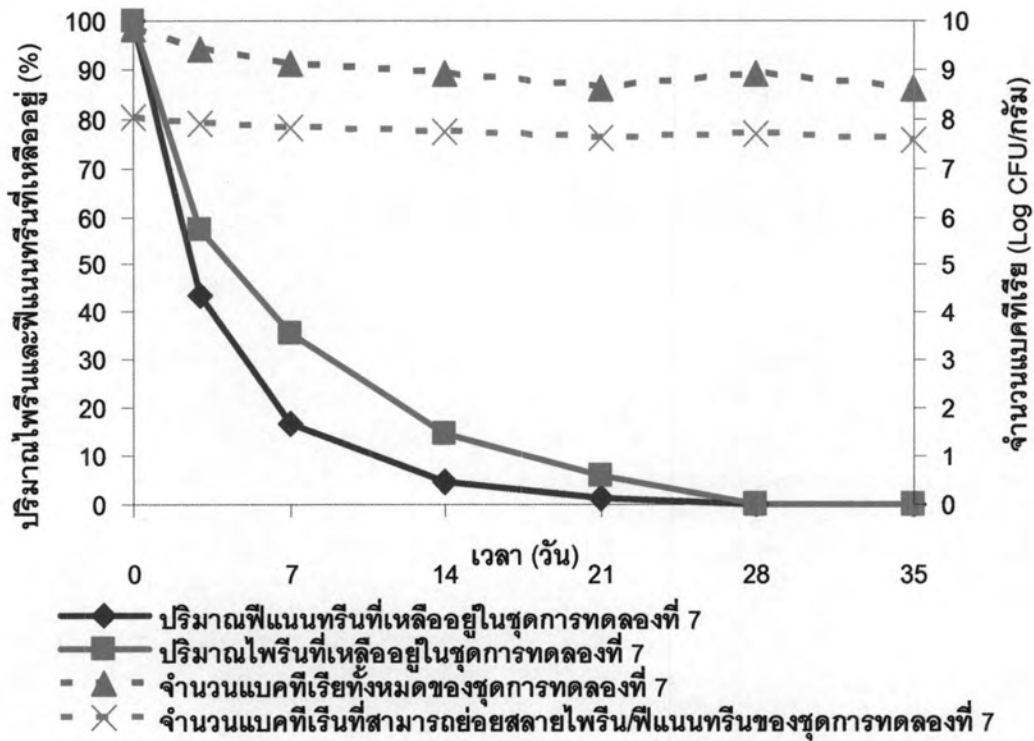
4.4.7 การสลายตัวของไพรีนและพีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM (ชุดการทดลองที่ 7)

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

ผลการทดลองพบว่า การสลายไพรีนและพีแนนทรีนเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง วันที่ 3 ของการทดลองตรวจพบปริมาณไพรีนและพีแนนทรีนที่เหลืออยู่เท่ากับ 57.31 และ 43.71 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และวันที่ 35 ของการทดลอง ปริมาณพีแนนทรีนลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ ขณะที่ตรวจพบว่าปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองเท่ากับ 0.03 เปอร์เซ็นต์

