บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
2. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA.
3. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan.
4. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ "ISSCO" laminar flow รุ่น BVT – 124 ของบริษัท International Sciencetific Supply, USA.
5. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunswick Scientific, USA.
6. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ –70 °ซ บริษัท Forma Scientific, USA.
7. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ –20 °ซ บริษัท Sanyo Electric, Japan
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys20 บริษัท Thermo spectonic, Japan.
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น Sorvall® Biofuge Stratos บริษัท Heraeus., Germany.
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น KM-15200 บริษัท Kubota, Japan.
11. ตู้อบแห้ง บริษัท Contherm Scientific, New Zealand.
12. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS400 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
13. ตู้บ่มเชื้อ รุ่น Heraeus type B 5050 E ของบริษัท Heraeus, Germany.
14. ชุดเครื่องมือทำไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) สำหรับตรวจสอบปริมาณของ PAHs
    - ลิควิดโครมาโทกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - คอลัมน์ (column) : Inertsill ODS-3 ขนาด 4.6 x 150 มิลลิเมตร ของบริษัท GL Science, Japan.

- เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-2A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
- เครื่องบันทึก (recorder) Chromatography รุ่น C-RIA ของบริษัท Shimadzu, Japan.
- กระบอกฉีดยา (microsyringe) ขนาด 100 ไมโครลิตร รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, USA.

15. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
16. เครื่องคัดกรองขนาดดิน ขนาดความกว้างของรู 0.84 และ 1.18 มิลลิเมตร รุ่น O.S.K. 119 Standard Sieve ของบริษัท Okawa Seiki, Japan.
17. เครื่องบด (blender) รุ่น MX-T31GH ของบริษัท Matsushita Electric, Taiwan.
18. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
19. กรวยแยก ขนาด 500 มล. ของบริษัท Sibata, Japan.
20. ไมโครปิเปต ขนาด 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Drummond Scientific, USA.
21. หัวกรอง ชนิด PTFE ขนาดความกว้างของรู 0.20 และ 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
22. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
23. ปิเปต (pipette) ขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร ของบริษัท Gilson, France.
24. ขวดแก้วฝาเกลียว(vial) ขนาด 22 ml (Screw Cap with Teflon Liner) ของบริษัท Lab System , Thailand.

เคมีภัณฑ์

1. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
2. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
3. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany.
5. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
6. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
7. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Auatralia.
8. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
9. เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) ของบริษัท May & Baker, England.
10. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Auatralia.
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany.
12. เมธานอล (CH_3OH) ของบริษัท Merck, Germany.
13. เอธิลอะซีเตท ($CH_3COOC_2H_5$) ของบริษัท Merck, Germany.
14. ไดคลอโรมีเธน (CH_2Cl_2) ของบริษัท Merck, Germany.
15. อะซีโตน (CH_3COCH_3) ของบริษัท Merck, Germany.
16. ไดเมธิลซัลฟอกไซด์(CH_3SOCH_3) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
17. แบคโตอการ์ (Bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
18. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท Merck, Germany.
19. ไซโคลเฮกซามีด (cyclohexamide) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เตรียมวัสดุพาหะ (carrier materials) และดิน

3.1.1. การเก็บตัวอย่าง

3.1.1.1 วัสดุพาหะที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เปลือกถั่ว ใบมะขาม เศษใบไม้ชนิดต่างๆ และสารเร่ง พด.1

