การบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจาก
ห้องปฏิบัติการด้วยวิธีทางชีวภาพ

นางสาวปิโยบล คอนรัตน์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOREMEDIATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON CONTAMINATED LIQUID-WASTE FROM LABORATORY

Miss Piyobol Kornrat

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจากห้องปฏิบัติการด้วยวิธีทางชีวภาพ
โดย	นางสาวปิโยบล คอนรัตน์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปิโยบล คอนรัตน์ : การบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจากห้องปฏิบัติการด้วยวิธีทางชีวภาพ (BIOREMEDIATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON CONTAMINATED LIQUID-WASTE FROM LABORATORY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. กาญจณา จันทองจีน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์, 92 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้ทดลองบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนสารประกอบกลุ่ม PAHs ที่เกิดจากงานวิจัยของหน่วยวิจัยการบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้วยวิธีชีวภาพ ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนมีการปนเปื้อนของ PAHs 3 ชนิด ได้แก่ ไพรีน ฟลูออแรนธีน และฟีแนนทรีน 0.65-2.34 0.32-0.49 และ 0.49-0.58 มก./ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน 1 ลิตร โดยมีการสะสม 11.49-35.89 5.88-8.55 และ 5.22-5.33 มก./กก.ในวัฏภาคตะกอน ตามลำดับ งานวิจัยนี้ใช้การลดปริมาณลงของไพรีนในวัฏภาคตะกอนเพื่อศึกษาการบำบัด PAHs ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน เมื่อศึกษาการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนโดยการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง 200 รอบ/นาที และใช้แบคทีเรียท้องถิ่น พบว่าแบคทีเรียท้องถิ่นสามารถบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนได้ โดยในวันที่ 16 จะมีไพรีนเหลืออยู่ 2.1 มก./กก. แต่เมื่อเติมไพรีน 100 มก./ลิตร เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาการบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวที่มีการปนเปื้อน PAHs ในปริมาณสูงเป็นผลให้มีไพรีน 400-757 มก./กก.ในวัฏภาคตะกอน พบว่าแบคทีเรียท้องถิ่นไม่สามารถบำบัดได้ โดยในวันที่ 16 จะมีไพรีนเหลืออยู่ 317.8 มก./กก. เมื่อทดลองเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK กลุ่มแบคทีเรีย TP และ TRCB ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไพรีนลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่เติมไพรีน 100 มก./ลิตร พบว่าชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนดีที่สุดโดยในวันที่ 16 จะมีไพรีนเหลืออยู่ 4.0 มก./กก. ภาวะที่เหมาะสมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ในการบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนในงานวิจัยนี้ คือ ภาวะความเป็นกรด-เบส 7.0 เติมอาหารเหลว CFMM (ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต และแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต) ความเข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 8.9 มล./ลิตร และให้อากาศโดยการบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที เป็นเวลา 16 วัน ปริมาณไพรีนในวันที่ 16 ของการทดลอง ลดลงเหลือ 3.0 มก./กก. ผ่านมาตรฐานสหภาพยุโรป สามารถปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมได้ เมื่อทำการตรวจติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เติมลงไปในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนระหว่างการบำบัดด้วยการวิเคราะห์ DGGE พบว่าในวันสุดท้ายของการทดลองกลุ่มแบคทีเรีย STK ยังคงมีชีวิตอยู่

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต ปิโยบล คอนรัตน์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ....

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ....

4872595823 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : LIQUID-WASTE/ PAHs/ PYRENE/ BIOREMEDIATION/ CONSORTIUM/ PHYSICAL AND CHEMICAL CONDITIONS

PIYOBOL KORNRAT: BIOREMEDIATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON CONTAMINATED LIQUID-WASTE FROM LABORATORY. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF. KANCHANA JUNTONGJIN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSST.PROF. KOBCHAI PATTARAGULWANIT, Dr.rer.nat., 92 pp.

This research aimed to bioremediate polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated liquid-waste from Bioremediation research unit, Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn university. It found that the liquid-waste polluted with pyrene, fluoranthene and phenanthrene at 0.65-2.34 0.32-0.49 and 0.49-0.58 mg/l, which were 11.49-35.89 5.88-8.55 and 5.22-5.33 mg/kg in sediment phase respectively. The decrease of pyrene in sediment was used as representative PAHs for monitoring biodegradation under these studies. By shaking the waste at 200 rpm under room temperature, indigenous bacteria could bioremediate the pollution since pyrene remaining was 2.1 mg/kg at day 16. One hundred mg/l pyrene was added to make 400-757 mg/kg in sediment phase to be as a model for remediation of high PAHs contamination. The result indicated that indigenous bacteria could not bioremediate the pollution since pyrene remaining was 317.8 mg/kg at day 16. Three highly effective degradaing bacterial consortium, STK TP and TRCB, were selected to treat the contaminated liquid-waste. It was found that the STK consortium had highest pyrene degrading activity and at day 16 pyrene remaining was 4.0 mg/kg. The suitable physical and chemical conditions for STK consortium to degrade pyrene in the liquid-waste were pH 7.0, adding 8.9 ml/l of 100-time strength of CFMM (without $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ and $CaCl_2 \cdot 2H_2O$) and incubated by shaking 300 rpm at room temperature for 16 days. The result showed that pyrene remaining at the end of day 16 was 3.0 mg/kg. From directive of the Council of the European Community, the treated contaminated liquid-waste could be discharged to the environment. DGGE profile to determine the STK consortium population after 16 days of contaminated liquid-waste bioremediation indicated that STK consortium could survive.

Department: Microbiology Student's Signature Piyobol Kornrat

Field of Study: Industrial Microbiology Thesis Advisor's Signature Kanchana Juntongjin

Academic Year: 2008 Thesis Co-advisor's Signature K. Patt

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ด้วยดี ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วนสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน ที่ให้เกียรติรับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย เป็นอย่างสูงที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และช่วยกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาฯ ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยในการดำเนินการวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยการบำบัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธีและศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย ที่มีส่วนสนับสนุนในการดำเนินการวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และขอขอบคุณน้องสาวที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือตลอดจนกำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญภาพ	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ	ฏ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. วารสารปริทัศน์	4
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย	25
3.1 เตรียมของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) จากห้องปฏิบัติการ	31
3.2 ศึกษาการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนโดยแบคทีเรียท้องถิ่น	33
3.3 ศึกษาการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนโดยแบคทีเรียท้องถิ่นเมื่อเติมไพรีน 100 มก./ลิตร	33
3.4 ศึกษาการย่อยสลายไพรีนที่เติมลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนเมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK TP และ TRCB	34
3.5 หาภาวะทางเคมีและกายภาพที่เหมาะสมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ในการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน	35
3.5.1 การให้อากาศ	35
3.5.2 ภาวะความเป็นกรด-เบส	36
3.5.3 สารอาหาร	37
3.6 ติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เติมลงไปในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนระหว่างการบำบัด	38

บทที่ หน้า
4. ผลการทดลอง.. 45
4.1วิเคราะห์ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนพอลิไซคลิกอะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน.. 45
4.2 ผลการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนโดยแบคทีเรีย ท้องถิ่น.. 47
4.3 ผลการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนโดยแบคทีเรีย ท้องถิ่นเมื่อเติมไพรีน 100 มก./ลิตร.. 48
4.4 ผลการเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK TP และ TRCB ต่อการย่อยสลายไพรีนที่เติมลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน.. 49
4.5 ภาวะทางเคมีและกายภาพที่เหมาะสมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ในการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน.. 51
4.5.1 ผลการให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็วต่างๆ ต่อการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK.. 51
4.5.2 ผลการปรับภาวะความเป็นกรด-เบสของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนต่อการย่อยสลายไพรีนเมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK....... 54
4.5.3 ผลการเสริมอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK.................... 56
4.6 ผลการติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เติมลงไปในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนระหว่างการบำบัด.. 58
5. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.. 60
รายการอ้างอิง.. 69
ภาคผนวก.. 79
ภาคผนวก ก.. 80
ภาคผนวก ข.. 82
ภาคผนวก ค.. 89
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.. 92

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 โครงสร้างและสมบัติทางกายภาพและเคมีของสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนบางชนิด (Juhasz และ Naidu, 2000)……………………………… 5

2.2 สมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของไพรีน... 6

2.3 โครงสร้างทางเคมีและความสามารถในการก่อให้เกิดมะเร็งของ PAHs บางชนิด (Cerniglia, 1992)………………………………………………………………… 9

2.4 โครงสร้างทางเคมีของ PAHs ที่องค์การพิทักษ์สิ่งแวดล้อม สหรัฐอเมริกาได้กำหนดว่าเป็นสารมลพิษที่มีลำดับความสำคัญก่อน (Witt, 1995)………………………….. 11

2.5 แบคทีเรียและราบางชนิดที่สามารถย่อยสลาย PAHs (Cerniglia, 1993)…………… 15

2.6 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน............... 17

2.7 ตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน.............................. 18

2.8 ตัวอย่างงานวิจัยที่เกิดจากหน่วยวิจัยการบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย... 20

3.1 ชนิดและความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ของกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย.... 30

4.1 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน.. 45

4.2 การกระจายตัวของ PAHs ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน................................ 46

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

2.1 โครงสร้างทางเคมีของไพรีน (Schirmer และคณะ, 1998)................................... 6

2.2 กระบวนการกำจัด PAHs ในสิ่งแวดล้อม (Cerniglia, 1992)................................ 12

2.3 วิถีกระบวนการสลาย PAHs โดยจุลินทรีย์ (Cerniglia, 1993)............................. 16

2.4 วิถีการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย (bacteria consortium) ที่คัดแยกจากป่าชายเลน (Luan และคณะ, 2006)... 19

4.1 การเจริญและปริมาณไพรีนที่เหลือจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียท้องถิ่น................. 47

4.2 การเจริญและปริมาณไพรีนที่เหลือจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียท้องถิ่นเมื่อเติมไพรีน 100 มก./ลิตร... 48

4.3 ผลการเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK TP และ TRCB ต่อการย่อยสลายไพรีนที่เติมลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน.. 50

4.4 ผลการให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็วต่างๆ ต่อการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK.. 52

4.5 ผลการให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที ต่อการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เปรียบเทียบกับไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK.. 53

4.6 ผลการปรับภาวะความเป็นกรด-เบสของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนต่อการย่อยสลายไพรีนเมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK... 55

4.7 ผลการเสริมอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK.. 57

4.8 แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rDNA แสดงพลวัตรประชากรแบคทีเรียที่พบระหว่างการบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน โดยวิธี DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40 – 70% denaturant... 59

ค.1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไพรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC.. 89

รูปที่ หน้า

ค.2 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออแรนธีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์
โดยวิธี HPLC.. 90
ค.3 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟีแนนทรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดย
วิธี HPLC.. 91

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ชม. = ชั่วโมง

กก. = กิโลกรัม

มก. = มิลลิกรัม

มล. = มิลลิลิตร

มม. = มิลลิเมตร

% = เปอร์เซ็นต์

$^{\circ}$ซ = องศาเซลเซียส

CFU = Colony Forming Unit

(หนึ่งโคโลนีที่คาดว่าเกิดจากหนึ่งเซลล์ของแบคทีเรีย)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันการเพิ่มของประชากร การขยายตัวทางเศรษฐกิจ การพัฒนาด้านอุตสาหกรรม และการเกษตรของประเทศไทยมีอย่างต่อเนื่อง ก่อให้เกิดการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของปริมาณ จำนวน และชนิดของของเสียอันตราย ซึ่งรวมถึงสารเคมีที่มีบทบาทสำคัญในชีวิตประจำวันของมนุษย์ในด้านต่างๆ ของเสียประเภทนี้มีส่วนประกอบของสารอินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะสารประกอบกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) (กรมควบคุมมลพิษ, 2548)

PAHs เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก 2 วงขึ้นไปเชื่อมต่อกัน เกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์และเชื้อเพลิงประเภทน้ำมัน (Molina และคณะ, 1999) พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย เช่น อากาศ ดิน ตะกอน และน้ำ (Juhasz และ Naidu, 2000) มีสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และถูกดูดซับบนอนุภาคดินและตะกอน (Yu และคณะ, 2005) ทำให้มีความคงทน ไม่สลายได้ง่ายในสิ่งแวดล้อม (Lei และคณะ, 2005) จัดเป็นสารมลพิษที่ได้รับการเฝ้าระวังมากกว่าสารอื่นว่ามีผลต่อสิ่งแวดล้อมและก่อให้เกิดผลเสียต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจากสามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลัน (acute toxic) มีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) สารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagen) และสามารถทำให้เกิดความผิดปกติต่อทารกในครรภ์ (teratogen) (Cai และคณะ, 2007)

กระบวนการกำจัด PAHs ออกจากสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพวิธีหนึ่ง คือ การใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลาย (Tam และคณะ, 2002) หรือวิธีการบำบัดทางชีวภาพ (Bioremediation) (Dean-Ross และคณะ, 2002) โดยจุลินทรีย์จะใช้สารประกอบ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญ ทำให้สาร PAHs ถูกกำจัดอย่างถาวรหรือเปลี่ยนโครงสร้างเป็นสารอื่นที่ลดความเป็นพิษให้น้อยลงหรือหมดไป วิธีการบำบัดทางชีวภาพ แบ่งออกได้เป็น 3 วิธี คือ กระบวนการย่อยสลายทางธรรมชาติ (natural attenuation) โดยจุลินทรีย์ท้องถิ่น (indigenous microorganism) ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย การกระตุ้นการย่อยสลายของจุลินทรีย์ท้องถิ่นให้เพิ่มขึ้นโดยการเติมสารอาหาร ในกรณีที่สิ่งแวดล้อมมีสารอาหารอย่างจำกัด

(biostimulation) และการเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่น (exogenous microorganism) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายตามที่ต้องการ ในกรณีที่จุลินทรีย์ท้องถิ่นไม่สามารถย่อยสลายสารพิษได้เอง (bioaugmentation) (Yu และคณะ, 2005)

การย่อยสลาย PAHs ด้วยจุลินทรีย์เป็นวิธีที่ได้รับความสนใจมาเป็นระยะเวลานาน เนื่องจากพบว่าเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายต่ำและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Eriksson และคณะ, 2002) ทำให้เกิดการศึกษาวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับการกำจัดสารประกอบ PAHs ออกจากสิ่งแวดล้อมขึ้นเป็นจำนวนมาก

หน่วยวิจัยการบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นหน่วยวิจัยหนึ่งที่ศึกษาการบำบัดสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) เป็นส่วนใหญ่และมีผลงานวิจัยจำนวนมาก ยกตัวอย่างเช่น

ทิมากร แสงดำ (2547) ได้แยกกลุ่มแบคทีเรีย STK จากปุ๋ยหมักใบมะขามพบว่าประกอบด้วย *Zoogloea* sp. *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. กลุ่มแบคทีเรียนี้มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไพรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในห้องปฏิบัติการ และยังสามารถย่อยสลาย PAHs อื่น เช่น ฟีแนนทรีน อะซีแนพธิลีน ไดเบนโซฟูแรน และอะซีแนพธีน เป็นต้น

วรกฤษฎ์ สภานนท์ (2549) ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ของกลุ่มแบคทีเรีย TAF+P, TAF-PP, TAF/5PC2-LB และ TAF/5R2CB ที่คัดแยกโดย จิรทีปฆ์ แสนรัก (2547) จากใบของพืชตระกูลถั่ว พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย TAF+P มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายไพรีน รองลงมาคือ TAF/5R2CB นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย TAF+P มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอนทราซีนและฟลูออแรนธีน กลุ่มแบคทีเรีย TAF/5R2CB มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและฟีแนนทรีน เป็นต้น

เนื่องจากหน่วยวิจัยการบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เริ่มปฏิบัติงานวิจัยมาเป็นเวลากว่าสิบปี จึงทำให้เกิดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนสารประกอบ PAHs อยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมาย

ที่จะบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนสารประกอบกลุ่ม PAHs ด้วยวิธีชีวภาพ โดยใช้กลุ่มแบคทีเรีย STK TAF+P หรือกลุ่มแบคทีเรีย TAF/5R2CB ที่คัดแยกได้จากหน่วยวิจัยนี้และมีประสิทธิภาพสูงมากในการย่อยสลาย PAHs จากนั้นหาภาวะทางเคมีและกายภาพที่เหมาะสมกับกลุ่มแบคทีเรีย ทำให้การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนมีประสิทธิภาพ พร้อมทั้งตรวจติดตามพลวัตประชากรกลุ่มแบคทีเรียที่เติมลงไประหว่างการบำบัด เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนสารประกอบกลุ่ม PAHs ที่เกิดจากงานศึกษาวิจัยให้ลดปริมาณลงจนอยู่ในระดับที่สามารถปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อมได้อย่างปลอดภัยต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจากห้องปฏิบัติการด้วยวิธีทางชีวภาพ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แนวทางในการบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจากห้องปฏิบัติการด้วยวิธีทางชีวภาพ และสามารถปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมได้อย่างปลอดภัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)

สมบัติทางกายภาพและเคมี

พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยวงอะโรมาติก 2 วงขึ้นไปเชื่อมต่อกัน โดยมีการจัดเรียงตัวเป็นแบบเชิงเส้น (Linear) เชิงมุม (Angular) หรือเป็นกลุ่ม (Cluster) (Valentín และคณะ, 2007) PAHs แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ PAHs น้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Low Molecular Weight PAHs, LMW) ประกอบด้วยวงอะโรมาติก 2 ถึง 3 วง และ PAHs น้ำหนักโมเลกุลสูง (High Molecular Weight PAHs, HMW) ประกอบด้วยวงอะโรมาติก 4 วงขึ้นไป (Molina และคณะ, 1999) PAHs เป็นสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำ มีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำ ทำให้มีความคงทนในสิ่งแวดล้อม โดยทั่วไปสภาพละลายได้ของ PAHs จะลดลงตามการเพิ่มจำนวนของวงเบนซีนที่เชื่อมต่อกัน (Juhasz และ Naidu, 2000) โดย PAHs น้ำหนักโมเลกุลต่ำ จะมีความสามารถในการละลายน้ำและถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่า ในขณะที่ PAHs น้ำหนักโมเลกุลสูง สามารถดูดซับกับดินและตะกอนได้อย่างแข็งแรง ทนทานต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์ได้มากกว่า ดังนั้น PAHs น้ำหนักโมเลกุลสูง จึงมีแนวโน้มที่จะดำรงอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน (Molina และคณะ, 1999)

