การย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดินโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK เจริญร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43

นางสาวปริยาภัทร แก้วภู่

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

DEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN SOIL BY A CO-CULTURE OF BACTERIAL CONSORTIUM STK AND *Agrocybe* sp. CU-43

Miss Pariyapat Kaewpu

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดินโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK เจริญร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43
โดย	นางสาว ปริยาภัทร แก้วภู่
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……. ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

……. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ)

……. กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

……. กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

ปริยาภัทร แก้วภู่ : การย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดินโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK เจริญร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43. (DEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN SOIL BY A CO-CULTURE OF BACTERIAL CONSORTIUM STK AND *Agrocybe* sp. CU-43) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ.ดร. ปาหนัน เริงสำราญ, 91 หน้า.

ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ของกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43 กลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนและไพรีนที่ความเข้มข้น 100 ppm ในอาหารเหลวได้หมดภายในระยะเวลา 7 และ 14 วัน ตามลำดับ ฟลูออรีนถูกย่อยสลายได้ดีจนเหลือเพียง 4.48% ภายใน 14 วัน ฟลูออแรนทีนไม่ถูกใช้โดย STK และคงเหลือ 94.33% รา *Agrocybe* sp. CU-43 สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนทีนและไพรีนจนเหลือ 23.45%, 28.85%, 69.10% และ 76.52% ตามลำดับในเวลา 14 วัน เมื่อทดสอบการย่อยสลายไพรีน ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และฟลูออแรนทีนในดินโดยใช้กลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43 หรือกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียวพบว่าไพรีนและฟีแนนทรีนที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 ppm ถูกย่อยสลายได้หมดในระยะเวลา 21 วัน ฟลูออรีนและฟลูออแรนทีนคงเหลือ 27.88% และ 17.67 % ตามลำดับ หลังการย่อยสลายเป็นเวลา 14 วัน โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารประกอบ PAHs เป็นชนิดละ 200 ppm และ 400 ppm ในดิน พบว่าการใช้กลุ่มแบคทีเรียร่วมกับราจะสามารถย่อยสลาย PAHs ทุกชนิดได้จนเหลือน้อยกว่า 10% ภายใน 21 วัน ซึ่งเร็วกว่าการใช้แบคทีเรีย STK หรือรา *Agrocybe* sp. CU-43 เพียงอย่างเดียว งานวิจัยจึงแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้กลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับ รา *Agrocybe* sp. CU-43 จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในดินได้ดีขึ้น

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5272409523: MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAHs)/Degradation in soil/Bacterial consortium and fungi co culture

PARIYAPAT KAEWPU: DEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN SOIL BY A CO-CULTURE OF BACTERIAL CONSORTIUM STK AND *Agrocybe* sp. CU-43. ADVISOR : ASST.PROF.KOBCHAI PATTARAGULWANIT, Dr.rer.nat., CO- ADVISOR Panan Rerngsamran ,Ph.D, 91 pp.

The abilities of a bacterial consortium STK and a fungus *Agrocybe* sp. CU-43 to degrade PAHs were investigated. Consortium STK could completely remove 100 ppm phenanthrene as well as pyrene in liquid medium within 7 and 14 days, respectively. Fluorene could also be degraded down to 4.48% within 14 days. Fluoranthene was failed by STK with 94.33% remaining. *Agrocybe* sp. CU-43 was able to degrade phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene to 23.45%, 28.85% 69.10% and 76.52%, respectively, in 14 days. In soil experiment, the coculture of *Agrocybe* sp. CU-43 and bacterial consortium STK was able to completely degrade 100 ppm pyrene and phenanthrene within 21 days. Fluorene and fluoranthene remained were 27.88% and 17.67% respectively after 14 days of incubation. When PAHs concentration in soil was raised to 200 ppm and 400 ppm, all PAHs were degraded to less than 10% in 21 days by the coculture more efficient than that of either STK or *Agrocybe* sp. CU-43 alone. These results suggested that the cocultivation of a fungal / bacterial strain may exert a positive effect on the PAHs degradation in soil.

Department: Microbiology	Student's Signature
Field of Study: Industrial Microbiology	Advisor's Signature
Academic Year: 2011	Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร .กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และ อาจารย์ ดร . ปาหนัน เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดได้จนกรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น รวมถึง การดูแลเอาใจใส่ ให้ กำลังใจ ที่มีให้มาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร . สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณา ให้เกียรติรับเป็นประธานกรรมการในการสอบในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา และกำลังใจ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์แก่ผู้วิจัย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร . กาญจณา จันทองจีน และรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณาให้เกียรติรับเป็นคณะกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้คำปรึกษา คำแนะนำ และกำลังใจ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านและขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ห้อง 462 406 ที่คอยให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ

ขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกคนบนภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้ที่คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่น้อง ญาติๆ ทุกคนและเพื่อนๆรุ่นพี่ที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้ลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญรูปภาพ..... ฎ

สัญญาลักษณ์และคำย่อ..... ฑ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม..... 5

2.1 สารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน..... 5

2.2 การแพร่กระจายสารประกอบ PAHs สู่สิ่งแวดล้อม..... 6

2.3 ความเป็นพิษของ PAHs..... 7

2.4 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย..... 8

2.4.1 ตัวอย่างการศึกษาการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรีย..... 9

2.4.2 ตัวอย่างการศึกษาการย่อยสลาย PAHs โดยรา..... 10

2.5 การบำบัด PAHs โดยใช้แบคทีเรียและราร่วมกัน..... 12

บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย..... 17

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง..... 17

เคมีภัณฑ์..... 20

วิธีดำเนินงานวิจัย..... 22

3.1 เตรียมกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43..... 22

3.1.1 จุลินทรีย์..... 22

3.1.2 การเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK..... 23

3.1.3 การเลี้ยงรา *Agrocybe* sp. CU-43..... 23

3.1.4 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์..... 23

3.2 ย่อยสลาย PAHs ของกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในอาหารเหลว..... 24

3.2.1 การย่อยสลาย PAHs ของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเหลว..... 24

หน้า

3.2.2 การย่อยสลาย PAHs ของรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในอาหารเหลว... 24

3.3 ย่อยสลาย PAHs ของกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดิน…….. 25

3.3.1 การเตรียมดิน…… 25

3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อ กลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43…….. 25

3.3.3 ทดสอบความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย STK และ/หรือ รา *Agrocybe* sp.CU-43 ในการย่อยสลาย PAHs ในดิน……..... 26

3.3.3.1 การย่อยสลาย PAHs ของกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดิน..... 26

3.4 ย่อยสลาย PAHs ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในดิน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43…….. 27

3.5 การติดตามพลวัตรประชากรของกลุ่มแบคทีเรีย STK และราในดิน Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)…… 27

3.5.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43 จากในดิน..... 27

3.5.2 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK…….. 28

3.5.3 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอของรา *Agrocybe* sp. CU-43..... 29

3.5.4การกำจัด Humic acid ที่ปนเปื้อนและตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ…….. 30

3.5.5 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)…….. 31

3.5.5.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ…….. 31

3.5.5.2 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ที่บริเวณ 16S rDNA ของกลุ่มแบคทีเรีย STK…… 31

หน้า

3.5.5.3 การเพิ่มจำนวนจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ที่บริเวณ internal transcribed spacer ของรา *Agrocybe* sp. CU-43 โดยใช้ไพรเมอร์ 32
3.5.5.4 การวิเคราะห์ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)..... 33
3.6 วิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์..... 34
3.6.1 วัดการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK..... 34
3.6.2 วัดการเจริญของรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในอาหารเหลว..... 34
3.7 วิเคราะห์ปริมาณ PAHs..... 34
3.7.1 การสกัด PAHs ที่คงเหลือในอาหาร..... 34
3.7.2 การสกัด PAHs ที่คงเหลือในดิน..... 35
3.7.3 วิเคราะห์ปริมาณ PAHs คงเหลือโดยแก๊สโครมาโตรกราฟี..... 35
แผนผังงานวิจัย..... 36
บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 37
4.1 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในอาหารเหลวโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43..... 37
4.1.1 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในอาหารเหลวโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK..... 37
4.1.2 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในอาหารเหลวโดย รา *Agrocybe* sp. CU-43..... 39
4.2 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดย กลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp.CU-43 ในดิน..... 39
4.2.1ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่ใช้ในการทดลอง..... 41
4.2.2 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดย กลุ่มแบคทีเรีย STK หรือ รา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดิน ที่ความเข้มข้นของสารประกอบ PAH ชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อกรัมดิน..... 42

หน้า

4.2.3 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดย กลุ่มแบคทีเรีย STK และ รา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดินที่ความเข้มข้นของสารประกอบ PAH ชนิดละ 200 มิลลิกรัมต่อกรัมดิน..... 45

4.2.4 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดย กลุ่มแบคทีเรีย STK และ รา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดินที่ความเข้มข้นของสารประกอบ PAH ชนิดละ 400 มิลลิกรัมต่อกรัมดิน..... 49

4.3 การติดตามพลวัตรประชากรของกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43 ด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)..... 53

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 55

รายการอ้างอิง..... 65

ภาคผนวก..... 74

ภาคผนวก ก..... 75

ภาคผนวก ข..... 78

ภาคผนวก ค..... 84

ภาคผนวก ง..... 90

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 91

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 แสดงการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลว โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK หลังจาก 14 วัน..... 38

4.2 แสดงการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลว โดยรา *Agrocybe* sp. CU-43 หลังจาก 14 วัน..... 39

4.3 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินตัวอย่างที่นำมาใช้ในการทดลอง..... 41

4.4 สรุปปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ในดินหลังจากย่อยสลายเป็นเวลา 21 วันโดยแบคทีเรีย STK, รา *Agrocybe* sp. CU-43 และ แบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43ที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อกรัมดิน..... 45

4.5 สรุปปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ในดินหลังจากย่อยสลายเป็นเวลา 21 วันโดยแบคทีเรีย STK, รา *Agrocybe* sp. CU-43 และ แบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43ที่ความเข้มข้นชนิดละ 200 มิลลิกรัมต่อกรัมดิน..... 49

4.6 สรุปปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ในดินหลังจากย่อยสลายเป็นเวลา 21 วันโดยแบคทีเรีย STK, รา *Agrocybe* sp. CU-43 และ แบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43ที่ความเข้มข้นชนิดละ 400 มิลลิกรัมต่อกรัมดิน..... 53

สารบัญรูป

รูป		หน้า
1	แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ PAHs ทั้ง 16 ชนิด	5
2	วิถีการย่อยสลายสารประกอบ PAH โดยจุลินทรีย์	8
4.1	แสดงการย่อยสลายของฟลูออรีน ฟีแนนทรีน ฟลูออแรนทรีน และ ไพรีน รวม 4 ชนิดที่ความเข้มข้นของสารประกอบ PAH ชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อกรัมดิน ในดินที่ระยะเวลา 21 วัน	43
4.2	แสดงจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ในการย่อยสลายร่วมกันโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK และ รา *Agrocybe* sp. CU-43 ที่ความเข้มข้นของ PAHs รวม 4 ชนิด ชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อกรัมดิน.....	44
4.3	แสดงการเจริญของรา *Agrocybe* sp. CU-43 .ในชุดการทดลองการย่อยสลาย PAHs 4 ชนิดโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดินที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน.....	44
4.4	แสดงการย่อยสลายของฟลูออรีน ฟีแนนทรีน ฟลูออแรนทรีน และ ไพรี น ที่ความเข้มข้นของสารประกอบ PAH ชนิดละ 200 มิลลิกรัมต่อกรัมดิน ในดินที่ระยะเวลา 21 วัน	47
4.5	แสดงจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ในการย่อยสลายร่วมกันโดยกลุ่มแบคทีเรีย STKและ รา *Agrocybe* sp. CU-43 ที่ความเข้มข้นของสารประกอบ PAHs ชนิดละ 200 มิลลิกรัมต่อกรัมดิน.....	48
4.6	แสดงการเจริญของรา *Agrocybe* sp. CU-43 .ในชุดการทดลองการย่อยสลาย PAHs 4 ชนิดโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดินที่ความเข้มข้นชนิดละ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน.....	48
4.7	แสดงการย่อยสลายของฟลูออรีน ฟีแนนทรีน ฟลูออแรนทรีน และ ไพรีน ที่ความเข้มข้นชนิดละ400มิลลิกรัมต่อกรัมดินในดินที่ระยะเวลา21วัน.....	51

4.8 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ในการย่อยสลายร่วมกันโดย
แบคทีเรีย และ รา *Agrocybe* sp. CU-43 ที่ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อกรัมดิน.... 52

4.9 แสดงการเจริญของรา *Agrocybe* sp. CU-43 .ในชุดการทดลองการย่อยสลาย PAHs
4 ชนิดโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดินที่ความ
เข้มข้นชนิดละ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน..... 52

4.10 แสดงพลวัตรประชากรจุลินทรีย์ในชุดการทดลองในดิน โดยเติมกลุ่มแบคทีเรีย
STK และรา Agrocybe sp. CU-43 เพื่อย่อยสลายสารประกอบ PAHs ทั้ง 4 ชนิดที่
ความเข้มข้นชนิดละ 100 ภายใน 21 วัน……..... 54

คำย่อและสัญลักษณ์

มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
ซม.	=	เซนติเมตร
°ซ	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
ppm	=	part per million
bp	=	base pairs

บทที่ 1
บทนำ

ปัญหาที่กำลังเป็นที่สนใจและต้องการได้รับการแก้ไขอย่างเร่งด่วนในปัจจุบันนี้คือปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมที่เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ไปพร้อมกับโลกที่มีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว ทั้งด้านเศรษฐกิจ ด้านเทคโนโลยี ด้านการคมนาคม ด้านอุตสาหกรรมต่างๆ รวมถึงด้านเกษตรกรรม เป็นต้น ซึ่ง เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ แต่ในอีกด้านหนึ่งก็ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านมลพิษอีกมากมายในสิ่งแวดล้อม เช่น มลพิษทางดิน ทางน้ำ ทางอากาศ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคภัยต่างๆต่อสิ่ง มีชีวิตทั้งรวมถึงพืชสัตว์และมนุษย์

พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) เป็นสารประกอบทางเคมีที่ประกอบขึ้นจากอะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจน ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงอะโรมาติกตั้งแต่ 2 วงขึ้นไปเชื่อมต่อกัน (Jacques และคณะ, 2008) PAHs มีการปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมเช่นในน้ำ ดิน อากาศ ซึ่งมักเกิดจากการกระทำของมนุษย์ เช่นอุตสาหกรรมการถลุงแร่ การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิง ยานพาหนะ โรงงานก๊าซ โรงงานถ่านหิน โรงงานน้ำมัน ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม ผลิตภัณฑ์ป้องกันเนื้อไม้ (creosote) นอกจากนี้ยังสามารถพบได้จากธรรมชาติ เช่น พื้นผิวใบไม้ พืชน้ำมัน ผิวของแมลง (Millero และ Sohn, 1991) ปรากฏการณ์ทางธรรมชาติ เช่น การเกิดไฟไหม้ป่า ภูเขาไฟระเบิด การเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเปลือกโลก การเกิดเชื้อเพลิงฟอสซิล การเกิดแร่ธาตุตามธรรมชาติ การสลายตัวของน้ำมันดิบ หรือ ถ่านหิน การรั่วซึมจากแหล่งน้ำมันดิบใต้ดิน เป็นต้น (Cerniglia, 1992) เนื่องจาก PAHs มีสมบัติที่ละลายน้ำได้ต่ำทำให้เกาะติดแน่นกับอนุภาคและตะกอนของดินหรืออาจถูกดูดซับกับสารอินทรีย์ในดิน จึงสามารถถูกย่อยสลายตัวโดยสิ่งแวดล้อมได้ยากและช้า การสลายตัวของ PAHs เกิดจากการสลายตัวด้วยแสง การสะสมในสิ่งมีชีวิตในดิน หรือการย่อยสลายจากจุลินทรีย์ การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารเคมีและการระเหย จึงปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน (Andreoni และ Gianfreda, 2007) นอกจากนี้สารประกอบ PAHs สามารถละลายได้ดีในไขมันจึงถูกดูดซับได้อย่างรวดเร็วโดยสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนม รวมทั้งที่มีรายงานว่าสามารถก่อให้เกิดมะเร็งก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ หรือทำให้ทารกมีรูปร่างผิดปกติ ได้จึงมีความจำเป็นต้องได้รับการบำบัด (Netto และคณะ, 2000)

สารประกอบ PAHs ถูกจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (low-molecular-weight; LMW) ซึ่งประกอบด้วยวงเบนซีนจำนวน 2-3 วง ได้แก่ แนพธาลีน ฟลูออรีน อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน ฟีแนนทรีน แอนทราซีน เป็นต้น และกลุ่มที่มีมวลโมเลกุลสูง (high-molecular-weight; HMW) ประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป เช่น ไพรีน ฟลูออแรนทีน ไครซีน เบนโซ[เอ]แอนทราซีน ไดแบนโซฟูแรน เบนโซ[เอ]ไพรีน โคโรนีน เป็นต้น (Kanaly และ Harayama, 2000) สารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงนั้น ความสามารถในการละลายน้ำจะต่ำกว่าพวกที่มีมวลโมเลกุลต่ำ แต่ จุดเดือดและจุดหลอมเหลวจะสูงกว่า ลักษณะของสารประกอบ PAHs มีลักษณะเป็นผลึกแข็งมีหลายสีตั้งแต่ สีใส สีขาว สีเหลืองอ่อน จนถึงเหลืองเข้ม เป็นสารที่ไม่มีขั้ว ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในพวกตัวทำละลายอินทรีย์ เช่นแอลกอฮอล์ เฮกเซน อะซีโตน เบนซีน อีเธอร์ โทลูอีน คลอโรฟอร์ม เป็นต้น (Haritash และ Kaushik, 2009) การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีโมเลกุลใหญ่ สามารถถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ได้ยาก แต่เมื่อย่อยสลายร่วมกับสารประกอบ PAHs ที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก จะช่วยส่งเสริมให้จุลินทรีย์สามารถสลายสารประกอบ PAHs ที่มีโมเลกุลใหญ่ได้ง่ายขึ้น (Herwijnen และคณะ, 2003)

การย่อยสลายสารพิษในดินโดยจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการได้แก่ ออกซิเจน สารอาหาร ค่า pH ความสามารถในการนำสารพิษไปใช้ในเซลล์ (Hwang และคณะ, 2007) การใช้วิธีการเติมสารอาหาร จึงเป็นวิธีที่สำคัญวิธีหนึ่งเนื่องจากเป็นแหล่งอาหารและแหล่งพลังงานซึ่งส่งเสริมให้จุลินทรีย์ท้องถิ่นที่มีในสิ่งแวดล้อมนั้นสามารถมีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเพิ่มมากขึ้นและผลิตเอนไซม์ต่างๆ เพื่อกระตุ้นให้เกิดการย่อยสลายสารพิษที่ปนเปื้อนได้เพิ่มสูงขึ้น (Amezcua-Allieri และคณะ, 2010) วิธีดังกล่าวเรียกว่า Biostimulation อีกหนึ่งวิธีที่เป็นวิธีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในการบำบัดสารพิษ รวมถึงสารประกอบ PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเช่น แหล่งน้ำและในดิน เป็นต้น คือวิธีการเติมจุลินทรีย์ หรือ Bioaugmentation คือการเติมแบคทีเรีย รา หรือ ยีสต์ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสา รพิษได้ดี ซึ่งช่วยทำให้เกิดการย่อยสลายได้เร็วขึ้นกว่าการย่อยสลายที่เกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ในท้องถิ่นที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้เช่น แบคทีเรีย *Mycobacterium* sp., *Gardona* sp. *Flavobacterium* sp. *Cycloclasticus* sp., *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. paucimobilis*, *P. vesicularis*, *P. cepacia*, *P. testosteroni*, *Rhodococcus* sp., *Aeromonas* sp.,*Corynebacterium venale*, *Bacillus cereus*, *Moraxella* sp., *Streptomyces* sp., *Vibrio* sp. และ *Cyclotrophicus* sp. (Hedlund และ Jame, 2001; Samanta และคณะ, 2002) ราที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้เช่น *Aspergillus sp., Aspergillus niger Trichocladium*

canadense, Fusarium oxysporum, Trichocladium canadense, Verticillium sp. Achremonium sp. Phanerochaete chrysosporium, Bjerkandera adusta, Penicillium sp., *Trichoderma harzianum, Saccharomyces cerevisiae* และ *Pleurotus ostreatus* (Haritash และ Kaushik, 2009; Machín-Ramírez และคณะ, 2010) เป็นต้น

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีวิถีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้แตกต่างกันจึงมีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ได้ต่างชนิดกัน (Xiang และคณะ, 2006) แบคทีเรียและรามีวิถีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs แตกต่างกัน แบคทีเรียจะใช้วิถีการย่อยสลายแบบ intracellular oxidation โดยใช้เอนไซม์ dioxygenase และ hydroxylation เพื่อเปิดวงเบนซีน และเข้าสู่วิถี TCA-cycle ต่อไป (Samanta และคณะ, 2002) ซึ่งเป็นการย่อยสลายในขั้นเริ่มต้นซึ่งทำให้วงของสารประกอบอะโรมาติกนั้นเปิดออกและดูดซึมคาร์บอนได้ ส่วนราจะใช้วิถี detoxification คือ วงอะ โรมาติกจะถูกเติมหมู่ไฮดรอกซิล จากนั้นเอนไซม์สามารถเข้ามาจับเพื่อทำให้วงเบนซีนเปิด (Li และคณะ, 2008) การนำจุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์มาใช้ร่วมกันในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จะช่วยเสริมประสิทธิภาพให้มีการย่อยสลายสารประกอบ PAHsได้ดีขึ้นและสามารถย่อยสารประกอบ PAHs ได้มากชนิดขึ้น (Jacques และคณะ, 2008; Boonchan และคณะ, 2000; Kohlmeier และคณะ, 2005; Wick และคณะ,2007)

กลุ่มแบคทีเรีย STK ประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *Zoogloea* sp. *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. แยกได้จากปุ๋ยหมักใบมะขามที่มีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก และสามารถย่อยสลายฟลูออรีน และแอนทราซีนที่มีความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 31.16 และ 62.21 มิลลิกรัมต่อลิตรภายใน 14 วัน ตามลำดับ สามารถย่อยสลายไพรีนในอาหารเหลวได้หมดในเวลา 14 วัน (ทิมากร แสงดำ, 2547) รา *Agrocybe* sp. CU-43 ชื่อสามัญว่า เห็ดยานาหงิ คัดแยกจากดอกเห็ดที่ศูนย์รวมเห็ด บ้านอรัญญิก จ . นครปฐม รา สายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส สามาร ถย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิด เช่นย่อยฟลูออรีนที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้หมดภายใน 6 วัน สามารถย่อยแอนทราซีน และฟีแนนทรีนได้ 91.2% และ 99.2 % ภายใน 21 วัน นอกจากนี้สามารถย่อยฟลูออแรนทรีน และไพรีนได้ 67.9% และ 81.2% ตามลำดับ (กุลนี ชูพึ่งอาตม์, 2550; Chupungars และคณะ, 2009) เนื่องจากสมบัติที่เป็นไฮโดรโฟบิกทำให้กลุ่มแบคทีเรีย STK ยึดติดกับอนุภาคดินได้ดีทำให้ความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ในดินลดลง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในดินโดยใช้กลุ่ม

แบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43 ซึ่งเป็นราสายใย และน่าจะทำให้ช่วยพากลุ่มแบคทีเรีย STK ให้กระจายในดินได้อีกด้วย นอกจากนี้ราดังกล่าวยังสามารถย่อยสลาย PAHs ได้ จึงน่าจะส่งเสริมประสิทธิภาพการย่อยสลายได้อีกทางหนึ่ง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