- **เปลือกถั่ว** เก็บมาจาก บริเวณเขตชานเมือง กรุงเทพฯ ซึ่งเปลือกถั่วมีลักษณะแห้งและเก่า
- **ใบมะขาม** เก็บมาจากบริเวณในไร่ อ. ตากฟ้า จ. นครสวรรค์ ซึ่งเก็บจากต้นมะขามแล้วนำมาทำให้แห้งเป็นเวลา 1 สัปดาห์
- **เศษใบไม้ชนิดต่าง ๆ** เก็บมาจากภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเลือกเก็บใบไม้ที่ร่วงจากต้นและมีลักษณะแห้ง
  เศษใบไม้ชนิดต่างๆที่นำมาใช้ในการทดลอง ประกอบด้วย ใบจามจุรี,ใบหูกวาง , ใบโพธิ์ ,ใบประดู่ ,หญ้าและกิ่งไม้เล็กๆ
- **สารเร่ง พด.1** นำมาจากสำนักงานวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน
  สารเร่ง พด.1 เป็นอินทรียวัตถุ ซึ่งประกอบด้วย เศษพืชแห้ง (เช่น ฟางข้าว เศษหญ้า ต้นข้าวโพด ต้นอ้อย ต้นถั่ว ต้นยาสูบ ผักตบชวา เป็นต้น) ยูเรีย มูลสัตว์ และกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เพื่อผลิตปุ๋ยหมักในช่วงระยะเวลาอันสั้นประกอบด้วย เชื้อแบคทีเรีย แอคติโนมัยซิสและรา

3.1.1.2 ดินที่ใช้ในการทดลอง นำมาจากบริเวณสวนผลไม้ ฝั่งธนบุรี กรุงเทพฯ โดยดินนี้อยู่ในบริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อนจากสาร PAHs มาก่อน โดยขุดลึกจากผิวประมาณ 5 เซนติเมตร ทำการแยกเศษใบไม้และหินออก

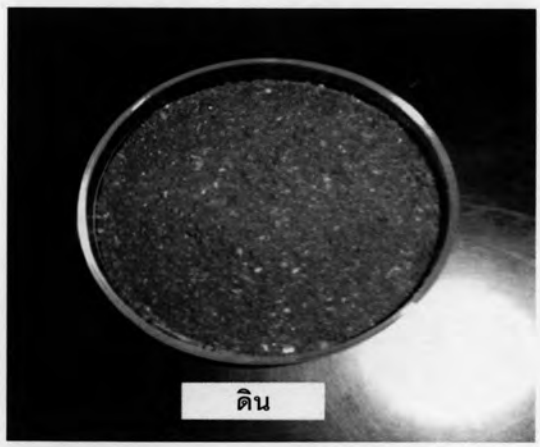
3.1.2. การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์และใช้ในการทดลอง

- นำวัสดุพาหะทั้ง 3 ชนิด (ยกเว้นสารเร่ง พด.1) มาปั่นและคัดกรองโดยใช้เครื่องคัดกรองขนาดดินเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 0.84 มิลลิเมตร (รูปที่ 3.1) แบ่งวัสดุพาหะแต่ละชนิดเพื่อนำไป

วิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพและเคมี ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อใช้ในการทดลอง

รูปที่ 3.1 แสดงภาพวัสดุพาหะที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เปลือกถั่ว เศษใบไม้ชนิดต่างๆ ใบมะขาม และสารเร่ง พด.1 ที่บดและผ่านการคัดกรองแล้ว

- นำดินมาปั่นและคัดกรองโดยเครื่องคัดกรองขนาดดินเส้นผ่านศูนย์กลาง1.18 มิลลิเมตร (รูปที่ 3.2) จากนั้นทำการแบ่งดินเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร PAHs ด้วยวิธี HPLC และวิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพและเคมี ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อใช้ในการทดลอง



รูปที่ 3.2 แสดงภาพดินที่ใช้ในการทดลองที่บดและผ่านการคัดกรองแล้ว

3.1.3. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

นำตัวอย่างวัสดุพาหะ 3 ชนิด (ยกเว้นสารเร่ง พด.1) 0.5 กิโลกรัม ส่งวิเคราะห์ที่ฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เพื่อวิเคราะห์

ความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ (maximum water holding capacity)

ค่าความเป็นกรด-ด่าง

และภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาเกษตรศาสตร์ บางเขน เพื่อวิเคราะห์

ปริมาณไนโตรเจน

ปริมาณโปแทสเซียม

สารอินทรีย์คาร์บอน

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

นำตัวอย่างดิน 0.5 กิโลกรัม ส่งวิเคราะห์ที่ฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เพื่อวิเคราะห์