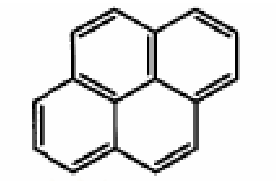
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 โครงสร้างและสมบัติทางกายภาพและเคมีของสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนบางชนิด (Juhasz และ Naidu, 2000)

PAHs	จำนวนวง	จุดหลอมเหลว (°ซ)	จุดเดือด (°ซ)	สภาพละลายได้ในน้ำ (มก./ลิตร)	ความดันไอ (ทอร์ ที่ 20°ซ)
ฟีแนนทรีน	3	101	340	1.29	$6.8x10^{-4}$
แอนทราซีน	3	216	340	0.07	$2.0\ x10^{-4}$
ฟลูออแรนธีน	4	111	250	0.26	$6.0x10^{-6}$
เบนซ์[*เอ*] แอนทราซีน	4	158	400	0.014	$5.0x10^{-9}$
ไพรีน	4	149	360	0.14	$6.8x10^{-7}$
ไครซีน	4	255	488	0.002	$6.3x10^{-7}$
เบนโซ[*เอ*]ไพรีน	5	179	496	0.0038	$5.0x10^{-7}$
ไดเบนซ์[*เอ,เอช*] แอนทราซีน	5	262	524	0.0005	$1.0x10^{-10}$
เบนโซ[*จี,เอช,ไอ*] เพอริลีน	6	222	-	0.0003	$1.0x10^{-10}$
อินดิโน[1,2,3-*ซีดี*] ไพรีน	6	163	536	0.062	$1.0x10^{-10}$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไพรีน (pyrene)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของไพรีน (Schirmer **และคณะ**,1998)

ไพรีน จัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) ประกอบด้วยวงเบนซีน 4 วง มีชื่อทางเคมีว่า เบนโซ[*ดี,อี,เอฟ*]ฟีแนนทรีน (benzo[*d,e,f*]phenanthrene) หมายเลขสากลทางเคมี 129-00-0 (Verschueren, 1997) เมื่ออยู่ในสถานะของแข็งจะไม่มีสี และมีสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของไพรีน

สูตรโมเลกุล	$C_{16}H_{10}$	(Verschueren, 1997)
น้ำหนักโมเลกุล	202.25 กรัม/โมล	(Verschueren, 1997)
ความถ่วงจำเพาะ	1.271 กรัม/ต่อมล. ที่ 23 $^{\circ}$ซ	(Verschueren, 1997)
ความดันไอ	6.85x10^{-7} มม.ปรอท	(Verschueren, 1997)
อุณหภูมิหลอมเหลว	151-156 $^{\circ}$ซ	(Verschueren, 1997)
อุณหภูมิกลายเป็นไอ	360-404 $^{\circ}$ซ	(Verschueren, 1997)
สภาพละลายได้ในน้ำ	0.14 มก./ลิตร	(Juhasz และ Naidu, 2000)
ค่าครึ่งชีวิตในดินและตะกอนดิน	19.4-630 วัน	(Daugulis และ McCracken, 2003)

ไพรีน มีโครงสร้างของโมเลกุลที่เสถียร ละลายน้ำได้น้อยมาก (Trzesicka-Mlynarz และ Ward, 1996) แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด เช่น เมธานอล เฮกเซน อะซีโตน (Patnaik, 1992) ไพรีน มักดูดซับกับอนุภาคของดินได้ดี จึงทำให้ทนทานต่อการย่อยสลาย เนื่องจากจุลินทรีย์ในดินสามารถนำไปใช้ประโยชน์ (bioavailability) ได้น้อย เป็นผลให้ไพรีนสะสมและมีความเสถียรในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน (Aronstein และคณะ, 1991)

ประโยชน์ของไพรีน คือ ใช้ในงานวิจัย หรือใช้เพื่อผลิตสี พลาสติก ยาปราบแมลงศัตรูพืช และเบนโซ[*เอ*]ไพรีน มนุษย์สามารถรับไพรีนเข้าสู่ร่างกายได้โดยการหายใจเอาควันบุหรี่หรืออากาศที่มีการปนเปื้อน การสัมผัสกับผิวหนัง และจากการรับประทานอาหารที่ผ่านการย่างหรือรมควัน ถึงแม้ว่าไพรีนจะไม่จัดเป็นสารก่อมะเร็งแต่หากสัมผัสโดยตรง (skin irritant) จะทำให้ผิวหนังเกิดการระคายเคือง และมีรายงานว่าผู้หญิงที่สูบบุหรี่หรืออยู่ในบริเวณที่มีควันบุหรี่เป็นเวลานานระหว่างตั้งครรภ์ จะมีผลทำให้พันธุกรรมของเด็กทารกเกิดการเปลี่ยนแปลง (mutation) ได้ (Zanieri และคณะ, 2007)

แหล่งกำเนิด

PAHs เป็นสารมลพิษที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์ สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ ดิน และตะกอน (Bernal- Martinez และคณะ, 2007) Cerniglia, (1992) และ Wilson และ Jones, (1993) สรุป PAHs มีแหล่งกำเนิดของ ดังต่อไปนี้

การซึมของน้ำมันดิบในธรรมชาติ
การแพร่กระจายของน้ำเสียชุมชนและอุตสาหกรรมปิโตรเคมี
การรั่วไหลที่เกิดจากอุบัติเหตุจากเรือบรรทุกน้ำมันและเรือชนิดอื่น
กระบวนการแยกและแปรสภาพก๊าซธรรมชาติจากเชื้อเพลิงฟอสซิล
การใช้แหล่งพลังงานและความร้อนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล
กระบวนการกลั่นน้ำมันดิบและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากน้ำมันดิบ
กระบวนการการผลิตถ่านโค้ก
การผลิตและการใช้คาร์บอนแบล็ค
การผลิตและการใช้แอสฟัลท์
กระบวนการรักษาเนื้อไม้
การผลิตผลิตภัณฑ์ถนอมเนื้อไม้ที่ใช้คลีโอโสทเป็นองค์ประกอบหลัก
การเก็บ การขนส่ง กระบวนการผลิต การใช้และการกำจัดน้ำมันเชื้อเพลิง
การกำจัดสิ่งปฏิกูลโดยการฝังดิน
การเผาไหม้ของถ่านหินในระบบแบบเปิด
การเผาสิ่งปฏิกูล

การกระจายตัวของ PAHs ในสิ่งแวดล้อม

PAHs ในอากาศ ไฟป่า ควันเสียจากรถยนต์ การเผาไหม้ถ่านหิน การระเหยจากดินและน้ำ ก่อให้เกิด PAHs ในอากาศ โดยพบว่า PAHs น้ำหนักโมเลกุลต่ำในบรรยากาศมีแหล่งกำเนิดจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิลและจากยานยนต์น้ำมันดีเซล ในขณะที่ PAHs น้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น เบนโซ[*เอ*]ไพรีน มีแหล่งกำเนิดจากยานยนต์น้ำมันเบนซิน (Juhasz และ Naidu, 2000)

PAHs ในตะกอน การรั่วซึมของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากการผลิตหรือขนส่งในทะเลและการบำบัดน้ำเสีย ก่อให้เกิดการสะสมของ PAHs ในตะกอนซึ่งมีความหลากหลายทั้งชนิดและปริมาณ โดยสามารถพบ PAHs ที่มีวงอะโรมาติกตั้งแต่ 2 ถึง 6 และมีปริมาณตั้งแต่ไม่กี่ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมจนถึงกรัมต่อกิโลกรัม (Molina และคณะ, 1999)

PAHs ในดิน การเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิลทำให้ PAHs กระจายตัวเข้าสู่ดิน (Juhasz และ Naidu, 2000) และสะสมในสิ่งแวดล้อม เนื่องจาก PAHs มีสภาพละลายได้ในน้ำต่ำจึงขัดขวางสภาพพร้อมใช้ทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ (Valentín และคณะ, 2007) ความเข้มข้นของ PAHs ที่พบในดินจะแปรผันตามกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับพื้นที่นั้น (Juhasz และ Naidu, 2000)

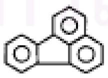
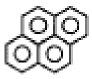
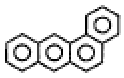
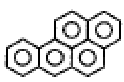
PAHs ในน้ำ การปนเปื้อนของ PAHs ในน้ำ มีแหล่งกำเนิดจากการชะล้างของดินที่ปนเปื้อนและจากน้ำเสียที่ปล่อยทิ้ง ส่วนใหญ่การกำจัด PAHs ในน้ำจะใช้วิธีการออกซิไดส์ โดยใช้โอโซน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือแมงกานีสออกไซด์ นอกจากนี้อาจใช้คาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวดูดซับ (Toruño และคณะ, 2007)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความเป็นพิษ

งานวิจัยจำนวนมากแสดงให้เห็นว่า PAHs ที่ประกอบด้วยวงอะโรมาติก 1 ถึง 3 วง ก่อให้เกิดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลัน ในขณะที่ PAHs น้ำหนักโมเลกุลสูง ก่อให้เกิดมะเร็งและการกลายพันธุ์ (Juhasz และ Naidu, 2000) โดยความสามารถในการก่อให้เกิดมะเร็งและการกลายพันธุ์ของ PAHs จะแปรผันตามจำนวนของวงอะโรมาติก PAHs ที่ประกอบด้วยวงอะโรมาติก 2-3 วง เช่น แนพทาลีน (2 วง) ฟีแนนทรีนและแอนทราซีน (3 วง) พบว่าไม่เป็นสารก่อมะเร็ง PAHs ที่ประกอบด้วยวงอะโรมาติก 4 วง เช่น ไพรีน ก่อให้เกิดความผิดปกติต่อพันธุกรรมแต่ไม่ก่อให้เกิดมะเร็ง ในขณะที่ PAHs ที่ประกอบด้วยวงอะโรมาติก 5 วง เช่น เบนซ์[*เอ*]แอนทราซีนและเบนโซ[*เอ*]ไพรีน สามารถก่อให้เกิดความผิดปกติต่อพันธุกรรมและมะเร็งได้ (Dean-Ross และคณะ, 2002)

ตารางที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีและความสามารถในการก่อให้เกิดมะเร็งของ PAHs บางชนิด (Cerniglia, 1992)

สาร PAHs	**โครงสร้าง**	**สภาพละลายได้ในน้ำ (มก.ต่อลิตร)**	**ความสามารถในการก่อให้เกิดมะเร็ง**
แนพธาลีน		31.7	ไม่ก่อให้เกิดมะเร็ง
อะซีแนพธีน		3.9	ไม่ก่อให้เกิดมะเร็ง
แอนทราซีน		0.07	ไม่ก่อให้เกิดมะเร็ง
ฟีแนนทรีน		1.3	ไม่ก่อให้เกิดมะเร็ง
ฟลูออแรนธีน		0.26	อาจจะก่อให้เกิดมะเร็ง
ไพรีน		0.14	ไม่ก่อให้เกิดมะเร็ง
เบนซ์[*เอ*]แอนทราซีน		0.002	ก่อให้เกิดมะเร็ง
เบนโซ[*เอ*]ไพรีน		0.003	ก่อให้เกิดมะเร็ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำนักงานวิจัยมะเร็งนานาชาติ (The International Agency for Research Cancer; IARC) แบ่ง PAHs ออกเป็น 3 กลุ่ม ตามการออกฤทธิ์ในการก่อมะเร็ง (Sul และคณะ, 2003) ดังนี้

กลุ่ม 2A เป็นสารที่น่าจะก่อมะเร็งในมนุษย์ได้สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ มี 3 ชนิด ได้แก่ เบนโซ[*เอ*] แอนทราซีน เบนโซ[*เอ*]ไพรีน และไดเบนซ์[*เอ,เอช*]แอนทราซีน

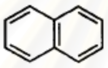
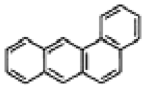
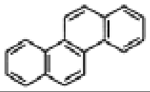
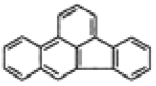
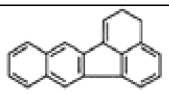
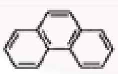
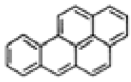
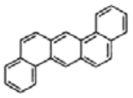
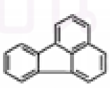
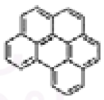
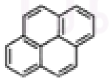
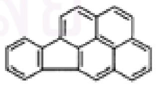
กลุ่ม 2B เป็นสารที่อาจก่อมะเร็งในมนุษย์ มี 11 ชนิด ได้แก่ แนพธาลีน เบนโซ[*บี*]ฟลูออแรนธีน เบนโซ[*เค*]ฟลูออแรนธีน เบนโซ[*เจ*]ฟลูออแรนธีน ไดเบนโซ[*เอ,เอช*]ไพรีน ไดเบนโซ[*เอ,แอล*]ไพรีน ไดเบนโซ[*เอ,อี*]ไพรีน ไดเบนโซ[*เอ,ไอ*]ไพรีน ไดเบนโซ[*เอ,เอช*]อะคริดีน ไดเบนโซ[*เอ,เจ*]อะคริดีน และอินดิโน[1,2,3-*ซีดี*]ไพรีน

กลุ่ม 3 เป็นสารที่ไม่ก่อมะเร็งในมนุษย์ มี 23 ชนิด ได้แก่ ไตรฟีนิลีน ฟีแนนทรีน แอนทราซีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธีน ไพรีน ไครซีน โคโรนีน เพอริลีน เบนโซ[*เอ*]อะคริดีน เบนโซ[*ซี*]อะคริดีน เบนโซ[*จี,เอช,ไอ*]ฟลูออแรนธีน เบนโซ [*เอ*]ฟลูออรีน เบนโซ [*บี*]ฟลูออรีน เบนโซ [*ซี*] ฟลูออรีน เบนโซ [*จี,เอช,ไอ*]เพอริลีน เบนโซ [*ซี*]ฟีแนนทรีน เบนโซ[*อี*]ไพรีน ไซโคลเพนทะ[*ซี,ดี*] ไพรีน ไดเบนซ์[*เอ,ซี*]แอนทราซีน ไดเบนโซ[*เอ,เจ*]แอนทราซีน ไดเบนโซ[*เอ,อี*]ฟลูออแรนธีน และไดเบนโซ[*เอช,อาร์,เอส,ที*]เพนทะฟีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

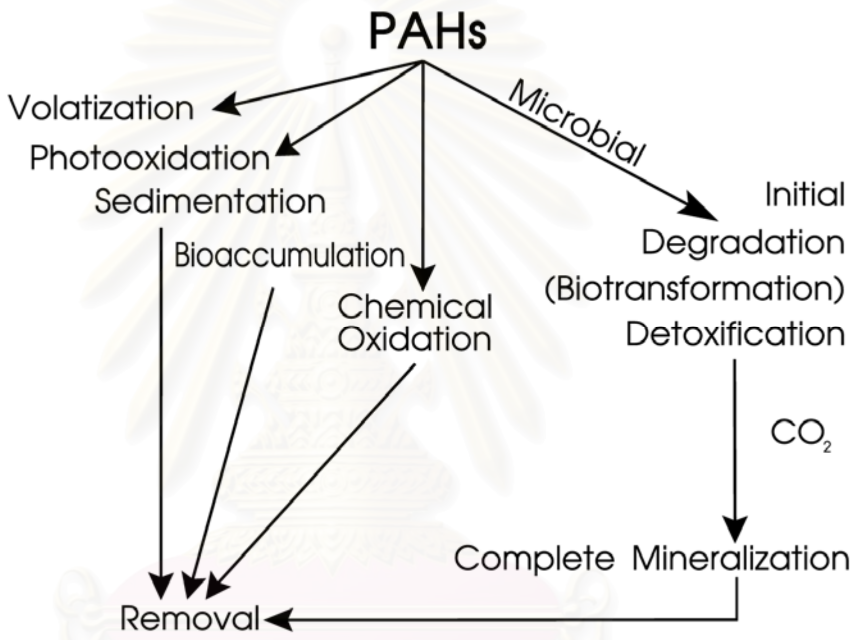
เนื่องจาก PAHs สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลัน (acute toxic) มีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) สารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagen) และมีความคงทน ไม่สลายได้ง่ายในสิ่งแวดล้อม องค์การพิทักษ์สิ่งแวดล้อม สหรัฐอเมริกา จึงกำหนดให้สารประกอบ PAHs 16 ชนิด เป็นสารมลพิษที่ได้รับการเฝ้าระวังมากกว่าสารอื่นและต้องกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างเร่งด่วน (Cerniglia, 1992)

ตารางที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของ PAHs ที่องค์การพิทักษ์สิ่งแวดล้อม สหรัฐอเมริกาได้กำหนดว่าเป็นสารมลพิษที่มีลำดับความสำคัญก่อน (Witt, 1995)

สาร PAHs	**โครงสร้าง**	**สาร PAHs**	**โครงสร้าง**
แนพธาลีน		เบนซ์[*เอ*]แอนทราซีน	
อะซีแนพธิลีน		ไครซีน	
อะซีแนพธีน		เบนซ์[*บี*]ฟลูออแรนธีน	
ฟลูออรีน		เบนซ์[*เค*]ฟลูออแรนธีน	
ฟีแนนทรีน		เบนโซ[*เอ*]ไพรีน	
แอนทราซีน		ไดเบนซ์[*เอ,เอช*]แอนทราซีน	
ฟลูออแรนธีน		เบนโซ[*จี,เอช,ไอ*]เพอริลีน	
ไพรีน		อินดิโน[1,2,3-*ซีดี*]ไพรีน	