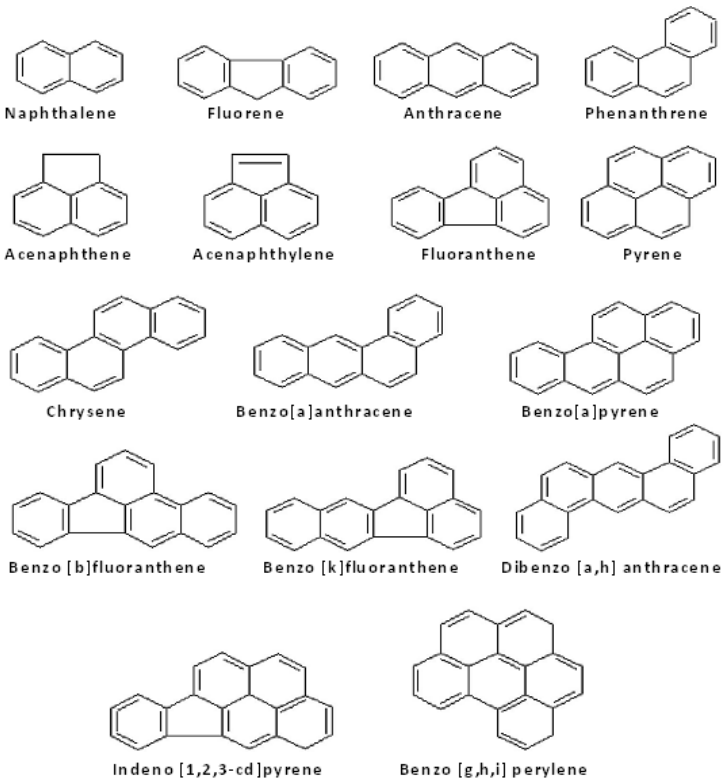
เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดินโดยใช้กลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดินโดยอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม

สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon; PAHs) เป็นสารประกอบทางเคมีที่ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจน ซึ่งประกอบกันเป็นวงเบนซีนที่มีจำนวนวงเบนซีนตั้ งแต่ 2 วงขึ้นไป โดยเชื่อมต่อกันเป็นโครงสร้างแบบเส้นตรง แบบมุมงอ หรือ แบบกลุ่ม (Bamforth และ Singleton, 2005) สารประกอบ PAHs มีการแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ สารประกอบ PAHs เหล่านี้มักจะเกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารเคมีต่างๆในแต่ละอุตสาหกรรม การรั่วไหลของน้ำมัน ปิโตรเลียม การเผาทำลายขยะ การกำจัดของเสีย ไอระเหยของสารเคมีต่างๆ เป็นต้น (Li และคณะ , 2008) The United State Environmental Protection Agency (US-EPA) กำหนดให้ PAHs ทั้ง 16 ชนิดในรูปที่ 1 เป็นสารพิษอันตรายที่ต้องให้ความสนใจอย่างมาก เนื่องจากส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตสามารถก่อให้เกิดมะเร็ง และการกลายพันธุ์ นอกจากนี้ยังกระทบต่อห่วงโซ่อาหารของมนุษย์อีกด้วย (Habe และ Omori, 2003)



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ PAHs ทั้ง 16 ชนิด (Habe และ Omori, 2003)

PAHs สามารถเข้าสู่ร่างกายได้หลายทาง ได้แก่การสัมผัส โดยถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายโดยการสัมผัสโดยตรงเช่น ลูกเหม็น ครีมหรือแชมพู ที่มี PAHs หรืออนุพันธุ์ของ PAHs เป็นส่วนประกอบ (International Agency for Research on Cancer, 1983-1985) การหายใจ โดยสูดดมควัน เช่น ไอจากท่อไอเสียเครื่องยนต์ ไอระเหย แก๊สจากโรงงานอุตสาหกรรม ผู้สูบบุหรี่ เป็นต้น (Lin และคณะ, 2001) การกินหรือดื่ม โดยพบว่ามี PAHs มีการปนเปื้อนสู่อาหารหลากหลายชนิด โดยเฉพาะอาหารประเภทเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ เนื่องจากในขณะปรุงเกิดกระบวนการการให้ความร้อนสูงต่อเนื้อสัตว์ ซึ่งวิธีการประกอบอาหารที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อน PAHs ได้แก่ การปิ้งย่าง การเผา การรมควัน และการทอด เป็นต้น (Purcaro และคณะ, 2006)

การแพร่กระจาย สารประกอบ PAHs สู่สิ่งแวดล้อม

โดยทั่วไปจะพบการแพร่กระจายของ PAHs ได้ทั้งในแหล่งน้ำต่างๆ ชั้นบรรยากาศ ในดิน เช่นบนผิวดิน ตะกอนดิน หรือ เม็ดดิน ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางธรรมชาติ โดยส่วนใหญ่มักเกิดจากปรากฏการณ์ทางธรรมชาติ เช่นการเกิดภูเขาไฟระเบิดซึ่งมีการเผาไหม้ที่อุณหภูมิสูงมาก เรียกว่ากระบวนการไพโรไลซิล (pyrolysis) และเมื่อลาวาเย็นตัวลงจะเกิดการเรียงตัวใหม่เกิดเป็นวงเบนซีน (Antizar- Ladislao และคณะ, 2004) นอกจากนี้ยังเกิดจาก ไฟไหม้ป่า การสลายตัวของฟอสซิล การสลายตัวของถ่านหิน และแร่ธาตุ หรือ การรั่วไหลของน้ำมันดิบใต้ดิน เป็นต้น (Cerniglia, 1992)

การเปลี่ยนแปลงโดยการกระทำของมนุษย์ ซึ่งกิจกรรมในชีวิตประจำวัน เช่น การเผาขยะ การใช้ยานพาหนะในการเดินทาง การใช้เครื่องยนต์ในการทำการเกษตร รวมถึงการฉีดพ่นยาฆ่าวัชพืช หรือฆ่าศัตรูพืช การจุดธูป การสูบบุหรี่ ยาเส้น ยาสูบ การจุดเตาถ่านประกอบอาหาร เป็นต้น (Cerniglia, 1992; Lin และคณะ, 2001; Wang และคณะ, 2010) นอกจากนี้สาเหตุหลักที่ทำให้การแพร่กระจายของ PAHs เพิ่มขึ้นจำนวนมาก และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วคือ กระบวนการต่างๆ ในอุตสาหกรรม เช่น อุ ตสาหกรรมโรงกลั่นน้ำมันปิโตรเลียม อุตสาหกรรมเหมืองแร่ ถ่านหิน อุตสาหกรรมไม้ รวมถึงการเผากำจัดทำลายขยะของโรงงานต่างๆ (Fiedler และคณะ, 2002)

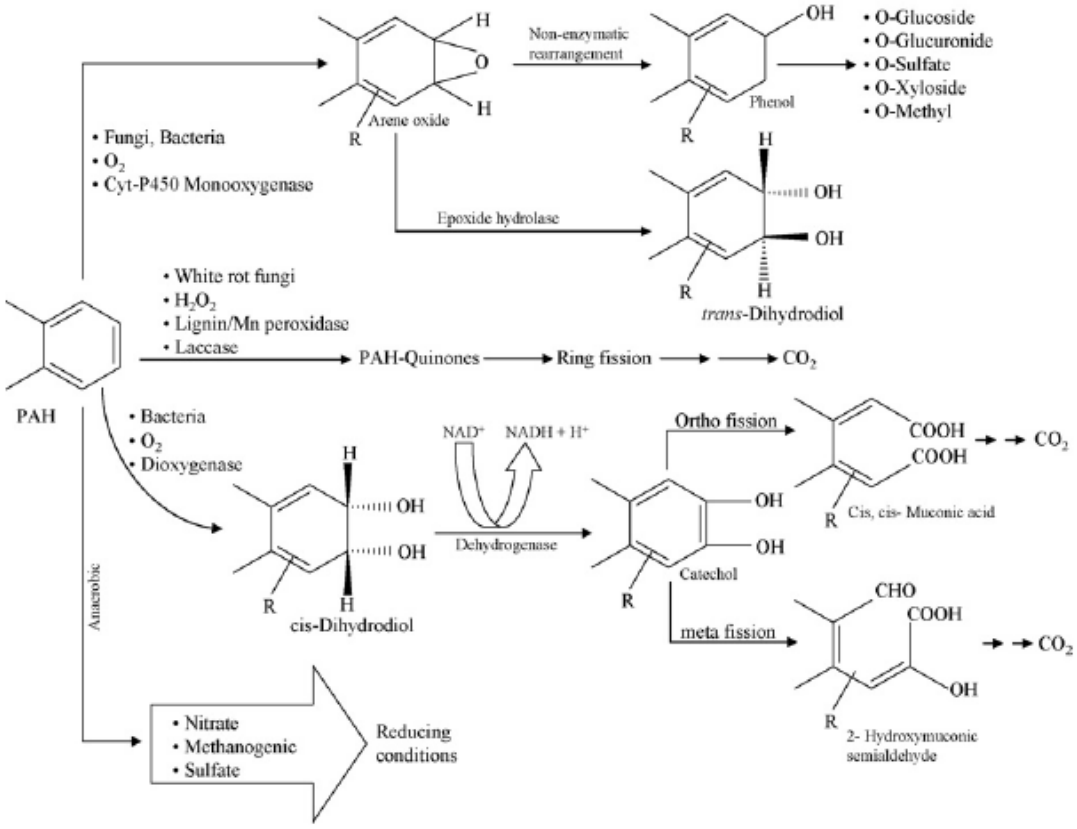
ความเป็นพิษของ PAHs

PAHs มีการปนเปื้อนอยู่ในอากาศทั่วโลก PAHs บางชนิดมีความเป็นพิษต่อมนุษย์หรือเป็นสารก่อมะเร็งต่อสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อาจก่อให้เกิดมะเร็งผิวหนัง มะเร็งปอด มะเร็งระบบทางเดินหายใจ และ กระเพาะปัสสาวะ (Cerniglia, 1992; Baird และคณะ, 2005) PAH เป็นสารก่อมะเร็งจึงส่งผลให้มีฤทธิ์เป็นสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์อีกด้วย และ PAH ต้องอยู่ในรูปของ epoxide จึงจะสามารถรวมตัวกับ DNA และก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ (Juhasz และคณะ, 2000 ; Baird และคณะ, 2005) PAHs บางชนิด เช่น แอนทราซีน , ไพรีน, เบนโซ[*เอ*]ไพรีน และเบนโซ[*เอ*]แอนทราซีน สามารถก่อเกิดอาการระคายเคืองของผิวหนังและเยื่อบุต่างๆได้ ซึ่งทำให้เกิดการอักเสบ บวมแดง พุพองที่ผิวหนัง และยังทำให้เกิดอาการระคายเคืองของดวงตา เยื่อบุตาอักเสบ ตาแดง หนังตาบวม น้ำตาไหล และทำให้มีอาการระคายเคืองที่เยื่อบุทางเดินหายใจ (กรมควบคุมมลพิษ, 2545) มีรายงานว่า PAHs มีผลกระทบต่อภูมิคุ้มกันได้ โดยจากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าการได้รับ เบนโซ [*เอ*]ไพรีน ทางผิวหนังสามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาของระบบภูมิคุ้มกันแบบ allergic contact hypersensitivity ทำให้การตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่มีต่อสารชนิดอื่นลดลง ยับยั้งการสร้างแอนติบอดี และสามารถเปลี่ยนแปลงการทำงานของ แมโครฟาจ , T-เซลล์ และ B-เซลล์ (Baird และคณะ, 2005)

เนื่องจาก PAHs มีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานานจึงจำเป็นต้องมีการบำบัด การบำบัดมีทั้งวิธีทางกายภาพ ได้แก่ การระเหยกลายเป็นไอ การเผาด้วยอุณหภูมิสูง และการตกตะกอน (Haritash และ Kaushik, 2009; Antizar-Ladislao และคณะ 2004) ทางเคมี ได้แก่ การออกซิเดชันด้วยแสง การเติมสารเคมี (Myers และคณะ 2007) และทางชีวภาพ การใช้วิธีทางชีวภาพเป็นวิธีที่น่าสนใจ ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม และประหยัด (Li และคณะ, 2008) วิธีทางชีวภาพที่นิยมใช้ได้แก่ การกระตุ้นทางชีวภาพ (biostimulation) คือ การเติมสารอาหารเพื่อกระตุ้นจุลินทรีย์ในธรรมชาติ และวิธีการเติมจุลินทรีย์ (bioaugmentation) ทั้ง 2 วิธีนี้สามารถช่วยเพิ่มกิจกรรมของจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษให้เพิ่มสูงขึ้นและรวดเร็วมากขึ้น (Edgehill, 1999; Li และคณะ, 2009)

การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย

การย่อยสลายโดยแบคทีเรีย แบคทีเรียสามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยเริ่มต้นจากการใช้เอนไซม์ Dioxygenase ร่วมกับอะตอมของออกซิเจน โดยอะตอมของออกซิเจนจะเข้าจับกับวงอะโรมาติกต่อจากนั้นแบคทีเรียจะใช้เอนไซม์ Dehydrogenase ย่อยสลาย PAH ให้อยู่ในรูป Catechol และย่อยสลายต่อโดยสามารถย่อยได้ 2 วิถีคือย่อยสลายที่ตำแหน่ง Ortho และตำแหน่ง meta (Cerniglia, 1992) ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 วิถีการย่อยสลายสารประกอบ PAH โดยจุลินทรีย์ (Haritash และ Kaushik, 2009)

ตัวอย่างการศึกษาการย่อยสลาย PAHs โดยใช้แบคทีเรีย

Yu และคณะ (2005) รายงานการศึกษาการย่อยสลายของกลุ่มแบคทีเรีย *Rhodococcus* sp., *Acinetobacter* sp. และ *Pseudomonas* sp. โดยใช้แบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์นี้ร่วมกันย่อยสลาย ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และ ไพรีน พบว่าสามารถย่อยสลายได้มากกว่า 90 % ในเวลา 2 สัปดาห์

Lin และ Cai (2008) ศึกษาพบว่า *Bacillus cereus* Py5 และ *Bacillus megaterium* Py6 สามารถย่อยสลาย ไพรีน ฟลูออแรนทรีน ฟีแนนทรีน และ ฟลูออรีน ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 92.1% 87.6% 92.3% และ 95.8% ภายในเวลา 21 วัน

Zhao และคณะ (2009) ศึกษาพบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas stutzeri* sp. ZP2 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนสารประกอบ PAHs ที่บริเวณปั๊มน้ำมันที่ เซี่ยงไฮ้ ประเทศจีน ซึ่งสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนที่ความเข้มข้นในช่วง 250, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยสามารถย่อยสลายได้ประมาณ 90% อย่างรวดเร็วภายในเวลา 6 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Machín-Ramírez และคณะ (2010) ศึกษาการย่อยสลายเบนโซ[*เอ*]ไพรีนที่มีความเข้มข้น 75 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยแบคทีเรีย *Serratia marcescens* ใช้เวลา 5 วันสามารถย่อยสลาย เบนโซ[*เอ*]ไพรีน ได้ 32.41%

Reddy และคณะ (2010) รายงานว่าแบคทีเรีย *Brevibacillus* sp. PDM-3 สามารถย่อยสลาย ฟีแนนทรีน ที่ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งสามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วคือ 93% โดยใช้เวลา 6 วัน

Zeng และคณะ (2010) ศึกษาการย่อยสลายฟลูออแรนทรีนและไพรีน โดยใช้แบคทีเรีย *Mycobacterium* สายพันธุ์ NJS-1 และ NJS-P ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถย่อยสลายได้มากกว่า 49.23% และ 54.14% ภายในเวลา 2 สัปดาห์

การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยรา

ราจะเริ่มใช้เอนไซม์ cytochrom P-450 monooxygenase เปลี่ยนโมเลกุลของ PAH เป็น arene oxide จากนั้นการทำงานของเอนไซม์ epoxide hydrolase จะย่อยสลายต่อจนเป็น trans-dihydrodiol แต่ในกรณีที่ไม่ใช้เอนไซม์ epoxide hydrolase จะย่อยสลายอยู่ในรูปของ phenol ในกรณีราพวกไวท์รอท จะใช้เอนไซม์ lignin peroxidase, manganese peroxidase และ laccase ย่อยสลายวงเบนซีนให้อยู่ในรูป PAH-quinones จากนั้นวงจะเปิดออก (Cerniglia, 1992) ดังแสดงในรูปที่ 2

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้รายย่อยสลาย PAHs

Anastasi และคณะ (2009) ศึกษาการย่อยสลายไพรีนที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีการเติมกลูโคสเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยใช้กลุ่มราพวกไวท์รอท คือรา *Trametes versicolor* (L.) สายพันธุ์ DSM15214 DSM15215 และ DSM15216 พบว่าสามารถย่อยสลายไพรีน ได้ 56% ในเวลา 28 วัน โดยบ่มที่ 24 องศาเซลเซียสในที่มืด และเมื่อทดสอบปริมาณเอนไซม์พบว่าปริมาณเอนไซม์ ligninolytic ที่ราสร้างขึ้นเพื่อใช้ในการย่อยสลายเพิ่มขึ้นไปพร้อมๆกับการย่อยสลายไพรีนที่เพิ่มขึ้น

Patel และคณะ (2009) ศึกษาการย่อยสลาย ฟลูออแรนทรีนด้วยราในกลุ่ม Basidiomycetes คือ *Pleurotus ostreatus* HP-1 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ manganese peroxidase (MnP) และ laccase ซึ่งสามารถย่อยสลาย ฟลูออแรนทรีน ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 70 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใน 8 วัน ได้ 54.09% ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มสูงที่สุดในวันที่ 8 เช่นกัน

Dai และคณะ (2010) รายงานว่ารา *Ceratobasidum stevensii* B6 ที่แยกได้จากพืชที่อยู่ในกลุ่ม *Eupharbiaceae* พบว่าเป็นราที่อยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes สามารถผลิตเอนไซม์ manganese peroxidase (MnP) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีนที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสนาน 10 วันได้ 89.51%

Pozdnyakova และคณะ (2010) พบว่ารา *Pleurotus ostreatus* D1 ซึ่งเป็นราที่อยู่ในกลุ่มไวท์รอทที่สามารถผลิตรเอนไซม์ laccase สามารถนำไพรีนมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ ซึ่งเมื่อทดสอบการย่อยสลาย ไพรีนบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลล์เซียส พบว่าภายในเวลา 14 วันราสามารถย่อยสลายไพรีนได้ 65.6± 0.9%

Gao และคณะ (2010) ศึกษาการย่อยสลายแอนทราซีน และ ไพรีนโดยราในกลุ่มไวท์รอท คือ *Pseudotrametes gibbosa* และ *Pleurotus ostreatus* ที่แยกได้จากดินที่เขา Changbai ในป่าแถบตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศจีนโดย *gibbosa* สามารถย่อยสลาย แอนทราซีน และไพรีนที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 43.43% และ 24.26% ตามลำดับ *ostreatus* สามารถย่อยสลายได้ 30.12% และ 18.76% บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

Ye และคณะ (2011) ศึกษาการย่อยสลาย แอนทราซีนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า *Aspergillus fumigates* ที่แยกได้จากดินที่อยู่ใกล้บริเวณปั๊มน้ำมัน สาม ารถย่อยสลายแอนทราซีนได้ 60% ภายใน 5 วัน โดยทดสอบการย่อยสลายที่ pH ที่แตกต่างกันตั้งแต่ 4-10 พบว่าที่ pH 5-7.5 รา *Aspergillus fumigates* สามารถย่อยสลายได้ดี และทดสอบที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันคือที่ 20 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถย่อยสลายได้ดีที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

การบำบัด PAHs โดยใช้แบคทีเรียและราร่วมกัน

ในวิถีการย่อยสลายสารพิษหรือสารประกอบ PAHs โดยการใช้แบคทีเรียและราร่วมกัน ราจะทำหน้าที่ย่อยสลายในขั้นต้นเนื่องจากรามีวิถีการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ที่สร้างขึ้นได้แก่ cytochrom P-450 monooxygenase lignin peroxidases manganese peroxidases และ laccases โดยจะย่อยสลายวงเบนซีนแบบสุ่ม จากนั้นแบคทีเรียจะเข้าย่อยสลายในขั้นต่อไป (Ramírez และคณะ, 2010) การย่อยสลายโดยแบคทีเรียจะใช้วิถีการย่อยสลายแบบ intracellular oxidation และ hydroxylation ซึ่งเป็นการย่อยสลายทำให้วงของสารประกอบอะโรมาติกนั้นเปิดออกโดยใช้เอนไซม์ dioxygenase และ เอนไซม์ dehydrogenase และเซลล์จุลินทรีย์จะสามารถใช้คาร์บอนจากวงอะโรมาติกมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ (Li และคณะ, 2008) การย่อยสลาย PAHs โดยใช้แบคทีเรียและราร่วมกันทำให้มีประสิทธิภาพการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น เพราะการย่อยสลายแบบไม่จำเพาะ กับตำแหน่งต่างๆบนวงอะโรมาติกด้วยเอนไซม์ของรามีผลทำให้รูปแบบของวงอะโรมาติกถูกเปลี่ยนรูปแบบให้เป็นสารที่มีความเป็นพิษลดลง จึงทำให้แบคทีเรียสามารถเข้ามาย่อยสลายวงอะโรมาติกได้ง่ายขึ้น (Sasek และคณะ, 2003) ดังนั้น จึงมีการศึกษาการใช้แบคทีเรียร่วมกับราในการย่อยสลาย PAHs เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์สายพันธุ์เดี่ยว พบว่าการใช้แบคทีเรียร่วมกับรามีประสิทธิภาพการย่อยสลาย ได้มากกว่า (Boonchan และคณะ, 2000; Kohlmeier และคณะ, 2005; Wick และคณะ, 2007) นอกจากนี้เส้นใยของราช่วยในการเคลื่อนตำแหน่งของแบคทีเรีย โดยปกติแล้วแบคทีเรียไม่สามารถเคลื่อนที่ในดินได้ไกลนักแต่เส้นใยของราสามารถช่วยพาแบคทีเรียไปยังดินบริเวณที่ลึกๆได้ เนื่องจากเส้นใยของราสามารถแทรกเข้าไปในที่แคบและลึกได้ จึงทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลาย PAHs ที่ปนเปื้อนดินบริเวณนั้นได้ดีขึ้น จึงทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายได้ (Boonchan และคณะ, 2000) นอกจากนี้รายังใช้เอนไซม์ในการย่อยสลาย PAHs แบบสุ่มไม่เจาะจงกับตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งของ PAHs จึงทำให้โมเลกุลของ PAHs ง่ายต่อการย่อยสลายของแบคทีเรีย (Sasek., 2003) การใช้กลุ่มของแบคทีเรียร่วมกับราจึงเริ่มเป็นที่น่าสนใจต่อไป

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้แบคทีเรียร่วมกับราในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

Boonchan และคณะ (2000) ศึกษาการย่อยสลาย PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงที่ปนเปื้อนในน้ำและในดิน โดยใช้แบคทีเรีย *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10,010 bacterial consortium VUN 10,009 และรา *Penicillium janthinellum* VUN 10,201 ที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนสารป้องกันเนื้อไม้ ซึ่งเมื่อใช้กลุ่มจุลินทรีย์เหล่านี้ร่วมกันสามารถย่อย เบนโซ[*เอ*]ไพรีน ได้ 53% ในเวลา 100 วัน

Cha´vez-Go´mez และคณะ (2003) ทำการทดลองการย่อยสลายฟีแนนทรีนในดินโดยใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ซึ่งใช้แบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Pseudomonas aeruginose, Ralstonia pickettii, Pseudomonas* sp. และ *Pseudomonas cepacea* และใช้รา 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Penicillium* sp., *Trichoderma viride, Alternaria tenuis* และ *Aspergillus terrus* ซึ่งจับคู่กันระหว่างแบคทีเรีย และราได้ทั้งหมด 16 คู่ (4X4) พบว่า *P. cepacea-Penicillium* sp., *R. pickettii-Penicillium* sp. และ *P. aeruginose-Penicillium* sp. สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน ได้สูงสุดคือ 72.84±3.85%, 73.61±6.38% และ 69.47±4.91% ตามลำดับ ในเวลา 18 วัน ซึ่งถ้าใช้แบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยวแต่ละชนิดสามารถย่อยได้ประมาณ 20% และราแต่ละสายพันธุ์สามารถย่อยได้ประมาณ 35%

Arun และคณะ (2008) ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายของราในกลุ่ม Basidiomycetes โดยใช้สายพันธุ์เดี่ยว และใช้แต่ละสายพันธุ์ร่วมกับ *Pseudomonas* ที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน ซึ่ง *Pseudomonas* สามารถย่อยสลายไพรีนที่เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 92.3% รา *Coriolus versicolor* และ *Fomitopsis palustris* ย่อยได้ 42.0% และ 7.3% แต่เมื่อใช้ *Pseudomonas* ร่วมกับรา *C. versicolor* และ *Pseudomonas* ร่วมกับรา *F. palustris* สามารถย่อยสลายไพรีนได้ 93.7% เท่ากันทั้งสองคู่ซึ่งใช้เวลา 28 วัน