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

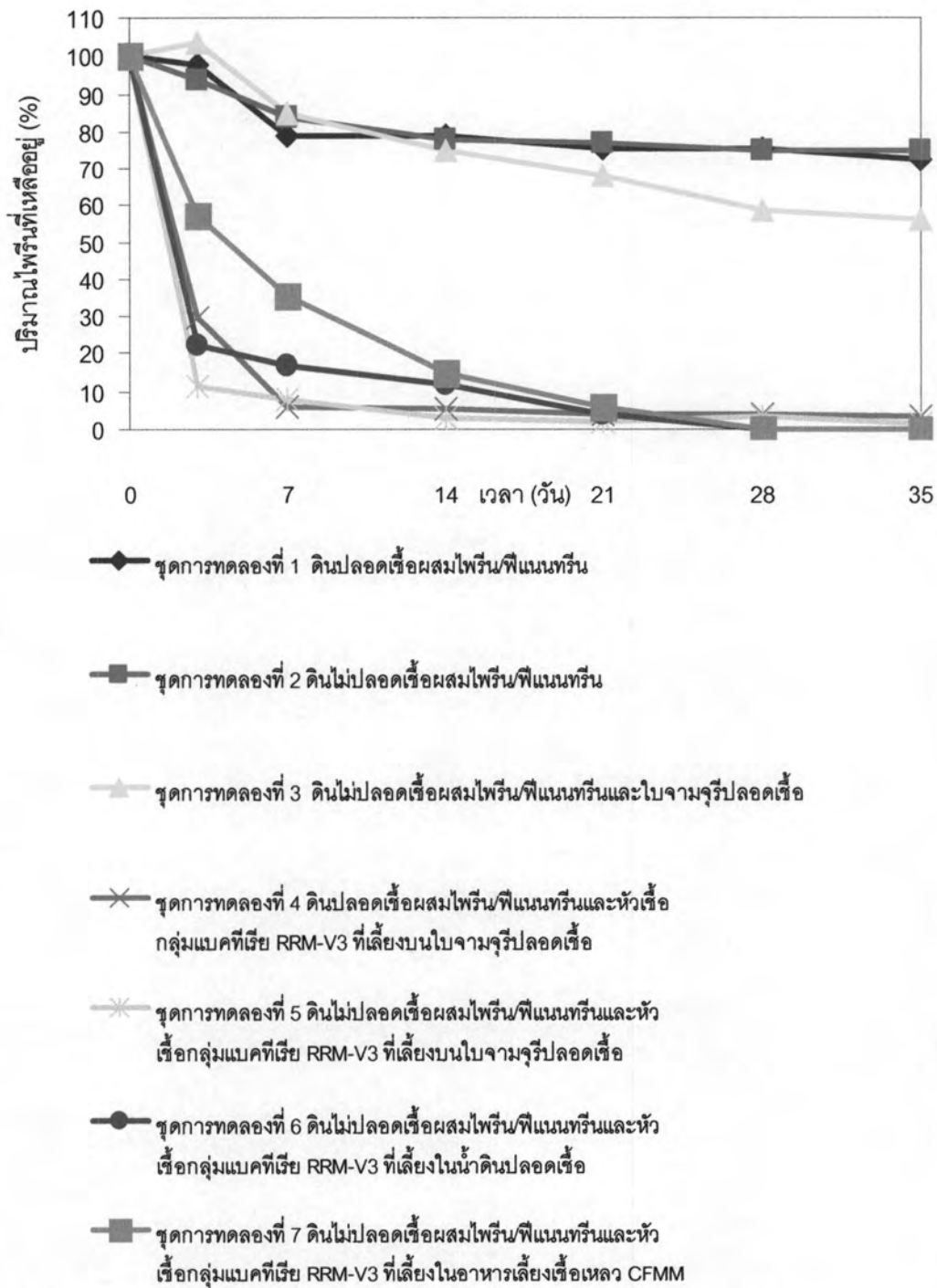
จะเห็นได้ว่าการเตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและพีแนนทรีนได้น้อยที่สุด รองลงมาคือหัวเชื้อที่เตรียมในน้ำดินจากชุดการทดลองที่ 6 และการเตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในไบจามจรีจากชุดการทดลองที่ 5 มีประสิทธิภาพและความเร็วในการย่อยสลายสูงที่สุด



รูปที่ 4.9 ปริมาณไฟรีนและฟิแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM (ชุดการทดลองที่ 7)