กระบวนการกำจัด PAHs ออกจากสิ่งแวดล้อม

PAHs ในสิ่งแวดล้อมสามารถถูกกำจัดได้จากหลายกระบวนการ ซึ่งประสิทธิภาพการกำจัดจะขึ้นอยู่กับสมบัติทางกายภาพและเคมีของสารประกอบ PAHs รวมทั้งปัจจัยต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม (Tam และคณะ, 2002) ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 กระบวนการกำจัด PAHs ในสิ่งแวดล้อม (Cerniglia, 1992)

การระเหยกลายเป็นไอ

การระเหยของสาร PAHs เกิดจากการรวมตัวกับโครงสร้างของน้ำแล้วระเหยไป ดังนั้น PAHs ที่ปนเปื้อนในน้ำจะมีอัตราการระเหยสูงกว่า PAHs ที่อยู่ในดิน และ PAHs น้ำหนักโมเลกุลจะมีอัตราการระเหยได้สูงกว่า PAHs น้ำหนักโมเลกุลสูง (Ashok และ Saxena, 1995)

การออกซิไดส์ด้วยแสง

กลไกการย่อยสลายจะขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิและปริมาณความเข้มข้นของแสง (Reyes และคณะ, 1998; Warner และคณะ, 2004)

การออกซิไดส์ทางเคมี

โดยใช้ โอโซน ซึ่งเป็นตัวออกซิไดซ์ที่แรง (Nam และ Kukor, 2000) หรือสารเคมีที่มีสมบัติเกิดไฮดรอกซีเรดิเคิล (hydroxyl ($OH^{\cdot}$) radicles) เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (Nadarajah และคณะ, 2002) เพื่อสลายสารประกอบ PAHs

การสะสมทางชีวภาพ

นอกเหนือจาก อากาศ ตะกอน ดินและน้ำ PAHs ยังสามารถสะสมได้ในสิ่งมีชีวิตทางทะเลและพืชอีกด้วย การได้รับ PAHs ของสิ่งมีชีวิตทางทะเลจะขึ้นอยู่กับสภาพพร้อมใช้ทางชีวภาพของ PAHs ขนาดของสิ่งมีชีวิต และอัตราการกิน ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสะสมของ PAHs ในพืช ได้แก่ คุณสมบัติทางกายภาพของ PAHs สภาวะทางสิ่งแวดล้อม สายพันธุ์และโครงสร้างของพืช (Juhasz และ Naidu, 2000)

การดูดซับบนอนุภาคตะกอน

เนื่องจาก PAHs มีสภาพละลายได้ในน้ำต่ำและมีสัมประสิทธิ์การแบ่งส่วนในออคทานอลและน้ำสูง ดังนั้นตะกอนจึงเป็นที่สะสมของ PAHs และมีความเข้มข้นในน้ำต่ำมาก (Juhasz และ Naidu, 2000) PAHs น้ำหนักโมเลกุลสูงจะเกาะติดแน่นเป็นเวลานานกว่า PAHs น้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Chin และคณะ, 1997)

แต่กระบวนการกำจัด PAHs ที่มีประสิทธิภาพเป็นที่ยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ หรือวิธีการบำบัดทางชีวภาพ (bioremediation) ซึ่งเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายต่ำและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Leys และคณะ, 2005)

วิธีการบำบัดทางชีวภาพ (Bioremediation)

วิธีที่ใช้จุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายสารมลพิษทางสิ่งแวดล้อม โดยจุลินทรีย์จะใช้สาร PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญ ทำให้สาร PAHs ถูกกำจัดอย่างถาวร โดย PAHs บางชนิดสามารถถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์จนได้คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำและพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ (mineralization) หรือเปลี่ยนโครงสร้างเป็นสารอื่นที่ลดความเป็นพิษให้น้อยลงหรือหมดไป (biotransformation) ซึ่งสารที่ได้เรียกว่า สารมัธยันตร์ (intermediate)กระบวนการย่อยสลาย PAHs อาจเกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์ชนิดเดียวหรือโดยกลุ่มจุลินทรีย์ (Gibson และ Subramanian, 1984) วิธีการบำบัดทางชีวภาพ แบ่งออกได้เป็น 3 วิธี คือ

1.กระบวนการย่อยสลายทางธรรมชาติ (natural attenuation) โดยจุลินทรีย์ท้องถิ่น (indigenous microorganism) ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย และเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ (Mills และคณะ, 2003) ข้อดีของวิธีนี้ คือ หลีกเลี่ยงการทำลายระบบนิเวศ อย่างไรก็ตามการบำบัดวิธีนี้มักใช้เวลานาน เนื่องจากขนาดประชากรของจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่มีความสามารถในการย่อยสลายต่ำ และเนื่องจากจุลินทรีย์ต้องเผชิญกับปัจจัยในสิ่งแวดล้อมที่ไม่สามารถควบคุมได้ ทำให้ความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษของจุลินทรีย์มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา

2.การกระตุ้นการย่อยสลายของจุลินทรีย์ท้องถิ่นให้เพิ่มขึ้น (biostimulation) โดยการเติมสารอาหารหรือซับสเตรต เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปรแตสเซียม การให้ออกซิเจน รวมทั้งการเติมสารลดแรงตึงผิว ซึ่งจะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของสารไฮโดรคาร์บอน ทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Haigh, 1996) บางกรณีการเติมเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและมูลสัตว์ จะเป็นการเพิ่มปริมาณสารอาหารและปริมาณออกซิเจน ทำให้สภาวะเหมาะสมต่อสิ่งมีชีวิตบริเวณนั้น นอกจากนี้ยังช่วยลดความสามารถในการเข้าจับกับอนุภาคดินของ PAHs จุลินทรีย์จึงนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างรวดเร็ว (Kästner และ Mahro, 1996) ดังนั้นการกระตุ้นที่เหมาะสมจะทำให้จุลินทรีย์ท้องถิ่นมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารปนเปื้อนได้ (Vidali, 2001)

3.การเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่น (exogenous microorganism) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายตามที่ต้องการ (bioaugmentation) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของ PAHs ในปริมาณสูงและจุลินทรีย์ท้องถิ่นไม่สามารถปรับตัวเพื่อย่อยสลายสารพิษเองได้ โดยจุลินทรีย์อาจได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม (genetically engineered microorganism, GEM) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย (Trzesicka-Mlynarz และ Ward, 1996) ข้อควรคำนึงถึงของวิธีการนี้ คือ ภาวะการแข่งขันระหว่างจุลินทรีย์ต่างถิ่นกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น (indigenous microorganisms) ซึ่งจุลินทรีย์ต่างถิ่นจะต้องสามารถเพิ่มจำนวนและอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อมนั้น ๆ (Vidali, 2001)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการบำบัด PAHs

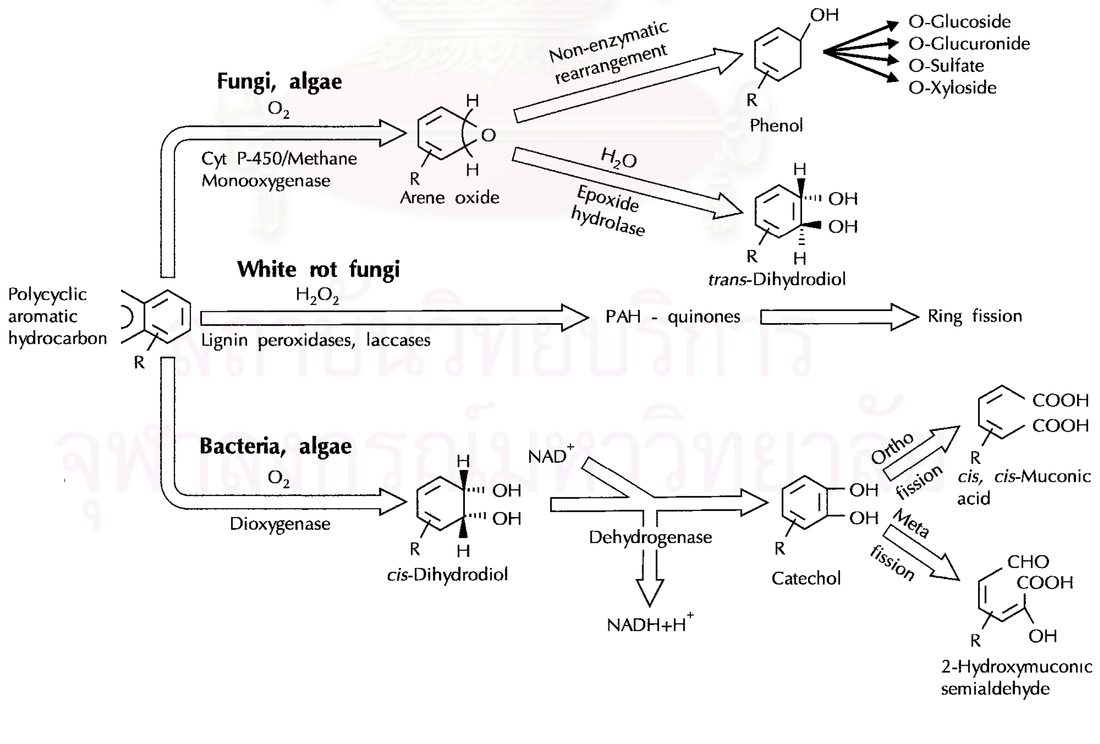
จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ใช้ในการย่อยสลาย PAHs ได้แก่ แบคทีเรียและรา white rot fungi ซึ่งจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดจะย่อยสลายสาร PAHs ด้วยกลไกที่ต่างกัน โดยแบคทีเรียจะใช้ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ในขณะที่ราจะเปลี่ยน PAHs ไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่หมดความเป็นพิษ (Cerniglia, 1993)

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PAHs (Cerniglia, 1993)

แบคทีเรีย	**รา**
Acmetobacter sp.	*Aspergillus niger*
Aeromonas sp.	*B]erkandera adusta*
Alcaligenes denitrificans	*Can&da utilis*
Arthrobacter sp.	*Claviceps paspali*
Bacillus cereus	*Cunninghamella bainieri*
Beijerinckia sp.	*Hyphochytriurn catenoides*
Mycobacterium sp.	*Penicdlium chrysogenum*
Pseudomonas sp.	*Rhizopus oryzae*
Rhodococcus sp.	*Smittiurn culisetae*
Staphylococcus auriculans	*Trametes versicolor*

การย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรียจะเกิดได้ทั้งภายใต้สภาวะใช้และไม่ใช้อากาศ การย่อยสลาย PAHs ภายใต้สภาวะไม่ใช้อากาศเป็นกระบวนการที่ช้าและกลไกทางชีวเคมียังไม่เป็นที่กระจ่าง ตรงกันข้ามกับการย่อยสลายภายใต้สภาวะใช้อากาศซึ่งได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางในทศวรรษที่ผ่านมา (Harayama, 1997) ปฏิกิริยาการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรียจะเกี่ยวข้องกับการเติมออกซิเจนเข้าไปเพื่อเปิดวงอะโรมาติก (cleavage of the aromatic ring) ด้วยเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (dioxygenase) ซึ่งเกิดขึ้นได้ 2 วิถี คือ วิถีเมตา (*meta* pathway) และวิถีออโธ (*ortho* pathway) (Juhasz และ Naidu, 2000)

การย่อยสลาย PAHs โดยรา ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 กลุ่มหลักได้แก่ ไซโตโครมพี-450 โมโนออกซีจีเนส (cytochrome P-450 Monoxygenases, Cyt P-450) และลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidases, LiPs) โดยไซโตโครมพี-450 โมโนออกซีจีเนส จะแคตาไลซ์ PAHs และกำจัดออกจากเซลล์ในรูปของ *0*-กลูโคไซด์ (*0*-glucoside), *0*-กลูคูโรไนด์ (*0*-glucuronide), *0*-ซัลเฟต (*0*-sulfate) หรือ *0*-ไซโลไซด์ (*0*-xyloside) ส่วนลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidases, LiPs) จะสลาย PAHs เกิดเป็นควินโนน (quinones)



รูปที่ 2.3 วิถีกระบวนการสลาย PAHs โดยจุลินทรีย์ (Cerniglia, 1993)

การย่อยสลายไพรีน

การย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรีย

แบคทีเรียบริสุทธิ์ งานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารไพรีน จากตัวอย่าง ดิน น้ำหรือตะกอนที่มีการปนเปื้อนสารประกอบ PAHs พบว่ามีทั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Mycobacterium* sp. *Norcardia* sp. และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Burkholderia* sp. *Pseudomonas* sp. *Sphingomonas* sp. ดังแสดงในตารางที่ 2.6 เป็นต้น

ตารางที่ 2.6 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
Mycobacterium sp. สายพันธุ์ BB1	Fritzsche (1994)
Mycobacterium sp. สายพันธุ์ CH1	Churchill และคณะ (1999)
Burkholderia cepacia สายพันธุ์ VUN10,001	Juhasz และคณะ(1997)
Pseudomonas putida	Doong และ Lei (2003)
Sphingomonas paucimobilis สายพันธุ์ EPA 505	Ye และคณะ (1995)

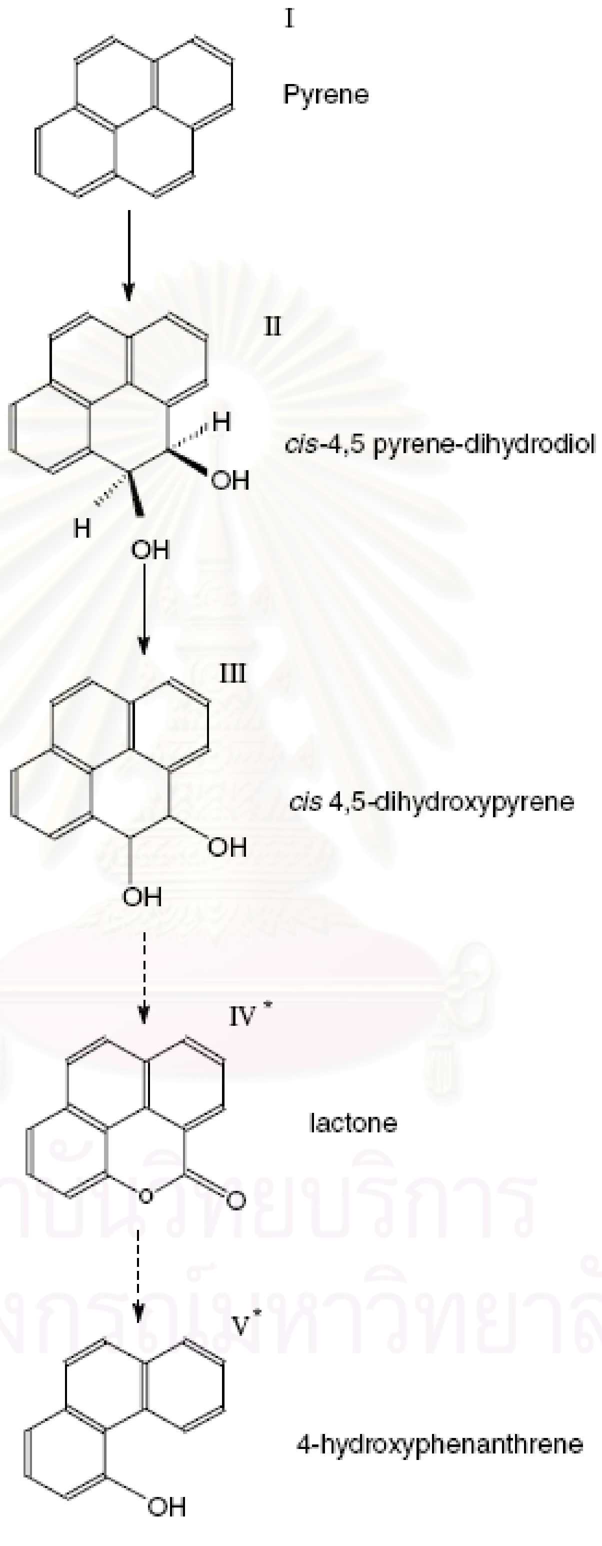
กลุ่มแบคทีเรีย ไพรีนหรือ PAHs น้ำหนักโมเลกุลสูงที่ประกอบด้วยวงอะโรมาติกตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป จะมีความเสถียรสูงและยากต่อการย่อยสลาย ซึ่งแบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์เดี่ยวส่วนใหญ่ไม่สามารถย่อยสลายสารดังกล่าวได้อย่างสมบรูณ์ การย่อยสลายสาร PAHs ที่มีโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อนจึงต้องอาศัยกระบวนการย่อยสลายแบบโคเมแทบอลิซึมหรือการย่อยสลายโดยกลุ่มจุลินทรีย์ (Wilson และ Jones, 1993)

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน

กลุ่มแบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
VUN 10,009	Boonchan และคณะ, (2000)
YL	Lin และ Cai, (2008)
RRMV-3	จิรทีปฆ์ แสนรัก, (2547)
STK	ทิมากร แสงดำ, (2547)
F2	Trzesicka-Mlynarz และ Ward (1996)
DC1	Smith และคณะ (1997)
B1-B6	Yuan และคณะ (2000)
C2CO C2PPN	Cui และคณะ (2008)

การย่อยสลายโดยกลุ่มจุลินทรีย์ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ส่งผลให้อัตราเร็วในการย่อยสลายเพิ่มขึ้น ที่สำคัญยังทำให้เกิดการย่อยสลายสาร PAHs ได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) ไม่ก่อให้เกิดสารมัธยันตร์ที่เป็นพิษ เนื่องจากกลุ่มจุลินทรีย์จะมีการทำงานแบบเสริมการเจริญซึ่งกันและกัน (synergism) (Yuan และคณะ, 2000)

กลไกการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียในการย่อยสลายสาร PAHs คือ แบคทีเรียชนิดที่ 1 สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายสารตั้งต้นได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายสารให้สมบูรณ์ เนื่องจากไม่สามารถย่อยสลายสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นภายในระบบได้ (dead-end metabolite) จึงทำให้เกิดการสะสมของสารมัธยันตร์ดังกล่าวซึ่งอาจเป็นพิษต่อแบคทีเรียชนิดที่ 1 ในขณะที่แบคทีเรียชนิดที่ 2 จะมีระบบเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารมัธยันตร์นั้นได้ทำให้ความเป็นพิษของสารมัธยันตร์ลดลง หรือสามารถนำสารดังกล่าวไปใช้ในการเจริญได้ ผลจากการเจริญของแบคทีเรียชนิดที่ 2 อาจสร้าง วิตามิน กรดอะมิโน หรือสารที่ช่วยให้มีการย่อยสลายสารตั้งต้นดีขึ้น เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียชนิดอื่นต่อไป (Mueller และคณะ, 1989)



รูปที่ 2.4 **วิถีการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย** (bacteria consortium) **ที่คัดแยกจากป่าชายเลน** (Luan **และคณะ**, 2006)

หน่วยวิจัยการบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เป็นหน่วยวิจัยที่ศึกษาการบำบัดสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) เป็นส่วนใหญ่ เริ่มปฏิบัติงานวิจัยมาเป็นเวลากว่าสิบปีและมีผลงานวิจัยจำนวนมาก จึงทำให้เกิดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนสารประกอบ PAHs ขึ้นเป็นจำนวนมากเช่นกัน

ตารางที่ 2.8 ตัวอย่างงานวิจัยที่เกิดจากหน่วยวิจัยการบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

งานวิจัย	เอกสารอ้างอิง
ความสามารถของแบคทีเรียดินที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายฟีแนนทรีนและพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น	ณัฐพันธุ์ ศุภกา, (2542)
ความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายแอนทราซีนและพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น	พจนีย์ จันทมาลี, (2543)
การใช้วัสดุจากกการเกษตรเร่งการย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ในดิน	นารีรัตน์ เจริญช่าง, (2544)
สารมัธยันตร์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่แยกได้จากใบมะขาม *Tamarindus india* Linn	ปิยะวรรณ เพชราภา, (2549)

เนื่องจาก PAHs สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลัน (acute toxic) มีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) สารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagen) และมีความคงทน ไม่สลายได้ง่ายในสิ่งแวดล้อม ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนสารประกอบ PAHs จากหน่วยวิจัยนี้จึงจัดเป็นของเสียอันตราย สามารถก่อให้เกิดอันตรายทั้งต่อผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการและก่อให้เกิดปัญหามลพิษได้หากปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม ดังนั้นของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน PAHs จึงจำเป็นต้องมีการบำบัดก่อนปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งกระบวนการที่มีประสิทธิภาพ เป็นที่ยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลายในการกำจัด PAHs คือ การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ หรือวิธีการบำบัดทางชีวภาพ (Bioremediation) (Tam และคณะ, 2002)

ข้อกำหนดการทิ้งของเสียที่มีการปนเปื้อน PAHs

ประเทศสหรัฐอเมริกา

องค์การพิทักษ์สิ่งแวดล้อม (Environmental Protection Agency) กำหนดมาตรฐานคุณภาพของ PAHs ในน้ำเสียว่ามีฟีแนนทรีน อะซีแนพธีน แอนทราซีน ฟลูออรีน และ อะซีแนพธิลีน ไม่เกิน 0.059 มก./ลิตร ฟลูออแรนธีน ไม่เกิน 0.068 มก./ลิตร และมีไพรีน ไม่เกิน 0.067 มก./ลิตร (http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69-c7.pdf)

ประเทศสหรัฐอเมริกา รัฐจอร์เจีย

กำหนดว่าห้ามปล่อยทิ้งน้ำเสียที่มีปริมาณ PAHs เกิน 0.4865 มก./ลิตร (http://www.ccwa1.com/doc/sect.six.aspx)

ประเทศออสเตรเลีย รัฐทัสมาเนีย

มาตรฐานที่ยอมรับได้สำหรับ PAHs ในของเสียที่เป็นของเหลว คือ 5 มก./ลิตร (http://www.environment.tas.gov.au/file.aspx?id=1907)

ประเทศแอฟริกาใต้ (Snyman และ Herselman 2006)

กำหนดความเข้มข้นรวมทั้งหมดของ PAHs 11 ชนิด ได้แก่ อะซีแนพธีน ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธีน ไพรีน เบนโซ[*บี*]ฟลูออแรนธีน เบนโซ[*เจ*]ฟลูออแรนธีน เบนโซ[*เค*]ฟลูออแรนธีน เบนโซ[*เอ*]ไพรีน เบนโซ [*จี,เอช,ไอ*]เพอริลีน และ อินดิโน[1,2,3-*ซีดี*]ไพรีน ในตะกอนน้ำเสีย ห้ามเกิน 6 มก./กก.

ประเทศเดนมาร์ก

มาตรฐานสำหรับความเข้มข้นสูงสุดของ PAHs 11 ชนิด ได้แก่ อะซีแนพธิลีน ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธีน ไพรีน เบนโซ[*บี*]ฟลูออแรนธีน เบนโซ[*เจ*]ฟลูออแรนธีน เบนโซ[*เค*]ฟลูออแรนธีน เบนโซ[*เอ*]ไพรีน เบนโซ [*จี,เอช,ไอ*]เพอริลีน และ อินดิโน[1,2,3-*ซีดี*]ไพรีน ในตะกอนน้ำเสีย ห้ามเกิน 6 และ 3 มก./กก. ในปี ค.ศ. 1997 และ 2000 ตามลำดับ (http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/sludge_pollutants_3.pdf)

สหภาพยุโรป (Pérez และคณะ, 2001)

กำหนดปริมาณ PAHs ในตะกอนน้ำเสียที่จะนำไปใช้ในการเกษตรห้ามเกิน 6 มก./กก.

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนสารประกอบกลุ่ม PAHs ที่เกิดจากงานศึกษาวิจัยด้วยวิธีชีวภาพ โดยใช้กลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากหน่วยวิจัยนี้และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs สูงมาก ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรีย STK ที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิกสูง เปรียบเทียบกับกลุ่มแบคทีเรีย TAF+P และ TAF/5R2CB ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ได้เจาะจงคัดเลือกสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิกโดยตรง

กลุ่มแบคทีเรีย STK (ทิมากร แสงดำ, 2547)

เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากปุ๋ยหมักใบมะขามโดยใช้แผ่นพอลิเตตระฟลูออโรเอทธิลีน (polytetrafluoroethylene, PTFE) ที่เคลือบด้วยไพรีน ประกอบด้วยแบคทีเรีย STK1 STK2 และ STK3 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในจีนัส *Zoogloea* sp., *Stenotrophomas* sp. และ *Mesorhizobium* sp.

กลุ่มแบคทีเรีย STK มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มก./ลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM) ได้หมดภายในเวลา 8 วัน นอกจากนี้ยังสามารถใช้สาร PAHs อื่นได้อีกหลายชนิด ได้แก่ ฟีแนนทรีน ไดเบนโซฟูแรน อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน รวมทั้งสามารถย่อยสลายแอนทราซีนและฟลูออรีนได้เล็กน้อย โดยมีอัตราการย่อยสลายสาร PAHs ที่แตกต่างกัน แต่กลุ่มแบคทีเรีย STK ไม่สามารถย่อยสลายฟลูออแรนทีน ไครซีน เบนโซ[*เอ*]ไพรีน และ เพอริลีนได้

กลุ่มแบคทีเรีย STK มีสมบัติไฮโดรโฟบิกสูง เนื่องจากมีความสามารถในการเกาะติดเจริญและย่อยสลายผลึกไพรีนที่เคลือบบนแผ่น PTFE ซึ่งเป็นวัสดุพอลิเมอร์ของพอลิเตตระฟลูออโรเอทธิลีนและมีสมบัติไฮโดรโฟบิกสูง

จะเห็นได้ว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK มีความหลากหลายในการใช้สาร PAHs ดังนั้นจึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำกลุ่มแบคทีเรียนี้ไปใช้บำบัดสาร PAHs ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนจากห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีการปนเปื้อนของ PAHs หลายชนิด อีกทั้งสมบัติไฮโดรโฟบิกที่สูงของเซลล์ที่แยกได้ ทำให้คาดว่ากลุ่มแบคทีเรียจะสามารถกระจายตัวจากวัฏภาคน้ำไปจับและดูดซับกับ PAHs ซึ่งมีสภาพการละลายในน้ำต่ำและเกาะติดกับวัฏภาคตะกอนได้ดี ส่งผลให้กลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถย่อยสลาย PAHs ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนได้ นอกจากนี้ยัง

พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถเจริญและย่อยสลายไพรีนในดินสภาวะ slurry ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน คือ มีส่วนของดินและน้ำได้ (ปิยะวรรณ เพชราภา, 2549)

กลุ่มแบคทีเรีย TAF+P และ กลุ่มแบคทีเรีย TAF/5R2CB (จิรทีปฆ์ แสนรัก, 2547)

เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากใบของพืชตระกูลถั่วด้วยวิธี enrichment culture technique โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM) ที่มีไพรีนความเข้มข้น 100 มก./ลิตร

วรกฤษฎ์ สภานนท์ (2549) ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนความเข้มข้นเริ่มต้น 1000 มก./ลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่คัดแยกได้โดย ทิมากร แสงดำ, (2547) กลุ่มแบคทีเรีย TAF+P TAF-PP TAF/5PC2-LB และ TAF/5R2CB ที่คัดแยกได้โดย จิรทีปฆ์ แสนรัก (2547) พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย TAF+P มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนสูงที่สุดรองลงมา คือ กลุ่มแบคทีเรีย TAF/5R2CB TAF/5PC2-LB TAF-PP และ กลุ่มแบคทีเรีย STK โดยในวันที่ 5 ของการทดลองจะมีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 0.1726 0.7777 1.2080 1.6382 และ 21.1805 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย TAF+P สามารถย่อยสลายแอนทราซีนและฟลูออแรนธีน กลุ่มแบคทีเรีย TAF/5R2CB สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและฟีแนนทรีน ได้อีกด้วย จะเห็นได้ว่ากลุ่มแบคทีเรีย TAF+P TAF-PP TAF/5PC2-LB และ TAF/5R2CB สามารถย่อยสลายไพรีนได้ดีกว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK โดยกลุ่มแบคทีเรีย TAF+P และ TAF/5R2CB มีประสิทธิภาพดีที่สุด

เนื่องจากกลุ่มแบคทีเรีย TAF+P และ TAF/5R2CB สามารถย่อยสลายไพรีนที่ความเข้มข้นสูงได้และมีความหลากหลายในการใช้สาร PAHs โดยเฉพาะแอนทราซีนและฟลูออแรนธีนที่กลุ่มแบคทีเรีย STK ย่อยสลายได้เล็กน้อยและไม่ได้ ตามลำดับ จึงเป็นประโยชน์ในการบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนจากห้องปฏิบัติการซึ่งมีการปนเปื้อนของ PAHs หลายชนิด อีกทั้งกลุ่มแบคทีเรีย TAF+P และ TAF/5R2CB เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ได้เจาะจงคัดเลือกสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิกโดยตรงเหมือนกับกลุ่มแบคทีเรีย STK เนื่องจากคัดแยกด้วยวิธี enrichment culture technique ทำให้อาจมีประโยชน์ในการบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนในวัฏภาคน้ำได้ดี

จากนั้นหาภาวะทางเคมีและกายภาพที่เหมาะสมกับกลุ่มแบคทีเรีย ทำให้การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนมีประสิทธิภาพ พร้อมทั้งตรวจติดตามพลวัตประชากรกลุ่มแบคทีเรียที่เติมลงไประหว่างการบำบัดโดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชากรแบคทีเรียระหว่างกระบวนการบำบัดทางชีวภาพ (Nakatsu และคณะ, 2000; Cunliffe และ Kertesz, 2005; Piskonen และคณะ, 2005; Ozaki และคณะ, 2007)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องชั่ง, บริษัท METTLER TOLEDO, สวิสเซอร์แลนด์.
    - ทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285
    - ทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น P2002-S
2. ชุดเครื่องผลิตน้ำปลอดประจุ, บริษัท ELGA, อังกฤษ.
    - เครื่องสูบน้ำ รุ่น LA534
    - เครื่องกรองน้ำ รุ่น ELGASTART OPTION 3A
    - ถังเก็บน้ำปริมาตร 25 ลิตร
    - เครื่องผลิตน้ำปลอดประจุ รุ่น MAXIMA ULTRAPURE WATER
3. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ, บริษัท SANYO Electric Biomedical Co., LTD, ญี่ปุ่น.
    - อุณหภูมิ – 80 ^{o}ซ รุ่น CVK-UB2
    - อุณหภูมิ – 20 ^{o}ซ รุ่น MDF-U536D
4. ชุดอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพเจล, บริษัท Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา.
    - Gel Doc
    - โปรแกรม Quantity One เวอร์ชั่น 4.4.1
5. เครื่องเขย่า
    - รุ่น Innova 4330, บริษัท New Brunswick Scientific, สหรัฐอเมริกา.
    - รุ่น Innova 4000, บริษัท New Brunswick Scientific, สหรัฐอเมริกา.
    - รุ่น Innova 2100, บริษัท New Brunswick Scientific, สหรัฐอเมริกา.
    - รุ่น 420, บริษัท Thermo Electron Corporation, สหรัฐอเมริกา.
6. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส รุ่น SevenEasy S20K, บริษัท METTLER TOLEDO, สวิสเซอร์แลนด์.
7. ตู้ควัน รุ่น AIRONRE 1200-GS, บริษัท SAFELAB SYSTEM, อังกฤษ.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงชนิดอ่าง รุ่น BANDELIN SONOREX RK 100, บริษัท BANDELIN electronic, เยอรมนี.
9. ชุดเครื่องมือทำไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) สำหรับตรวจสอบชนิดและปริมาณของ PAHs, บริษัท Shimadzu, ญี่ปุ่น.
    - เครื่องควบคุมระบบ (system controller) รุ่น SCL – 10A VP
    - ลิควิดโครมาโทกราฟ (liquid chromatograph) รุ่น LC - 10AD VP
    - เครื่องกำจัดแก๊ส (degasser) รุ่น DGU – 14A
    - เครื่องตรวจหา (UV-Vis detector) รุ่น SPD - 10A VP
    - ออโตอินเจคเตอร์ (autoinjector) รุ่น SIL - 10AD VP
    - เตาอบคอลัมน์ (column oven) รุ่น CTO – 10AS VP
    - เครื่องบันทึก (recorder) รุ่น C-RIA
    - คอลัมน์ (column) รุ่น Inertsill ODS-3 ขนาด 4.6 x 150 มม., บริษัท GL Science, ญี่ปุ่น.
10. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น GENIE2, บริษัท Scientific Industries, สหรัฐอเมริกา.
11. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร, บริษัท Gilson, ฝรั่งเศส.
12. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มล., บริษัท Nissho Nipro, ญี่ปุ่น.
13. หัวกรอง ชนิด PTFE ขนาดความกว้างของรู 0.20 ไมโครเมตร, บริษัท RESTEK COPORATION, สหรัฐอเมริกา.
14. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave), บริษัท TOMY Kogyo, ญี่ปุ่น.
    - รุ่น ES-315
    - รุ่น SS-325
15. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UE 600, บริษัท Memmert, เยอรมนี.
16. ตู้อบแห้ง (oven) รุ่น UL 80, บริษัท Memmert, เยอรมนี.
17. ตู้เขี่ยเชื้อ “ISSCO” LAMINAR FLOW รุ่น RV–124, บริษัท INTERNATIONAL SCIENTIFIC SUPPLY CO.,LTD, สหรัฐอเมริกา.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

18. ชุดเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator), บริษัท TOKYO RIKAKIKAI CO., LTD, ญี่ปุ่น.
    - เครื่องควบคุมอุณหภูมิ รุ่น EYELA CCA-1110
    - เครื่องสูบน้ำ รุ่น A-3S
    - เครื่องระเหยแห้ง รุ่น EYELA N-1000
    - อ่างน้ำดิจิตัล รุ่น SB-1000
19. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น SPECTRONIC 20GENYSYS, บริษัท SPECTRONIC Instruments, สหรัฐอเมริกา.
20. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A, บริษัท Shimadzu, ญี่ปุ่น.
21. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น J-30I, บริษัท BECKMAN COULTER, สหรัฐอเมริกา.
22. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งพื้น (centrifuge) รุ่น 6500, บริษัท KUBOTA CORPORATION TOKYO, ญี่ปุ่น.
23. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น type B 5050 E, บริษัท Heraeus, เยอรมนี.
24. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Pico, บริษัท Kendro, เยอรมนี.
25. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น MylabTH Thermo-Block SLTDB-120, บริษัท SeouLin Bioscience, เกาหลี.
26. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycle) รุ่น MJ Mini^{TM} Personal Thermal Cycler, บริษัท Biorad, สหรัฐอเมริกา
27. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) Mini gel electrophoresis system, บริษัท Mupid-2 Advance, ญี่ปุ่น.
28. ชุดเครื่องมือ DCode^{TM} system, บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา
29. ปิเปต (pipette) ขนาด 1 5 และ 10 มล., บริษัท HBG, เยอรมนี.