Jacques และคณะ (2008) พบว่าการย่อยสลาย PAHs ที่ปนเปื้อนในดิน ซึ่งเติมกลุ่มของจุลินทรีย์ประกอบด้วยรา *Fusarium oxysporum* และกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้แนพธาลีน ได้แก่ *Mycobacterium fortuitum, Bacillus cereus, Microbacterium* sp., *Gordonia polyisoprenivorans* และ *Microbacteriaceae* พบว่าสามารถย่อยสลาย PAHs ได้มีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้รา หรือแ บคทีเรียอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว โดยสามารถย่อยสลายแอนทราซีน ฟีแนนทรีน และไพรีน ที่มีความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของดิน ได้ 99.4% 99.7% และ 96.3% ตามลำดับ

Li และคณะ (2008) ได้ศึกษาการย่อยสลาย PAHs ที่ปนเปื้อนอยู่ในดิน ปริมาณ 15.72 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยแบคทีเรียร่วมกับราที่คัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน โดยศึกษาการย่อยสลายในดินเปรียบเทียบกับสเลอรีในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่าการย่อยโดยกลุ่มแบคทีเรียร่วมกับราสามารถย่อยสลาย แอนทราซีน ฟลูออแรนทรีน และเบนโซ[*เอ*]ไพรีน ที่บำบัดในสเลอรีในถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้ 46.0–75.8%, 50.2–86.1%, และ 54.3–85.7% และในดินสามารถย่อยสลายได้ 45.9–75.5%, 62–83.7%, และ 64.5–84.5% ตามลำดับ

Mancera-López และคณะ (2008) ใช้วิธีการเติมสารอาหาร (Biostimulation) โดยการเติมชานอ้อย และวิธีการเติมจุลินทรีย์ (Bioaugmentation) คือราสายใยได้แก่ *Rhizopus* sp., *Penicillium funiculosum* และ *Aspergillus sydowii* โดยเปรียบเทียบระหว่างใช้วิธีการเติมสารอาหาร Biostimulation อย่างเดียว และการใช้วิธีการเติมสารอาหาร Biostimulation ร่วมกับวิธีการเติมจุลินทรีย์ Bioaugmentation พบว่าการใช้ 2 วิธีร่วมกันสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายให้สูงขึ้นกว่าใช้วิธีการเติมสารอาหารเพียงอย่างเดียว

Wu และคณะ (2008) ศึกษาการย่อยสลาย PAHs หลายชนิดโดยใช้วิธีการเติมจุลินทรีย์คือใช้รา *Monilinia* sp. W5-2 และการเติมสารอาหาร โดยใช้ซังข้าวโพด พบว่าทั้ง 2 วิธีสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ได้เพิ่มมากขึ้นจากชุดควบคุมที่ไม่เติมทั้งสารอาหารและไม่เติมจุลินทรีย์ โดยเมื่อเติมจุลินทรีย์การย่อยสลายเพิ่มขึ้น 32% และในชุดที่เติมสารอาหารการย่อยสลายเพิ่มขึ้น 13% นอกจากนี้การเติมจุลินทรีย์ช่วยเพิ่มการย่อยสลาย PAHs โมเลกุลใหญ่เช่น เบนโซ[*เอ*]ไพรีน ได้ 51%

Li และคณะ (2009) ได้ทดลองใช้แบคทีเรียและราที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อน PAHs เป็นระยะเวลานาน โดยดินมีการปนเปื้อนของ PAHs หลายชนิดและมีความเข้มข้นทั้งหมด 8.33 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ราที่ใช้มี 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Phanerochaete chrysosporium*, *Cunninghamella* sp., *Alternaria alternate*-(Fr.) Keissler, *Penicillium chrysogenum*, และ *Aspergillus niger* และแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus* sp., *Zoogloea* sp. และ *Flavobacterium* sp. โดยทำการทดลองในดินที่ฆ่าเชื้อ แล้วเติมกลุ่มแบคที เรียร่วมกับกลุ่มรา พบว่ามีค่าการย่อยสลาย PAHs 41.3% โดยดินที่ไม่ฆ่าเชื้อแล้วเติมกลุ่มจุลินทรีย์มีค่าการย่อยสลาย PAHs 40.7% และในดินที่ไม่ฆ่าเชื้อและไม่เติมกลุ่มจุลินทรีย์มีค่าการย่อยสลาย PAHs เพียง 35% โดยบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 64 วัน

Zhao และคณะ (2009) เติมสารอาหารได้แก่ เปปโตน ยีตส์สกัด และ กลูโคส พบว่า สารอาหารดังกล่าว สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย ฟีแนนทรีน ของแบคทีเรีย *Pseudomonas stutzeri* ZP2 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปรับ pH เท่ากับ 8 และพบว่า กลูโคสสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายได้มากกว่าสารอาหารชนิดอื่น

Borràs และคณะ (2010) ศึกษาการย่อยสลาย PAHs ผสมที่ปนเปื้อนในดินแถวบริเวณ ทำการเกษตรในเขต Catalunya ประเทศสเปนซึ่งมีการปนเปื้อน 286.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน พบว่ารา *Irpex lacteus* ซึ่งเป็นราในกลุ่มไวท์รอท สามารถย่อยสลายคงเห ลือ 234.9 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม และแบคทีเรียร่วมกันทั้ง 2 สายพันธุ์คือ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Rhodococcus erythropolis* สามารถย่อยสลายคงเหลือ 214.2 เมื่อทดสอบการย่อยสลายของรา และแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ร่วมกันปริมาณ PAHs ที่คงเหลือคือ 195.9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมโดย ใช้เวลาทั้งหมด 5 สัปดาห์

Machín-Ramírez และคณะ (2010) ศึกษาการย่อยสลายร่วมกันของแบคทีเรียและรา โดยพบว่าการย่อยสลาย เบนโซ [*เอ*]ไพรีน ที่ความเข้มข้น 75 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยแบคทีเรีย *Serratia marcescens* สามารถย่อยสลายได้ 32.41% และรา *Penicillium sp*. สามารถย่อยสลาย ได้ 41.57% และเมื่อนำแบคทีเรียและรามาย่อยสลายเบนโซ[*เอ*]ไพรีนร่วมกันพบว่าประสิทธิภาพ ในการย่อยสลายเพิ่มสูงขึ้นเป็น 65% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 5 วัน

Teng และคณะ (2010) ศึกษาโดยการเติมแป้งและกลูโคสเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนโดยเติมโซเดียม ซั คซิเนท เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน หลังจากวันที่ 10 เพิ่มการให้อากาศในดิน และเพิ่มความชื้นในดินเป็น 70% หลังจากนั้นบ่มเป็นเวลา 90 วัน ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นเพิ่มจำนวนมากขึ้นและสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน ได้เพิ่มขึ้นประมาณ 10%-20%

Ling และคณะ (2011) พบว่าการย่อยสลายไพรีนที่มีความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแบคทีเรีย *Bacillus vallismortis* JY3A ที่แยกจากตะกอนดินที่ปนเปื้อนน้ำมันที่ปั๊มชื่อ Jinan ที่อำเภอ Shandong ประเทศจีน และราในกลุ่มไวท์รอท *Phanerochaete chrysosporium* JY16 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 7 วัน ซึ่งแบคทีเรียสามารถย่อยสลายไพรีนได้ 10.8% และราสามารถย่อยสลายได้ 25.1% ประสิทธิภาพการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเมื่อนำแบคทีเรียและรามาย่อยสลายร่วมกันได้ 55.4%

Wen และคณะ (2011) ศึกษาการย่อยสลาย ไพรีน โดยรากลุ่ม ราไวท์รอท คือ *Pseudotrametes gibbosa* ที่แยกได้จากดินที่ภูเขา ChangBai ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศจีน ซึ่งใช้วิธีการเติมสารอาหาร (Biostimulation) ร่วมด้วย ได้แก่ กลูโคส แป้งข้าวโพด รำข้าวสาลี และ ขี้เลื่อยเพื่อทดสอบดูประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีน พบว่าเมื่อเติมสารอาหารจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพการย่อยสลาย ไพรีน ได้เพิ่มมากขึ้น

กลุ่มแบคทีเรีย STK ประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *Zoogloea* sp. *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. แยกได้จากปุ๋ยหมักใบมะขามที่มีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก และสามารถย่อยสลายฟลูออรีน และแอนทราซีนที่มีความเข้ มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 31.16 และ 62.21 มิลลิกรัมต่อลิตรภายใน 14 วัน ตามลำดับ สามารถย่อยสลายไพรีนในอาหารเหลวได้หมดในเวลา 14 วัน (ทิมากร แสงดำ, 2547) รา *Agrocybe* sp. CU-43 ชื่อสามัญว่า เห็ดยานาหงิ คัดแยกจากดอกเห็ดที่ศูนย์รวมเห็ด บ้านอรัญญิก จ . นครปฐม รา สายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส สามารถย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิด เช่นย่อยฟลูออรีนที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้หมดภายใน 6 วัน สามารถย่อยแอนทราซีน และฟีแนนทรีนได้ 91.2% และ 99.2 % ภายใน 21 วัน นอกจากนี้สามารถย่อยฟลูออแรนทรีน และไพรีนได้ 67.9% และ 81.2% ตามลำดับ (กุลนี ชูพึ่งอาตม์, 2550; Chupungarsและคณะ,2009)

บทที่ 3
อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์

1. กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
2. กระดาษกรอง (filter paper) เบอร์ 1 ของบริษัท Whatmann, USA
3. หลอดฝาเกลียว (Vial) ขนาด 22 มิลลิลิตร (Screw cap with teflon finer) ของบริษัท Pyrex Lab System, Thailand
4. ขวดแก้วใสฝาเกลียว (Duran) ขนาด 250, 500, 1000 มิลลิลิตร ของบริษัท Pyrex Lab System, Thailand
5. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England
6. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunswick Scientific, USA
7. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น MP 125 ของบริษัท Mettler-Toledo, Switzerland
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan
   - หัวหมุนเหวี่ยง (rotor) ขนาดเล็ก รุ่น RA50J
   - หัวหมุนเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA22
9. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
10. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA
11. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan
12. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE (polytetrafluoroethylene) ขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan

13.ชุดเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี (Gas Chromatography, GC)

- เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น 6890N ของบริษัท Agilent Technologies, USA
- คอลัมน์ (column) ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วย เฟนนิลเมธิลไซโลเซน ความเข้มข้น 5 % หนา 0.25 ไมโครเมตร
- เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิด Frame Ionization Detector (FID)
- เข็มฉีดยาขนาดเล็ก (microsyrings) ขนาด 10 ไมโครลิตร

14. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO laminar flow รุ่น BVT-124 ของบริษัท International Scientific Supply, USA. และ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
15. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ –20 °ซ ของบริษัท Sanyo Electric, Japan
16. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ –70°ซ รุ่น ULT1786 ของบริษัท Forma Scientific, USA
17. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ของบริษัท Memmert, Germany
18. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
19. ตู้อบแห้ง (Oven) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand
20. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 2, 10, 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France
21.เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท KoKusan, Japan
22.เครื่องตรวจสอบเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000™ บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
23.ชุดเครื่องเจลอิเล็กโทรฟอเรซิส mini Gel migration trough รุ่น i-mupid บริษัท COSMO BIO, Japan
24. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
25. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer, USA
26. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Mikro20 บริษัท Hettich zentrifuge, Germany

27. เครื่องตรวจสอบเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000™ บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
28. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer, USA
29. ชุดเครื่องเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส mini Gel migration through รุ่น i-mupid บริษัท COSMO BIO, Japan
30. ชุดเครื่องมือ DCode™ system บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA

เคมีภัณฑ์

1. แอนทราซีน ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
2. อะซีแนพธีน ของบริษัท Sigma, USA
3. อะซีแนพธิลีน ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
4. ฟีแนนทรีน ของบริษัท Sigma, USA
5. ไพรีน ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
6. ฟลูออรีน ของบริษัท Sigma, USA
7. ฟลูออแรนทรีน ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
8. ไดเบนโซฟูแรน ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
9. ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (CH_3SOCH_3) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy
10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
11. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia
12. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia
13. อะซีโตน ของบริษัท Merck, Germany
14. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France
15. โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia
16. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France
17. แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) ของบริษัท Carlo ERBA, France
18. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) ของบริษัท May & Baker, England
19. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia
20. แบคโตอะการ์ ของบริษัท Difco Laboratories, USA
21. ทริปโตน ของบริษัท Difco Laboratories, USA
22. ผงสกัดจากยีสต์ ของบริษัท Difco Laboratories, USA
23. ผลสกัดจากมอลท์ ของบริษัท Difco Laboratories, USA
24. เพปโตน ของบริษัท Difco Laboratories, USA
25. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
26. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท Merck, Germany
27. สารปฏิชีวนะนิสเตติน ของบริษัท Bio Basic INC., Canada
28. เมธานอล (CH_3OH) ของบริษัท Merck, Germany
29. นอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) ของบริษัท J.T. Baker, USA

30. Triton-X 100 ของบริษัท Research organic, USA
31. Proteinase K บริษัท US.Biological, US
32. ชุดเอนไซม์ Taq DNA polymerase บริษัท New England Biolabs, USA
33. ฟีนอล (phenol) บริษัท Merck, Germany
34. อะกาโรสเจล (agarose gel) บริษัท IUAI, Japan
35. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
36. ไอโซโปรพานอล (isopropanol) บริษัท Merck, Germany
37. Lambda *Hind*III บริษัท Bio-Rad, UK
38. 100 base pair DNA ladder บริษัท Bio-Rad, UK
39. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) บริษัท Nacalai Tesque, Japan
40. อะกาโรสเจล (agarose gel) บริษัท IUAJ, Japan
41. 100 bp DNA ladder บริษัท Geneaid, Tiawan
42. Lambda *Hind*III บริษัท Bio-Rad, UK
43. Trizma base (tris[hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) บริษัท Sigma, USA
44. ไรโบนิวคลีเอสเอ Rnase A บริษัท Promega, USA
45. โปรตีนเนสเค (Proteinase K) บริษัท US.Biological, USA
46. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_22H_2O$) บริษัท Sigma, USA
47. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) บริษัท Nacalal tesque, Japan
48. *Taq* DNA polymerase บริษัท TAKARA, Japan บริษัท Fernentas, USA บริษัท New England Biolabs, USA บริษัท Qiagen, Germany และ บริษัท BioExellence, Thailand
49. ชุด Gel / PCR DNA Fragments extraction kit บริษัท Geneaid. Taiwan

50. สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค DGGE บริษัท Bio-Rad, USA

Formamide (Deionize)

40% Acrylamide/Bis solution, Ultra Prue Grade, 37.5:1 (2.6% C)

Urea

Ammonium persulfate (APS), ACS Grade

TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine)

50xTAE

Dye solution

Ethidium bromide solution เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เตรียมกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43

3.1.1 จุลินทรีย์

กลุ่มแบคทีเรีย STK เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากปุ๋ยหมักใบมะขาม ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ได้แก่ สกุล *Zoogloea* sp. *Stenotrophomonas* sp และ *Mesorhizobium* sp. กลุ่มแบคทีเรียเหล่านี้มีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก และมี ความสามารถในการย่อยสลายไพรีน ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้หมดภายในเวลา 14 วัน นอกจากนี้ สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน ไดเบนโซฟูแรน และ ฟลูออรีน (ทิมากร แสงดำ, 2547)

รา *Agrocybe* sp. CU-43 ชื่อสามัญว่า เห็ดยานาหงิ คัดแยกจากดอกเห็ดที่ศูนย์รวมเห็ดบ้านอรัญญิก จ . นครปฐม ราสายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส สามารถย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิด เช่น ย่อยฟลูออรีนที่ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้หมดภายใน 6 วัน สามารถย่อยแอนทราซีนและฟีแนนทรีนได้ 91.2% และ 99.2 % ภายใน 21 วัน นอกจากนี้สามารถย่อยฟลูออแรน ธรีน และไพรีนได้ 67.9% และ 81.2% ตามลำดับ (กุลนี ชูพึ่งอาตม์, 2550; Chupungars และคณะ, 2009)

3.1.2 การเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK

เลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) (Sambrook และ Russell, 2001) (ภาคผนวก ก) 100 มิลลิลิตร บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ถ่ายเชื้อ 10% โดยปริมาตร ลงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM (Carbon-free mineral medium) (Komukai-Nakamura และคณะ, 1996) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่มีไพรีนและฟีแนนทรีน ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนในการเจริญ บ่มที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 8 วัน

3.1.3 การเลี้ยงรา *Agrocybe* sp. CU-43

เลี้ยงรา *Agrocybe* sp. CU-43 บนอาหารแข็ง MEA (malt extract agar) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อ โดยนำสายใยราบนจานอาหารแข็งจำนวน 1 จานถ่ายลงอาหารเหลว Modified Glucose Peptone Yeast extract (mGPY) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่มีลูกแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน (Chupungars และคณะ, 2009)

3.1.4 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

ปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียหรือราด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 2 ครั้ง สำหรับเซลล์แบคทีเรียนำตะกอนแขวนลอยในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ และเจือจางให้มีการดูดกลืนด้วยแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 1 ซึ่งเท่ากับจำนวนเซลล์แบคทีเรียประมาณ 10^8 CFU/มล. กรณีราหลังจากปั่นเหวี่ยง ตักเซลล์รา 10% น้ำหนักต่อปริมาตร โดยชั่งน้ำหนักเซลล์ด้วยเครื่องชั่ง ทำโดยวิธีปลอดเชื้อจากนั้นถ่ายเซลล์ลงในอาหารเหลว

3.2 การย่อยสลาย PAHs ของกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU- 43 ในอาหารเหลว

3.2.1 การย่อยสลาย PAHs ของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเหลว

ศึกษาการเจริญและความสามารถในการย่อยสลาย PAHs 8 ชนิดได้แก่ แอนทราซีน อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลี น ฟีแนน ทรีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธรีน ไพรีน และ ไดเบนโซฟูแรน ที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเหลว CFMM 5 มิลลิลิตร โดยเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ประมาณ 10^8 CFU/มล. เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน เก็บตัวอย่างทุก 7 วัน วัดการเจริญของแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.6.1

3.2.2 การย่อยสลาย PAHs ของรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในอาหารเหลว

ศึกษาการเจริญและความสามารถของรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในการย่อยสลาย PAHs 8 ชนิดได้แก่ แอนทราซีน อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธรีน ไพรีน และ ไดเบนโซฟูแรน ที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรที่เตรียมในไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (ภาคผนวก ข) ลงในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด (Nitrogen-limiting medium หรือ N-limiting medium) (ภาคผนวก ก) ที่มีกลูโคส 1% ปริมาตร 45 มิลลิลิตรที่มีลูกแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เติมรา *Agrocybe* sp. CU- 43 ปริมาณ 5 กรัมน้ำหนักเปียก เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 7 วันเป็นเวลา 14 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วัดการเจริญของราโดยวิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามวิธีในข้อ 3.6.2 สกัด PAHs ที่เหลือในอาหาร 3.7.1 และตรวจหาปริมาณ PAHs ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) ตามวิธีของ Grifoll และคณะ (1995) ตามวิธีในข้อ 3.6.2 ชุดควบคุมคือชุดที่ไม่เติมรา *Agrocybe* sp. CU- 43

3.3 การย่อยสลาย PAHs ของกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดิน

3.3.1 การเตรียมดิน

เก็บตัวอย่างดินจากสวนกล้วยไม้ อ . ครบุรี จ . นครราชสีมา ที่ไม่มีประวัติการปนเปื้อน PAHs โดยการขุดดินลึกลงไปประมาณ 15 เซนติเมตรเพื่อจะได้ดินที่ปราศจากการปนเปื้อน PAHs จากนั้นนำตัวอย่างดินมาตากแดดนาน 5 วัน และคัดกรองดินด้วยเครื่องคัดกรองขนาดดินที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 มิลลิเมตร ตรวจสอบการปนเปื้อน PAHs ในดินตัวอย่างตามวิธีในข้อ 3.7 วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ลักษณะเนื้อดิน โครงสร้างดิน ค่าความจุของการอุ้มน้ำ ที่กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณสารอินทรีย์ ฟอสฟอรัส โปแทสเซียม ไนโตรเจน อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ที่ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เก็บตัวอย่างดินที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43

เตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ตามวิธีข้อ 3.1.2 ปรับปริมาณเซลล์เป็นประมาณ 10^8 CFU/มล. และเตรียมหัวเชื้อรา *Agrocybe* sp. CU-43 โดยนำเมล็ดข้าวฟ่าง 20 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 45 นาที ตัดชิ้นวุ้นด้วยแกนโลหะสำหรับเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. จากราที่เลี้ยงบน MEA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 วัน จำนวน 10 ชิ้น วางชิ้นวุ้นบนเมล็ดข้าวฟ่างที่ปลอดเชื้อเติม N-limiting medium ปริมาตร 10 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตามวิธีของ Chupungars และคณะ, (2009)

3.3.3 การทดสอบความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย STK และ/หรือรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในการย่อยสลาย PAHs ในดิน

แบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด ได้แก่

ก. ดินที่ไม่ปลอดเชื้อที่เติม PAHs และข้าวฟ่างที่ปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุมเพื่อตรวจสอบการลดลงของ PAHs เนื่องจากปัจจัยทางกายภาพ และชีวภาพในดิน

ข. ดินที่ไม่ปลอดเชื้อที่เติม PAHs และเติมเฉพาะกลุ่มแบคทีเรีย STK

ค. ดินที่ไม่ปลอดเชื้อที่เติม PAHs และเติมเฉพาะรา *Agrocybe* sp. CU-43

ง. ดินที่ไม่ปลอดเชื้อที่เติม PAHs เติมเชื้อผสมของกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43

เลือก PAHs ชนิดที่กลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43 สามารถย่อยสลายได้น้อยที่สุดในอาหารเหลวจากข้อ 3.2 จำนวน 4 ชนิดเพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย PAHs โดยใช้กลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดิน

3.3.3.1 การย่อยสลาย PAHs ของกลุ่มแบคทีเรีย STK และ รา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดิน

ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อจากข้อ 3.3.1 ผสมขี้เลื่อยสำเร็จรูป 10 % (ภาคผนวก ง)(กุลนี ชูพึ่งอาตม์, 2550) จำนวน 2 กรัม เติม ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธรีน และ ไพรีน ที่มีความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ปรับความชื้นที่ 70% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำด้วย N-limiting medium ที่ปลอดเชื้อ เติมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรียจากข้อ 3.1.2 ปริมาณ 10^8 CFUต่อกรัมดิน เติมราที่เจริญบนเมล็ดข้าวฟ่าง จากข้อ 3.3.2 จำนวน 10 เมล็ด ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 7 วันเป็นเวลา 21 วัน ทุกชุดการทดลองทำ 3 ครั้ง วัดการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count ตามวิธีในข้อ 3.6.1 การเจริญของราตามวิธีในข้อ 3.6.2 สกัดสาร PAHs ที่เหลืออยู่ในดิน 3.7.2 และตรวจหาปริมาณ PAHs ด้วย แก๊สโครมาโทกราฟีตามวิธีในข้อ 3.7.3 ชุดควบคุมคือชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK อย่างเดียว ชุดที่เติมรา *Agrocybe* sp. CU- 43 อย่างเดียว และ ชุดที่ไม่เติมทั้งกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU- 43

3.4 การย่อยสลาย PAHs ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในดิน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43

ทดสอบความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในการย่อยสลาย PAHs ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันในดิน นำหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STKจำนวน 10^8 CFU/กรัมดิน และ รา *Agrocybe* sp. CU-43 ที่เจริญบนเมล็ดข้าวฟ่างจำนวน 10 เมล็ดลงในดิน 2 กรัมที่บรรจุในหลอดฝาเกลียวขนาดเล็ก เติม ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน ฟลูออแรน ธรีน และ ไพรีน ที่มีความเข้มข้นชนิดละ 100 200 หรือ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้องเก็บตัวอย่างทุก 7 วันเป็นเวลา 21 วัน แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ครั้ง วัดการเจริญตามวิธีในข้อ 2.3 สกัดสาร PAHs ที่เหลืออยู่ในดิน และตรวจหา ปริมาณ PAHs ด้วย GC ตามวิธีในข้อ 3.2.4 และ 3.2.5 ชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK อย่างเดียว ชุดที่เติมรา *Agrocybe* sp. CU- 43 อย่างเดียว และ ชุดที่ไม่เติมทั้งกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU- 43

3.5 การติดตามพลวัตรประชากรของกลุ่มแบคทีเรีย STK และราในดิน Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