ลักษณะเนื้อดิน

ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุหรือไอออน (cation exchange capacity)

ความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ

ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ปริมาณไนโตรเจน

ปริมาณโปแทสเซียม

สารอินทรีย์คาร์บอน

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

3.2 เตรียมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพื่อเพาะเลี้ยงในวัสดุพาหะ

3.2.1 การเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ใน Carbon Free Mineral Medium (CFMM)

นำกลุ่มแบคทีเรีย STK (ทิมากร แสงดำ, 2547) มาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีนเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 8 วัน (รูปที่ 3.3)

0 วัน 8 วัน

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

3.3 คัดเลือกวัสดุพาหะที่ให้การเจริญและการอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK

3.3.1 การเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรียในวัสดุพาหะ 4 ชนิด ประกอบด้วย เปลือกถั่ว เศษใบไม้ชนิดต่างๆ ใบมะขามและสารเร่ง พด.1

โดยเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ใน CFMM จากข้อ 3.2.1 นำมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 10 นาที นำส่วนเซลล์แบคทีเรียมาล้างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ทำการปั่นเหวี่ยงในสภาวะเดิม โดยทำตามขั้นตอนนี้ 2 ซ้ำ นำส่วนเซลล์มาแขวนลอยในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % เพื่อปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^8 cell/ml นำมาเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้แบคทีเรียใช้อาหารสะสมที่เหลืออยู่ในเซลล์ให้หมด (Grifoll และคณะ,1995) แล้วนำมาเลี้ยงในวัสดุพาหะ ซึ่งประกอบด้วย เปลือกถั่ว ใบมะขาม เศษใบไม้ชนิดต่างๆและสารตัวเร่งพด.1ปลอดเชื้อ โดยนำวัสดุพาหะไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุด คือ

ชุดการทดลองที่1 โดยชั่งเปลือกถั่ว 1.5 กรัม ใส่ในขวดแก้วฝาเกลียว นำมาปรับความชื้น (moisture content) ให้เท่ากับ 70% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ และปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7-7.5 โดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ผสมกับโซเดียมคลอไรด์ 1 นอร์มัล ลงไปให้มีน้ำหนักตรงกับค่าที่คำนวณจากความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำที่ได้จากการวิเคราะห์ แล้วผสมกับเปลือกถั่วให้เข้ากันโดยเครื่องผสม นำไพรีน 100 มก.ต่อกก.ของวัสดุพาหะ มาละลายในอะซิโตน

เติมลงในเปลือกถั่วที่เตรียมไว้ แล้วผสมให้เข้ากันโดยเครื่องปั่นผสมอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน เพื่อให้อะซิโตนระเหยจนหมด จากนั้นเติมกลุ่มแบคทีเรีย STKที่มีความเข้มข้น 10^8 cell/ml ลงในเปลือกถั่ว ผสมให้เข้ากัน เตรียมชุดการทดลองทั้งหมด 36 ขวด สำหรับเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 , 7 , 14 , 21 , 28 , 35 , 42 , 49 และ 56 ครั้งละ 4 ขวด นำขวดไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 56 วัน (รูปที่ 3.4) โดยมีการขยับฝาเกลียวเพื่อให้อากาศ ทุกๆ 7 วัน (Charoenchang, 2001) เก็บตัวอย่างทุกๆ 7 วัน โดยเก็บตัวอย่าง 4 ขวดต่อ 1 ชุดการทดลอง(ทั้ง4 ชุด) โดยนำ 2 ขวดแรกมาตรวจหากลุ่มแบคทีเรีย STK ตามวิธีข้อ 3.3.2 เพื่อดูการอยู่รอดของแบคทีเรีย โดยติดตามจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK จากลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร และนำ 2 ขวดที่เหลือ มาสกัดไพรีนที่เหลืออยู่ในเปลือกถั่ว ตามวิธีข้อ 3.3.3 ทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องHPLC เพื่อดูความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย STK