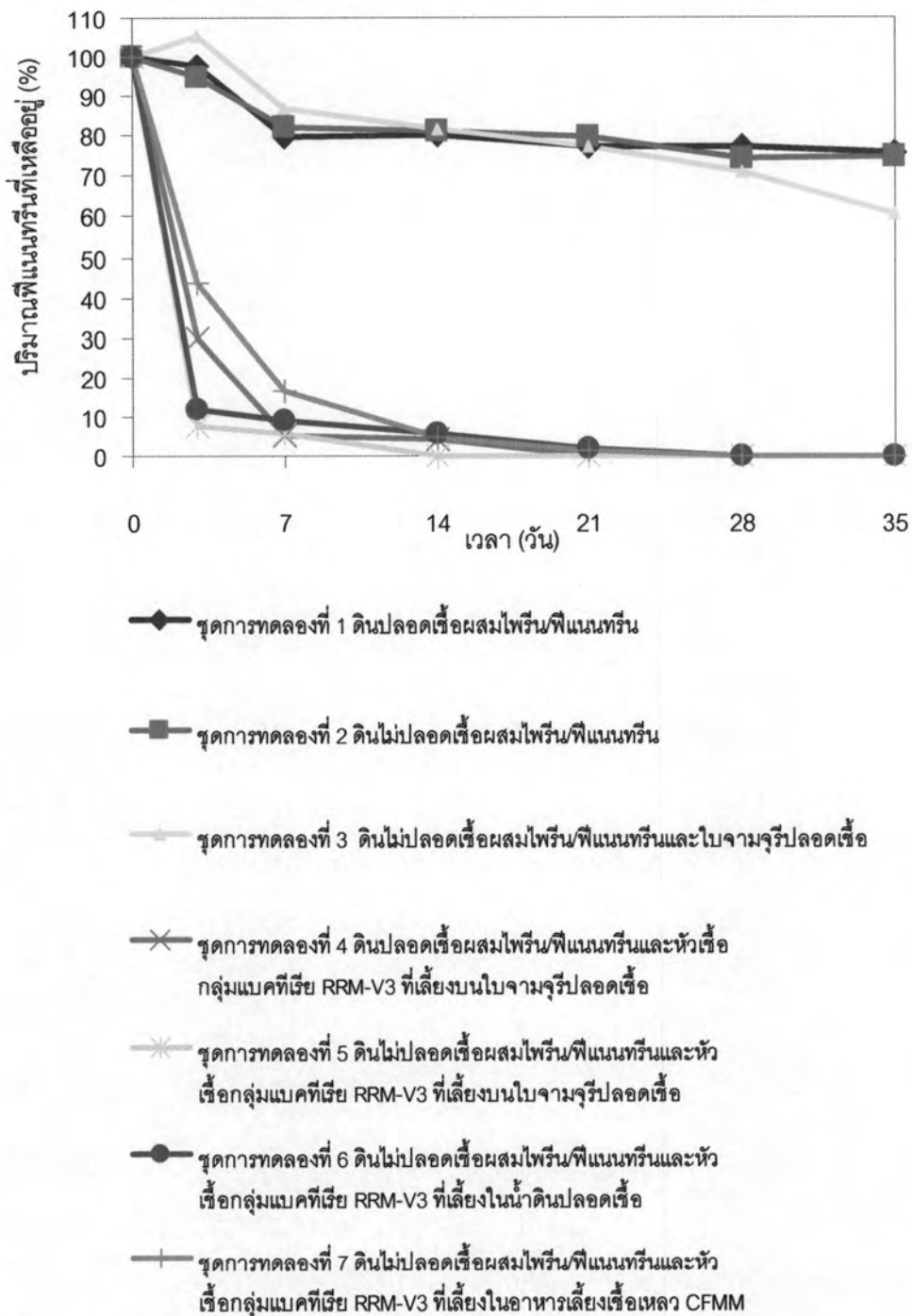
4.5 เปรียบเทียบผลจากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7

4.5.1 เปรียบเทียบปริมาณไพรินที่เหลืออยู่จากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7