3.5.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp.CU-43 จากในดินโดยใช้ชุด FAST DNA SPIN KIT FOR SOIL (MP Biomedicals LLC, USA)

เตียมตัวอย่างดิน 500 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์สำเร็จรูปที่มี Lysing Matrix E Tube และเม็ดบีด จากนั้นเติม MT บัปเฟอร์ ปริมาตร 122 ไมโคลิตร โซเดียมฟอสเฟต บัปเฟอร์ ปริมาตร 978 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Homoginizer ความเร็ว 46 รอบ / 30 วินาที ทำ 2 ครั้ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ นาน 30 นาทีสลับมาบ่มที่อุณหภูมิ -80 °ซ นาน 30 นาทีจำนวน 3 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำส่วนใสถ่ายใสหลอด Catch tube หลอดใหม่ เติม PPG 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยมือ 10 รอบ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ถ่ายใสหลอด เอ็ปเพ็นด็อรปหลอดใหม่หลอดละ 500 ไมโคลิตรเติม binding matrix suspension 1 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมาด้วยมือเบานาน 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ดูดส่วนบนออก 250 ไมโครลิตรทิ้ง จากนั้นถ่ายส่วนที่เหลือครั้งละประมาณ 600 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครฟิวจ์ที่มี SPIN™ filter จนหมด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีนาน 2 นาที นำส่วนใสที่ตกลงมาใต้แผ่นกรองทิ้งจากนั้นเติม SEWS-M 500 ไมโครลิตรใน SPIN™ filter นำไปปั่นเหวียงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีนาน 2 นาที จากนั้นนำ SPIN™ filter ออกมาใส่ในหลอด Catch tube หลอดใหม่ผึ่งให้แห้งนาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เติม DES 50 ไมโครลิตร ใช้ปลายทริปคนเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีนาน 2 นาที จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.2 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน ถ่ายเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อแยกเซลล์ ถ่ายส่วนของเหลวออก ทำซ้ำ 3 ครั้งจนได้ปริมาณเซลล์ตามต้องการ เติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 567 ไมโครลิตร ในตะกอนเซลล์ที่ได้ ผสมให้เข้ากันเบาๆ เพื่อให้ตะกอนกระจายตัวด้วยไมโครปิเปต เติมสารละลาย SDS เข้มข้น 10% ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมโดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ เติม โปรตีเนสเค (Proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) (ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของโปรตีเนสเคใน 0.5% SDS) ผสมโดยการกลับหลอดไป มา บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยการกลับหลอดไปมา เบาๆ เติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา เบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (โดยปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ปริมาตร 700 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมกันจนกลายเป็นอิมัลชัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสด้านบน ซึ่งเป็นส่วนที่มีดีเอ็นเอ ถ่ายลงในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ จากนั้นเติมสารละลาย ฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ปริมาตร 800 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายของเหลวส่วนบนใส่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ อีกครั้ง เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนใส ผสมโดยกลับหลอดไปมาจนปรากฏตะกอนสีขาวของดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีนาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทานอล 70% ที่เย็นจัด 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาทีเพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอเทส่วนใสทิ้งจากนั้นนำตะกอนดีเอ็นเอ สีขาวมาระเหยแห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายดีเอ็นเอด้วย บัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) เก็บส่วนใสที่มีดีเอ็นเอ เติมสารละลาย RNase เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตรเพื่อกำจัด อาร์เอ็นเอ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.3 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอของรา *Agrocybe* sp. CU-43

เตรียมหัวเชื้อรา *Agrocybe* sp. CU-43 ตามวิธีในข้อ 3.2.2 จากนั้นตักเส้นใยราใส่กระดาษอลูมิเนียมทำโดยวิธีปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °ซ และนำเส้นใยราราไปทำให้แห้งโดยวิธีไลโอฟิไลซ์ (Lyophilization) เก็บรักษาเส้นใยที่อุณหภูมิ – 20 °ซ

การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอของรา *Agrocybe* sp. CU-43 ดัดแปลงวิธีจาก Reader และ Broda (1985) นำเส้นใยราที่ทำให้แห้งทั้งหมดชั่งน้ำหนักจดบันทึกไว้ แล้วนำมาบดในโกร่งบดโดยเติมไนโตรเจนเหลวจนสายใยรามีลักษณะเป็นผงละเอียด จากนั้นเติม extraction buffer ปริมาณ 10 เท่าของน้ำหนักสายใยราทั้งหมดใช้โกร่งกวนผสมเบาๆให้เป็นเนื้อเดียวกัน ระวังอย่าให้เกิดฟอง แบ่งใส่หลอดเอ็ปเพ็นด็อรปหลอดละ 500 ไมโครลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ นาน 30 นาที เติมฟีนอล/คลอโรฟอร์มโดยดูดจากส่วนล่างของภาชนะที่บรรจุ 50 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) กลับหลอดไปมาเบาๆด้วยมือ 20 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 60 นาที ดูดส่วนใสส่วนบนถ่ายใส่หลอดเอ็ปเพ็นด็อรปใหม่หลอดละ 500 ไมโครลิตร เติม RNaseA ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 30 นาทีจากนั้นเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม อีกครั้งผสมกลับไปมาด้วยมือเบาๆ 20 ครั้งปั่นเหวี่ยงที่สภาวะเดิม และนำส่วนใสมาตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมสารละลายโซเดียมอะซีเทตความเข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) 0.1 เท่าของส่วนใส และเติม 100% เอทานอล ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส จากนั้นกลับหลอดไปมาด้วยมือเบาๆ จนเห็นตะกอนสีขาว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 15 นาทีเทส่วนใสทิ้งจากนั้นล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 5 นาที ดูดเอทานอลออกแล้วทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกครั้ง เทเอทานอลทิ้งระวังตะกอนหลุดออกมา ผึ่งตะกอนที่อุณหภูมิ 37 °ซ จนตะกอนแห้ง ละลายดีเอ็นเอโดยใช้ TE บัปเฟอร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 20-30 ไมโครลิตรขึ้นอยู่กับปริมาณตะกอนดีเอ็นเอ เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °ซ

3.5.4 การกำจัด Humic acid ที่ปนเปื้อนและตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ

เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1% โดยหลอมเหลวในบัฟเฟอร์ TAE ที่มีความเข้มข้นเป็น 1 เท่า (ภาคผนวก ข) รอให้อุณหภูมิลดลงอยู่ที่ประมาณ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นเทเจลอะกาโรสลงในถาดแม่พิมพ์โดยมีหวีกั้น ทิ้ งให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที ใส่แผ่นอะกาโรสเจลลงในแชมเบอร์ จากนั้นนำบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า เททับบนแผ่นอะกาโรสเจลให้ท่วมสูงเหนือเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร เตรียมสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตรผสมกับสีติดตาม 1 ไมโครลิตร จากนั้นหยอดสารละลายดีเอ็นเอที่ผสมสีติดตามลงในช่องบนแผ่นอะกาโรสเจล แล้วต่อกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ ให้ไหลผ่านแผ่นอะกาโรสเจล นาน 30 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) นาน 15 นาที นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ด้วยเครื่องตรวจสอบเจล (Gel Documentation)

การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย Glass powder for recovery of DNA EASY TRAP™ (TAKARA BIO INC, Japan) ซึ่งปฏิบัติตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยตัดเจล บริเวณที่ปรากฏแถบดีเอนเอ ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ เติม NaI ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักอะกาโรสเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ผสมโดยการกลับหลอดไปมาทุกๆ 5 นาทีจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมด จากนั้นเติม glass milk ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อ 1 ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอจับกับ glass milk จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วินาที เทส่วนน้ำใสทิ้งแล้วเติม washing buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยไมโครปิเปต แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ภาวะเดิม ดูดส่วนน้ำใสส่วนบนออก จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเพื่อให้ washing buffer ระเหยออกจน glass milk แห้ง แล้วเติม TE Buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1-2 เท่าของ glass milk นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อชะล้างสายดีเอ็นเอให้หลุดออกจาก glass milk นำส่วนใสที่มีดีเอ็นเอเก็บในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

3.5.5 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

3.5.5.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณอัตราส่วนที่ความยาวคลื่น 260/280 ถ้ามีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนสูง แต่ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนอยู่สูง

การคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) = A_{260} X 50 X ค่าความเจือจาง

3.5.5.2 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ที่บริเวณ 16S rDNA ของกลุ่มแบคทีเรีย STK

ไพร์เมอร์ที่ใช้คือ 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') ซึ่งมี GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG-3') เชื่อมต่อบริเวณ 5' และ 520R (5'- ACCGCGGCTGCTGGC -3') (Muyzer และคณะ,1993) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ PCR ความยาวประมาณ 200 bp โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาเป็นดังนี้

สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 3 ไมโครลิตร (ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1X buffer) สารละลาย dNTP (ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์) 0.6 ไมโครลิตร forward primer (341F) และ reverse primer (520R) ความเข้มข้นชนิดละ 20 พิโคโมล (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 ไมโครโมลาร์) 1 ไมโครลิตร สารละลาย DNA แม่แบบ (ความเข้มข้น ประมาณ 100 ng) 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 หน่วย) 0.2 ไมโครลิตร ผสมส่วนประกอบต่างๆแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 30 ไมโครลิตร ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันเบาๆระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ส่วนผสมทั้งหมดข้างต้นต้องแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) (Biorad, USA) ตั้งโปรแกรมตามขั้นตอนดังนี้

1. Initial denaturation step อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที
2. Touchdown program จำนวน 20 รอบ
    2.1 Denaturation step อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
    2.2 Annealing step อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
    (อุณหภูมิลดลงทีละ 0.5 องศาเซลเซียส ในแต่ละรอบ)
    2.3 Extension step อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที
3. Denaturation step อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
4. Annealing step อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
5. Extension step อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที
6. ทำขั้นตอนที่ 3-5 จำนวน 30 รอบ
7. Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที

3.5.5.3 การเพิ่มจำนวนจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ที่บริเวณ internal transcribed spacer ของรา *Agrocybe* sp. CU-43โดยใช้ไพรเมอร์

ใช้ไพร์เมอร์ ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') (White และคณะ, 1990) ที่มี GC clamp (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3') (Heuer และคณะ, 1997) เชื่อมต่อบริเวณ 5' และ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White และคณะ, 1990) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ผลิตภัณฑ์ PCR มีความยาวประมาณ 700 bp โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาตามข้อที่ 3.5.3.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) (Biorad, USA) ตั้งโปรแกรมตามขั้นตอนดังนี้

1. Initial denaturation step อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที
2. Touchdown program จำนวน 20 รอบ
    2.1 Denaturation step อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
    2.2 Annealing step อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
    (อุณหภูมิลดลงทีละ 0.5 องศาเซลเซียส ในแต่ละรอบ)
    2.3 Extension step อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที
3. Denaturation step อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
4. Annealing step อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
5. Extension step อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที
6. ทำขั้นตอนที่ 3-5 จำนวน 30 รอบ
7. Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี อะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟริซิสที่เติมบัฟเฟอร์ TAE ที่มีความเข้มข้น 1 เท่า (ภาคผนวก ข) เตรียมอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2% (ภาคผนวก ข) เตรียมเจลตามวิธีในข้อ 3.5.4

3.5.5.4 การวิเคราะห์ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ DGGE ของ DCode™ system (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) เตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 8% ที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 30 – 70% (ภาคผนวกข) จากสารละลาย denaturant 100% ที่มีส่วนประกอบของ urea และ 40% formamide (ภาคผนวก ข) การทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant โดยใช้ระบบการจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ หลังจากทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant ลงในชุดแซนวิชเตรียมเจลแล้ว ต้องเสียบหวีลงไประหว่างกระจกแซนวิช ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทิ้งให้อะคริลาไมด์เจลแข็งตัวนาน 6 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำชุดแซนวิชใส่ในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 7 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนจนได้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ผสมผลิตภัณฑ์ PCR กับสีติดตาม จากนั้นหยอดตามช่องวิ่ง แล้วทำอีเลคโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ 130 โวลต์ ที่ 60 องศาเซลเซียสนาน 5 ชั่วโมง ย้อมพอลิอะคริลาไมด์เจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) นาน 20 นาที นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ด้วยเครื่องตรวจสอบเจล (Gel Documentation)

3.6 การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์

3.6.1 การวัดการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK

แขวนลอยเซลล์แบคทีเรียในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% โดยเจือจางให้เซลล์มีความเข้มข้นที่เหมาะสม เกลี่ยเซลล์บนอาหารแข็ง LB ในกรณีที่ต้องการหาจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ได้ให้เลี้ยงบนอาหารแข็ง CFMM ที่วางผลึกของ PAHs บนฝาจานอาหาร ในกรณีที่เลี้ยงร่วมกับรามาก่อนให้เติม nystatin เพื่อยับยั้งราโดยเติมที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 2-5 วันนับจำนวนโคโลนี

3.6.2 การวัดการเจริญของรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในอาหารเหลว

ปั่นเหวี่ยงสายใยราที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที ถ่ายเซลล์ลงในกระทงพลาสติกที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น 24 ชั่วโมงจนน้ำหนักคงที่ จ ากนั้นนำเซลล์ไปอบแห้งที่ภาวะเดียวกัน และทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักสายใยรา โดยมีทศนิยมทั้งหมด 4 หน่วย

3.7 การวิเคราะห์ปริมาณ PAHs

3.7.1 การสกัด PAHs ที่คงเหลือในอาหารเหลว

สกัดสาร PAHs ที่เหลือในอาหารเหลวโดยเติม n-hexane ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในตัวอย่างอาหารเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 2 นาที แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง แยกส่วน n-hexane ใส่หลอดทดลองใหม่ เติม anhydrous Na_2SO_4 (ที่ผ่านการอบแห้งข้ามคืนและทิ้งไว้ให้เย็น) เพื่อกำจัดน้ำที่เหลือออกจากชั้นของ n-hexane จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ anhydrous Na_2SO_4 ตกตะกอน ดูดส่วนใสเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์

3.7.2 การสกัด PAHs ที่คงเหลือในดิน

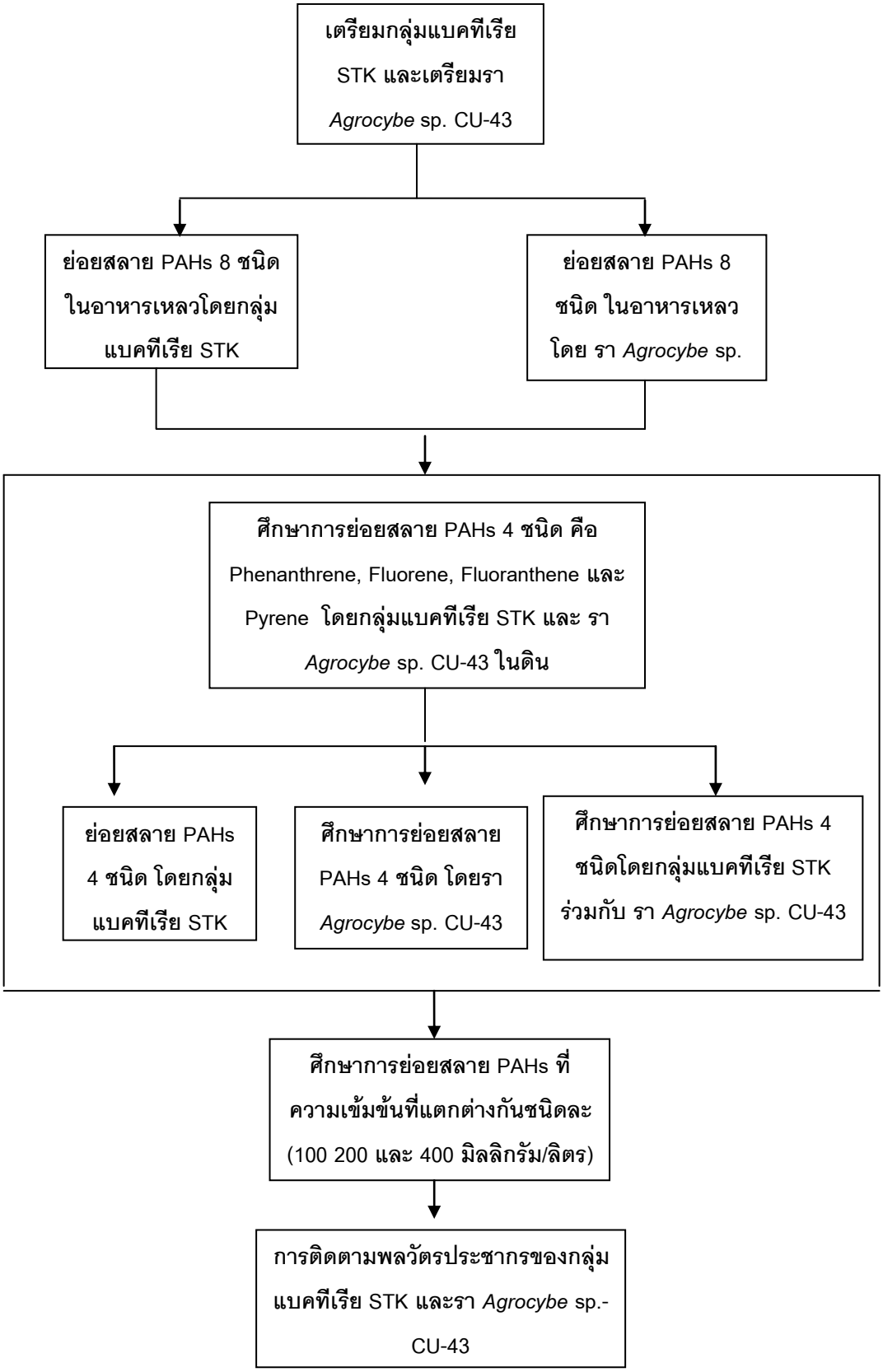
สกัด PAHs ที่คงเหลือในดินโดย เติม n-hexane ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และ เติม 15% Triton-X100 ในปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ในตัวอย่ างดิน 2 กรัม จากนั้นเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างดินแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกส่วนใสส่วนบนถ่ายใสหลอดทดลองหลอดใหม่ เติม anhydrous Na_2SO_4 (ที่ผ่านการอบแห้งข้ามคืนและทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่) เพื่อกำจัดน้ำที่เหลือออกจากชั้นของ n-hexane ตั้งทิ้งไว้ให้ anhydrous Na_2SO_4 ตกตะกอนสักครู่ ดูดส่วนใสเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์

3.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณ PAHs คงเหลือโดยแก๊สโครมาโตรกราฟี

วิเคราะห์ปริมาณ PAHs ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ใช้คอลัมน์ capillary column HP-5 ชนิด 5% Phenyl Methyl Siloxane (30 เมตร x 0.32 มิลลิเมตร x 0.25 เมตร nominal) อุณหภูมิสูงสุด 325 องศาเซลเซียส ชนิดตัวตรวจจับสัญญาณเป็นแบบ Flame ionizing Detector (FID)
ลำดับการตรวจวิเคราะห์ PAHs

- อุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์เริ่มต้นที่ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นช่วงละ 25 องศาเซลเซียสต่อนาที จนกระทั่งอุณหภูมิอยู่ที่ 160 องศาเซลเซียส และคงที่เป็นเวลา 3 นาที
- ช่วงที่ 2 อุณหภูมิเพิ่มขึ้นช่วงละ 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนอุณหภูมิถึง 220 องศาเซลเซียส และคงที่เป็นเวลา 2 นาที
- ช่วงที่ 3 อุณหภูมิเพิ่มขึ้นช่วงละ 40 องศาเซลเซียสต่อนาที จนอุณหภูมิถึง 300 องศาเซลเซียส และคงที่เป็นเวลา 2 นาที
- ช่วงสุดท้ายอุณหภูมิจะคงที่ 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยอัตราการไหลของฮีเลียมเท่ากับ 1.7 มิลลิลิตรต่อนาที

แผนผังงานวิจัย



บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การย่อยสลาย สารประกอบ PAHs ในอาหารเหลวโดย กลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43.

4.1.1 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในอาหารเหลวโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK

ทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย PAHs 8 ชนิดได้แก่ แอนทราซีน อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธรีน ไพรีน และ ไดเบนโซฟูแรน ที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเหลว CFMM โดยเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ประมาณ 10^8 CFU/มล. ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1 แสดงว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถย่อยสลาย ไพรีน และฟี แนนทรีน ได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 14 วัน ในขณะที่ ฟลูออรีนสาม ารถถูกย่อยสลายได้ดีมากคงเหลือ 4.84% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ที่เหลือ 80.03% การสูญหายไปของสารประกอบ PAHs ในชุดควบคุมอาจเกิดจาก การระเหย หรือการออกซิเดชั นด้วยแสง (Haritash และ Kaushik, 2009) ในขณะที่ อะซีแนพ ธิลีน, ไดเบนโซฟูแรน สามารถย่อยสลายได้ปานกลางโดยถูกย่อยสลายคงเหลือ 49.98%, 58.16% อะซีแนพธีน และแอนทราซีนสามารถถูกย่อยสลายได้ต่ำคงเหลือ 71.14% และ 75.09% ตามลำดับ ฟลูออแรนธรีน ไม่สามารถถูกย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในแต่ละชุดการทดลองมีการเจริญคงที่โดยเพิ่มขึ้นเล็กน้อยสูงสุดในวันที่ 3 โดยเพิ่มปริมาณขึ้นประมาณ (8±0.3 log CFUต่อมิลลิลิตร) และเจริญคงที่จนถึงวันที่ 14 ผลทดลองนี้มีผลสอดคล้องกับผลของ ทิมากร แสงดำ (2547)

ตารางที่ 4.1 แสดงการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลว โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK หลังจาก 14 วัน

PAHs	วันที่ 0	ชุดควบคุม (% PAHs ที่เหลืออยู่)	ชุดทดสอบ (% PAHs ที่เหลืออยู่)
ฟีแนนทรีน	100	83.15	0
แอนทราซีน	100	96.09	75.09
อะซีแนพธิลีน	100	57.27	49.98
อะซีแนพธีน	100	79.8	71.14
ฟลูออรีน	100	80.03	4.84
ฟลูออแรนธรีน	100	93.67	94.33
ไพรีน	100	97.79	0
ไดเบนโซฟูแรน	100	74.24	58.16

4.1.2 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในอาหารเหลวโดย รา *Agrocybe* sp. CU-43

นำรา *Agrocybe* sp.CU-43 ไปทดสอบการย่อยสลาย ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน อะซีแนพธิลีน ฟลูออแรนธรีน และ อะซีแนพธีน ที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลว N-limiting medium ภายในเวลา 14 พบว่า PAHs 5 ชนิดมีจำนวน คงเหลือ 23.45%, 28.85%, 67.09%, 69.1% และ 70.91% ตามลำดับ ไพรีนสามารถย่อยสลายได้น้อยคงเหลือมากถึง 76.52% ไดเบนโซฟูแรน และ แอนทราซีน ไม่สามารถถูกย่อยสลายโดยรา *Agrocybe* sp. CU-43 ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ในขณะที่การทดลองของกุลนี *Agrocybe* sp. CU-43 สามารถย่อยสลายฟลูออรีน ได้หมดภายใน 6 วัน ฟีแนนทรีน และแอนทราซีนย่อยสลายคงเหลือ 0.8% และ 8.8% ในวันที่ 21 ฟลูออแรนธรีน และไพรีน คงเหลือ 32.1% และ18.8% หลังจากย่อยสลาย 30 วัน

ตารางที่ 4.2 แสดงการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลว โดยรา *Agrocybe* sp. CU-43 หลังจาก 14 วัน

PAHs	วันที่ 0	ชุดควบคุมวันที่ 14 (% PAHs ที่เหลืออยู่)	ชุดทดสอบวันที่14 (% PAHs ที่เหลืออยู่)
ฟีแนนทรีน	100	96.33	23.45
แอนทราซีน	100	73.17	79.19
อะซีแนพธิลีน	100	105.77	67.09
อะซีแนพธีน	100	105.57	70.91
ฟลูออรีน	100	82.84	28.85
ฟลูออแรนธรีน	100	105	69.1
ไพรีน	100	88.34	76.52
ไดเบนโซฟูแรน	100	105.7	93.57

จากการทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK หรือรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในอาหารเหลวสรุปได้ว่า ไพรีนสามารถถูกย่อยได้โดยกลุ่มแบคทีเรียในขณะที่ ฟลูออแรนธีนไม่ถูกย่อยสลาย และรา *Agrocybe* sp. CU-43 ไม่สามารถย่อยสลายไพรีนขณะที่ฟลูออแรนธีน ย่อยสลายได้ปานกลาง ฟลูออรีน และ ฟีแนนทรีนถูกย่อยสลายได้จากกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43 ดังนั้นในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดย กลุ่มแบคทีเรีย STK และ รา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดิน จึงเพื่อศึกษาว่า การทำงานร่วมกันของกลุ่มแบคทีเรียและรา สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs หรือไม่ ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน ไพรีน และ ฟลูออแรนธรีน จึงถูกเลือกเป็นตัวแทนเพื่อใช้ในการศึกษา ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดิน

4.2 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดย กลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดิน

การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในดิน เตรียมดินปริมาณ 2 กรัมโดยเติมไพรีน ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และฟลูออแรนธรีนที่มีความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมกรัมดิน ซึ่งเตรียมโดยละลายในอะซิโตน ปรับความชื้นในดินให้มีค่าเท่ากับ 70% จากนั้นเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK และ รา *Agrocybe* sp. CU-43 โดยทำการทดลองนาน 21 วัน เก็บตัวอย่างทุก 7 วันเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ PAHs ที่คงเหลือ และตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

4.2.1 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่ใช้ในการทดลอง

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณสวนกล้วยไม้ อำเภอ ครบุรี จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งตัวอย่างดินนี้เป็นดินร่วนปนดินเหนียว มีสีน้ำตาลเข้มออกแดงทดสอบการปนเปื้อน PAHs ตามวิธีในข้อ 3.7 วิเคราะห์ปริมาณ PAHs ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี ตามวิธีในข้อ 3.7.3

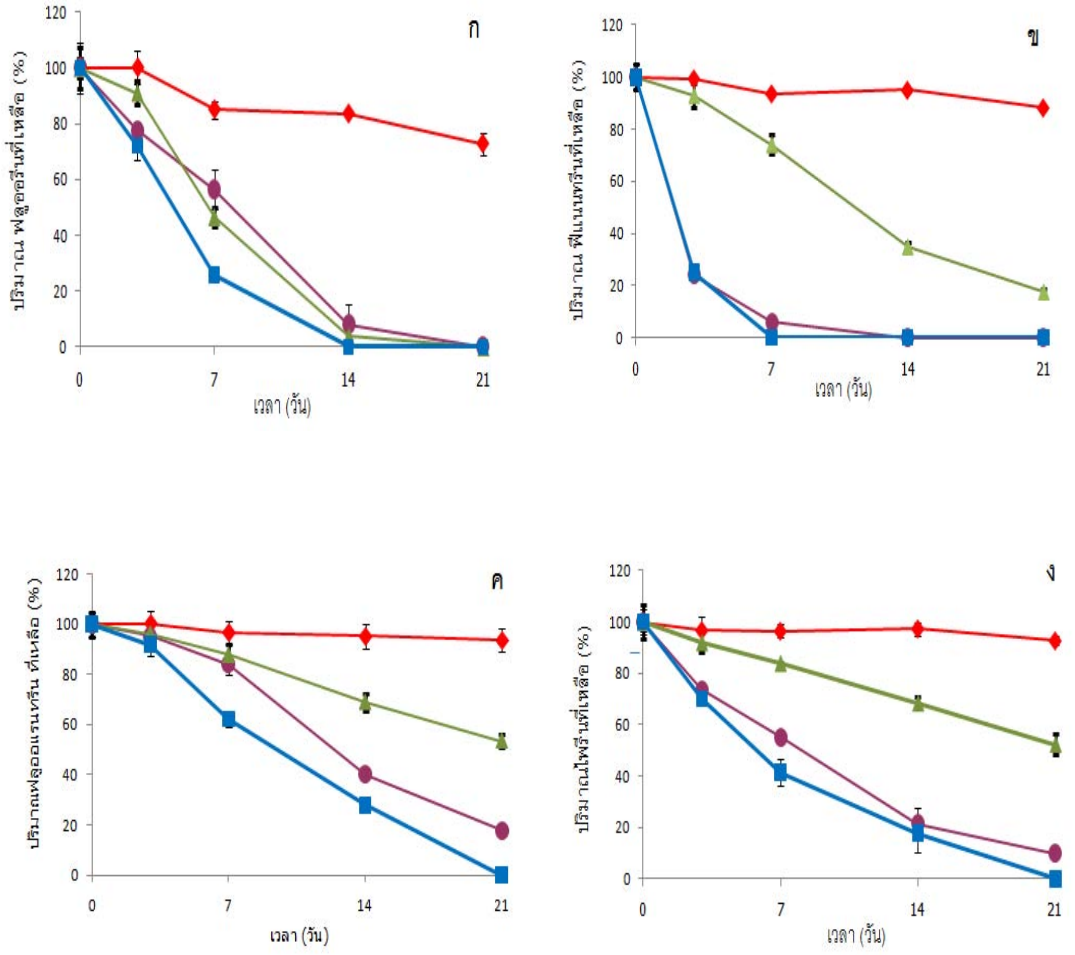
วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร และ ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินตัวอย่างที่นำมาใช้ในการทดลอง

ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมี	ผลจากการวิเคราะห์
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	6.5
ปริมาณสารอินทรีย์ (%)	2.27
ปริมาณฟอสฟอรัส (mg/kg)	502
ปริมาณโปแตสเซียส (mg/kg)	269
ปริมาณไนโตรเจน (%)	0.11
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (%)	12
ปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอน (%)	1.32
ค่าความจุของการอุ้มน้ำ(%)	32.98

4.2.2 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดย กลุ่มแบคทีเรีย STK หรือ รา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดิน ที่ความเข้มข้นของสารประกอบ PAH ชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน

รูปที่ 4.1 แสดงการย่อยสลายฟลูออรีน ฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธรีน และไพรีน รวม 4 ชนิดๆ ละ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK (STK) หรือ รา *Agrocybe* sp. CU-43 (CU-43) และการทำงานร่วมกันของกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43 (STK+CU-43) ซึ่งการย่อยสลาย ฟลูออรีน สามารถถูกย่อยสลายได้หมดภายใน 21 วันโดย STK และ CU-43 ซึ่งจากการทดลองพบว่า CU-43 สามารถย่อยสลายฟลูออรีนได้เร็วกว่า STK และเมื่อศึกษาการย่อยสลาย STK+CU-43 พบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายเพิ่มขึ้นโดยย่อยสลายได้หมดเร็วขึ้นภายใน 14 วัน เมื่อ STK ย่อยสลายฟีแนนทรีนสามารถย่อยสลายได้หมดในวันที่ 14 ซึ่งย่อยสลายได้เร็วกว่า CU-43 ย่อยสลายคงเหลือ 17.59% ในวันที่ 21 ในขณะที่ถูกย่อยสลายโดย STK+CU-43 สามารถย่อยได้หมดภายใน 7 วัน จึงแสดงให้เห็นว่าการย่อยสลายร่วมกันของ STK+CU-43 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย เมื่อเทียบ ในชุดควบคุมคงเหลือ 88.22% ภายใน 21 วัน ฟลูออแรนธรีน และไพรีน เมื่อถูกย่อยสลายโดย STK สามารถย่อยสลายคงเหลือ 17.68% และ9.7% โดยสามารถย่อยสลายได้รวดเร็วกว่าการย่อยสลายโดย CU-43 ซึ่งคงเหลือ 53.46% และ 52.33% ตามลำดับ STK+CU-43 สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 21 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมคงเหลือ 93.63% และ 92.72% จากการทดลองการย่อยสลาย PAHs ทั้ง 4 ชนิดโดย STK สามารถย่อยสลายได้รวดเร็วกว่า CU-43 ยกเว้น ฟลูออรีน และการย่อยสลายร่วมกันโดย STK+CU-43 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ทั้ง 4 ชนิดเมื่อเทียบกับการย่อยสลายโดยใช้เชื้อเดี่ยว ตารางที่ 4.4 แสดงการเจริญของแบคทีเรียในชุดทดลองการย่อยสลายร่วมกันของ STK+CU-43 จำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ทั้ง 4 ชนิดได้มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น log 8.66 CFU ต่อกรัมดิน และเพิ่มจำนวนขึ้นสูงสุดในวันที่ 3 มีจำนวนแบคทีเรีย log 9.17 CFU ต่อกรัมดิน จากนั้นลดลงเล็กน้อยและเจริญคงที่จนสิ้นสุดในวันที่ 21 มีจำนวน log 8.92 ต่อกรัมดิน ในชุดควบคุมในดินไม่ปลอดเชื้อที่เติม PAHs ทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้ มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น log 4.67 CFU ต่อกรัมดิน และค่อยลดลงเล็กน้อยจนถึงวันสุดท้ายในวันที่ 21 มีจำนวน log 4.19 CFU ต่อกรัมดิน การเจริญของแบคทีเรียในชุดควบคุมยังสามารถเจริญได้อาจเนื่องมาจากการใช้สารอาหารที่อยู่ในดินเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโตของเซลล์ แสดงในรูปที่ 4.2 การเจริญของราสายพันธุ์ CU-43 สามารถเจริญเพิ่มมากขึ้นจากวันแรกของการทดลองจนถึงวันสุดท้ายแสดงดังรูปที่ 4.3



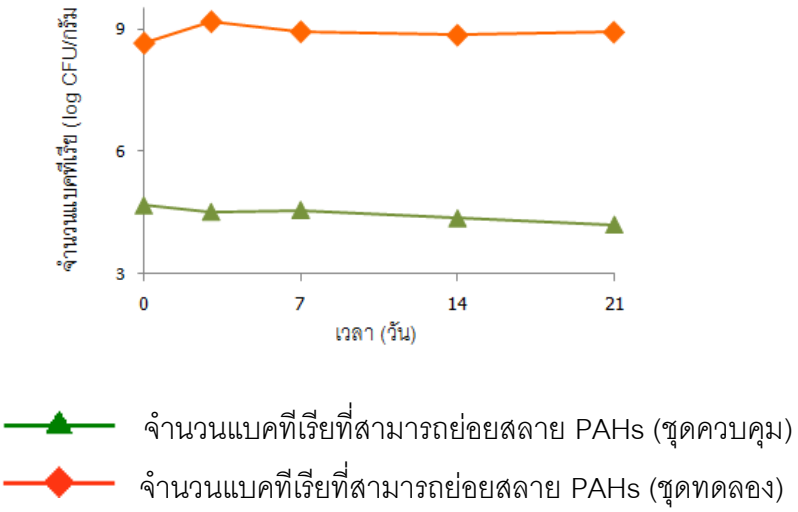
ดินที่ไม่ปลอดเชื้อที่เติม PAHs

ดินที่ไม่ปลอดเชื้อที่เติม PAHs เติมรา *Agrocybe* sp. CU-43

ดินที่ไม่ปลอดเชื้อที่เติม PAHs เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

ดินที่ไม่ปลอดเชื้อที่เติม PAHs เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43

รูปที่ 4.1 แสดงการย่อยสลายของฟลูออรีน (ก) ฟีแนนทรีน (ข) ฟลูออแรนธรีน (ค) และ ไพรีน (ง) รวม 4 ชนิดที่ความเข้มข้นของสารประกอบ PAH ชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ในดินที่ระยะเวลา 21 วัน



รูปที่ 4.2 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ในการย่อยสลายร่วมกันโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK และ รา *Agrocybe* sp. CU-43 ที่ความเข้มข้นของ PAHs รวม 4 ชนิด ชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน

รูปที่ 4.3 แสดงการเจริญของรา *Agrocybe* sp. CU-43 .ในชุดการทดลองการย่อยสลาย PAHs 4 ชนิดโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดินที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน

ตารางที่ 4.4 สรุปปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ในดินหลังจากย่อยสลายเป็นเวลา 21 วันโดยแบคทีเรีย STK, รา *Agrocybe* sp. CU-43 และ แบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43 ที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน

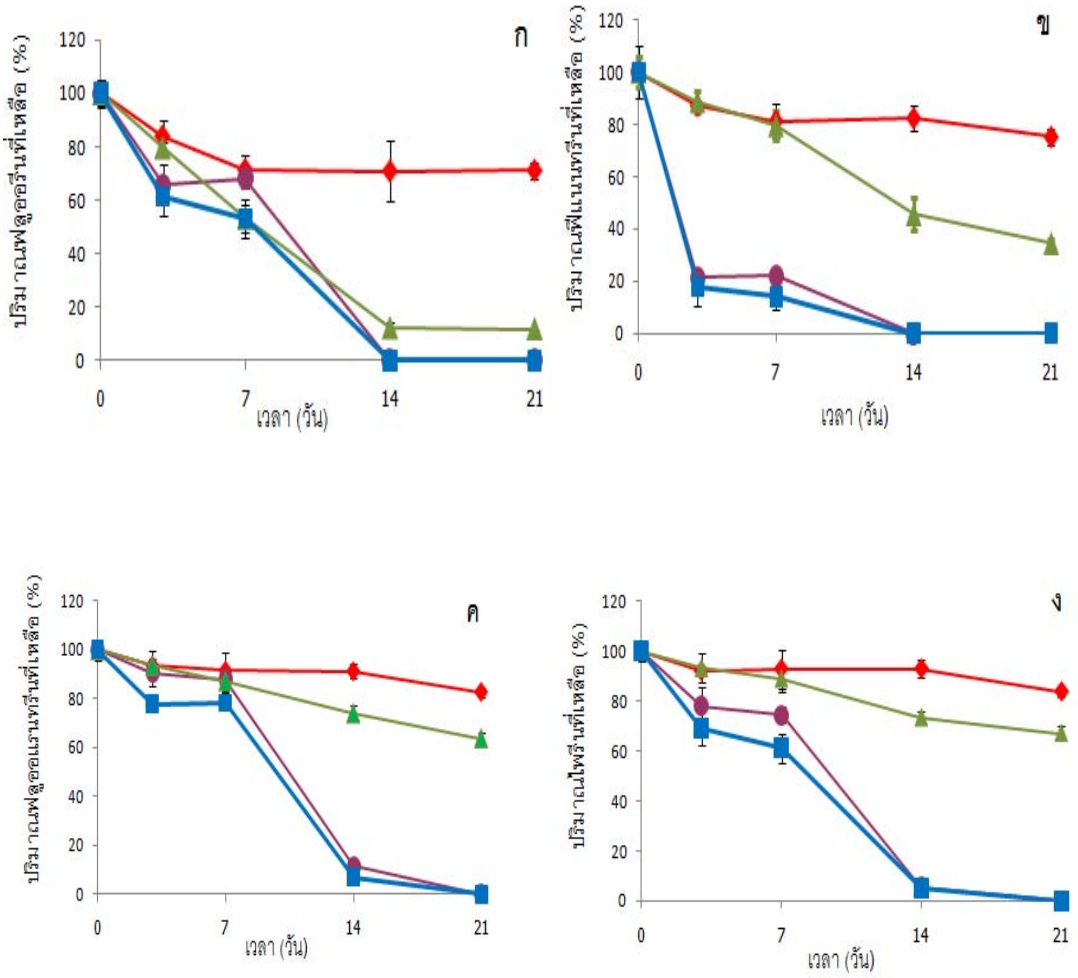
PAHs	ชุดควบคุม (%PAH ที่เหลืออยู่)	ชุดทดลอง (% PAHs ที่เหลืออยู่)		
		CU-43	STK	STK+CU-43
ฟลูออรีน	72.74	0	0	0
ฟีแนนทรีน	88.22	17.59	0	0
ฟลูออแรนธรีน	93.63	53.46	17.68	0
ไพรีน	92.72	52.33	9.7	0

4.2.3 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดย กลุ่มแบคทีเรีย STK และ รา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดินที่ความเข้มข้นของสารประกอบ PAH ชนิดละ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน

จากการทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ PAHs รวมทั้งหมด 4 ชนิดที่มีความเข้มข้นชนิดละ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน การย่อยสลายฟลูออรีน และ ฟีแนนทรีน โดย STK สามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 14 วัน CU-43 สามารถย่อยสลายคงเหลือ 11.62% และ34.56% ในวันที่21 ซึ่งย่อยสลายได้ช้ากว่า STK ในขณะที่ STK+CU-43 สามารถย่อยสลายได้เพิ่มขึ้นมากกว่าการย่อยสลายโดยใช้ STK และ CU-43 อย่างเดียว ซึ่งย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 14 วันในชุดควบคุมคงเหลือ 71.18% และ 75.21% STK สามารถย่อยสลายไพรีน และ ฟลูออแรนธรีน ได้หมดภายใน 21 วันเช่นเดียวกับการย่อยสลายร่วมกันของ STK+CU-43 ในขณะที่การย่อยสลายโดย CU-43 ย่อยสลายได้ช้ากว่า STK และการย่อยสลายของ STK+CU-43 ซึ่งภายใน 21 วันยังพบว่าปริมาณไพรีน และฟลูออแรน ธรีนคงเหลือ 67.17% และ 63.61% ซึ่งพบว่าในชุดควบคุมคงเหลือ 83.74 และ 82.56% จากการทดสอบการย่อยสลาย PAHs ทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินพบว่าการย่อยสลายของ CU-43 มีประสิทธิภาพต่ำลงกว่าที่ความเข้มข้นที่ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ผลการทดลองจึงแสดงให้เห็นว่าการย่อยสลายร่วมกันของ STK+CU-43 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายใกล้เคียงกับการย่อยสลายโดย STK อย่างเดียว อาจเนื่องมาจากการเจริญของรา CU-43 ที่เจริญได้ช้ากว่า STK ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการย่อยสลายที่เกิดขึ้นจากการทำงานร่วมกันของ STK+CU-43 น่าจะเป็นความสามารถของ STK มากกว่า แต่ทั้งนี้การย่อย

สลายของ STK+CU-43 ก็ยังคงมากกว่าการย่อยสลายโดย STK อย่างเดียว อาจเนื่องจากเส้นใยของราอาจมีผลช่วยนำพา STK ให้เข้าสู่บริเวณที่ลึก และแคบได้มากขึ้น แสดงดังตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.4

การเจริญของแบคทีเรียที่สามารถใช้สารประกอบ ฟลูออรีน ฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธีน และไพรีน ที่ความเข้มข้นชนิดละ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ในชุดการทดลองการย่อยสลายของกลุ่ม STK+CU-43 พบว่ามีการเจริญเพิ่มขึ้นเป็น log 9.18 CFUต่อกรัมดินในวันที่ 3 จากวันแรกมีจำนวนแบคทีเรีย log 8.61 CFU ต่อกรัมดิน จากนั้นเจริญคงที่จนถึงวันที่ 21 และเหลือปริมาณแบคทีเรีย log 8.85 CFU ต่อกรัมดิน ในชุดควบคุมที่เติมสารประกอบ PAHs ในดินที่ไม่ปลอดเชื้อ ปริมาณแบคทีเรียที่สามารถใช้สารประกอบ PAHs ได้ มีจำนวนเริ่มต้น log 4.72 CFU ต่อกรัมดิน และลดลงจนเหลือปริมาณ log 3.82 CFU ต่อกรัมดินในวันที่ 21 การลดลงของปริมาณแบคทีเรียที่สามารถใช้ PAHs ได้ในชุดควบคุมมีจำนวนลดลงเรื่อยเพราะแบคทีเรียในดินไม่สามารถใช้ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ รวมถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เ พิ่มขึ้นเนื่องจากความเข้มข้นของ PAHs ที่เพิ่มขึ้น แสดงดังรูปที่ 4.5 ซึ่งการเจริญของราสายพันธุ์ CU-43 สามารถเจริญเติบโตได้เพิ่มมากขึ้นแสดงดังรูปที่ 4.6



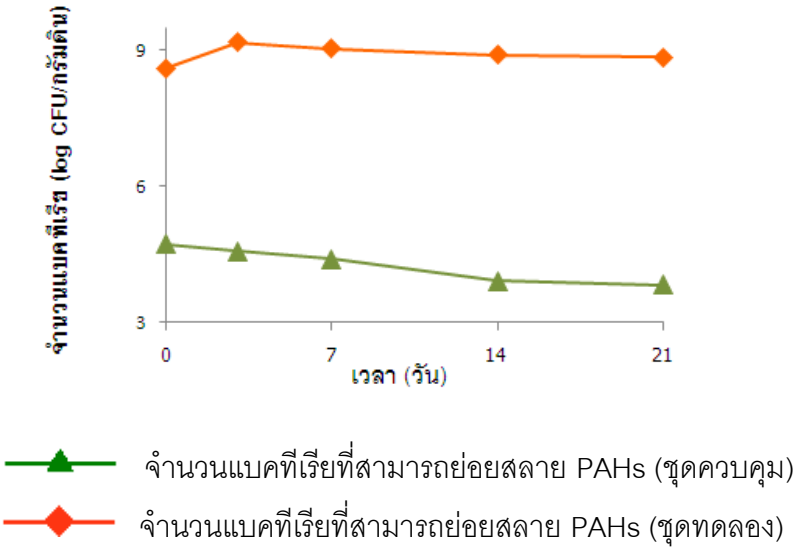
ดินที่ไม่ปลอดเชื้อที่เติม PAHs

ดินที่ไม่ปลอดเชื้อที่เติม PAHs เติมรา *Agrocybe* sp. CU-43

ดินที่ไม่ปลอดเชื้อที่เติม PAHs เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

ดินที่ไม่ปลอดเชื้อที่เติม PAHs เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43

รูปที่ 4.4 แสดงการย่อยสลายของฟลูออรีน (ก) ฟีแนนทรีน (ข) ฟลูออแรนธรีน (ค) และ ไพรีน (ง) ที่ความเข้มข้นของสารประกอบ PAH ชนิดละ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ในดินที่ระยะเวลา 21 วัน



รูปที่ 4.5 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ในการย่อยสลายร่วมกันโดยกลุ่มแบคทีเรีย STKและ รา *Agrocybe* sp. CU-43 ที่ความเข้มข้นของสารประกอบ PAHs ชนิดละ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน

รูปที่ 4.6 แสดงการเจริญของรา *Agrocybe* sp. CU-43 .ในชุดการทดลองการย่อยสลาย PAHs 4 ชนิดโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดินที่ความเข้มข้นชนิดละ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน

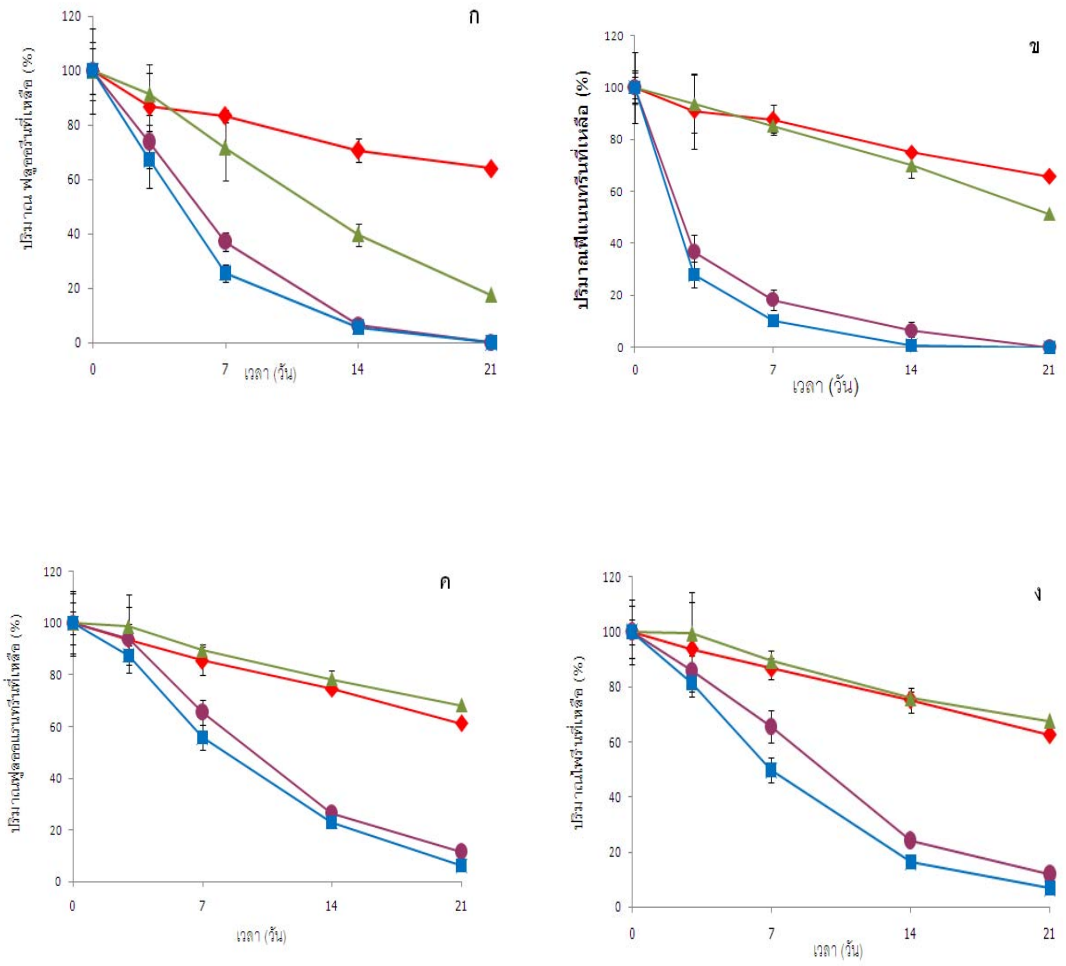
ตารางที่ 4.5 สรุปปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ในดินหลังจากย่อยสลายเป็นเวลา 21 วันโดยแบคทีเรีย STK, รา *Agrocybe* sp. CU-43 และ แบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43 ที่ความเข้มข้นชนิดละ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน