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เคมีภัณฑ์

1. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3), บริษัท J.T. Baker, สหรัฐอเมริกา.
2. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต (Na_2HPO_4•$12H_2O$), บริษัท Merck, เยอรมนี.
3. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4), บริษัท Merck, เยอรมนี.
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH), บริษัท Merck, เยอรมนี.
5. กรดไฮโดรคลอริก (HCl), บริษัท Merck, เยอรมนี.
6. ทริปโตน (tryptone), บริษัท B.D., สหรัฐอเมริกา.
7. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract), บริษัท Bio Springer, ฝรั่งเศส.
8. วุ้นแบคโต (Bacto agar), บริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา.
9. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต ($MgSO_4$•$7H_2O$), บริษัท Merck, เยอรมนี.
10. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2$•$2H_2O$), บริษัท Merck, เยอรมนี.
11. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3$•$6H_2O$), บริษัท Carlo ERBA reagent, อิตาลี.
12. ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (CH_3SOCH_3), บริษัท Merck, เยอรมนี.
13. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4), บริษัท Merck, เยอรมนี.
14. เมธานอล (CH_3OH), บริษัท Merck, เยอรมนี.
15. เอธิลอะซีเตท ($CH_3COOC_2H_5$), บริษัท Merck, เยอรมนี.
16. ไดคลอโรมีเธน (CH_2Cl_2), บริษัท Merck, เยอรมนี.
17. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl), บริษัท Merck, เยอรมนี.
18. ไพรีน (pyrene), บริษัท Kanto Chemical, ญี่ปุ่น.
19. ฟีแนนทรีน (phenanthrene), บริษัท ZIGMA CHEMICAL, สหรัฐอเมริกา.
20. อะซีแนพธิลีน (acenaphthylene), บริษัท Kanto Chemical, ญี่ปุ่น.
21. ไดเบนโซฟูแรน (dibenzofuran), บริษัท Kanto Chemical, ญี่ปุ่น.
22. อะซีแนพธีน (acenaphthene), บริษัท ZIGMA CHEMICAL, สหรัฐอเมริกา.
23. ฟลูออแรนธีน (fluoranthene), บริษัท Kanto Chemical, ญี่ปุ่น.
24. ฟลูออรีน (fruorene), บริษัท Wako Pure Chemical, ญี่ปุ่น.
25. แนพธาลีน (naphthalene), บริษัท Kanto Chemical, ญี่ปุ่น.
26. แอนทราซีน (anthracene), บริษัท Kanto Chemical, ญี่ปุ่น.
27. โซเดียมอะซีเตต (CH_3COONa), บริษัท Merck, เยอรมนี.

28. ฟีนอล (phenol), บริษัท Merck, เยอรมนี.
29. อะกาโรสเจล (agarose gel), บริษัท IUAI, ญี่ปุ่น.
30. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenolblue), บริษัท Fluka, เยอรมนี.
31. Ribonuclease A (RNase A), บริษัท Sigma, สหรัฐอเมริกา.
32. *Taq* DNA polymerase, บริษัท New England Biolabs, อังกฤษ.
33. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP, บริษัท New England Biolabs, อังกฤษ.
34. 1 kb DNA ladder, บริษัท New England Biolabs, อังกฤษ.
35. 100 base pair DNA ladder, บริษัท New England Biolabs, สหรัฐอเมริกา.
36. โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์, บริษัท PROLIGO, สหรัฐอเมริกา.
37. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$), บริษัท Sigma, สหรัฐอเมริกา.
38. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$), บริษัท Sigma, สหรัฐอเมริกา.
39. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$), บริษัท Nacalai tesque, ญี่ปุ่น.
40. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), [($C_{16}H_{32}N(CH_3)_3$)Br], บริษัท TCI-EP, ญี่ปุ่น.
41. Glass powder for DNA recovery รุ่น EASYTRAP Ver.2, บริษัท TAKARA, ญี่ปุ่น.
42. Formamide (deionized), บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา.
43. 40% Acrylamide/Bis solution, 37.5:1 (2.6% C), บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา.
44. Urea, บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา.
45. Ammonium persulfate, บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา.
46. TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine), บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา.
47. Dye solution, บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา.
48. Ethidium bromide solution เข้มข้น 10 มก./มล., บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา.
49. โปรตีเนสเค, บริษัท Sigma, สหรัฐอเมริกา.
50. คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$), บริษัท LAB-SCAN ANALYTICAL SCIENCES, ไทย.
51. ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ($C_5H_{12}O$), บริษัท Sigma, สหรัฐอเมริกา.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

52. ไอโซโปรพานอล (C_3H_7OH), บริษัท BDH, อังกฤษ.

53. เอธานอล (absolute CH_3CH_2OH), บริษัท Merck, เยอรมนี.

54. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH), บริษัท Merck, เยอรมนี.

กลุ่มแบคทีเรีย งานวิจัยนี้มีการใช้กลุ่มแบคทีเรีย ดังนี้

ตารางที่ 3.1 ชนิดและความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ของกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

กลุ่มแบคทีเรีย	ชื่อที่ใช้ในงานวิจัย	PAHs ที่สามารถย่อยสลายได้	เอกสารอ้างอิง
กลุ่มแบคทีเรีย STK	STK	ไพรีน อะซีแนพธิลีน ฟีแนนทรีน อะซีแนพธีน ไดเบนโซฟูแรน	ทิมากร แสงดำ (2547)
กลุ่มแบคทีเรีย TAF+P	TP	ไพรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนธีน	จิรทีปฆ์ แสนรัก (2547)
กลุ่มแบคทีเรีย TAF/5R2CB	TRCB	ไพรีน อะซีแนพธิลีน ฟีแนนทรีน	จิรทีปฆ์ แสนรัก (2547)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เตรียมของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) จากห้องปฏิบัติการ

3.1.1 เก็บตัวอย่างของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

เก็บตัวอย่างของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนสาร PAHs ที่ไม่มีตัวทำละลายที่เป็นสารเคมีปะปนอยู่ จากถังเก็บของเสียขนาด 20 ลิตร จำนวน 3 ถัง ซึ่งได้มาจากการศึกษาวิจัยการบำบัดสารพิษอันตรายของห้องปฏิบัติการ 462 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้สายสูบน้ำสูบของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนในถังเก็บของเสียขึ้นลงเป็นเวลา 10 นาที เพื่อผสมวัฏภาคน้ำและวัฏภาคตะกอนของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนจากถังเก็บของเสียจำนวน 3 ถังมาผสมรวมกันในอัตราส่วน 1:1:1 (ปริมาตร:ปริมาตร:ปริมาตร) หลังจากนั้นนำของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนไปทำให้ตะกอนขนาดใหญ่แตกเป็นขนาดเล็กด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปทดลอง โดยเก็บของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนไว้ที่อุณหภูมิห้องระหว่างการดำเนินงานวิจัย

3.1.2 วิเคราะห์ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

- วิเคราะห์สภาพความเป็นกรด-เบส ด้วย pH meter
- ตรวจหาแบคทีเรียในตัวอย่างโดยวิธี Viable Plate Count

  โดยนำของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนมาเจือจางด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น
- วิเคราะห์ชนิดและปริมาณสาร PAHs โดยวิธี HPLC

  ปั่นแยกวัฏภาคน้ำและวัฏภาคตะกอนของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนปริมาตร 20 มล. ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที

  - สกัดหาชนิดและปริมาณสาร PAHs ในวัฏภาคน้ำด้วยเอธิลอะซีเตทโดยนำของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนวัฏภาคน้ำปริมาตร 5 มล.มาปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้เท่ากับ 2.0-3.0 โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นเติมเอธิลอะซีเตทปริมาตร 5 มล.ลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที ตั้ง

ทิ้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นแยกส่วนเอธิลอะซีเตทเก็บไว้ ทำการสกัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนวัฏภาคน้ำด้วยเอธิลอะซีเตทปริมาตร 5 มล.ซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมส่วนเอธิลอะซีเตททั้งหมดเข้าด้วยกัน กำจัดน้ำที่ปนออกมาโดยการเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส จากนั้นนำส่วนเอธิลอะซีเตทไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน เติมเมธานอลปริมาตร 1 มล. ลงไปละลาย PAHs ในขวดก้นกลม กรองสารละลาย PAHs ผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็ก เก็บที่อุณหภูมิ -20 ^{o}ซ จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

- สกัดหาชนิดและปริมาณสาร PAHs ในวัฏภาคตะกอนโดยวิธีดัดแปลงมาจากวิธีของ Juhasz และคณะ (1997) โดยเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส 1 เท่าของวัฏภาคตะกอนที่บรรจุในขวดแก้ว จากนั้นสกัดด้วยไดคลอโรมีเธนปริมาตร 1 เท่าของวัฏภาคตะกอน ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 2 นาที นำวัฏภาคตะกอนที่อยู่ในขวดแก้วไปจุ่มในอ่างกำเนิดเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแยกส่วนไดคลอโรมีเธนเก็บไว้ และสกัดวัฏภาคตะกอนด้วยไดคลอโรมีเธนซ้ำอีก 2 ครั้ง รวบรวมส่วนไดคลอโรมีเธนทั้งหมด ทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน เติมเมธานอลปริมาตร 1 มล.ลงไปละลาย PAHs ในขวดก้นกลม กรองสารละลาย PAHs ผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็ก เก็บที่อุณหภูมิ -20 ^{o}ซ จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

โดยใช้ภาวะดังนี้

- คอลัมน์ (column): inertsill® ODS ขนาด 4.6 x 150 มม.
- ตัวชะสาร (mobile phase): เมธานอล 80%
- อัตราไหล (flow rate): 1 มล./นาที
- อุณหภูมิคอลัมน์: 40 ^{o}ซ
- ความยาวคลื่นแสงอุลตราไวโอเลตที่ใช้ตรวจวิเคราะห์: 275 นาโนเมตร
- ปริมาตรสารที่ฉีด: 10 ไมโครลิตร

- วิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่สถาบันวิจัยภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 ศึกษาการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนโดยแบคทีเรียท้องถิ่น

Catallo และ Portier (1992) รายงานว่าในตะกอนที่มีการปนเปื้อน PAHs จะพบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้และย่อยสลาย PAHs ดังนั้นงานวิจัยขั้นต้นจึงทำการศึกษาการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนโดยแบคทีเรียท้องถิ่น

นำของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนปริมาตร 20 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มล. จำนวน 5 ขวด สำหรับเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 4 8 12 และ 16 ไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 วัน เก็บตัวอย่างจำนวน 1 ขวด ทุกๆ 4 วัน โดยตัวอย่างของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนใน 1 ขวดทดลอง จะถูกแบ่งออกมา 0.1 มล. เพื่อใช้หาปริมาณแบคทีเรียท้องถิ่น จากนั้นสกัดวิเคราะห์หาปริมาณไพรีนในวัฏภาคตะกอนจากของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่เหลือทั้งหมดในขวดทดลอง ตามวิธีที่แสดงในข้อ 3.1.2 ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ

3.3 ศึกษาการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนโดยแบคทีเรียท้องถิ่นเมื่อเติมไพรีน 100 มก./ลิตร

Moreda และคณะ (2001) และ Shiaris และ Jambard-Sweet (1986) รายงานว่าตะกอนจากน้ำเสียจะมีการสะสมของ PAHs 0.5-718 มก./กก.ในขณะที่ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนในงานวิจัยนี้มีการสะสมของ PAHs ในวัฏภาคตะกอน 5.22-35.89 มก./กก. ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการเพิ่มปริมาณ PAHs ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาการบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวในกรณีที่มีการปนเปื้อน PAHs ในปริมาณสูง

โดยเติมไพรีน 100 มก./ลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มล. ที่มีของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนปริมาตร 20 มล. จำนวน 5 ขวด สำหรับเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 4 8 12 และ 16 หลังจากนั้นนำขวดของเสียไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 วัน เก็บตัวอย่างตามวิธีที่แสดงในข้อ 3.2 ทุกๆ 4 วัน เพื่อหาปริมาณแบคทีเรียท้องถิ่นและสกัดวิเคราะห์หาปริมาณไพรีนในวัฏภาคตะกอน ตามวิธีที่แสดงในข้อ 3.1.2 ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 ศึกษาการย่อยสลายไพรีนที่เติมลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนเมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK TP และ TRCB

เนื่องจากแบคทีเรียท้องถิ่นไม่สามารถย่อยสลายไพรีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อของเสียที่เป็นของเหลวมีการปนเปื้อนของ PAHs ในปริมาณที่สูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทดลองเติมกลุ่มแบคทีเรีย (exogenous microorganism) ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs (bioaugmentation) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัด (Trzesicka-Mlynarz และ Ward, 1996) กลุ่มแบคทีเรียที่ใช้ในการบำบัดประกอบด้วย

- กลุ่มแบคทีเรีย STK (ทิมากร แสงดำ, 2547)
- กลุ่มแบคทีเรีย TP (จิรทีปฆ์ แสนรัก, 2547)
- กลุ่มแบคทีเรีย TRCB (จิรทีปฆ์ แสนรัก, 2547)

3.4.1 เตรียมกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้ย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

นำกลุ่มแบคทีเรีย STK, TP และ TRCB ที่เก็บไว้ที่ 4 $^{\circ}$ซ ปริมาตร 10 มล. มาเลี้ยงในอาหารเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM) ปริมาตร 90 มล. ที่มีไพรีนเข้มข้น 100 มก./ลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 8 วัน ปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียแต่ละกลุ่มด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ นาน 10 นาที ล้างส่วนเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ทำการปั่นเหวี่ยงในภาวะเดิมโดยทำตามขั้นตอนนี้ 2 ซ้ำ นำส่วนเซลล์แบคทีเรียมาแขวนลอยในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ปรับความเข้มข้นให้ได้ 7.3 log CFU/มล. นำเซลล์แขวนลอยที่ปรับความเข้มข้นแล้วมาเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 24 ชม.เพื่อให้แบคทีเรียใช้อาหารสะสมที่เหลืออยู่ในเซลล์ให้หมดไป (Grifoll และคณะ, 1995)

3.4.2 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียและการย่อยสลายไพรีนที่เติมลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

เติมไพรีน 100 มก./ลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มล. ที่มีของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนปริมาตร 20 มล. จำนวน 20 ขวด (5 ขวด/1 ชุดการทดลอง) สำหรับเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 4 8 12 และ 16 หลังจากนั้นเติมเซลล์แขวนลอยของกลุ่มแบคทีเรียแต่ละชนิด ได้แก่ STK TP และ TRCB (7.3 log CFU/มล.) ปริมาตร 2 มล. โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด ดังนี้

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชุดควบคุม ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่ไม่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรีย

ชุดการทดลองที่ 1 ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

ชุดการทดลองที่ 2 ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนเติมกลุ่มแบคทีเรีย TP

ชุดการทดลองที่ 3 ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนเติมกลุ่มแบคทีเรีย TRCB

นำขวดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนทุกชุดการทดลอง ไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 วัน เก็บตัวอย่างแต่ละชุดการทดลองตามวิธีที่แสดงในข้อ 3.2 ทุกๆ 4 วัน เพื่อหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและสกัดวิเคราะห์หาปริมาณไพรีนในวัฏภาคตะกอนตามวิธีที่แสดงในข้อ 3.1.2 ทำการทดลองชุดการทดลองละ 2 ซ้ำ

3.5 หาภาวะทางเคมีและกายภาพที่เหมาะสมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ในการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

ผลการทดลองจากข้อที่ 3.4 แสดงให้เห็นว่าการเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK จะทำให้การย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนมีประสิทธิภาพสูงที่สุด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้กลุ่มแบคทีเรีย STK ในการบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน PAHs หลังจากนั้นทดสอบหาภาวะทางเคมีและกายภาพที่เหมาะสมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ต่างๆ ดังนี้

3.5.1 การให้อากาศ

การให้อากาศหรือปริมาณออกซิเจน เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลาย PAHs ของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศน์ (Cerniglia, 1992) ดังนั้นการให้อากาศหรือออกซิเจนในปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้การย่อยสลาย PAHs มีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้จึงทำการทดลองหาความเร็วที่เหมาะสมของเครื่องเขย่าเพื่อให้อากาศแก่กลุ่มแบคทีเรีย STK โดยแบ่งการทดลองเป็น 5 ชุด ดังนี้

ชุดควบคุม เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที

ชุดการทดลองที่ 1 เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที

ชุดการทดลองที่ 2 เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที

ชุดการทดลองที่ 3 เขย่าที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที

ชุดควบคุมชุดการทดลองที่ 3 เขย่าที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที (ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK)

เนื่องจากการเขย่าให้อากาศแก่กลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที เป็นการเขย่าที่ความเร็วค่อนข้างสูง ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีชุดควบคุมชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที เช่นกันแต่จะไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพื่อศึกษาว่าการย่อยสลายไพรีนเกิดจากความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย STK หรือเกิดจากปัจจัยทางกายภาพ

3.5.1.1 เตรียมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพื่อย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

ตามวิธีที่แสดงในข้อ 3.4.1

3.5.1.2 ศึกษาการเจริญและการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรียทั้งหมดในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

เติมเซลล์แขวนลอยของกลุ่มแบคทีเรีย STK (7.3 log CFU/มล.) ปริมาตร 2 มล. ลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนปริมาตร 20 มล. ที่เติมไพรีน 100 มก./ลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มล. จำนวน 25 ขวด (5 ขวด/1 ชุดการทดลอง) หลังจากนั้นนำขวดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 200 250 และ 300 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 วัน เก็บตัวอย่างแต่ละชุดการทดลองตามวิธีที่แสดงในข้อ 3.2 ทุกๆ 4 วัน เพื่อหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและสกัดวิเคราะห์หาปริมาณไพรีนในวัฏภาคตะกอนตามวิธีที่แสดงในข้อ 3.1.2 ทำการทดลองชุดการทดลองละ 2 ซ้ำ

3.5.2 ภาวะความเป็นกรด-เบส

ภาวะความเป็นกรด-เบส เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลาย PAHs ของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศน์ (Cerniglia, 1992) เนื่องจากสิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการปรับภาวะความเป็นกรด-เบส ของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนเพื่อหาภาวะความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมต่อกลุ่มแบคทีเรีย STK และทำให้การย่อยสลายไพรีนมีประสิทธิภาพสูง โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด ดังนี้

ชุดควบคุม ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่ไม่มีการปรับภาวะความเป็นกรด-เบส

ชุดการทดลองที่ 1 ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน ภาวะความเป็นกรด-เบส 6.0

ชุดการทดลองที่ 2 ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน ภาวะความเป็นกรด-เบส 7.0

ชุดการทดลองที่ 3 ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน ภาวะความเป็นกรด-เบส 8.0

3.5.2.1 เตรียมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพื่อใช้ย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

ตามวิธีที่แสดงในข้อ 3.4.1

3.5.2.2 ศึกษาการเจริญและการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรียทั้งหมดในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