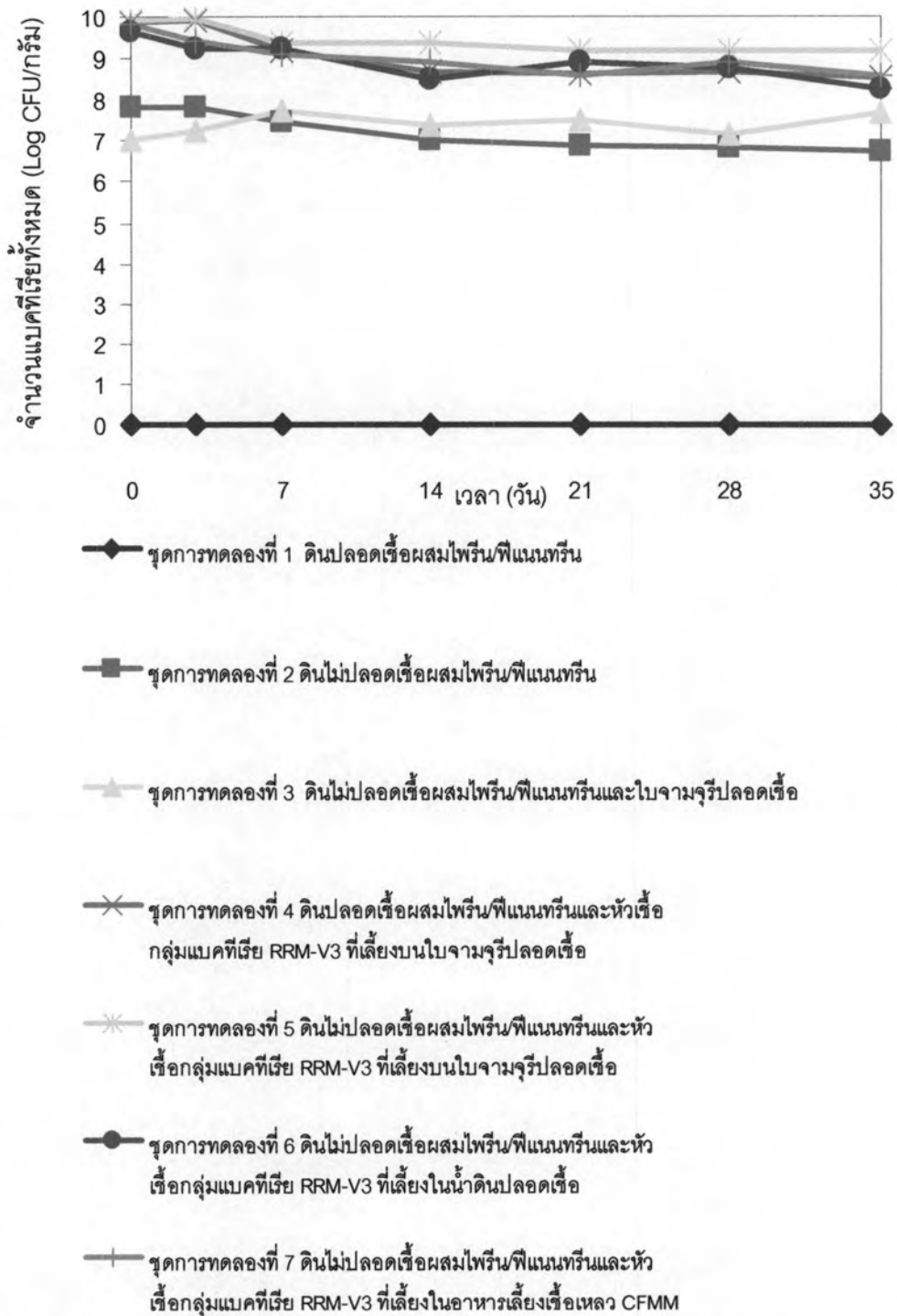
รูปที่ 4.10 เปรียบเทียบปริมาณไพรินที่เหลืออยู่จากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7

4.5.2 เปรียบเทียบปริมาณฟีนนทรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7