PAHs	ชุดควบคุม (%PAH ที่เหลืออยู่)	ชุดทดลอง (% PAHs ที่เหลืออยู่)		
		CU-43	STK	STK+CU-43
ฟลูออรีน	71.18	11.62	0	0
ฟีแนนทรีน	75.21	34.56	0	0
ฟลูออแรนธรีน	82.56	63.61	0	0
ไพรีน	83.74	67.17	0	0

4.2.4 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดย กลุ่มแบคทีเรีย STK และ รา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดินที่ความเข้มข้นของสารประกอบ PAH ชนิดละ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน

การย่อยสลาย PAHs 4 ชนิดที่ความเข้มข้นชนิดละ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน รา CU-43 สามารถย่อยสลาย ฟลูออรีน ฟีแนน ทรีน ฟลูออแรนธรีน และไพรีน คงเหลือ 17.46% 51.24% 68.26% และ 67.62% ตามลำดับ ภายใน 21 วันซึ่งสามารถย่อยสลายได้ช้ากว่าที่ความเข้มข้นที่ 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน STK สามารถย่อยสลายฟลูออรีน และฟีแนนทรี นได้หมดภายใน 21 วัน ฟลูออแรนธรีน และ ไพรีนคงเหลือ 11.55% และ 11.93% ซึ่งสามารถย่อยสลายได้รวดเร็วกว่า CU-43 ในกรณีการย่อยสลายโดย STK+CU-43 สามารถย่อยสลายได้มากกว่าการย่อยสลายโดยเชื้อเดี่ยว โดยสามารถย่อยสลายฟลูออรีน และฟีแนนทรีนได้อย่างสมบูรณ์ในวันที่ 21 ฟลูออแรนธรีน และ ไพรีน คงเหลือเล็กน้อย 6.04% และ 6.62% ในขณะที่ชุดควบคุม ฟลูออรีน ฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธรีน และไพรีน คงเหลือ 63.97% 65.83% 61.14% และ 62.60 ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.7 และตารางที่ 4.6

จากการทดลองการลดลงของชุดควบคุมน่าจะเกิดจากปัจจัยทางกายภาพมากกว่าทางชีวภาพเนื่องจากการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถใช้สารประกอบ PAHs ได้ในชุดควบคุมพบว่าปริมาณเซลล์มีการลดลงอย่างต่อเนื่องจากปริมาณเริ่มต้น log 4.68 CFU ต่อกรัมดินลดลงเรื่อยๆ จนวันสุดท้ายเหลือ log 3.67 CFU ต่อกรัมดิน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในดินไม่สามารถใช้ PAHs เป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ ในชุดการทดลองพบการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยเพิ่มสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลองคือ log 9.10 CFU ต่อกรัมดิน จากเริ่มต้นที่ log 8.54 CFU ต่อกรัมดิน และในวันที่ 21 ปริมาณเซลล์คงเหลือ log 8.86 CFU ต่อกรัมดิน แสดงดังรูปที่ 4.8 และการเจริญของราเจริญได้ปานกลาง โดยแสดงในรูปที่ 4.9



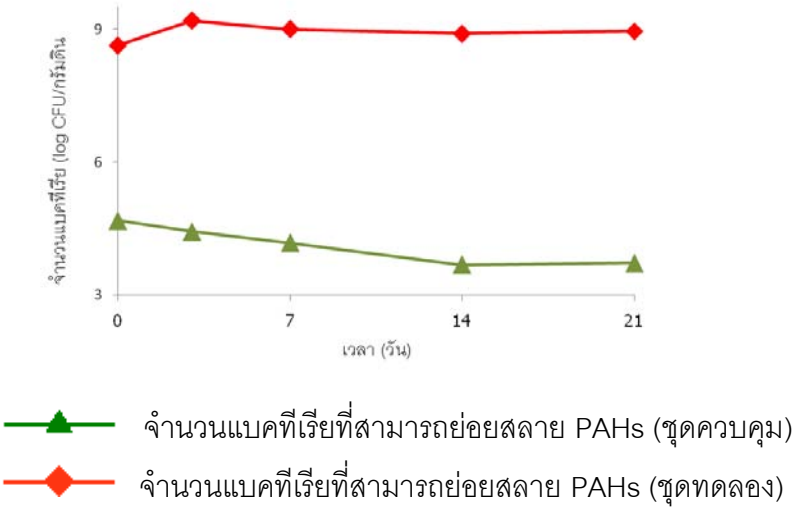
ดินที่ไม่ปลอดเชื้อที่เติม PAHs

ดินที่ไม่ปลอดเชื้อที่เติม PAHs เติมรา *Agrocybe* sp. CU-43

ดินที่ไม่ปลอดเชื้อที่เติม PAHs เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

ดินที่ไม่ปลอดเชื้อที่เติม PAHs เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43

รูปที่ 4.7 แสดงการย่อยสลายของฟลูออรีน (ก) ฟีแนนทรีน (ข) ฟลูออแรนธรีน (ค) และ ไพรีน (ง) ที่ความเข้มข้นชนิดละ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ในดินที่ระยะเวลา 21 วัน



รูปที่ 4.8 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ในการย่อยสลายร่วมกันโดยแบคทีเรีย และ รา *Agrocybe* sp. CU-43 ที่ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน

รูปที่ 4.9 แสดงการเจริญของรา *Agrocybe* sp. CU-43 .ในชุดการทดลองการย่อยสลาย PAHs 4 ชนิดโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในดินที่ความเข้มข้นชนิดละ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน

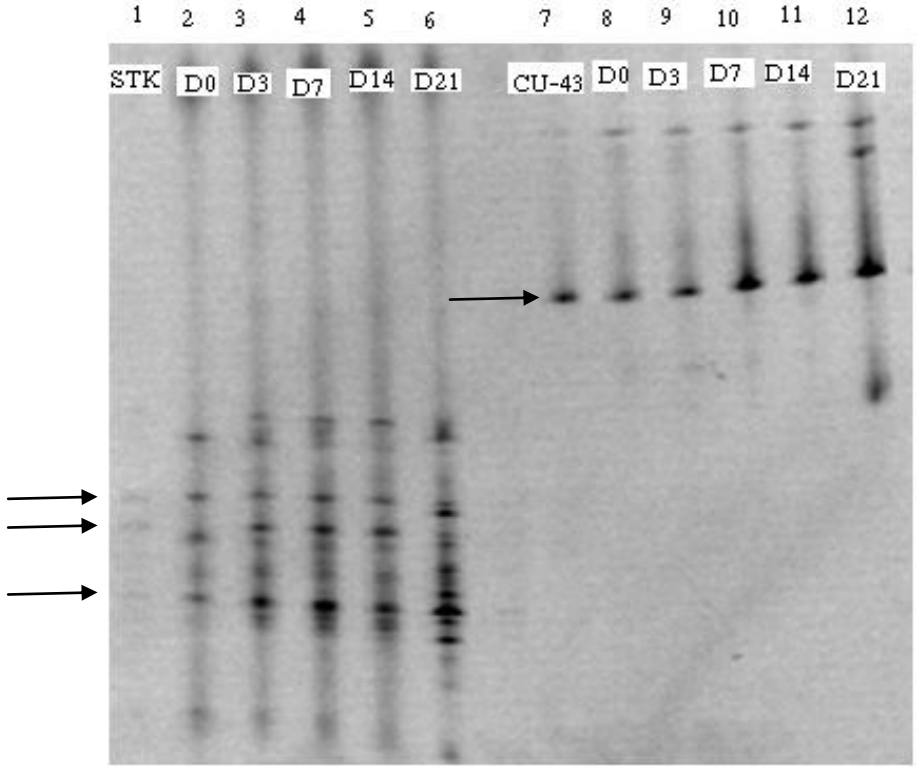
ตารางที่ 4.6 สรุปปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ในดินหลังจากย่อยสลายเป็นเวลา 21 วันโดยแบคทีเรีย STK, รา *Agrocybe* sp. CU-43 และ แบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43 ที่ความเข้มข้นชนิดละ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน

PAHs	ชุดควบคุม (%PAHที่เหลืออยู่)	ชุดทดลอง (% PAHs ที่เหลืออยู่)		
		CU-43	STK	STK+CU-43
ฟลูออรีน	63.97	17.46	0	0
ฟีแนนทรีน	65.83	51.24	0	0
ฟลูออแรนธรีน	61.24	68.26	11.55	6.04
ไพรีน	62.60	67.62	11.93	6.62

4.3 การติดตามพลวัตรประชากรของกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43 ด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

จากการติดตามประชากรของกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในชุดการทดลองการย่อยสลาย ฟลูออรีน ฟีแนนทรี น ฟลูออแรนธรี น และไพรีน ที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน โดยติดตามทุก 7 วันจนครบ 21 วัน โดยใช้เทคนิค DGGE ช่องวิ่งที่ 1 (กลุ่มแบคทีเรีย STK) ช่องที่ 2-6 (แสดงกลุ่มประชากรแบคทีเรียทั้งหมดในดินในวันที่ 0 3 7 14 และ21 ตามลำดับ) ช่องวิ่งที่ 7 (รา *Agrocybe* sp. CU-43) ช่องวิ่งที่ 8-12 (แสดงกลุ่มประชากรราทั้งหมดในดินในวันที่ 0 3 7 14 และ21 ตามลำดับ) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าตลอดช่วงการทดลอง 21 วัน พบแถบดีเอ็นเอที่อยู่ตามแนวลูกศร ที่ขึ้นตรงกับ 3 แถบดีเอ็นเอในช่องวิ่งที่ 1ซึ่งวิเคราะห์ได้ว่าแถบที่ปรากฏเป็นดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK แถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในช่องวิ่งที่ 1 มี 3 แถบเนื่องจากกลุ่มแบคทีเรีย STK มีแบคทีเรียทั้งหมด 3 สายพันธุ์ และแถบดีเอ็นเอในแนวเดียวกับลูกศรทั้ง 3 มีแถบค่อนข้างเข้มกว่าแถบดีเอ็นเออื่น จึงแสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK มีบทบาทตลอดการทดลอง และแถ บดีเอ็นเออื่นๆที่อยู่นอกแนวลูกศร จะเห็นได้ว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอค่อยๆจางลงจากวันแรกจนถึงวันสุดท้าย จึงอาจสรุปได้ว่าแบคทีเรียอื่นๆในดินไม่มีผลกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียในชุดควบคุมมีการลดลง แสดงในรูปที่ 4.10

แถบดีเอ็นเอในแนวลูกศรในช่องวิ่งที่ 7-12 จะเด่นกว่าแถบดีเอ็นเออื่น ในช่องวิ่งที่ 8-12 เทียบกับแถบดีเอ็นเอในช่องวิ่งที่ 7 แถบตรงกันจึงวิเคราะห์ได้ว่าเป็นดีเอ็นเอรา *Agrocybe* sp. CU-43 และในแนวลูกศรในช่องวิ่งที่ 8-12 แถบดีเอ็นเอที่เด่นชัดแสดงให้เห็นว่า *Agrocybe* sp. CU-43 น่าจะมีบทบาทในการย่อยสลาย และแถบดีเอ็นเอในช่องวิ่งที่ 8-12 มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจึงอาจสรุปได้ว่ารา *Agrocybe* sp. CU-43 มีการเจริญเติบโตขึ้นจากวันที่ 0 (ในช่องวิ่งที่ 8) จนถึงวันที่ 21 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลอง (ในช่องวิ่งที่ 12) แสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.10 แสดงพลวัตรประชากรจุลินทรีย์ในชุดการทดลองในดิน ด้วยวิธี DGGE โดยเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43 เพื่อย่อยสลายสารประกอบ PAHs ทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้นชนิดละ100มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินภายใน21วัน

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

กลุ่มแบคทีเรีย STK เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่แยกจากปุ๋ยหมักใบมะขามประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ซึ่งอยู่ในจีนัส *Zoogloea* sp. *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิก กลุ่มแบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน ที่มีคว ามเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้หมดภายในเวลา 14 วันเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว (ทิมากร แสงดำ 2547)ผลการทดลองการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเหลว โดยทดสอบการย่อยสลายPAHs ทั้งหมด 8 ชนิดได้แก่ แอนทราซีน อ ะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน ฟลู ออแรนธรีน ไพรีน และ ไดเบนโซฟูแรน โดยทดสอบการย่อยสลายแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารเหลว CFMM ทดสอบการย่อยสลายภายใน 14 วันซึ่งเก็บตัวอย่างทุก 7 วัน โดยเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ประมาณ 10^8 CFU/มล. พบว่าจากการทดลองกลุ่มแบคทีเรีย STK มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีน และฟีแนน ทรีน ได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 14 วัน และสามารถย่อยสลายสารประกอ บ PAHs ได้อีกหลายชนิดได้แก่ ฟลูออรีน แอนทราซีน อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน แ ละ ไดเบนโซฟูแรน ในขณะที่ ฟลูออแรนธรีน ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ซึ่งมีผลไปในทิศทางเดียวกับ ทิมากร แสงดำ (2547) ซึ่งสามารถย่อยสลายไพรีน และฟีแนนทรีนได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 14 วัน อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน ฟลูออรีน ไดเบนโซฟูแรน สามารถย่อยสลายได้ปานกลาง แอนทราซีน สามารถย่อยสลาย ได้เล็กน้อย และไม่สามารถย่อยสลาย ฟลูออแรนทรีน โดยทำกา รทดลองการย่อยสลายภายใน 14 วัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAH ได้หลายชนิดทั้งพวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งน่าจะเหมาะสมกับการนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในการย่อยสลายสารประกอบ PAH ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมซึ่งในปัจจุบันการปนเปื้อนของ PAH มีการปนเปื้อนของ PAH ผสมกันหลายชนิด

ในการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ามีรายงานมากมายซึ่งแสดงการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยรากลุ่มไวท์รอทหลายสายพันธุ์ได้แก่ *Pleurotus Ostreatus* D1 *Pleurotus eryngii, Pleurotus pulmonarius*, *Coriolus hirsutus Phanerochaete* chrysosporium, *Phlebia radiata Pleurotus eryngii* และ *P. pulmonarius* สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้โดยใช้เอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยสลายลิกนินได้ เช่น แลคเคส ลิกนินพอร์ออกซิเดส และ แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (Pozdnyakova และคณะ, 2010; Rodriguez และคณะ, 2004) *Agrocybe* sp CU-43 เป็นราไวท์รอทชนิดหนึ่ง มีชื่อสามัญว่า เห็ดยานาหงิ คัดแยกจากดอกเห็ดที่ศูนย์รวมเห็ด บ้านอรัญญิก จ . นครปฐม เป็นราในไฟลัม Basidiomycota สับไฟลัม Agaricomycotina คลาส Agaricomycetes ที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์กลุ่มที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้ คือ แลคเคส และ แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส มีรายงานพบว่าในงานวิจัยก่อนหน้านี้ ราในจีนัส *Agrocybe* สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้หลายชนิดได้แก่ ฟีแนน ธีน แอนทราซีน และไพรีน (Steffen และคณะ, 2003) *Agrocybe aegerita* สามารถย่อยสลาย ฟลูออรีน ไดเบนโซฟูแรน แอนทราซีน ฟีแนนทรีน และ ไพรีน โดยใช้เอนไซม์เพอร์ออกซีจีเนส (Aranda และคณะ, 2009)

จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้ การ ย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในอาหารเหลว N-limiting medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน พบว่ารา *Agrocybe* sp. CU-43 สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ฟลูออรีนและฟีแนนทรีนสามารถถูกย่อยสลายคงเหลือ 28.85% และ 23.45% ตามลำดับ และสามารถย่อยสลาย อะซีแนพธิลีน ฟลูออแรนธรีน และอะซีแนพธีน ได้ คงเหลือ 67.09% 69.1% และ 70.91% ไพรีนสามารถย่อยสลายได้ไม่มากนักซึ่งคงเหลือ 76.52% ในขณะที่ ไดเบนโซฟูแรน และ แอนทราซีน ไม่สามารถถูกย่อยสลายโดยรา *Agrocybe* sp. CU-43 ภายในเวลา 14 วัน ซึ่งการทดลองที่เคยศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่ความเข้มข้นเดียวกัน *Agrocybe* sp. CU-43 สามารถย่อยสลาย ฟลูออรีนได้หมดภายใน 6 วัน และย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นได้แก่ แอนทราซีน ฟีแนนทรี น คงเหลือน้อยกว่า 10% ฟลูออแรนธรีน และไพรีน ถูกย่อยสลายคงเหลือ 32.1% และ18.8% ตามลำดับ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน Chupungars และคณะ. (2009) โดยจากผลการทดลองพบว่าการที่ประสิทธิภาพย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยรา CU-43 ช้ากว่าผลการทดลองของ Chupungars และคณะ (2009) อาจเนื่องจากระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพราะเลี้ยงแตกต่างกันซึ่งในการทดลองนี้ใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน

เนื่องจากการปนเปื้อนของ PAHs ในสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่แล้วจะพบในรูปแบบของ PAHs ที่ผสมกันหลายชนิด (Leon และ Kumar, 2005) มีรายงานจำนวนมากเกี่ยวกับการบำบัดการปนเปื้อน PAHs หลายชนิดในดิน (Kim และ Lee, 2007) หนึ่งในกระบวนการนั้นคือ การเติมจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นการเติมแบคทีเรียและราร่วมกันเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ที่มีความเข้มข้นสูง (Boonchan และคณะ, 2000, Jacques และคณะ, 2008, Machín-Ramírez และคณะ, 2010) ในการทดลองนี้ จำลองระบบนิเวศการย่อยสลายสารประกอบ PAHs 4 ชนิดได้แก่ ฟลูออรีน ฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธรี น และ ไพรีน โดยศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK (สายพันธุ์ STK) และรา *Agrocybe* sp. CU-43 (สายพันธุ์ CU-43) และการทำงานร่วมกันของกลุ่มแบคทีเรีย STK และ รา Agrocybe sp. CU-43 (สายพันธุ์ STK+สายพันธุ์ CU-43) ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันเริ่มต้นที่ 100 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ใช้เวลา 21 วันเก็บตัวอย่างทุก 7 วัน จากการทดลองการย่อยสลาย PAHs ทั้ง 8 ชนิดในอาหารเหลว ไพรีนถูกเลือกเป็นตัวแทนในการย่อยสลายในดินเนื่องจากสามารถถูกย่อยได้โดยสายพันธุ์ STK แต่ไม่สามารถย่อยสลายได้โดยสายพันธุ์ CU-43 ฟลูออแรนธรีน สามารถถูกย่อยสลายได้โดยสายพันธุ์ CU-43 แต่ไม่สามารถย่อยได้โดยสายพันธุ์ STK ฟลูออรีน และฟีแนนทรีน สามารถถูกย่อยได้จากสายพันธุ์ STK และสายพันธุ์ CU-43 จึงถูกเลือกเป็นตัวแทนเพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยน่าจะสามารถถูกย่อยสลายได้ดีขึ้นเมื่อใช้การทำงานร่วมกัน โดยสายพันธุ์ STK และสายพันธุ์ CU-43 ในดิน

รายงานก่อนหน้านี้พบว่าศักยภาพการย่อยสลายสารประกอบ PAHs สามารถถูกย่อยสลายได้มากขึ้นเมื่อถูกย่อยสลายโดยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ (Hwang และคณะ, 2007) (Kim และ Lee, 2007) ศึกษาพบว่าเมื่อใช้รา *Aspergillus terreus* และ แบคทีเรีย *Rhodococcus* sp. ร่วมกันในการย่อยสลายไพรีนปรากฏว่ามีค่าการย่อยสลายที่ดีกว่าการใช้แบคทีเรียหรือราในการย่อยสลายเพียงอย่างเดียว เช่นเดียวกับการใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* และ *Rhodococcus erythropolis* ร่วมกับราในกลุ่มไวท์รอท (*Irpex lacteus*) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs ชนิด 4 วง (Borràs และคณะ, 2010)

จากการทดลองผลการย่อยสลาย PAHs ทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน สายพันธุ์ STK สามารถย่อยสลายฟลูออรีน และฟีแนนทรี นได้หมดในวันที่ 21 ฟลูออแรนธรีน และไพรีน สามารถย่อยสลายคงเหลือ 17.68% และ9.7% ขณะที่สายพันธุ์ CU-43 สามารถย่อยสลายฟลูออรีนได้เร็วกว่า สายพันธุ์ STK ซึ่งย่อยสลายได้หมดภาย 21 วัน และสามารถย่อยสลาย ฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธรีน และไพรีนคงเหลือ 17.59 % 53.46% และ 52.33% ในวันที่ 21 และเมื่อใช้สายพันธุ์ STK ร่วมกับ สายพันธุ์ CU-43 สามารถย่อยสลายฟลูออรีนได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 14 วัน ย่อยสลายฟีแนนธีนย่อยสลายได้หมด ในวันที่ 7 ฟลูออแรนธรีน และไพรีนถูกย่อยสลายได้หมดภายใน 21 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมปริมา ณ ฟลูออรีน ฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธรีน และไพรีน คงเหลือ 72.74% 88.22% 93.63% และ92.72%ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าการย่อยสลายโดยสายพันธุ์ STK+สายพันธุ์ CU-43 สามารถย่อยสลายได้เร็วกว่าการใช้สายพันธุ์ STK และสายพันธุ์ CU-43 อย่างเดียว

การย่อยสลายสารประกอบ PAHs รวมทั้ง 4 ชนิดที่มีความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ STK มีความสามารถย่อยสลาย PAHs ทั้ง 4 ชนิดได้เร็วกว่าการย่อยสลายโดย สายพันธุ์ CU-43 ยกเว้นฟลูออรีน อาจเนื่องจากแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตที่เร็วกว่า และ สายพันธุ์ STK เป็นกลุ่มเชื้อจึงสามารถร่วมกันช่วยย่อยสลายได้รวดเร็วและย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิดมากกว่า และจากการทดลองนี้พบว่าสารประกอบ PAHs สามารถถูกย่อยสลายได้รวดเร็วมากขึ้นเมื่อใช้การย่อยสลายร่วมกันของ สายพันธุ์ STK+สายพันธุ์CU-43 เนื่องจากการทำงานที่ส่งเสริมกันของสายพันธุ์ STK และสายพันธุ์ CU-43 โดยมีรายงานว่าเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสที่ราในกลุ่มไวท์รอทผลิตขึ้นมา สามารถย่อยกระตุ้นให้แบคทีเรียในดินให้มีศักยภาพเพิ่มขึ้น (Gao และคณะ, 2010) และเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นจากรายังมีผลทำให้สารพิษถูกเปลี่ยนแปลงรูปแบบให้อยู่ในรูปแบบที่มีความเป็นพิษน้อยลง จึงง่ายต่อการย่อยสลายโดยแบคทีเรีย (Sasek, 2003) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสที่สายพันธุ์ CU-43 ผลิตขึ้นมาสามารถช่วยกระตุ้นการทำงานของสายพันธุ์ STK ให้เพิ่มมากขึ้นอีกทางหนึ่ง นอกจากนี้สาเหตุที่สายพันธุ์ CU-43 สามารถย่อยสลายได้เร็วกว่า STK เนื่องจาก CU-43 สามารถนำฟลูออรีนไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้อย่างรวดเร็วตามผลการศึกษาของ Chupungars และคณะ (2009) ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ CU-43 สามารถนำฟลูออรีนไปใช้ได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 6 วัน