เติมไพรีน 100 มก./ลิตร และเซลล์แขวนลอยของกลุ่มแบคทีเรีย STK (7.3 log CFU/มล.) ปริมาตร 2 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มล. ที่บรรจุของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนปริมาตร 20 มล. ซึ่งได้ทำการปรับภาวะความเป็นกรด-เบส แต่ละภาวะแล้ว จำนวน 20 ขวด (5 ขวด/1 ชุดการทดลอง) จากนั้นนำขวดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 วัน เก็บตัวอย่างแต่ละชุดการทดลองตามวิธีที่แสดงในข้อ 3.2 ทุกๆ 4 วัน เพื่อหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและสกัดวิเคราะห์หาปริมาณไพรีนในวัฏภาคตะกอนตามวิธีที่แสดงในข้อ 3.1.2 ทำการทดลองชุดการทดลองละ 2 ซ้ำ

3.5.3 สารอาหาร

ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีจากข้อที่ 3.1.2 พบว่าของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนมีอัตราส่วนของคาร์บอน:ไนโตรเจน:ฟอสฟอรัส เท่ากับ 770:23:1 (มก./ลิตร) แสดงให้เห็นว่าปริมาณของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสมีน้อยมาก ดังนั้นการทดลองนี้จึงทำการปรับอัตราส่วนของคาร์บอน:ไนโตรเจน:ฟอสฟอรัส โดยเพิ่มปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน ให้มีปริมาณใกล้เคียงกับในอาหารเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM) การเพิ่มปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ทำได้โดยเติมอาหารเหลว CFMM ความเข้มข้น 100 เท่า (ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต และแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต) เปรียบเทียบกับการเติมอาหารเหลว CFMM ความเข้มข้น 100 เท่า

3.5.3.1 เตรียมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพื่อใช้ย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

ตามวิธีที่แสดงในข้อ 3.4.1

3.5.3.2 ศึกษาการเจริญและการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรียทั้งหมดในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

เติมไพรีนปริมาณ 100 มก./ลิตร และเซลล์แขวนลอยของกลุ่มแบคทีเรีย STK (7.3 log CFU/มล.) ปริมาตร 2 มล. ลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนภาวะความเป็นกรด-เบส 7.0 ปริมาตร 20 มล. ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มล. จำนวน 15 ขวด (5 ขวด/1 ชุดการทดลอง) หลังจากนั้นเติมสารอาหารเพื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัส โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 ชุด ดังนี้

ชุดควบคุม ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่ไม่มีการเติมสารอาหาร

ชุดการทดลองที่ 1 ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่มีการเติมอาหารเหลว CFMM (ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต และแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต) ความเข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 178 ไมโครลิตร

ชุดการทดลองที่ 2 ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่มีการเติมอาหารเหลว CFMM ความเข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 178 ไมโครลิตร

จากนั้นนำขวดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 วัน เก็บตัวอย่างแต่ละชุดการทดลองตามวิธีที่แสดงในข้อ 3.2 ทุกๆ 4 วัน เพื่อหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและสกัดวิเคราะห์หาปริมาณไพรีนในวัฏภาคตะกอนตามวิธีที่แสดงในข้อ 3.1.2 ทำการทดลองชุดการทดลองละ 2 ซ้ำ

3.6 ติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เติมลงไปในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนระหว่างการบำบัด

เพื่อศึกษาว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK มีความสามารถในการอยู่รอดระหว่างการบำบัดหรือไม่ งานวิจัยนี้จึงทำการตรวจติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เติมลงไปเพื่อบำบัดสาร PAHs ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนซึ่งมีภาวะทางเคมีและกายภาพเหมาะสมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด ดังนี้

ชุดควบคุม กลุ่มแบคทีเรีย STK

ชุดควบคุม ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

ชุดการทดลองที่ 1 ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนเมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ในวันที่ 0 ของการบำบัด

ชุดการทดลองที่ 2 ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนเมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ในวันที่ 16 ของการบำบัด

3.6.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ใช้ในการบำบัด

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มล. แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16-18 ชม. ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มล. ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ ที่ความเร็ว 9,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 576 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นเติม 10% SDS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เติมโปรตีเนสเค (Proteinase K) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ เป็นเวลา 1 ชม. แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 ^{o}ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย (ประมาณ 0.7-0.8 มล.) ผสมโดยการกลับหลอดไปมาจนกระทั่งสารละลายกลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนน้ำใส ที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรสารละลายสุดท้าย ผสมโดยการกลับหลอดไปมาจนกระทั่งสารละลายกลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโปรพานอลปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาจนกระทั่งตะกอนขาวของดีเอ็นเอปรากฏ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนไอโซโปรพานอลทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธานอล 70%

เย็นจัดปริมาตร 1 มล. โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยเอธานอลออกให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติม RNase A (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอก่อนเก็บที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ

3.6.2 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

สกัด DNA จากตัวอย่างของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน ตามวิธีของ Sei และคณะ (2000) โดยนำของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกวัฏภาคตะกอนที่ความเร็ว 9,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง ทำซ้ำจนได้น้ำหนักวัฏภาคตะกอนประมาณ 100 มก. เติม High extraction buffer ปริมาตร 440 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) เติมโปรตีนเนสเค (proteinase K) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติม 10% SDS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 2 ชม. โดยผสมให้เข้ากัน ทุก 20 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตรประมาณ 0.7-0.8 มล. กลับหลอดไปมาจนกระทั่งสารละลายกลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ สกัดซ้ำ 2 ครั้ง แล้วเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรส่วนน้ำใส ผสมโดยการกลับหลอดไปมาจนกระทั่งสารละลายกลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสซึ่งมีดีเอ็นเอไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมโซเดียมอะซีเตทความเข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใส และเติมเอธานอล 100% เย็นจัดปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายทั้งหมด นำไปแช่แข็งที่ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -86 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70% เย็นจัดปริมาตร 1 มล. โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยเอธานอลออกให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ

3.6.3 การกำจัด humic acid และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

หลอมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1% ในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า (ภาคผนวก ข) แล้วเทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวีเสียบอยู่ ทิ้งให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 15 นาที จากนั้นนำชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ไปวางในแชมเบอร์ แล้วเททับอะกาโรสเจลด้วยบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ให้ท่วม 2-3 มม. หยอดสารละลายดีเอ็นเอผสมสีติดตามลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิส (Mupid-2 Advance, ญี่ปุ่น) โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มล. (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV)

ทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย Glass powder for DNA recovery (TAKARA, ญี่ปุ่น) ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยตัดส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอจากเจลใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ ชั่งน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจลโดยหักออกจากน้ำหนักหลอดเปล่า เติม NaI ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 55 $^{\circ}$ซ จนกระทั่งอะกาโรสเจลละลาย แล้วเติม glass powder ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ต่อ 1 ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันทุกๆ 1 นาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอจับกับ glass powder นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วินาที เทส่วนน้ำใสออก แล้วล้างดีเอ็นเอด้วย washing buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยการปั่นล้างเก็บที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วินาที ดูดส่วนน้ำใสออก ทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นเติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 เท่าของ glass powder ที่เติมตอนต้น แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วินาที ดูดส่วนน้ำใสซึ่งมีดีเอ็นเออยู่ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ ทำซ้ำ 3 ครั้ง เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ

3.6.4 วิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอตามวิธีของ Sambrook และ Russell (2001) จากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัม/มล.) = A_{260} X 50 X dilution factor

3.6.5 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

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

- 10X PCR buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X buffer)	5	ไมโครลิตร
- สารละลาย EUB f933 primer ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- สารละลาย EUB r1387 primer ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด 10 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (ความเข้มข้นสุดท้าย 1.25 U)	0.25	ไมโครลิตร
- ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.6.1 , 3.6.3 (ประมาณ 100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
- น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ จนกระทั่งมีปริมาตรสุทธิ	50	ไมโครลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

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

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

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส โดยหลอมอะกาโรสเจลเข้มข้น 2% ในบัฟเฟอร์ TAE 1 เท่า (ภาคผนวก ข) เทลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ทิ้งให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 15 นาที จากนั้นนำชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ไปวางในแชมเบอร์ แล้วเททับอะกาโรสเจลด้วยบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ให้ท่วม 2-3 มม. หยอดสารละลายดีเอ็นผสมสีติดตาม พร้อมดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ลงในช่องวิ่งเพื่อเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอที่ได้ จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมล. (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 1 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 (Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา.)

3.6.6 วิเคราะห์ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

ในการวิเคราะห์ DGGE จะใช้อุปกรณ์ของ DCode^{TM} system (Bio-Rad Laboratories Inc., สหรัฐอเมริกา) เตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 40 – 70% (ภาคผนวก ข) ลงในชุดแซนวิชเตรียมเจลโดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต แล้วเสียบหวีลงไประหว่างกระจกแซนวิช ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทิ้งให้พอลิอะคริลาไมด์แข็งตัวประมาณ 5 ชั่วโมง แล้วนำชุดเจลแซนวิชใส่ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า (ภาคผนวก ข) อุณหภูมิประมาณ 55 ^{o}ซ ปริมาตร 6.8 ลิตร หยอดผลิตภัณฑ์ PCR ผสมสีติดตามลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ อุณหภูมิ 55 ^{o}ซ เป็นเวลา 15 ชม. หลังจากนั้นย้อมพอลิอะคริลาไมด์เจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมล. (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 15 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 (Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 วิเคราะห์ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจากการศึกษาวิจัยของห้องปฏิบัติการ 462 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมี ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

คุณสมบัติ	ค่าการวิเคราะห์
สภาพความเป็นกรด-เบส	6.0-6.7
ปริมาณแบคทีเรีย (log CFU/มล.)	7.3-7.6
ปริมาณไนโตรเจน (มก./ลิตร)	209 *
ปริมาณฟอสฟอรัส (มก./ลิตร)	8.97 *
ปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอน (มก./ลิตร)	6910 *
สาร PAHs (มก./ลิตร)	
- ไพรีน	0.65-2.34
- ฟลูออแรนธีน	0.32-0.49
- ฟีแนนทรีน	0.49-0.58

หมายเหตุ * วิเคราะห์โดย สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิเคราะห์ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน พบว่ามีการปนเปื้อนของ PAHs 3 ชนิด ได้แก่ ไพรีน ฟลูออแรนธีน และฟีแนนทรีน ปริมาณ 0.65-2.34 0.32-0.49 และ 0.49-0.58 มก.ต่อของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนปริมาตร 1 ลิตร ตามลำดับ และพบว่า PAHs ทั้ง 3 ชนิด มีการกระจายตัวในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การกระจายตัวของ PAHs ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

สาร PAHs ในวัฏภาคน้ำ (มก./ลิตร)	
- ไพรีน	0.08-0.55
- ฟลูออแรนธีน	0.03-0.06
- ฟีแนนทรีน	0.23-0.31
สาร PAHs ในวัฏภาคตะกอน (มก./กก.)	
- ไพรีน	11.49-35.89
- ฟลูออแรนธีน	5.88-8.55
- ฟีแนนทรีน	5.22-5.33

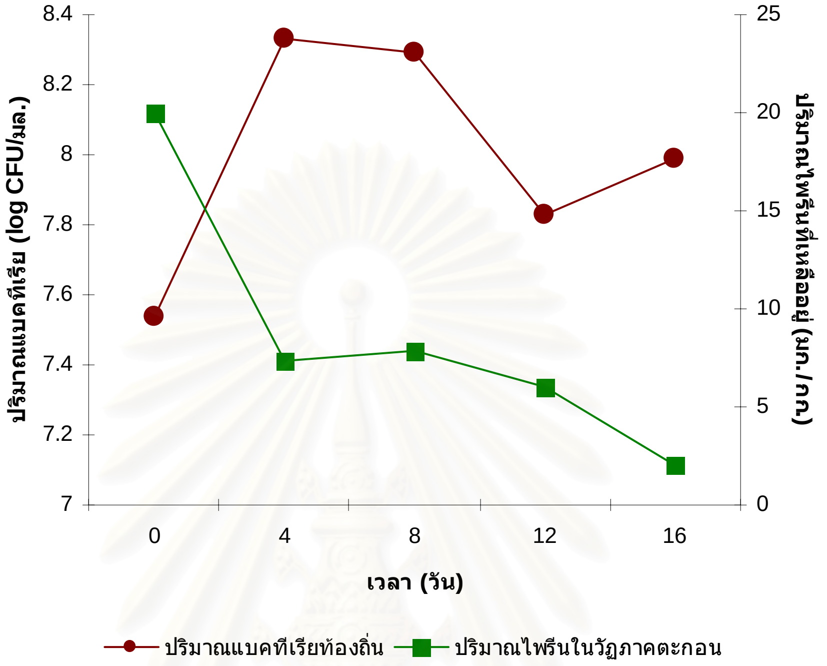
หมายเหตุ * ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วยตะกอนน้ำหนัก 50 กรัม

ในวัฏภาคน้ำของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนจะพบไพรีน ฟลูออแรนธีน และ ฟีแนนทรีน 0.08-0.55 0.03-0.06 และ 0.23-0.31 มก./ลิตรของวัฏภาคน้ำ ขณะที่ในวัฏภาคตะกอนของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนจะพบไพรีน ฟลูออแรนธีน และ ฟีแนนทรีน 11.49-35.89 5.88-8.55 และ 5.22-5.33 มก./กก.ของวัฏภาคตะกอน

เห็นได้ชัดว่า PAHs มีแนวโน้มที่จะกระจายตัวในวัฏภาคตะกอน และจะพบในวัฏภาคน้ำน้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้การลดปริมาณลงของ PAHs ในวัฏภาคตะกอนเป็นวิธีการศึกษาการบำบัด PAHs ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนจากห้องปฏิบัติการด้วยวิธีทางชีวภาพ และใช้ไพรีนเป็นตัวแทนของ PAHs ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน เนื่องจากไพรีนเป็น PAHs ชนิดที่พบมากที่สุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

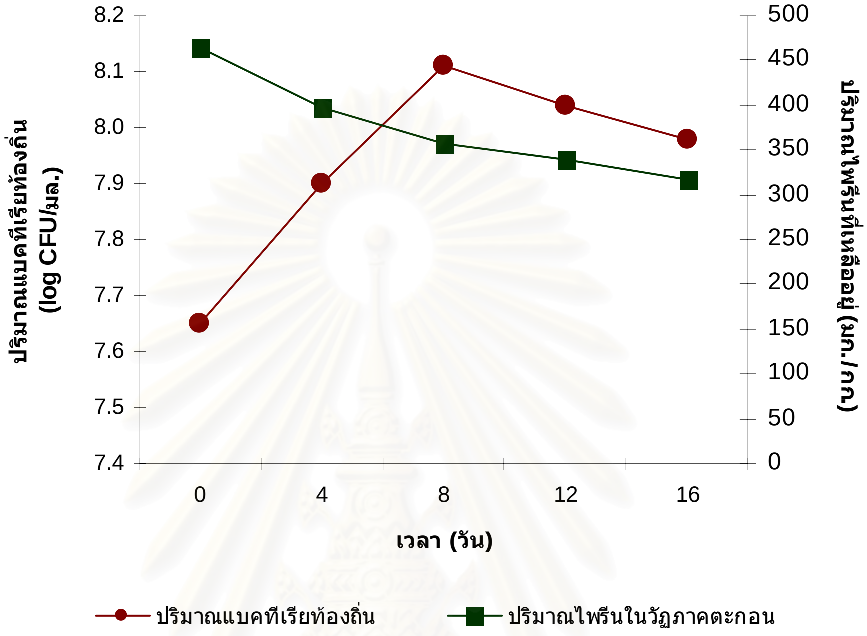
4.2 ผลการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนโดยแบคทีเรียท้องถิ่น



รูปที่ 4.1 การเจริญและปริมาณไพรีนที่เหลือจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียท้องถิ่น

ผลการทดลองในรูปที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 วัน แบคทีเรียท้องถิ่นสามารถเจริญและย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนได้ โดยแบคทีเรียท้องถิ่นจะเพิ่มจำนวนจาก 7.54 log CFU/มล. ในวันที่ 0 ไปเป็น 8.33 ในวันที่ 4 หลังจากนั้นแบคทีเรียท้องถิ่นจะลดจำนวนลงเหลือ 8.29 7.83 และ 7.99 log CFU/มล. ในวันที่ 8 12 และ 16 ของการทดลองตามลำดับ ในขณะที่ไพรีนซึ่งมีปริมาณเริ่มต้น 19.99 มก./กก. ในวันที่ 0 จะถูกย่อยสลายเหลือ 7.35 7.85 5.97 และ 2.1 มก./กก. ในวันที่ 4 8 12 และ 16 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองตามลำดับ

4.3 ผลการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนโดยแบคทีเรียท้องถิ่นเมื่อเติมไพรีน 100 มก./ลิตร



รูปที่ 4.2 การเจริญและปริมาณไพรีนที่เหลือจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียท้องถิ่นเมื่อเติมไพรีน 100 มก./ลิตร

ผลการทดลองในรูปที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเติมไพรีน 100 มก./ลิตร ลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนแล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 วัน แบคทีเรียท้องถิ่นจะเจริญและเพิ่มจำนวนจาก 7.65 log CFU/มล. ในวันที่ 0 ไปเป็น 7.90 และ 8.11 log CFU/มล. ในวันที่ 4 และ 8 ของการทดลองตามลำดับ หลังจากนั้นแบคทีเรียท้องถิ่นจะลดจำนวนลงเหลือ 8.04 และ 7.98 log CFU/มล. ในวันที่ 12 และ 16 ของการทดลองตามลำดับ ในขณะที่ไพรีนจะถูกย่อยสลายจาก 464.6 มก./กก. ในวันที่ 0 เหลือ 396.5 357.2 340.3 และ 317.8 มก./กก. ในวันที่ 4 8 12 และ 16 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองตามลำดับ

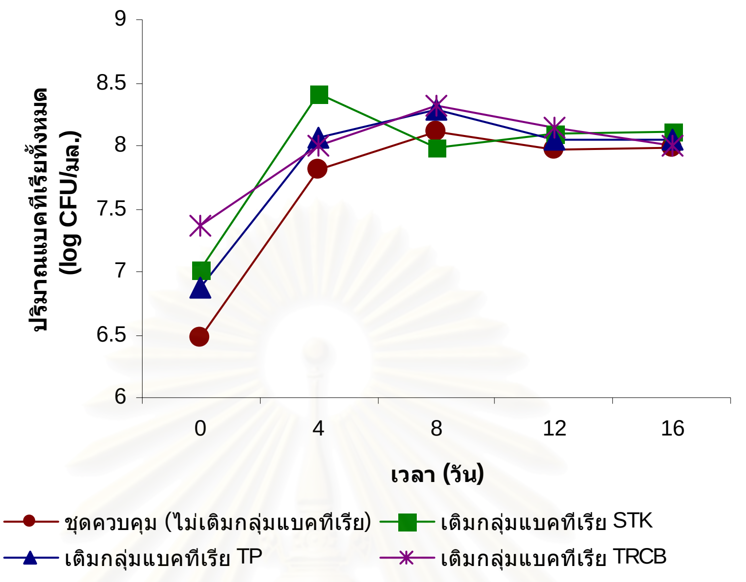
4.4 ผลการเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK TP และ TRCB ต่อการย่อยสลายไพรีนที่เติมลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

ผลการทดลองในรูปที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่า เมื่อเติมเซลล์แขวนลอยของกลุ่มแบคทีเรียแต่ละชนิด ได้แก่ STK TP และ TRCB (7.3 log CFU/มล.) ลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่เติมไพรีน 100 มก./ลิตร แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 วัน แบคทีเรียทั้งหมดในชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้เร็วและมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย TP และชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย TRCB โดยมีจำนวนมากที่สุดในวันที่ 4 ของการทดลอง คือ 8.42 log CFU/มล. ในขณะที่ชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย TP และชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย TRCB มีจำนวนมากที่สุดในวันที่ 8 ของการทดลอง คือ 8.11 8.28 และ 8.32 log CFU/มล. ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าในวันที่ 16 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ยังมีจำนวนคงเหลือ 8.11 log CFU/มล. ในขณะที่ชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย TP และชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย TRCB แบคทีเรียทั้งหมดคงเหลือ 7.98 8.04 และ 8.00 ตามลำดับ (รูปที่ 4.3 ก.)