ชุดการทดลองที่ 2 ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 แต่เปลี่ยนวัสดุพาหะเป็นใบมะขาม

ชุดการทดลองที่ 3 ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 แต่เปลี่ยนวัสดุพาหะเป็นเศษใบไม้ชนิดต่างๆ

ชุดการทดลองที่ 4 ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 แต่เปลี่ยนวัสดุพาหะเป็นสารตัวเร่ง พด.1

โดยชุดการทดลองทั้ง 4 ชุด มีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดเลือกวัสดุพาหะที่ให้การเจริญและการอยู่รอดของกลุ่มแบคทีเรีย STK ดีที่สุด

ชุดควบคุม ชั่งวัสดุพาหะ ซึ่งประกอบด้วย เปลือกถั่ว ใบมะขาม เศษใบไม้ชนิดต่างๆ และสารตัวเร่ง พด.1 ปลอดเชื้อ 1.5 กรัม ลงในขวดแก้วฝาเกลียว โดยแยกวัสดุพาหะแต่ละชนิดลงในหลอดแก้วฝาเกลียวได้ 4 ขวด ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 แต่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ลงในวัสดุพาหะทั้ง 4 ชนิด เพื่อศึกษาการสลายตัวของไพรีนในวัสดุพาหะ

รูปที่ 3.4 **แสดงภาพชุดการทดลอง กลุ่มแบคทีเรีย** STK **ที่เลี้ยงในวัสดุพาหะต่างๆ ได้แก่ เปลือกถั่ว**(A) **เศษใบไม้ชนิดต่างๆ**(B) **ใบมะขาม**(C) **และสารเร่ง พด.**1(D)

3.3.2 วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count

โดยนำดินหรือวัสดุพาหะมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 3)ที่เติมไซโคลเฮกซามีด เข้มข้น 200 มก.ต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.3.3 หาปริมาณสาร PAHs ที่เหลืออยู่ในดินหรือวัสดุพาหะ โดยวิธีสกัดดัดแปลงมาจากวิธีของ Juhaszและคณะ (1997)

โดยเติมโซเดียมซัลเฟต แอนไฮดรัส 1 เท่าของตัวอย่าง ลงในขวดแก้วบรรจุดินหรือวัสดุพาหะ จากนั้นสกัดด้วยไดคลอโรมีเธนปริมาตร 1 เท่าของตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 2 นาที นำตัวอย่างดินที่อยู่ในขวดแก้วไปจุ่มในอ่างกำเนิดเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแยกส่วนไดคลอโรมีเธนเก็บไว้ และสกัดตัวอย่างดินด้วยไดคลอโรมีเธนซ้ำอีก 2 ครั้ง รวบรวมส่วนไดคลอโรมีเธนทั้งหมด ทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน ละลายไพรีนที่เหลืออยู่ในขวดก้นกลมด้วยด้วยเมธานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่ในหลอดแก้วขนาดเล็ก

3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในวัสดุพาหะหรือดิน โดยวิธี HPLC

นำตัวอย่างที่ได้จากชุดทดลองมาวิเคราะห์หาปริมาณไพรีนโดยวิธี HPLC(รูปที่ 3.5) ซึ่งมีส่วนประกอบและสภาวะต่างๆ ในระบบ ดังนี้

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

เตรียมชุดสารมาตรฐานของไพรีน โดยเติมไพรีนที่ละลายในอะซิโตนลงในดินหรือวัสดุพาหะ ให้ได้ความเข้มข้น 0 -1000 มก.ต่อ กก.ของดิน จากนั้นสกัดด้วยไดคลอโรมีเธนตามขั้นตอนในข้อ 3.3.3 นำสารมาตรฐานมาวิเคราะห์ HPLC ทำกราฟมาตรฐาน(ภาคผนวก ค)นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างไปคำนวณหาปริมาณไพรีนโดยใช้กราฟมาตรฐานที่ได้จากชุดสารมาตรฐาน

รูปที่ 3.5 แสดงภาพ เครื่อง HPLC ที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในการทดลอง

3.4 สร้างกล้าเชื้อแบคทีเรีย STK ในวัสดุพาหะที่คัดเลือกได้

นำกลุ่มแบคทีเรีย STK มาเลี้ยงในวัสดุพาหะที่ทำการคัดเลือกแล้ว โดยใช้วิธีการและสภาวะการเลี้ยงเชื้อเดียวกับข้อ 3.3 บรรจุในขวดแก้วฝาเกลียว เมื่อครบตามกำหนดเวลาที่คัดเลือกจึงนำไปใช้ใน 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 ใช้เป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียเพื่อนำไปบำบัดดินที่ปนเปื้อน

ส่วนที่ 2 บ่มเป็นเวลา 6 เดือน เก็บตัวอย่างทุก 20 วัน โดยใช้วิธีการและสภาวะการเลี้ยงเชื้อเดียวกับข้อ 3.3 เพื่อติดตามหาระยะเวลาที่กลุ่มแบคทีเรียสามารถมีชีวิตในวัสดุพาหะได้นานสุด

I2347502X

3.5 บำบัดดินปนเปื้อนไพรีนด้วยกล้าเชื้อที่สร้างขึ้น

แบ่งการศึกษาประสิทธิภาพของกล้าเชื้อที่สร้างขึ้นเป็น 2 วิธี

3.5.1 การเจริญและการอยู่รอดร่วมกับการย่อยสลายไพรีนในดินสภาวะ solid

ชุดการทดลองที่1 นำตัวอย่างดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมาผสมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียในวัสดุพาหะที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 3.4 ในส่วนที่ 1) เพื่อศึกษาการอยู่รอดและความสามารถในการย่อยสลายไพรีนในดินของกล้าเชื้อแบคทีเรีย โดยชั่งดิน 15 กรัม ในขวดแก้วฝาเกลียว นำมาปรับความชื้น (moisture content) ให้เท่ากับ 70%ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ และปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7-7.5 โดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ผสมกับโซเดียมคลอไรด์ 1 นอร์มัล ลงไปให้มีน้ำหนักตรงกับค่าที่คำนวณจากความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำที่ได้จากการวิเคราะห์ แล้วผสมกับดินให้เข้ากันโดยเครื่องผสม นำไพรีน 100 มก.ต่อ กก.ของดิน (Charoenchang, 2001) มาละลายในอะซิโตน แล้วผสมลงในดินที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องปั่นผสมอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน เพื่อให้อะซิโตนระเหยจนหมด จากนั้นเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียในวัสดุพาหะที่คัดเลือกได้ 3 กรัมลงในดิน ผสมให้เข้ากัน เตรียมชุดการทดลองทั้งหมด 28 ขวด สำหรับเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 ,10, 20 ,30 , 40, 50 และ 60 วัน นำขวดไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 60 วัน โดยขยับฝาเกลียวเพื่อให้อากาศ ทุกๆ 7 วัน (Charoenchang, 2001) เก็บตัวอย่างทุกๆ 7 วัน โดยเก็บตัวอย่าง 4 ขวด ต่อ 1 ชุดการทดลอง โดยนำ 2 ขวดแรก มาตรวจหากลุ่มแบคทีเรีย STK และแบคทีเรียในดิน ตามวิธีข้อ 3.3.2 เพื่อดูการอยู่รอดของแบคทีเรีย โดยติดตามจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STK และแบคทีเรียในดินจากลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร และนำ 2 ขวดที่เหลือ มาสกัดไพรีนที่เหลืออยู่ในดิน ตามวิธีข้อที่ 3.3.3 ทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องHPLC เพื่อดูความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของกล้าเชื้อแบคทีเรีย

ชุดการทดลองที่ 2 ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 แต่เปลี่ยนเป็นกล้าเชื้อในวัสดุพาหะที่คัดเลือกได้อีกชนิดหนึ่ง

ชุดการทดลองที่ 3 ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของไพรีนเป็น 1000 มก.ต่อ กก.ของดิน