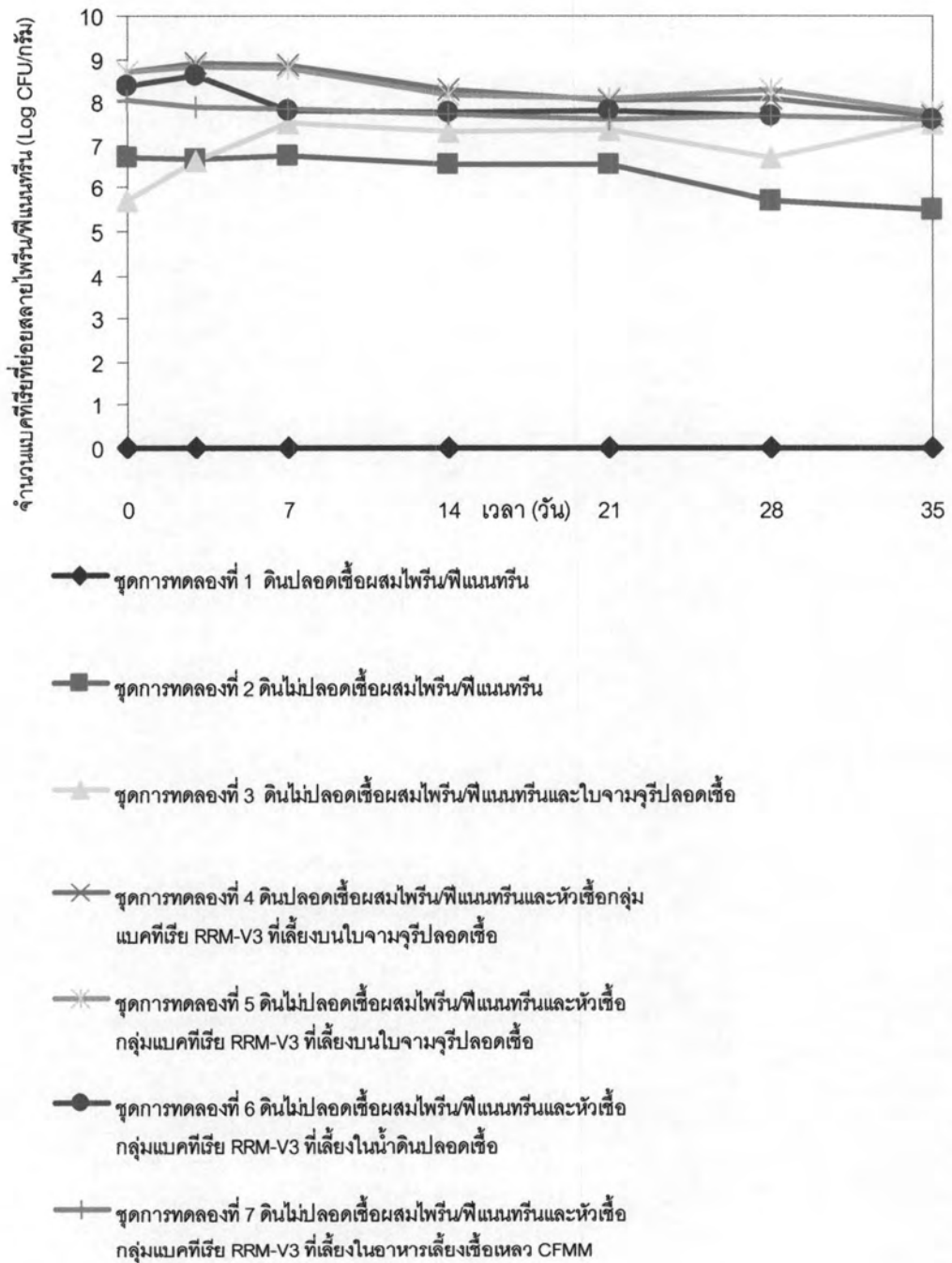
รูปที่ 4.11 เปรียบเทียบปริมาณฟีนนทรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7

4.5.3 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7



รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7

4.5.4. เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/พีแนมทรินจากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7



รูปที่ 4.13 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/พีแนมทรินจากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7

4.6 พลวัตประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในช่วงเวลาของการบำบัด

การติดตามพลวัตประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในช่วงเวลาของการบำบัด ทำการศึกษาใน 4 ชุดการทดลองดังนี้

1. การเตรียมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนใบจามจุรีปลอดเชื้อ เพื่อติดตามพลวัตประชากรของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีในช่วงเวลา 14 วันของการทดลอง
2. การสลายตัวของไฟรินและพีแนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อในชุดการทดลองที่ 2 เพื่อติดตามพลวัตประชากรของแบคทีเรียในดินเพียงอย่างเดียวในช่วงเวลาของการบำบัด
3. การสลายตัวของไฟรินและพีแนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อในชุดการทดลองที่ 5 ที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อ เพื่อดูพลวัตประชากรของแบคทีเรียในดินที่มีกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนใบจามจุรีอยู่ด้วยในช่วงเวลาของการบำบัด
4. กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมเปรียบเทียบตำแหน่งของแบคทีเรียแต่ละชนิดของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนพอลิอะคริลาไมด์เจล

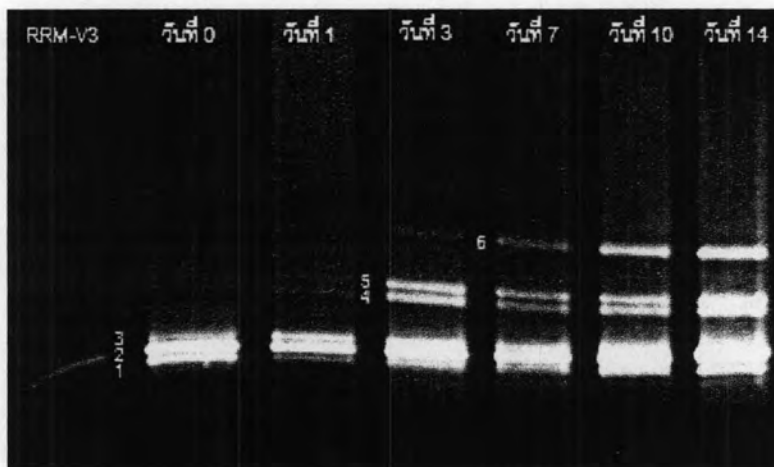
การติดตามพลวัตประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในช่วงเวลาของการบำบัด ทำได้โดยการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอแม่แบบให้เท่ากัน จากนั้นเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ซึ่งมีขนาดประมาณ 500 bp ไปวิเคราะห์ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis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

4.6.1 พลวัตประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อ

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

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

ผลที่ได้แสดงว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการบ่มานานขึ้น และประชากรแบคทีเรียที่มีความโดดเด่นในวันแรกยังคงความโดดเด่นนั้นไว้ตลอดการทดลอง



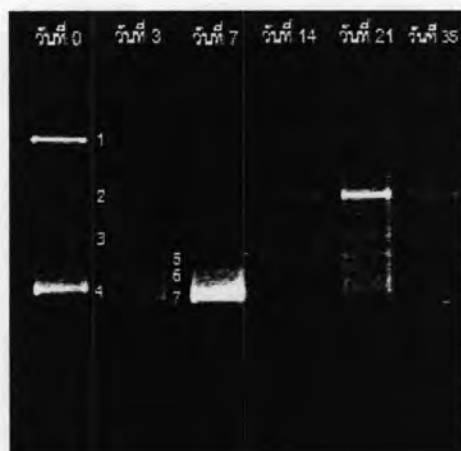
รูปที่ 4.14 แถบขึ้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rDNA แสดงพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อที่เวลาต่างๆ โดยวิธี DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40 – 70% denaturant

4.6.2 พลวัตประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองที่ 2 การสลายตัวของไพรีนและพีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อ

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

จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่โดดเด่นมีการเปลี่ยนแปลงตลอดช่วงเวลาของการทดลอง ดังนี้ ในวันที่ 0 ของการทดลองพบว่า ดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE แถบที่ 1 มีความโดดเด่นที่สุด และเรียงจางลงในวันต่อมา ในวันที่ 7 ของการทดลองพบดีเอ็นเอแถบที่ 7 โดดเด่นขึ้นมาแทน และวันที่ 21 พบดีเอ็นเอแถบที่ 2 โดดเด่นขึ้นมา (รูปที่ 4.17)

เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรที่ได้กับผลการสลายตัวของของไพรีนและพีแนนทรีนจะเห็นว่าวันที่ 7 ปริมาณสารประกอบ PAHs มีอัตราการลดลงสูงสุด และประชากรแบคทีเรียชนิดที่ 7 โดดเด่นขึ้น แต่ความโดดเด่นนั้นกลับหายไปหลังจากวันนี้ และประชากรแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการสลายตัวของของไพรีนและพีแนนทรีน (รูปที่ 4.4)

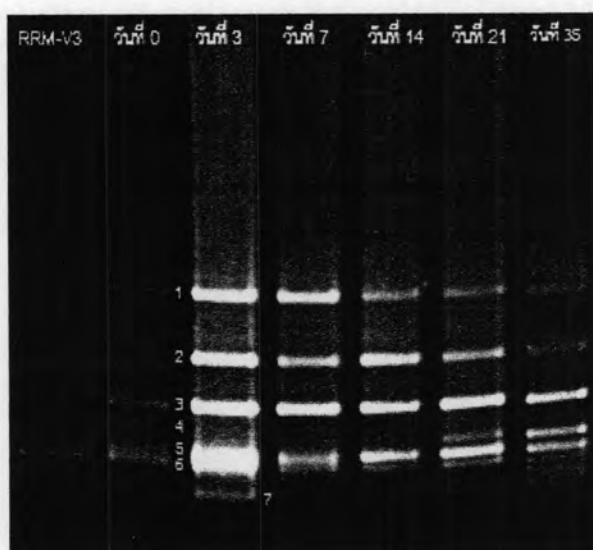


รูปที่ 4.15 แถบชั้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rDNA แสดงพลวัตประชากรแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ 2 ได้แก่ ดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมไพรีน/พีแนนทรินที่เวลาต่างๆ โดยวิธี DGGE ในพอลิอะครีลาไมด์เจลที่มี 40 – 70% denaturant

4.6.3 การติดตามพลวัตประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองที่ 5 การสลายตัวของไพรีนและพีแนนทรินในดินไม่ปลอดเชื้อ ที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนไบโຈามจรีปลอดเชื้อ

การติดตามพลวัตประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองที่ 5 ดินไม่ปลอดเชื้อ ผสมกับไพรีนและพีแนนทริน และหัวเชื้อที่เตรียมบนไบโຈามจรี เพื่อดูพลวัตประชากรของแบคทีเรียทั้งหมดที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาของการบำบัด ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DGGE ในพอลิอะครีลาไมด์เจลที่มี 40 - 70% denaturant เมื่อเริ่มต้นการทดลองพบว่า มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 6 แถบ โดย 3 แถบด้านล่าง คือ แถบที่ 4 – 6 พบว่ามีตำแหน่งตรงกับแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ใช้เป็นชุดควบคุม ผลบวก วันที่ 3 ของการทดลองพบว่า แถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่จากวันแรกเด่นชัดขึ้นมาและมีแถบที่ 7 เพิ่มขึ้นมาอีก 1 แถบ ยกเว้นดีเอ็นเอแถบที่ 4 หายไปแต่จะปรากฏอีกครั้งในวันที่ 21 และเข้มมากขึ้นในวันสุดท้ายของการทดลอง หลังจากวันที่ 3 ของการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE แถบที่ 1 และ 2 เริ่มจางลง แต่ยังคงอยู่ตลอดช่วงเวลาของการทดลอง เช่นเดียวกับดีเอ็นเอแถบที่ 3 ซึ่งความเข้มของแถบดีเอ็นเอลดลงจากวันที่ 3 แต่ยังคงมีความเข้มมากกว่าแถบที่ 1 และ 2

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



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