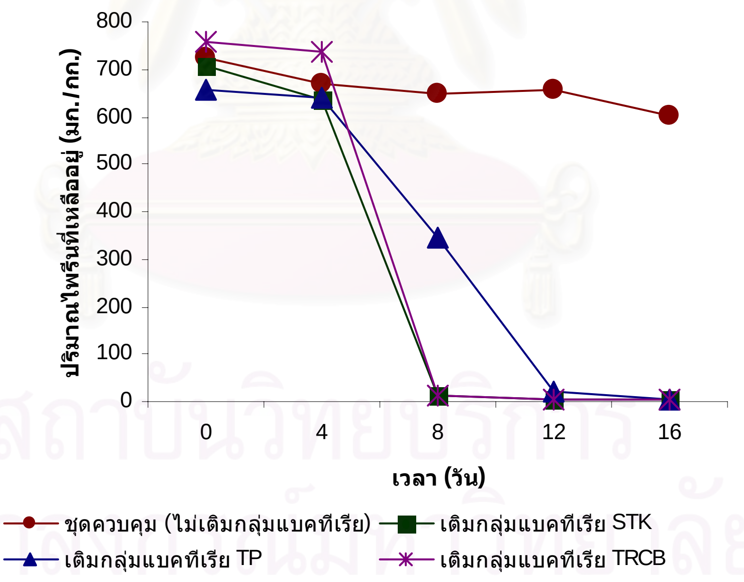
และเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนพบว่าชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ไพรีนมีการย่อยสลายมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย TP และชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย TRCB โดยในวันที่ 16 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองจะมีไพรีนเหลือ 4.0 602.9 4.1 และ 5.4 มก./กก. ตามลำดับ (รูปที่ 4.3 ข.) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้กลุ่มแบคทีเรีย STK ในการบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน PAHs

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.



ข.



รูปที่ 4.3 ผลการเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK TP และ TRCB ต่อการย่อยสลายไพรีนที่เติมลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

ก. การเจริญของแบคทีเรียทั้งหมด

ข. ปริมาณไพรีนที่เหลือจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียทั้งหมด

4.5 ภาวะทางเคมีและกายภาพที่เหมาะสมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ในการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

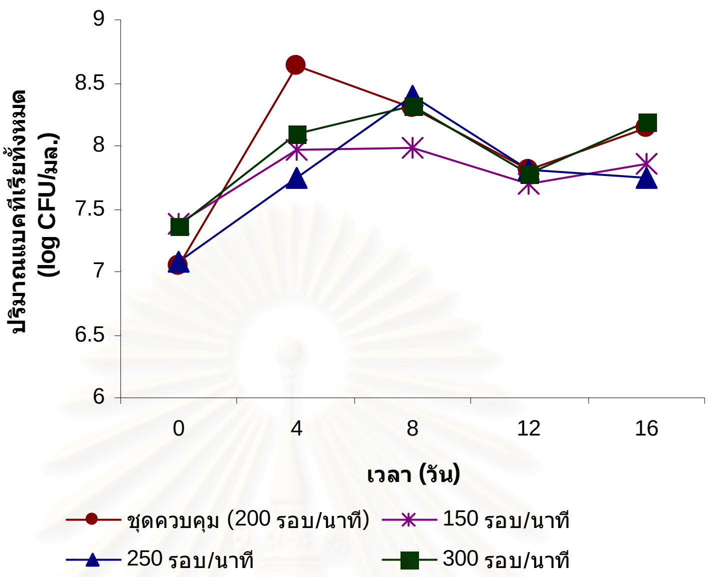
4.5.1 ผลการให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็วต่างๆ ต่อการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

ผลการทดลองในรูปที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่เติมไพรีน 100 มก/ลิตร แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบคทีเรียทั้งหมดในชุดควบคุม (เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที) ชุดการทดลองเขย่าที่ความเร็ว 250 และ 300 รอบ/นาที จะมีการเจริญและเพิ่มจำนวนได้สูงกว่าการบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที โดยชุดควบคุม (เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที) แบคทีเรียทั้งหมดจะเพิ่มจำนวนได้สูงสุดในวันที่ 4 คือ 8.64 log CFU/มล. ในขณะที่ชุดการทดลองเขย่าที่ความเร็ว 150 250 และ 300 รอบ/นาที แบคทีเรียทั้งหมดจะเพิ่มจำนวนได้สูงสุดในวันที่ 8 คือ 7.99 8.39 และ 8.32 log CFU/มล. ตามลำดับ (รูปที่ 4.4 ก.)

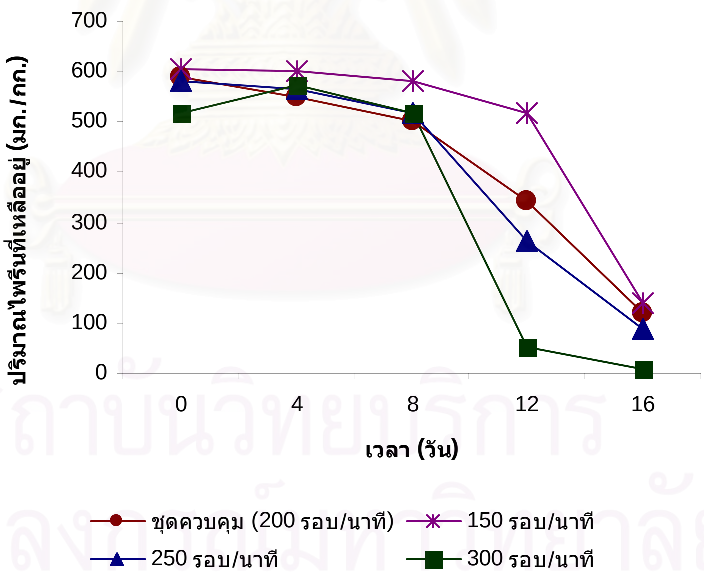
เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนพบว่าชุดการทดลองเขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที ซึ่งเป็นความเร็วสูงสุดของการทดลองนี้ ก่อให้เกิดการย่อยสลายของไพรีนสูงสุด โดยในวันที่ 16 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองจะมีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 7.8 มก./กก. ในขณะที่ชุดควบคุม (เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที) ชุดการทดลองการเขย่าที่ความเร็ว 150 และ 250 รอบ/นาที จะเหลือปริมาณไพรีน 119.7 138.2 และ 87.1 ตามลำดับ (รูปที่ 4.4 ข.)

และเมื่อศึกษาการย่อยสลายไพรีนที่เกิดจากการทดลองเขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที ผลการทดลองในรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าการย่อยสลายไพรีนที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากความสามารถของกลุ่มแบคทีเรีย STK เนื่องจากในวันที่ 16 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK จะมีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 7.8 มก./กก. ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK แต่เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที เช่นกันจะมีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 331.8 มก./กก. ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความเร็วการเขย่าให้อากาศแก่กลุ่มแบคทีเรีย STK ในการบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน PAHs ที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที

ก.



ข.

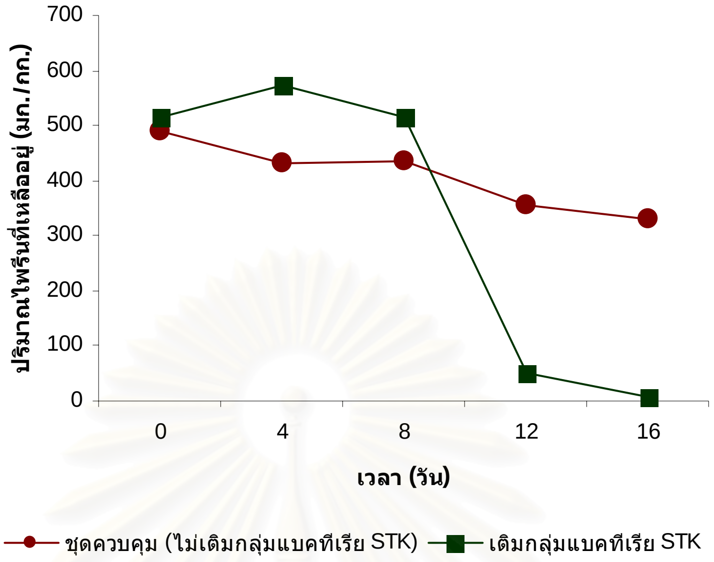


รูปที่ 4.4 ผลการให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็วต่างๆ ต่อการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

ก. การเจริญของแบคทีเรียทั้งหมด

ข. ปริมาณไพรีนที่เหลือจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียทั้งหมด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



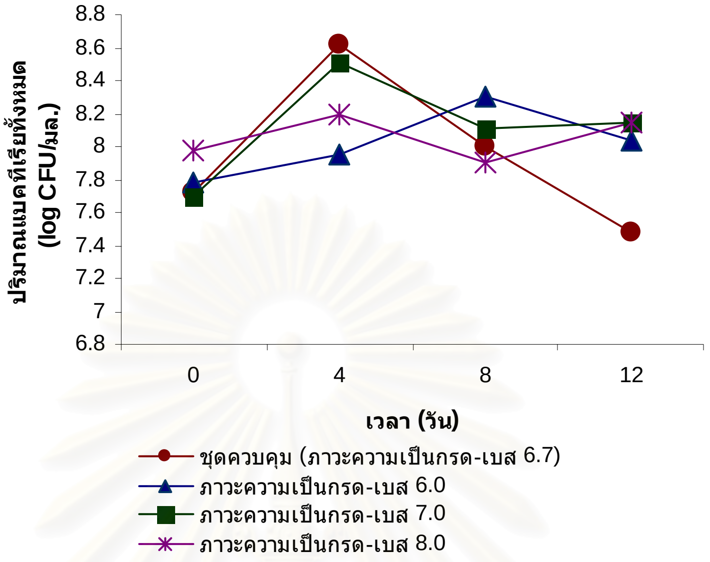
รูปที่ 4.5 ผลการให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที ต่อการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เปรียบเทียบกับไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

4.5.2 ผลการปรับภาวะความเป็นกรด-เบสของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนต่อการย่อยสลายไพรีนเมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

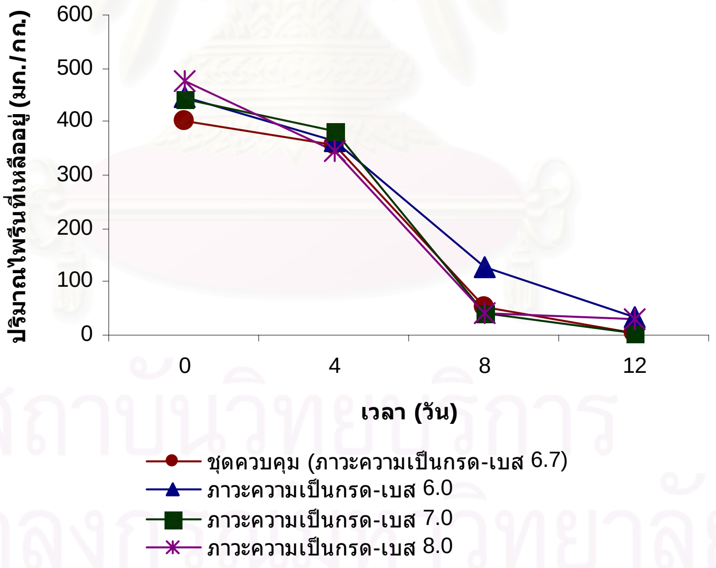
ผลการทดลองในรูปที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเติมไพรีนและกลุ่มแบคทีเรีย STK ลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่ปรับภาวะความเป็นกรด-เบส ต่างๆ แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที แบคทีเรียทั้งหมดในชุดควบคุม (ภาวะความเป็นกรด-เบส 6.7) และชุดการทดลองที่ภาวะความเป็นกรด-เบส 7.0 แบคทีเรียทั้งหมดจะเจริญและเพิ่มจำนวนได้สูงกว่า ชุดการทดลองภาวะความเป็นกรด-เบส 6.0 และ 8.0 โดยพบว่าแบคทีเรียทั้งหมดมีจำนวนสูงสุดในวันที่ 4 ของการทดลอง คือ 8.62 และ 8.51 log CFU/มล. ตามลำดับ ขณะที่ชุดการทดลองภาวะความเป็นกรด-เบส 6.0 แบคทีเรียทั้งหมดจะมีจำนวนสูงสุด คือ 8.30 log CFU/มล. ในวันที่ 4 และชุดการทดลองภาวะความเป็นกรด-เบส 8.0 แบคทีเรียทั้งหมดจะมีจำนวนสูงสุดคือ 8.20 log CFU/มล. ในวันที่ 8 ของการทดลอง (รูปที่ 4.6 ก.) เมื่อพิจารณาการย่อยสลายไพรีนพบว่าในวันที่ 12 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลอง ชุดควบคุม (ภาวะความเป็นกรด-เบส 6.7) ชุดการทดลองภาวะความเป็นกรด-เบส 6.0 7.0 และ 8.0 จะมีปริมาณไพรีนเหลือ 5.5 33.9 5.5 และ 30.8 มก./กก. ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าถึงแม้ชุดควบคุม (ภาวะความเป็นกรด-เบส 6.7) และ ชุดการทดลองภาวะความเป็นกรด-เบส 7.0 จะเหลือปริมาณไพรีนเท่ากัน แต่เนื่องจากชุดการทดลองภาวะความเป็นกรด-เบส 7.0 มีปริมาณไพรีนเริ่มต้นในวันที่ 0 สูงกว่าชุดควบคุม (ภาวะความเป็นกรด-เบส 6.7) ชุดการทดลองภาวะความเป็นกรด-เบส 7.0 จึงมีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนสูงสุด รองลงมาคือชุดควบคุม (ภาวะความเป็นกรด-เบส 6.7) ชุดการทดลองภาวะความเป็นกรด-เบส 6.0 และ 8.0 ตามลำดับ (รูปที่ 4.6 ข.)ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกปรับภาวะความเป็นกรด-เบสของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนให้เป็น 7.0 สำหรับการบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน PAHs

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.