ชุดควบคุมที่ 1 เพื่อศึกษาความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของจุลินทรีย์ที่มีในดิน ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองข้างต้น แต่ไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียในวัสดุพาหะที่คัดเลือกได้

ชุดควบคุมที่ 2 เพื่อศึกษาการสลายตัวไพรีนเมื่อปราศจากปัจจัยทางชีวภาพของดิน ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองข้างต้น แต่ใช้ดินปลอดเชื้อ โดยนำดินไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน และไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียในวัสดุพาหะที่คัดเลือกได้

ชุดควบคุมที่ 3 เพื่อศึกษาความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของจุลินทรีย์ในดินเมื่อเติมวัสดุพาหะที่คัดเลือกได้ปลอดเชื้อที่ไม่ได้มีการเพาะเลี้ยงกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย STK จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองข้างต้น

3.5.2 การเจริญและการอยู่รอดร่วมกับการย่อยสลายไพรีนในดินสภาวะ slurry อัตราส่วนดิน 1 กรัมต่อน้ำ 8 มิลลิลิตร (รุจา สารคุณ, 2548)

ชุดการทดลองที่ 1 นำตัวอย่างดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมาผสมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียในวัสดุพาหะที่คัดเลือกได้ เพื่อศึกษาการอยู่รอดและความสามารถในการย่อยสลายไพรีนในดินของกล้าเชื้อแบคทีเรียในวัสดุที่คัดเลือกได้ โดยชั่งดิน 7.5 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไพรีน 100 มก.ต่อลิตร (รุจา สารคุณ, 2548) มาละลายในอะซิโตน แล้วผสมลงในดินที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน เพื่อให้อะซิโตนระเหยจนหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไป 72 มล. แล้วผสมให้เข้ากัน เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียในวัสดุพาหะที่คัดเลือกแล้ว 1.5 กรัม ผสมให้เข้ากัน เตรียมชุดการทดลองทั้งหมด 24 ขวดรูปชมพู่ สำหรับเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 , 2 , 4 , 6 , 8 และ 10 วัน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน โดยนำ 2 ขวดแรกมาสกัด เพื่อหาไพรีนที่เหลืออยู่ โดยนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนดินกับน้ำ สกัดตัวอย่างแยกส่วนวัฏภาคดินกับวัฏภาคน้ำ โดยส่วนของวัฏภาคดินสกัดด้วยไดคลอโรมีเธนตามวิธีข้อ 3.3.3 และส่วนวัฏาคน้ำสกัดด้วยเอธิลอะซีเตท ทำโดยนำส่วนวัฏภาคน้ำที่ทราบปริมาตรแน่นอนมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 2.0-3.0 โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นเติมเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของวัฏภาคน้ำลงในวัฏภาคน้ำผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นแยกส่วนเอธิลอะซีเตทเก็บไว้ ทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อซ้ำอีก 2ครั้ง รวมส่วนเอธิลอะซีเตททั้งหมดเข้าด้วยกัน กำจัดน้ำที่ปนออกมาโดยการเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส จากนั้นนำส่วนเอธิลอะซีเตทไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน เติมเมธานอลปริมาตร 1 มล. ลงไปละลายสาร PAHs ในขวดก้นกลม กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตรใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็ก แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ โดยวิธี HPLC ต่อไป เพื่อดู

ความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของกล้าเชื้อแบคทีเรีย และนำ 2 ขวดที่เหลือ มาตรวจหากลุ่มแบคทีเรีย STKและแบคทีเรียในดิน ตามวิธีข้อ 3.3.2 เพื่อดูการอยู่รอดของแบคทีเรีย โดยติดตามจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย STKและแบคทีเรียในดิน จากลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร

ชุดการทดลองที่ 2 ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นเป็น 1000 มก.ต่อ กก.ของดิน

ชุดควบคุม เพื่อศึกษาความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของจุลินทรีย์ที่มีในดิน ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองข้างต้น แต่ไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียในวัสดุพาหะที่คัดเลือกได้