การเจริญของแบคทีเรียต้องอาศัยแห ล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน ซึ่งดินที่นำมาใช้ในการทดลองนี้เมื่อวิเคราะ ห์ลักษณะทางกายภาพ และทางเคมี พบว่าในดินมีปริมาณอินทรีย์คาร์บอน และไนโตรเจน ในดินต่ำ แต่มีอัตราส่วน C:N ที่เหมาะสมในการบำบัดสารพิษคือประมาณ 10 % (Vidali , 2001)จึงทำให้กลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เติมลงไปจำเป็นต้องใช้สารประกอบ PAHs ที่เติมลงไปในดินเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน ส่งผลให้ สายพันธุ์ STK สามารถย่อยสลาย PAHs ได้ดี และนอกจากนี้การย่อยสลาย PAHs 4 ชนิดเป็นการเพิ่มจำนวนแหล่งคาร์บอนมากขึ้นกว่าการย่อยสลายในอาหารเหลว การย่อยสลาย แหล่งคาร์บอนหลายชนิดอาจทำให้เกิดการย่อยสลายแบบร่วมกัน (co methabolism) (Herwijnen และคณะ, 2003) จึงส่งผลให้การย่อยสลายฟลูออแรนทรีนในดินสามารถย่อยสลายได้โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK และเนื่องจาก การย่อยสลาย ในอาหารเหลวมีแหล่ งคาร์บอนอย่างเดียวคือฟลูออแรน ธรีนจึงทำให้ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK และนอกจากนี้อาจเกิดจากเชื้อในดินมีส่วนช่วยในการเปลี่ยนรูป PAHs ในขั้นต้นและอาจส่งผลให้กลุ่มแบคทีเรีย STK ย่อยสลาย ฟลูออแรนธรีนในดินต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs 4 ชนิดในดินที่ความเข้มข้น ชนิดละ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน พบว่ากลุ่มแบคทีเรียสายพันธุ์ STK สามารถย่อยสลายฟลูออรีนฟีแนนทรีน ถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในวันที่ 14 สายพันธุ์ CU-43 ย่อยสลายคงเหลือ 11.62% และ 34.56% ภายใน 21 วัน เมื่อสายพันธุ์ STK+สายพันธุ์ CU-43 สามารถย่อยสลายได้หมดภายใน 14 วัน ในชุดควบคุมคงเหลือ 71.18% และ 75.21% ฟลูออแรนธรีน และ ไพรีน ถูกย่อยสลายโดยสายพันธุ์ STK ได้หมดภายใน 21 วัน สายพันธุ์ CU-43 ย่อยสลายคงเหลือ 63.61% และ 67.17% ตามลำดับ กรณีการย่อยสลายร่วมกันของ สายพันธุ์ STK+สายพันธุ์ CU-43 สามารถย่อยสลายฟลูออแรนธรีน และไพรีน ได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 21 วัน ซึ่งในชุดควบคุมคงเหลือ 82.56% และ 83.74%

การย่อยสลาย PAHs ทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน สายพันธุ์ CU-43 สามารถย่อยสลาย ฟลูออรีน ฟีแนน ทรีน ฟลูออแรนธรีน และไพรีน คงเหลือ 17.46% 51.24% 68.26% และ 67.62% ตามลำดับ ภายใน 21 วัน ซึ่งสามารถย่อยสลายได้ช้ากว่าที่ความเข้มข้นที่ 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน สายพันธุ์ STK สามารถย่อยสลายฟลูออรีน และ ฟีแนนทรีนได้หมดภายใน 21 วัน ฟลูออแรนธรีน และ ไพรีนคงเหลือ 11.55% และ 11.93% ซึ่งสามารถย่อยสลายได้รวดเร็วกว่า สายพันธุ์ CU-43 ในกรณีการย่อยสลายโดยสายพันธุ์ STK+สายพันธุ์ CU-43 สามารถย่อยสลายได้มากกว่าการย่อยสลายโดยเชื้อเดี่ยว โดยสามารถย่อยสลายฟลูออรีน และ ฟีแนนทรีนได้อย่างสมบูรณ์ในวันที่ 21 ฟลูออแรนธรีน และ ไพรีน

คงเหลือเล็กน้อย 6.04% และ 6.62% ในขณะที่ชุดควบคุม ฟลูออรีน ฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธรีน และไพรีน คงเหลือ 63.97% 65.83% 61.14% และ 62.60% ตามลำดับ จากการทดลองการลดลงของชุดควบคุมน่าจะเกิดจากปัจจัยทางกายภาพมากกว่าทางชีวภาพเนื่องจากการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถใช้สารประกอบ PAHs ได้ในชุดควบคุมพบว่าปริมาณเซลล์มีการลดลงอย่างต่อเนื่องจากวันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง โดยปริมาณ เริ่มต้นจาก log 4.68 CFUจนวันสุดท้ายคงเหลือ log 3.67 CFUต่อกรัมดิน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในดินไม่สามารถใช้ PAHs เป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ ซึ่งเมื่อเทียบ ในชุดการทดลองพบการเจริญของ สายพันธุ์ STK เพิ่มสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลองคือ log 9.10 CFUต่อกรัมดิน จากเริ่มต้นที่ log 8.54 CFUต่อกรัมดิน และในวันที่ 21 ปริมาณเซลล์คงเหลือ log 8.86 CFUต่อกรัมดิน ดังนั้นการย่อยสลายที่เกิดขึ้นในชุดทดลองจึงเป็นความสามารถของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายจากเชื้อท้องถิ่นที่อยู่ในดิน

จากการทดลองชุดนี้แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK มีประสิทธิภาพสูงสามารถย่อยสลาย PAHs ที่ความเข้มข้นที่ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นที่ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ในขณะเดียวกันที่ความเข้มข้นที่ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินประสิทธิภาพในการย่อยสลายของกลุ่มแบคทีเรีย STK ลดลง ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ PAHs ต่ำหรือสูงเกินไปอาจจะไม่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย เช่นการย่อยสลาย PAH ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย *Bacillus vallismortis* JY3A สามารถย่อยสลายได้ประมาณ 42% ในขณะที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 150 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถย่อยสลายเพิ่มขึ้นเป็น 70% และที่ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถย่อยสลายลดลงเหลือ 38% โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วัน (Ling และคณะ, 2011)

จากการทดลองในชุดควบคุมที่เติมความเข้มข้น PAHs ทั้ง 4 ชนิด พบว่าปริมาณ PAHs ลดลงค่อนข้างมาก อาจเนื่องมาจากการดูดซับ PAHs ไปในอนุภาคของเม็ดดิน ซึ่งการดูดซับ กับเม็ดดินจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบ PAHs เพิ่มสูงขึ้น (Johnsen และคณะ, 2005) ซึ่งสามารถสังเกตได้จากชุดควบคุมที่ความเข้มข้นของ PAHs 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน พบว่าปริมาณ PAHs มีการลดลงมากกว่าชุดควบคุมที่ความเข้มข้น 200 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ซึ่งการลดลงในชุดควบคุมไม่น่าเกิดจากการย่อยสลายของแบคทีเรียในดินเพราะจากการนับจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ในชุดควบคุมพบว่าจำนวนแบคทีเรียมีปริมาณลดลงจึงแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในดินไม่สามารถใช้สารประกอบ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ และ นอกจาก นี้น่าจะเกิดจากกระบวนการสลายตัวทางกายภาพ เช่นการถูกออกซิเดชันด้วยแสง หรือการระเหย (Haritash และ Kaushik, 2009)

จากการทดลอง เห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของ PAHs เพิ่มขึ้นจาก 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ตามลำดับ การย่อยสลายของ สายพันธุ์ CU-43 จะย่อยสลายสารประกอบ PAHs ทั้ง 4 ชนิดได้ช้าลง อาจเป็นผลจากความเป็นพิษจากความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ PAHs มีการรายงานพบว่า เมื่อความเข้มข้นของ PAH เพิ่มขึ้นสามารถทำให้ปริมาณเอนไซม์ แลค แคส ที่ราสร้างขึ้นลดต่ำลง จึงส่งผลต่อการย่อยสลาย PAH ที่ช้าลง (Gianfreda และ Rao, 2004) และโดยทั่วไปแล้ว สายพันธุ์ CU-43 มีการเจริญเติบโตได้ช้า สาเหตุนี้อาจเป็นเห ตุผลที่ทำให้ความสามารถในการย่อยสลาย PAHs น้อยกว่า สายพันธุ์ STK จึงทำให้การย่อยสลาย ร่วมกันของสายพันธุ์ STK+สายพันธุ์ CU-43 มีค่าการย่อยการย่อยสลายได้ดีกว่าแต่ไม่มากนัก เมื่อเ ทียบกับชุดที่ย่อยสลายโดยแบคทีเรีย สายพันธุ์ STK เพียงชนิดเดียว จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าความสามารถในการย่อยสลายน่าจะเกิดจาก สายพันธุ์ STK แต่ในชุดการทดลองการย่อยสลายร่วมกันของ สายพันธุ์ STK+สายพันธุ์ CU-43 ดีกว่า การย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK อย่างเดีย วจึงอาจสรุป ได้ จาก สมติฐานที่ว่า เส้นใยของราสามารถแทรกเข้าไปในที่แคบและลึกได้ (Jacques และคณะ , 2008) จึงจะ ช่วยในการ กระจายกลุ่ม แบคทีเรีย STK ที่มีสมบัติเป็น hydrophobicity สูงซึ่งมีการกระจายตัวได้น้อย ให้สามารถเข้าไปย่อยสลาย PAHs ได้อย่างทั่วถึงในดิน ซึ่งสามารถสังเกตุได้จากการเจริญของเส้นใยราในรูปที่ 4.3 4.6 และ 4.9 เส้นใยราสามารถแพร่เข้าไปในดินได้ทั่วถึง จึง อาจส่งเสริม ให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายได้ (Boonchan และคณะ , 2000) แม้ว่า ราไม่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้แต่ ยังคงสามารถเจริญเติบโตได้เนื่องจากราอาจใช้สารอาหารจากขี้เลื่อยสำเร็จรูป ที่เติมลงไป เพื่อใช้เป็นคาร์บอนในการเจริญได้

การเจริญของสายพันธุ์ STK ในการย่อยสารประกอบ PAHs ทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆพบว่า มีการเพิ่มจำนวนจากวันแรกของชุดการ ทดลองในแต่ละชุดการทดลอง ประมาณ 0.5 log CFU ต่อกรัมดินในวันที่ 3 ซึ่งเจริญสูงสุดในวันนี้ และจากนั้นก็เจริญคงที่จนวันสุดท้ายของการทดลอง ซึ่งการเพิ่มขึ้นของสายพันธุ์ STK มีการเพิ่มจำนวนไม่มากนักแต่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้สูง อาจมีสาเหตุจากเซลล์กลุ่มแบคทีเรีย STK อาจจะเกาะติดกับเส้นใยของราทำให้ปริมาณเซลล์ที่นับได้อาจน้อยกว่าความเป็นจริง และอาจเติมสารลดแรงตึงผิวเพื่อช่วยให้เซลล์แบคทีเรียหลุดออกจากเส้นใยราได้มากขึ้น Kanaly และคณะ, 2003 และ Hweang และคณะ, 2007 กล่าวว่าการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โมเลกุลใหญ่โดยการย่อยสลายร่วมกันของกลุ่มจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ สารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นอาจไม่ได้ถูกนำมาใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าเมื่อมีการย่อยสลาย PAH เพิ่มสูงขึ้น แต่จำนวนแบคทีเรียไม่เพิ่มจำนวนขึ้นมากนัก นอกจากนี้สายพันธุ์ STK สามารถย่อยสลายได้สูงอาจ

เนื่องจากเชื้อสายพันธ์นี้เป็นกลุ่มของแบคทีเรียซึ่งมีแบคทีเรียอยู่ 3 สายพันธุ์ ซึ่งการใช้สารประกอบ PAHs ของแบคทีเรียแต่สายพันธุ์แตกต่างกันซึ่งมีผลช่วยส่งเสริมกันในการย่อยสลาย

การเจริญของรา *Agrocybe* sp. CU-43 ที่ความเข้มข้น 100 และ200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินพบว่าสามารถเจริญได้ดี และที่คว ามเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน สามารถเจริญได้ปานกลาง ซึ่งการหาการเจริญของราไม่สามารถหาการเจริญของราในดินได้ แต่ถ้าเป็นการเลี้ยงราในอาหารเหลวจะสามารถหาการเจริญโดยวิธีการหาน้ำหนักแห้งได้ (Chávez-Gómez และคณะ, 2003) เนื่องจากสามารถกำจัดอาหารเหลวออกจากเส้นใยราได้โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงแล้วล้างด้วย 0.85% NaCl แต่การหาน้ำหนักแห้งของราที่เจริญในดินไม่สามารถหาได้เนื่องจากไม่สามารถกำจัดดินออกจากเส้นใยราได้ ดังนั้นในผลการทดลองของงานวิจัยนี้จึงไม่มีรายงานผลการเจริญของรา แต่แสดงภาพการเจริญของราซึ่งสามารถเห็นได้ ว่ารามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบจากวันแรกของการทดลอง แสดงดังรูปที่ 4.3 4.6 และ4.9 ตามลำดับ

จากการทดลองการใช้จุลินทรีย์ร่วมกันคือกลุ่มแบคทีเรีย STK และ รา *Agrocybe* sp. CU-43 ในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs สามารถย่อยสลายได้ดีกว่าการย่อยสลายโดยใช้สายพันธุ์ STK และ สายพันธุ์ CU-43 เพียงอย่างเดียว เพราะเกิดจากการทำงานร่วมกันของกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp CU-43 ซึ่งข้อดีของแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโต และย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว (Zhao และคณะ, 2009) กรณีราสามารถทนต่อสภาวะต่างๆได้ดี, สายใยเข้าถึงที่ลึก และแคบได้ เอนไซม์ที่สร้างขึ้นสามารถย่อยสลายได้แบบสุ่ม (Haritash และ Kaushik, 2009) และเอนไซม์ที่สร้างขึ้นจากราสามารถช่วยกระตุ้นให้กลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้เพิ่มมากขึ้น (Gao และคณะ, 2010) มีรายงานก่อนหน้านี้พบว่าการย่อยสลาย PAHs ผสมที่ปนเปื้อนในดินแถวบริเวณทำการเกษตรในเขต Catalunya ประเทศสเปนซึ่งมีการปนเปื้อน PAHs ผสม 286.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน โดยใช้รากลุ่มไวท์รอท (*Irpex lacteus*) สามารถย่อยสลายคงเหลือ 234.9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมกับแบคทีเรียร่วมกันทั้ง 2 สายพันธุ์คือ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Rhodococcus erythropolis* สามารถย่อยสลายคงเหลือ 214.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อทดสอบการย่อยสลายของราและแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ร่วมกันปริมาณ PAHs ที่คงเหลือคือ 195.9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมโดยใช้เวลาทั้งหมด 5 สัปดาห์ (Borràs และคณะ, 2010)

นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้มีการเติมขี้เลื่อยสำเร็จรูป 10% (ภาคผนวก ง) ผสมกับดินในชุดการทดลองการย่อยสลาย PAHs พบว่าสามารถส่งผลให้สายพันธุ์ CU-43 สามารถเจริญได้ดีขึ้น ซึ่งมีรายงานโดย กุลนี ชูพึ่งอาตม์ (2550) พบว่าการเจริญของราสายพันธุ์ CU-43 ไม่สามารถเจริญได้เมื่อเลี้ยงในดินที่ไม่เติมขี้เลื่อย ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานพบว่าการเติมวัสดุทางการเกษตร

สามารถช่วยเพิ่มการยึดจับ เพิ่มช่องว่างระหว่างเม็ดดิน และเป็นสารอาหารเพื่อส่งเสริมให้รามีประสิทธิภาพการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น (Wen และคณะ, 2011) และมีรายงานพบว่าการเติมสารอาหารลงในดินเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดการเหนี่ยวนำให้ราสามารถสร้างเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อนำมาใช้ในการย่อยสลายสารพิษได้ (Wu และคณะ, 2008)

จากทดลองการติดตามประชากรของกลุ่มแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในชุดการทดลองการย่อยสลาย ฟลูออรีน ฟีแนนธีน ฟลู ออแรนธีน และไพรีน ที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในดิน โดยติดตามทุก 7 วันจนครบ 21 วัน โดยใช้เทคนิค DGGE แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK ประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ซึ่งสังเกตได้จากในช่องวิ่งที่ 1 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ และกลุ่มแบคทีเรีย STK มีบทบาทในการย่อยสลาย PAHs ตลอดการทดลองเนื่องจากแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในช่องวิ่งที่ 2-6 มีแถบที่ชัดเจนกว่าแถบดีเอ็นเออื่นๆซึ่งแถบดีเอ็นเอค่อยๆจางลงจากวันแรกจนถึงวันสุดท้าย จึงอาจสรุปได้ว่า แบคทีเรียอื่นๆในดินไม่มีผลกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียในชุดควบคุมมีการลดลง นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มีการเจริญที่แตกต่างกันซึ่งบางสายพันธุ์เจริญอย่างเด่นชัดในช่วงต้น บางสายพันธุ์เจริญในช่วงกลาง และ ช่วงปลายของการทดลอง จึงส่งผลต่อการย่อยสลายสา ร PAHs และสารมัธยันต์ชนิดต่างๆที่เกิดขึ้นได้อย่างแตกต่างกันจึงเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่น่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย ในขณะเดียวกันในช่องวิ่งที่ 7-12 แสดงแถบดีเอ็นเอของราสายพันธุ์ CU-43 พบว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจากวันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการทดลองจึ่งสรุปได้ว่ารามีการเจริญเพิ่มขึ้นในตลอดการย่อยสลายซึ่งสอดคล้องกับรูปที่ 4.3 ในช่องวิ่งที่ 12 จะเห็นแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นมาน่าจะเกิดจากการเจริญของราที่เจริญหลังจากการทดลองเนื่องจากขั้นการเก็บรักษาตัวอย่างก่อนนำมาศึกษาการติดตามพลวัตรประชากร อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ในขั้นตอนการติดตามพลวัตรประชากรโดยเทคนิค DGGE ควรเพิ่มการติดตามพลวัตรประชากรในดินที่ไม่เติมทั้งกลุ่มแบคทีเรีย STK และราสายพันธุ์ CU-43 เพื่อทราบว่ามีจุลินทรีย์ในดินชนิดใดบ้าง และมีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการบำบัดหรือไม่

จากงานวิจัยนี้การใช้แบคทีเรียและราร่วมกันในการบำบัด PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ และควรนำไปศึกษาเพื่อ พัฒนาต่อไป เช่นการศึกษาโดยเติมราสายพันธุ์ CU-43 ลงในการทดลองก่อนจากนั้นจึงเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ตามลงไปหลังจากรายย่อยสลาย PAHs ได้คงที่ หรือการนำราในกลุ่มราสายใย (Filamentous fungi) ที่ไม่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้มาใช้ในการทดลองเพื่อทดสอบยืนยันการนำพาแบคทีเรียให้เข้าไปในดิน และ นอกจากนี้อาจศึกษาจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ได้ดีและมีอัตราการเจริญที่ใกล้เคียงกันโดยจับคู่ที่เหมาะสมกันระหว่างแบคทีเรียและราจะช่วยส่งเสริมศักยภาพการย่อยสลายให้เพิ่มมากขึ้น(Kimและคณะ,2007)

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมควบคุมมลพิษ. 2545. PAH. กองจัดการสารอันตรายและกากของเสีย. กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม.กรุงเทพมหานคร

กุลนี ชูพึ่งอาตม์ . 2550. การคัดแยกและลักษณะสมบัติของราที่สลายสารพอลิไซคลิกแอโรมาติกไฮโดรคาร์บอน. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทิมากร แสงดำ. 2547. การแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีสมบัติในการเกาะติดและย่อยสลายไพรีนจากปุ๋ยหมัก ตระกลูถั่ว . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Amezcua-Allieri, M. A., Rodríguez-Dorantes, A., Meléndez-Estrada, J. 2010. The use of biostimulation and bioaugmentation to remove phenanthrene from soil. Oil, Gas and Coal Technology. 3(1):39-59.

Anastasi, A., Coppolab, T., Prigione, V., and Varese, G. C. 2009. Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: Role of laccases and peroxidases. Journal of Hazardous Materials. 165:1229–1233.

Andreoni, V. and Gianfreda, L. 2007. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats Applied Microbiology and Biotechnology. 76:287–308.

Antizar- Ladislao, B., Lopez-Real, J. M., and Beck, A. J. 2004. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated waste using composting approaches. Critical Review in Environmental Science and Technology. 34:249-289.

Aranda, E., Ullrich, R., and Hofrichter, M. 2009. Conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons, methyl naphthalenes and dibenzofuran by two fungal peroxygenases. Biodegradation. 21:267–281.

Arun, A., Raja, P.P., Arthi, R., Ananthi, M., Kumar, K.S., and Eyini, M. 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation by Basidiomycetes fungi, *Pseudomonas* isolate, and their co cultures : Comparative *in vivo* and *in silico* approach. Applied Biochemistry and Biotechnology. 151:132–142.

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.

Baird, W., Hooven, L., and Brinda, M. 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. Environmental and Molecular Mutagenesis. 45:106–114.

Bamforth, S. M., and Singleton, I. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons:Current knowledge and future directions. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 80:723–736.

Bautista, L. F., Sanz, R., Molina, M. C, Gonzalez, N., and Sanchez, D. 2009. Effect of different non-ionic surfactants on the biodegradation of PAHs by diverse aerobic bacteria International Biodeterioration & Biodegradation. 63:913–922.

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. Applied and Environmental Microbiology. 66(3):1007–1019.

Borràs, E., Caminal, G., Sarrà, M., and Novotný, C. 2010. Effect of soil bacteria on the ability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by *Trametes versicolor* and *Irpex lacteus* from contaminated soil. Soil Biology & Biochemistry 42:2087-2093.

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

Chávez-Gómez, B., Quintero, R., Esparza-García, F., Mesta-Howard, A. M., Zavala Díaz de la Serna, F.J., Hernández-Rodríguez, C.H., Gillén, T., Poggi-Varaldo, H. M., Barrera-Cortés J., Rodríguez-Vázquez, R. 2003. Removal of phenanthrene from soil by co-cultures of bacteria and fungi pregrown on sugarcane bagasse pith. Bioresource Technology. 89:177–183.

Chupungars, K., Rerngsamran, P., and Thaniyavarn, S. 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Agrocybe* sp. CU-43 and its fluorene transformation. International Biodeterioration & Biodegradation. 63:93-99.

Dai, C. C., Tian, L., S., Zhao, Y. T.,Chen, Y., and Xie, H. 2010. Degradation of phenanthrene by the endophytic fungus *Ceratobasidum stevensii* found in Bischofia polycarpa. Biodegradation. 21:245–255.

Edgehill, R.U., 1999. Bioremediation by inoculation with microorganisms. Bioremediation of contaminated soils. Adriano, D.C., Bollag, J.M., Frnakenberger, W.T., Sims, R.C., (Eds). ASA/CSSA/SSSA, Madison, pp. 290-314.

Fiedler, H. Cheung, C. K., and Wong, M. H. 2002. PCDD/PCDF, chlorinated pesticides and PAH in chinese teas. Chemosphere. 46:1429-1433.

Gao, D., Liang, H., Du, L., and Chen, J. 2010. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by white rot-fungus *Pseudotrametes gibbosa* isolated from the boreal forest in Northeast China. African Journal of Biotechnology . 9(41):6888-6893.

Grifoll, M., Selifonov, S. A., and Chapman, P. J. 1995. Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorene by *Pseudomonas* sp. strain F247. Applied and Environmental Microbiology. 60(7):2438-2449.

Gianfreda, L., and Rao, M. A. 2004. Potential of extracellular enzymes in remediation of polluted soils: A review. Enzyme and Microbial Technology. 35:339-354.

Habe, H., and Omori, T. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 67(2): 225-243.

Haritash, A. K., and Kaushik, C. P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. Journal of Hazardous Materials. 169:1

Hedlund, B. P., and James, T. S. 2001. *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov. a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 51: 61–66.

Herwijnen, R. V., Wattiau, P., Bastiaens, L., Daal, L., Jonker, L., Springael, D., Govers, H. A. J., and Parsons, J. R. 2003. Elucidation of the metabolic pathway of fluorene and cometabolic pathways of phenanthrene, fluoranthene, anthracene and dibenzo thiophene by *Sphingomonas* sp. LB126. Research in Microbiology . 154 : 199–206.

Hwang, H. M., Hu, X., and Zhao, X. 2007. Enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by environmentally friendly techniques Journal of Environmental Science and Health Part C. 25:313–352.

Jacques, R.J.S., Okeke, B.C., Bento, F.M., Teixeira, A.S., Peralba, M.C.R., and Camargo, F.A.O. 2008. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. Bioresource Technology. 99:2637–2643.

Johnsen, A. R., Wick, L. Y., and Harms, H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environmental Pollution. 133:71-84.

Juhasz, A. L., Stanley, G. A., and Britz, M. L. Degradation of high molecular weight PAHs in contaminated soil by a bacteria consortium: Effects on microtox and mutagenicity bioassays. Bioremediation Journal. 2000. 4:271–283.

Kanaly, R. A., Harayama. S., and Watanabe, K. 2003. *Rhodanobacter* sp. strain BPC1 in a benzo[a]pyrene-mineralizing bacterial consortium. Applied and Environmental Microbiology. 68:5826–5833.

Kim, J. D., and Lee, C. G. 2007. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by bacterium-fungus co-cultures. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 12:410-416.

Kohlmeier, S., Smits, T. H., Ford, R. M., Keel, C., Harms, H., and Wick, L. Y. 2005. Taking the fungal highway: mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. Environment. Science and Technology. 39:4640–4646.

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

Kotterman, M.J.J., Vis, E.H., and Field, J.A., 1998. Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp strain BOS55 and indigenous microflora. Applied and Environmental Microbiology. 64:2853-2858.

Leon, V., and Kumar, M. 2005. Biological upgrading of heavy crude oil. Biotechnology and Bioprocess Engineering.10:471-481.

Li, X., Li, P., Lin, X., Zhang, C., Li, Q., and Gong, Z. 2008. Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. Journal of Hazardous Materials.150:21–26.

Li, X., Lin, X., Li, P., Liu, W., Wang, L., Ma, F., and Chukwuka, K.S. 2009 Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. Journal of Hazardous Material. 172:601-605.

Lin, Y., and Cai, L. X. 2008. PAH-degrading microbial consortium and its pyrene-degrading plasmids from mangrove sediment samples in Huian, China. Marine Pollution Bulletin. 57:703-706.

Ling, J., Zhang, G., Sun, H., Fan, Y., Ju, J., and Zhang, C. 2011. Isolation and characterization of a novel pyrene-degrading *Bacillus vallismortis* strain JY3A. Science of the Total Environment. 409 :1994–2000.

Machín-Ramírez, C., Morales, D., Martínez-Morales, F., Okoh, A. I., and Trejo-Hernández, M.R., 2010. Benzo[a]pyrene removal by anemic and co-cultures of some bacterial and fungal strains. International Biodeterioration & Biodegradation. 64:538-544.

Meulenberg, R., Rijnaarts, H.H.M., Doddema, H.J., and Field, J.A., 1997. Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability FEMS Microbiology letters. 152:45-49.

Mancera-LÓpez, M. E., Esparza-García, F., Chávez-GÓmez, B., Rodrí guez-Vá zquez, R., Saucedo-Castanéda, G., and Barrera-Cortés, J. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. International Biodeterioration & Biodegradation. 61:151–160.

Millero, F.J., and Sohn ML. 1991. Chemical Oceanography. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 531.

Moody, J. D., Freeman, J. P., Doerge, D. R., and Cerniglia, C. E. 2001 Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp strain PYR-1. Applied and Environmental Microbiology. 67:1476–1483.

Muyzer, G., De Waal, E. C., Lerman, L. S., and Maniatis, T. 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. Nucleic Acids Res.13:3131-3145.

Myers, S.R., Ali, M.Y., Wright, T., and Cunningham, C. 2007. Benzo[a]pyrene metabolism: Role of bioalkylation. Polycyclic Aromatic Compounds. 27:339-359.

Netto, A.D.P., Moreira, J.C., Dias, A.E.X.O., Arbilla, G., Ferreira, L.F.V., Oliveira, A.S., and Barek, J. 2000. Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their nitrated derivatives (NHPAS) : A review of methodology. Quim Nova. 23:765–773.

Patel, H., Gupte, A., and Gupte, S. 2009. Biodegradation of fluoranthene by Basidiomycetes fungal isolate *Pleurotus Ostreatus* HP-1. Applied Biochemical Biotechnology. 157:367–376.

Pozdnyakova, N. N., Nikiforova, V. S., and Turkovskaya, O. V. 2010. Influence of PAHs on ligninolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus* D1. Central European Journal of Biology. 5(1) :83–94.

Purcaro, G., Navas, J. A., Guardiola, F., Conte, L. S., and Moret, S. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons in frying oils and snacks. Journal of Food Protection. 69:199–204.

Reader, U., Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology. 1:17-20.

Reddy, M., s., Naresh, B., Leela, T., Prashanthi, M., Madhusudhan, N. C., Dhanasri, G., and Devi, P. 2010. Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp. Bioresource Technology 101:7980-7983.

Rodriguez, E., Nuero, O., Guillen, F., Martinez A. T., and Martinez, M. J. 2004. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: The role of laccase and versatile peroxidase. Soil Biology & Biochemistry. 36: 909-916.

Samanta, S. K., Singh, O. V., and Jain, R. K. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation. TRENDS in Biotechnology. 20(6): 243-248.

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sasek, V., Bhatt, M., Cajthaml, K., and Lednická, D. 2003. Compost-mediated removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 44: 336-342.

Seo, J. S., Keum Y. S., and Li, Q. X. 2009 Bacterial degradation of aromatic compounds. International Journal of Environmental Research and Public Health. 6:278-309.

Steffen, K.T., Hataka, A. and Hofrichter, M. 2003. Degradation of benzo[a]pyrene by the liter-decompositing basidiomycetes *Stropbaria coronillarole* of manganese peroxidase. Applied and Environmental Microbiology. 69:3957-3964.

Teng, Y., Luo, Y., Ping, L., Zou, D., Li, Z., and Christie, P. 2010. Effects of soil amendment with different carbon sources and other factors on the bioremediation of an aged PAH-contaminated soil. Biodegradation. 21:167–178.

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

Wang, C. Y., Wang, F., Wang, T., Bian, Y. R., Yang, X. L., and Jiang, X. 2010. PAHs biodegradation potential of indigenous consortia from agricultural soil and contaminated soil in two-liquid-phase bioreactor (TLPB). Journal of Hazardous Materials. 176: 41-47.

Wen, J. W., Gao, D., Zhang, B., and Liang H. 2011. Co-metabolic degradation of pyrene by indigenous white-rot fungus *Pseudotrametes gibbosa* from the northeast China. International Biodeterioration & Biodegradation. 65: 600-604.

Wick, L. Y., Remer, R., Würz, B., Reichenbach, J., Braun, S., Schàfer, F., and Harms, H. 2007. Effect of fungal hyphae on the access of bacteria to phenanthrene in soil. Environmental Science and Technology. 41, 500–505.

Wu, Y., Luo, Y., Zou, D., Ni, J., Liu, W., Teng, Y., and Li, Z. 2008. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil with Monilinia sp.: degradation and microbial community analysis. Biodegradation. 19:247–257.

Xiang, Z., Pei, C. S., Cheng-Jun, Z., and Shi-Lei, S. 2006. Microbial PAH-degradation in soil: Degradation pathways and contributing factors. Pedosphere and Biosphere.16(5): 555-565.

Ye, J. S., Yin, H., Qiang, J., Peng, H., Qin, H. M., Zhang, N., and He, B. Y. 2011. Biodegradation of anthracene by Aspergillus fumigates. Journal of Hazardous Materials. 185:174- 181.

Yu, S.H., Ke, L., Wong, Y. S., and Tam, N. F. Y. 2005. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. Environment Internationnal. 31: 149-154.

Zeng, J., Lin, X., Zhang, J., and Li, X. 2010. Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-degrading Mycobacterium spp. and the degradation in soil. Journal of Hazardous Materials. 183:718-723.

Zhao, H. P., Wu, Q. S., Wang, L., Zhao, X. T., and Gao, H. W. 2009. Degradation of phenanthrene by bacterial strain isolated from soil in oil refinery fields in Shanghai China. Journal of Hazardous Materials. 164:863-869.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM)

ก.)	ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดเดคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	5.5	กรัม
	แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3	กรัม
	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม
ข.)	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01	กรัม
	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.005	กรัม
	เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	0.005	กรัม

นำสารส่วน ก .) ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายในส่วน ข .) ที่ทำการเตรียมแยกแต่ละชนิดและทำให้ปราศจากเชื้อโดยทำการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตทขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.45 ไมโครเมตร ลงในอาหารที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM (CFMM agar)

ทำการเตรียมอาหารด้วยวิธีการเดียวกับการเตรียมอาหารเหลว CFMM ละลายผงวุ้น 15 กรัม ต่อ อาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มล. ลงไปในสารละลายส่วน ก.) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือ 50-60 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติมสารละลายในส่วน ข .) และเติมสารป้องกันการเจริญของรา Nystatin ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ปราศจากเชื้อก่อนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตน (tryptone)	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม

ทำการละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.0 ปรับปริมาตรดินให้เป็น 1,000 มล. แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

ทำการเตรียมอาหารด้วยวิธีการเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB โดยละลายผงวุ้นปริมาตร 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มล. ลงไปในอาหารก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงที่ 50-60 องศาเซลเซียสเติมสารป้องกันการเจริญของรา Nystatin ที่ปราศจากเชื้อก่อนนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง malt extract

สารสกัดจากมอล์ต (malt extract)	20	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม
กลูโคส (glucose)	20	กรัม
เพปโตน (peptone)	5	กรัม

นำสารทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Modified Glucose Peptone Yeast extract medium (mGPY)

กลูโคส (Glucose)	10	กรัม
แบคโตเพปโตน (Bacto peptone)	3	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	2	กรัม
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5	กรัม
โซเดียมทาร์เทรต ($Na_2C_4H_4O_6$)	0.4	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

ทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่เข้มข้น 1 นอร์มอล ให้เป็น 4.5 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Nitrogen-limiting medium (N-limiting medium)

กลูโคส (Glucose)	10	กรัม
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	0.1	กรัม
ไอออน (II) เฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)	0.001	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.001	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.001	กรัม

ทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่เข้มข้น 1 นอร์มอล ให้เป็น 4.5 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารละลาย PAH ในไดเมธิลซัลฟอกไซด์

ชั่งสารมาตรฐาน PAH 100 มิลลิกรัม ละลายในไดเมธิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โซนิเคตจนตกผลึก PAH ละลายหมด จากนั้นนำไปทำให้ปราศจา กเชื้อโดยการกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรู 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดแก้วที่ห่อด้วยกระดาษอลูมิเนียมให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลาย PAH ในอะซิโตน

ชั่งสารมาตรฐาน PAH ที่ต้องการเตรียม 20 มิลลิกรัม ละลาย PAH แต่ละชนิดใน อะซิโตน ปริมาตร 10 มล. ผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เนื่องจากอะซิโตนมีการระเหยอย่างรวดเร็ว ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 %

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

สารละลาย Triton X-100 15%

เตรียม Triton X-100 15 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 85 มิลลิลิตร

เอทานอล 70 %

เตรียมเอทานอล 99 % ละลายปริมาณ 700 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นที่ปลอดประจุ 300 มิลลิลิตร

สารปฏิชีวนะ

เตรียมนิสเตติน (Nystatin) 40 มิลลิกรัม ละลายใน ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ 1 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในขวดแก้วที่ห่อด้วยกระดาษอลูมิเนียมให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลาย 10% SDS

ทำการชั่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม จากนั้นคอยๆละลายในน้ำที่ปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มล. เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล. แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนดต่อตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

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

CTAB	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.7	โมลาร

เตรียมสารละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มล. จากนั้นจึงเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตร 100 มล. แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนดต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

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

ละลาย Trismabase ในน้ำที่ปลอดประจุ ปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น แล้วคนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงทำการปรับ pH ความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอ

ริกเขมขนใหเปน 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเปนปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆาเชื้อดวยความดันไอ 15 ปอนดต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เปนเวลา 15 นาที

สารละลาย EDTA เขมขน 0.5 โมลาร ความเปนกรด-ดางเปน 8.0

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

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นจึงเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซดแล้วคนใหเขากันจากนั้นรอใหเย็นลงแลวจึงปรับคาความเปนกรด - ดางดวยกรดไฮโดรคลอริกเขมขนใหเปน 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆาเชื้อดวยความดันไอ 15 ปอนดตอตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เปนเวลา 15 นาที

High extraction buffer

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

บัฟเฟอร TE ความเปนกรด-ดางเปน 8.0

Tris-HCl	10.0 มิลลิโมลาร
EDTA	1.0 มิลลิโมลาร

ผสมสารละลาย Tris-HCl เขมขน 1.0 โมลาร์ ความเปนกรด-ดางเปน 8.0 ปริมาตร 10 มล. เขากับสารละลาย EDTA เขมขน 0.5 โมลาร์ ความเปนกรด-ดางเปน 8.0 ปริมาตร 2 มล. แล้วเติมน้ำปลอดประจุ จนเปนปริมาตร 1,000 มล. จากนั้นนำไปนึ่งฆาเชื้อดวยความดันไอ 15 ปอนดต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เปนเวลา 15 นาที

บัฟเฟอร 50X Tris-acetate (TAE)

Tris base	242	กรัม
กรดอะซีติกเขมขน	57.1	มล.
สารละลาย EDTA เขมขน 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100	มล.

เตรียมน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล.ละลายสารทั้งหมดข้างต้น แลวเติมน้ำปลอดประจุจนเปนปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆาเชื้อดวยความดันไอ 15 ปอนดตอตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เปนเวลา 15 นาที

สารละลายคลอโรฟอรม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล

ผสมคลอโรฟอรมและไอโซเอมิลแอลกอฮอลเขาดวยกันในอัตราสวน 24: 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายฟนอล/คลอโรฟอรม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล

ผสมสารละลายฟนอลอิ่มตัวดวย Tris-HCl เขากับคลอโรฟอรมและไอโซเอมิลแอลกอฮอลในอัตราสวน ฟนอล : คลอโรฟอรม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เปน 25 : 24 : 1 (ปริมาตรตอปริมาตรตอปริมาตร) ผสมใหเขากันเก็บไวในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายโซเดียมอะซีเตท เขมขน 3 โมลาร ความเปนกรด-ดางเทากับ 5.2

ละลายโซเดียมอะซีเตท น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุใหไดปริมาตรประมาณ 400 มล.แล้วนำไปปรับคาความเปนกรด-ดางใหเปน 5.2 ดวยกรดอะซีติก ปริมาตรประมาณ 57 มล. เติมน้ำปลอดประจุใหไดปริมาตรครบ 500 มล. นำไปนึ่งฆาเชื้อดวยความดันไอ 15 ปอนดตอตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เปนเวลา 15 นาที

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด

ทำการละลายเอธิเดียมโบรไมดในน้ำปลอดประจุ ปลอดเชื้อใหมีความเขมขนสุดทายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมตอมิลลิลิตร แล้วเก็บในภาชนะที่ปดสนิทในที่มืด

Loading dye

Bromphenolblue	0.025 %
ซูโครส	40 %

ละลายสวนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0%

อะกาโรสเจล	1	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มิลลิลิตร

หลอมละลายให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10%

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

สารละลาย RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตร 1 มล. แล้วจึงเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายโปรตีเนสเค (proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผงโปรตีนเนสเคน้ำหนัก 20 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตร 1 มล. แล้วจึงเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

0% denaturing solution

40% อะคริลาไมด์/บิส	8.13	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เขมขน 50 เทา	1	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	50	มิลลิลิตร

70% เอธานอล

99% เอธานอล	700	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	300	มิลลิลิตร

80% denaturing solution

40% อะคริลาไมด์/บิส	8.13	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เขมขน 50 เทา	1	มิลลิลิตร
ฟอรมาไมด์	16	มิลลิลิตร
ยูเรีย	16.82	กรัม
น้ำปลอดประจุใหครบปริมาตร	50	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

ตาราง ค.1 แสดงการย่อยสลาย PAHs ทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมกรัมดิน ในดินโดยแบคทีเรีย STK รา *Agrocybe* sp. CU-43 และ การทำงานร่วมกันของแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43

วัน (ฟลูออรีน)	ชุดควบคุม	แบคทีเรีย STK	รา*Agrocybe* sp. CU-43	แบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43
0	100± 6.9009	100±3.1501	100±5.5461	100±3.8214
3	100.17±4.6490	77.59±2.4946	91.13±3.0038	72.09±4.6801
7	85.06±2.4172	56.35±6.1024	46.62±2.6153	25.83±1.8147
14	83.56±0.1154	7.95±6.0099	3.69±4.7342	0
21	72.74±2.9737	0	0	0

วัน (ฟีแนนทรีน)	ชุดควบคุม	แบคทีเรีย STK	รา*Agrocybe* sp. CU-43	แบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43
0	100±5.1597	100±1.8027	100±5.5644	100±2.2030
3	99.25±3.6936	23.98±5.7933	93.06±2.5482	25.05±7.5055
7	93.56±1.0016	5.88±7.3323	74.19±0.0577	0
14	94.94±1.2220	0	34.92±5.2051	0
21	88.22±1.0016	0	17.59±3.0924	0

วัน (ฟลูออแรนธรีน)	ชุดควบคุม	แบคทีเรีย STK	รา*Agrocybe* sp. CU-43	แบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43
0	100±3.8991	100±2.1283	100±3.9017	100±1.6093
3	100.17±4.2335	95.38±1.0692	96.19±2.4704	91.96±0.9291
7	96.66±2.0816	83.98±0.8185	87.77±0.8736	62.23±4.1860
14	95.21±1.0148	40.02±4.8583	68.93±4.1968	27.88±7.5566
21	93.63±1.2741	17.68±0.0577	53.46±3.5501	0

วัน (ไพรีน)	ชุดควบคุม	แบคทีเรีย STK	รา*Agrocybe* sp. CU-43	แบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43
0	100±3.7313	100±3.7242	100±5.2548	100±2.5324
3	96.72±4.1581	73.75±2.3515	91.98±2.8005	70±2.5735
7	96.42±2.0256	55.18±3.1224	83.92±0.3000	41.34±5.7974
14	97.33±1.9553	21.44±6.8942	68.41±1.8027	17.67±8.2099
21	92.72±1.3000	9.7±0.1000	52.33±3.1895	0

ตาราง ค.2 แสดงการย่อยสลาย PAHs ทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ในดินโดย แบคทีเรีย STK รา *Agrocybe* sp. CU-43 และ การทำงานร่วมกันของแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43

วัน (ฟลูออรีน)	ชุดควบคุม	แบคทีเรีย STK	รา*Agrocybe* sp. CU-43	แบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43
0	100±4.8055	100±1.0969	100±5.0921	100±2.6102
3	84.03±5.6190	65.69±7.6813	79.67±1.8770	61.43±7.1065
7	71.55±5.3594	68.13±3.5161	53.21±7.1358	53.22±4.8952
14	70.95±11.4328	0	11.99±2.6000	0
21	71.18±3.14324	0	11.62±0.6928	0

วัน (ฟีแนนทรีน)	ชุดควบคุม	แบคทีเรีย STK	รา*Agrocybe* sp. CU-43	แบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43
0	100±9.9026	100±1.0214	100±5.6000	100±4.0853
3	87.19±1.8520	21.45±0.7549	88.80±4.2567	17.66±0.7571
7	81.30±6.3213	22.12±0.6506	79.56±5.6000	14.11±4.6500
14	82.39±4.8397	0	45.63±6.0434	0
21	75.21±3.3531	0	34.56±1.7435	0

วัน (ฟลูออแรนธรีน)	ชุดควบคุม	แบคทีเรีย STK	ราAgrocybe sp. CU-43	แบคทีเรีย STK ร่วมกับราAgrocybe sp. CU-43
0	100±4.4015	100±3.0435	100±3.5444	100±1.6802
3	93.52±0.4041	90.58±5.3910	93.56±5.8642	77.75±2.1779
7	91.46±7.3749	87.88±4.4545	87.12±4.7606	78.17±1.0692
14	91.25±2.7465	11.39±1.9035	73.97±3.1192	6.85±0.4041
21	82.56±1.9000	0	63.61±2.3811	0

วัน (ไพรีน)	ชุดควบคุม	แบคทีเรีย STK	รา*Agrocybe* sp. CU-43	แบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43
0	100±3.7242	100±3.0989	100±3.1942	100±2.4684
3	91.94±1.0583	78.10±7.7835	93.26±5.8968	69.48±7.0192
7	92.80±7.9008	74.44±3.1749	89.03±5.0477	61.23±5.8346
14	92.93±3.6828	5.51±0.9073	73.44±2.2278	4.88±0.6245
21	83.74±1.9008	0	67.17±2.6907	0

ตาราง ค.3 แสดงการย่อยสลาย PAHs ทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ในดินโดย แบคทีเรีย STK รา *Agrocybe* sp. CU-43 และ การทำงานร่วมกันของแบคทีเรีย STK และรา *Agrocybe* sp. CU-43

วัน (ฟลูออรีน)	ชุดควบคุม	แบคทีเรีย STK	รา*Agrocybe* sp. CU-43	แบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43
0	100 ± 15.7611	100 ± 2.8307	100 ± 10.6491	100 ± 8.3990
3	86.86 ± 12.3224	73.87 ± 9.8147	91.26 ± 10.9562	67.23 ± 10.3659
7	83.36 ± 2.3713	37.06 ± 3.6013	71.51 ± 11.7797	25.56 ± 3.2186
14	70.65 ± 4.3015	6.27 ± 0.3464	39.76 ± 4.1501	5.51 ± 0.8386
21	63.97 ± 2.6689	0	17.46 ± 8.1647	0

วัน (ฟีแนนทรีน)	ชุดควบคุม	แบคทีเรีย STK	รา*Agrocybe* sp. CU-43	แบคทีเรีย STK ร่วมกับรา *Agrocybe* sp. CU-43
0	100 ± 13.7971	100 ± 3.97030	100 ± 5.9556	100 ± 6.4156
3	90.98 ± 14.3841	36.68 ± 6.4210	93.75 ± 11.3529	27.89 ± 4.9729
7	87.58 ± 5.7046	18.22 ± 3.9526	85.09 ±2.4684	10.31 ± 0.7549
14	75.06 ± 0.6506	6.39 ± 3.3201	70.17 ± 5.0401	0.77 ± 3.3486
21	65.83 ± 1.3051	0	51.24 ± 13.5798	0

วัน (ฟลูออแรนธรีน)	ชุดควบคุม	แบคทีเรีย STK	รา*Agrocybe* sp. CU-43	แบคทีเรีย STK ร่วมกับรา*Agrocybe* sp. CU-43
0	100 ± 11.5494	100 ± 4.4643	100 ± 12.4809	100 ± 8.1745
3	93.67±12.7962	93.94 ± 5.8968	98.78 ± 12.3304	87.57 ± 3.7098
7	85.46 ± 5.4027	65.57 ± 4.9084	89.37 ± 2.5059	55.79 ± 4.6522
14	74.64 ± 1.1718	26.49 ± 0.8144	78.29 ± 3.2654	23.07 ± 0.6110
21	61.24 ± 0.814	11.55 ± 4.9369	68.26 ± 8.63963	6.04 ± 2.4542

วัน (ไพรีน)	ชุดควบคุม	แบคทีเรีย STK	รา*Agrocybe* sp. CU-43	แบคทีเรีย STK ร่วมกับรา*Agrocybe* sp. CU-43
0	100 ± 9.5409	100 ± 4.4305	100 ± 11.5854	100 ± 9.6624
3	93.81±17.2252	87.79 ± 5.8045	99.44 ± 14.9165	81.52 ± 3.2969
7	86.79 ± 3.8974	65.57 ± 5.9138	89.53 ± 3.5949	49.65 ± 4.5829
14	75.11 ± 4.4613	24.08 ± 0.2645	75.82 ± 2.6312	16.16 ±1.0692
21	62.60 ± 1.6196	11.93 ± 2.3459	67.62 ± 8.8234	6.62 ± 2.8618

ภาคผนวก ง

วัสดุเพิ่มเติม

ขี้เลื่อยสำเร็จรูป

ขี้เลื่อย	100	กิโลกรัม
รำละเอียด	7	กิโลกรัม
อาหารเสริม (กระถินป่น)	3	กิโลกรัม
แป้งข้าวเหนียว	1	กิโลกรัม
ปูนขาว	1	กิโลกรัม
พูไม๊ (Pumite)	1	กิโลกรัม
น้ำตาลทราย(แดง)	1	กิโลกรัม
ดีเกลือ	200	กรัม
ยิปซัม	500	กรัม

ประวัติผู้เขียน

นางสาวปริยาภัทร แก้วภู่ เกิดเมื่อวันพุธที่ 24 ธันวาคม พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดนครสวรรค์ ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2550 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552