ข.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.6 ผลการปรับภาวะความเป็นกรด-เบสของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนต่อการย่อยสลายไพรีนเมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

ก. การเจริญของแบคทีเรียทั้งหมด

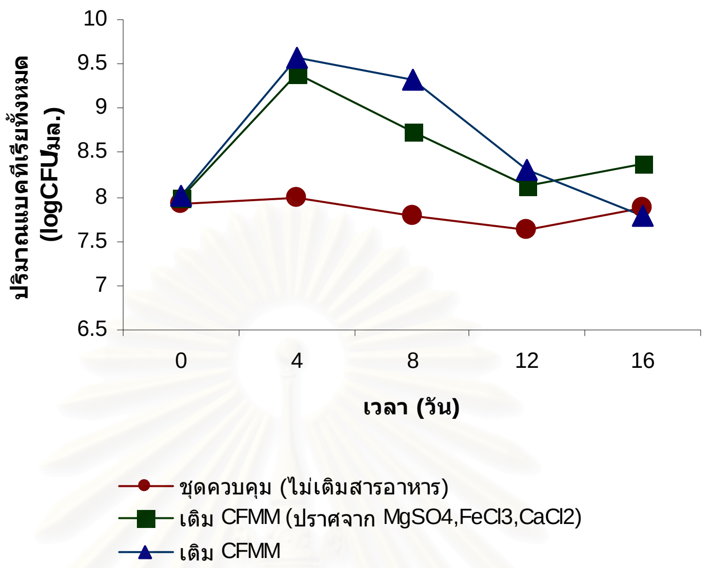
ข. ปริมาณไพรีนที่เหลือจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียทั้งหมด

4.5.3 ผลการเสริมอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

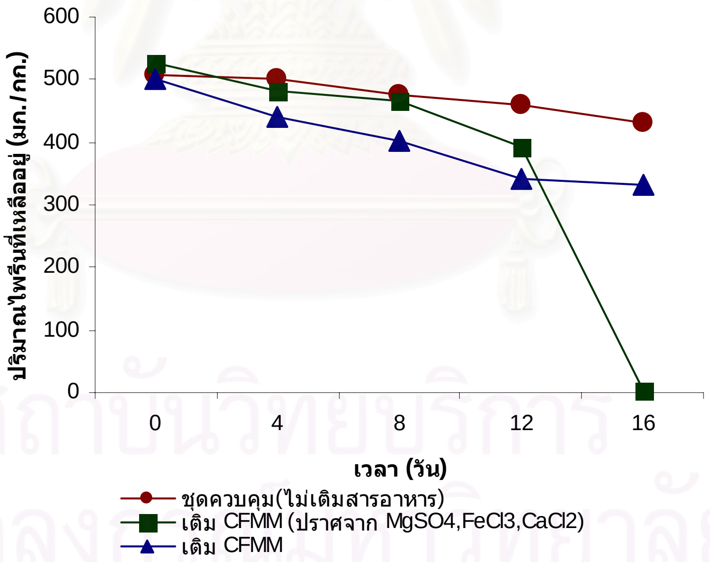
ผลการทดลองในรูปที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่าการเติมสารอาหาร ได้แก่ อาหารเหลว CFMM (ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต และแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต) และ อาหารเหลว CFMM เพื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนภาวะความเป็นกรด-เบส 7.0 ที่เติมไพรีนและกลุ่มแบคทีเรีย STK แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที แบคทีเรียทั้งหมดสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้สูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารอาหารเลย โดยแบคทีเรียทั้งหมดจะมีจำนวนสูงสุดในวันที่ 4 ของการทดลอง คือ 9.39 และ 9.57 log CFU/มล. ในชุดการทดลองที่เติมอาหารเหลว CFMM (ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต และแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต) และในชุดการทดลองที่เติมอาหารเหลว CFMM ในขณะที่ชุดควบคุม (ไม่เติมสารอาหาร) แบคทีเรียทั้งหมดจะมีจำนวนสูงสุดในวันที่ 4 ของการทดลอง คือ 8.0 log CFU/มล. (รูปที่ 4.7 ก.) เมื่อพิจารณาการย่อยสลายไพรีน พบว่าชุดการทดลองที่เติมอาหารเหลว CFMM (ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต และแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนสูงที่สุด รองลงมา คือ ชุดการทดลองที่เติมอาหารเหลว CFMM และชุดควบคุม โดยในวันสุดท้ายของการทดลองจะมีปริมาณไพรีนเหลือ 3.0 332.2 และ 431.4 มก./กก. ตามลำดับ (รูปที่ 4.7 ข.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.



ข.



รูปที่ 4.7 ผลการเสริมอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

ก. การเจริญของแบคทีเรียทั้งหมด

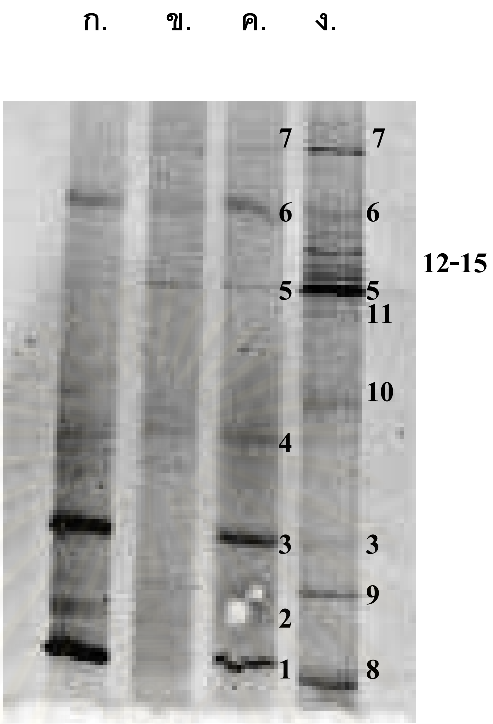
ข. ปริมาณไพรีนที่เหลือจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียทั้งหมด

4.6 ผลการติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เติมลงไปในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนระหว่างการบำบัด

ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40 - 70% denaturant เพื่อตรวจติดตามกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เติมลงไปเพื่อบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน PAHs พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง มีแถบดีเอ็นเอในโปรไฟล์ของ DGGE 7 แถบ โดยแถบที่ 1-3 คือ แถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK ซึ่งมีตำแหน่งตรงกับแถบดีเอ็นเอของชุดควบคุมกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยแถบที่ 1 และ 3 จะมีความเข้มมากกว่าแถบที่ 2 (รูปที่ 4.8 ค.)

วันที่ 16 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในโปรไฟล์ของ DGGE แถบที่ 1 และ 2 หายไปแต่แถบที่ 3 ยังคงอยู่ โดยมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอลดลงจากวันที่ 0 ในขณะที่แถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียท้องถิ่นเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ของการทดลองจะมีความหลากหลายและมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของประชากรดังนี้ คือ แถบที่ 4 หายไป แถบที่ 5 – 7 ยังคงอยู่ โดยแถบที่ 5 และ 7 มีความเด่นชัดขึ้น นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอแถบที่ 8 - 15 โดดเด่นขึ้นมา (รูปที่ 4.8 ง.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.8 แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rDNA แสดงพลวัตรประชากรแบคทีเรียที่พบระหว่างการบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน โดยวิธี DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40 – 70% denaturant

ก. ชุดควบคุม กลุ่มแบคทีเรีย STK

ข. ชุดควบคุม ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน

ค. ชุดการทดลองที่ 1 ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนเมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ในวันที่ 0 ของการบำบัด

ง. ชุดการทดลองที่ 2 ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนเมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ในวันที่ 16 ของการบำบัด

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ห้องปฏิบัติการทดลองเป็นแหล่งก่อกำเนิดมลพิษที่สำคัญแห่งหนึ่ง ของเสียอันตรายที่เกิดจากกระบวนการทดลองต่างๆ ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานและก่อให้เกิดปัญหามลพิษได้หากปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม (กรมควบคุมมลพิษ, 2548)

หน่วยวิจัยการบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นหน่วยวิจัยที่ศึกษาการบำบัดสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) เป็นส่วนใหญ่ ทำให้เกิดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนสารประกอบ PAHs อยู่เป็นจำนวนมาก เนื่องจาก PAHs มีความเป็นพิษและคงทนไม่สลายได้ง่ายในสิ่งแวดล้อม (Valentín และคณะ, 2007) ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนสารประกอบ PAHs จึงจัดเป็นของเสียอันตรายที่ต้องมีการบำบัดก่อนปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม กระบวนการกำจัด PAHs ที่มีประสิทธิภาพ คือ การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ หรือวิธีการบำบัดทางชีวภาพ (Bioremediation) (Tam และคณะ, 2002)

เมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน พบว่ามีการปนเปื้อนของ PAHs 3 ชนิด ได้แก่ ไพรีน ฟลูออแรนธีน และ ฟีแนนทรีน ปริมาณ 0.65-2.34 0.32-0.49 และ 0.49-0.58 มก./ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนปริมาตร 1 ลิตร เนื่องจาก PAHs มีสภาพละลายได้ในน้ำต่ำและมีสัมประสิทธิ์การแบ่งส่วนในออคทานอลและน้ำสูง ตะกอนจึงเป็นที่สะสมของ PAHs (Molina และคณะ, 1999) ในวัฏภาคน้ำของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนจะพบไพรีน ฟลูออแรนธีน และฟีแนนทรีน 0.08-0.55 0.03-0.06 และ 0.23-0.31 มก./ลิตรของวัฏภาคน้ำ ขณะที่ในวัฏภาคตะกอนของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนจะพบไพรีน ฟลูออแรนธีน และ ฟีแนนทรีน 11.49-35.89 5.88-8.55 และ 5.22-5.33 มก./กก.ของวัฏภาคตะกอน เห็นได้ชัดว่า PAHs มีแนวโน้มที่จะกระจายตัวในวัฏภาคตะกอน และจะพบในวัฏภาคน้ำน้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้การลดปริมาณลงของ PAHs ในวัฏภาคตะกอนเป็นวิธีการศึกษาการบำบัด PAHs ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนจากห้องปฏิบัติการด้วยวิธีทางชีวภาพ และใช้ไพรีนเป็นตัวแทนของ PAHs ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน เนื่องจากไพรีนเป็น PAHs ชนิดที่พบมากที่สุดและจัดเป็น PAHs น้ำหนักโมเลกุลสูง (High Molecular Weigh PAHs, HMW PAHs) ซึ่งทนทานต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์ได้มากกว่า (Molina และคณะ, 1999)

Catallo และ Portier (1992) รายงานว่าในตะกอนที่มีการปนเปื้อน PAHs จะพบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้และย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนและสามารถใช้จุลินทรีย์เหล่านี้เพื่อบำบัด PAHs ได้

จากการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน พบว่าของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนมีแบคทีเรียท้องถิ่น 7.3-7.6 log CFU/มล. ซึ่งคาดว่าแบคทีเรียท้องถิ่นจะปรับตัวและพัฒนาความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ได้ (Ke และคณะ, 2003) งานวิจัยขั้นต้นจึงทำการศึกษาการย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนโดยแบคทีเรียท้องถิ่น โดยนำของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 วัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียท้องถิ่นสามารถบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน PAHs ที่เกิดจากการศึกษาวิจัยของห้องปฏิบัติการ 462 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีการปนเปื้อนของไพรีนในวัฏภาคตะกอน 19.99 มก./กก. ได้ โดยในวันที่ 16 จะมีไพรีนเหลืออยู่ 2.08 มก./กก. (รูปที่ 4.1) ผ่านมาตรฐานสหภาพยุโรป ที่กำหนดปริมาณ PAHs ในกากตะกอนน้ำเสียไม่เกิน 6 มก./กก. (Pérez และคณะ, 2001) สามารถปล่อยทิ้งสู่สิ่งแวดล้อมได้

Moreda และคณะ (2001) รายงานว่าตะกอนน้ำเสียจากโรงงานบำบัดน้ำเสีย Arazuri ประเทศสเปน จะพบ PAHs 128-482 มก./กก.

Shiaris และ Jambard-Sweet (1986) รายงานว่าตะกอนบริเวณปากแม่น้ำของอ่าวบอสตัน สหรัฐอเมริกา มีการสะสมของ PAHs 0.5-718 มก./กก. ซึ่ง PAHs มีแหล่งกำเนิดมาจากกระบวนการกำจัดตะกอนน้ำเสีย

จากรายงานของ Moreda และคณะ (2001) และ Shiaris และ Jambard-Sweet (1986) แสดงให้เห็นว่าตะกอนจากน้ำเสียจะมีการสะสมของ PAHs ในปริมาณที่สูง ในขณะที่ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนในงานวิจัยนี้มีมีการสะสมของ PAHs ในวัฏภาคตะกอน 5.22-35.89 มก./กก. ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการเพิ่มปริมาณ PAHs ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาการบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวในกรณีที่มีการปนเปื้อน PAHs ในปริมาณสูงและเพื่อรองรับการเพิ่มปริมาณของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน PAHs จากการศึกษาวิจัยที่จะเกิดขึ้นอีกเป็นจำนวนมาก การเพิ่มปริมาณ PAHs ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน ทำได้โดยเติมไพรีน 100 มก./ลิตร ลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน ซึ่งจะส่งผลให้วัฏภาคตะกอนมีการสะสมของไพรีนประมาณ 400-757 มก./กก. จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 วัน เพื่อศึกษาการย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรียท้องถิ่น ผลการ

ทดลอง (รูปที่ 4.2) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียท้องถิ่นไม่สามารถบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน เมื่อมีการปนเปื้อนของไพรีนในวัฏภาคตะกอน 464.6 มก./กก.ได้ โดยในวันที่ 16 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลอง ยังคงมีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 317.8 มก./กก. ซึ่งสูงกว่ามาตรฐานที่สหภาพยุโรปกำหนดไว้ และไม่สามารถปล่อยทิ้งสู่สิ่งแวดล้อมได้

เนื่องจากแบคทีเรียท้องถิ่นไม่สามารถย่อยสลายไพรีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อของเสียที่เป็นของเหลวมีการปนเปื้อนของ PAHs ในปริมาณที่สูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทดลองเติมกลุ่มแบคทีเรีย (exogenous microorganism) ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs (bioaugmentation) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัด (Trzesicka-Mlynarz และ Ward, 1996)

กลุ่มแบคทีเรีย STK (ทิมากร แสงดำ, 2547) กลุ่มแบคทีเรีย TP และ กลุ่มแบคทีเรีย TRCB (จิรทีปต์ แสนรัก, 2547) เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไพรีน และสามารถย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิด ดังนั้นจึงเติมเซลล์แขวนลอยของกลุ่มแบคทีเรียแต่ละชนิดความเข้มข้น 7.3 log CFU/มล. ลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่เพิ่มไพรีน 100 มก./ลิตร เพื่อศึกษาการเจริญและประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนของแต่ละกลุ่มแบคทีเรีย พบว่าหลังจากนำของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 วัน แบคทีเรียทั้งหมดภายในขวดทดลองที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้เร็วและมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย TP และชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย TRCB และในวันที่ 16 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ยังมีจำนวนคงเหลือสูงกว่าชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย TP และชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย TRCB (รูปที่ 4.3 ก.) เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนพบว่าชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ไพรีนจะมีการย่อยสลายมากที่สุด โดยในวันที่ 16 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองจะมีไพรีนเหลือ 4.0 มก./กก. (รูปที่ 4.3 ข.)

กลุ่มแบคทีเรีย STK เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากปุ๋ยหมักใบมะขามใบมะขามโดยใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *Zoogloea* sp., *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. แบคทีเรียกลุ่มนี้มีสมบัติไฮโดรโฟบิกสูงเนื่องจากคัดแยกโดยใช้แผ่น PTFE ที่เคลือบด้วยไพรีน จากสมบัติไฮโดรโฟบิกที่สูงของกลุ่มแบคทีเรีย STK อาจทำให้เมื่อเติม STK ลงในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน STK จะสามารถกระจายตัวจากวัฏภาคน้ำไปสัมผัสกับวัสดุดูดซับไฮโดรโฟบิกได้ง่ายและเร็ว (ทิมากร แสงดำ, 2547) ซึ่งวัสดุดูดซับไฮโดรโฟบิกในที่นี้ คือ วัฏภาคตะกอนที่ดูดซับไพรีนอยู่ ทำให้ STK สามารถนำ

ไพรีนไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อการเจริญเติบโตและย่อยสลายไพรีนและ PAHs อื่นที่อยู่ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งได้แสดงให้เห็นจากผลการทดลองว่าชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK จำนวนแบคทีเรียรวมทั้งหมดในขวดทดลองจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีจำนวนสูง สามารถย่อยสลายไพรีนได้เร็วกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าวันสุดท้ายของการทดลองจะมีไพรีนเหลือน้อยที่สุด ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK ยังมีจำนวนคงเหลือสูง อาจเป็นเพราะสมบัติของเซลล์ที่แยกได้จะช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียสามารถอยู่รอดและปรับตัวได้ดีในสิ่งแวดล้อม (ทิมากร แสงดำ, 2547)

กลุ่มแบคทีเรีย TP และ กลุ่มแบคทีเรีย TRCB เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ จิรทีปฆ์ แสนรัก (2547) คัดแยกได้จากใบของพืชตระกูลถั่ว ด้วยวิธี enrichment liquid culture ซึ่งทำให้กลุ่มแบคทีเรียทั้ง 2 ไม่มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิกโดยตรงเหมือนกับกลุ่มแบคทีเรีย STK อย่างไรก็ตาม วรกฤษฎ์ สภานนท์ (2549) ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ของกลุ่มแบคทีเรีย TP และ TRCB พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย TP มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายไพรีน รองลงมาคือ TRCB นอกจากนี้ยังพบว่า กลุ่มแบคทีเรีย TP มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอนทราซีน และฟลูออแรนธีน กลุ่มแบคทีเรีย TRCB มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย อะซีแนพธิลีนและฟีแนนทรีน ซึ่งน่าจะมีประโยชน์ในการบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่มีการปนเปื้อนของไพรีน ฟลูออแรนธีน และฟีแนนทรีน โดยเฉพาะฟลูออแรนธีน ซึ่ง ทิมากร แสงดำ (2547) รายงานว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK ไม่สามารถย่อยสลายได้ แต่เนื่องจากกลุ่มแบคทีเรียไม่มีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิก ส่งผลให้ความสามารถในการนำไพรีนไปใช้ต่ำกว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK ซึ่งได้แสดงให้เห็นจากผลการทดลองว่าชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย TP และชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย TRCB จำนวนแบคทีเรียรวมทั้งหมดในขวดทดลองจะเพิ่มขึ้นช้ากว่าและมีจำนวนต่ำกว่า ส่งผลให้ย่อยสลายไพรีนช้ากว่า นอกจากนี้ยังพบว่าวันสุดท้ายของการทดลองจะมีปริมาณไพรีนเหลือมากกว่า ชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK แต่เมื่อพิจารณาปริมาณไพรีนเหลืออยู่พบว่าเหลือมากกว่าชุดการทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนมีลักษณะเป็น slurry ทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างกลุ่มแบคทีเรีย TP และ กลุ่มแบคทีเรีย TRCB กับไพรีนเพิ่มขึ้น เนื่องจากน้ำจะช่วยให้ตะกอนเกิดการแตกตัว ทำให้ไพรีนเคลื่อนที่ไปยังวัฏภาคน้ำอย่างรวดเร็วรวมทั้งยังเพิ่มการเคลื่อนที่ของจุลินทรีย์อีกด้วย (Doick และ Semple, 2003) นอกจากนี้การเขย่าให้อากาศอาจทำให้เชื้อแบคทีเรียกระจายได้ทั่วในขวดทดลองส่งผลให้ความสามารถในการนำไพรีนไปใช้ของกลุ่มแบคทีเรีย TP และ กลุ่มแบคทีเรีย TRCB เพิ่มขึ้น

เนื่องจากกลุ่มแบคทีเรีย STK มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนดีที่สุด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้กลุ่มแบคทีเรีย STK ในการบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนสารประกอบ PAHs จากห้องปฏิบัติการ และหาภาวะทางเคมีและกายภาพที่เหมาะสมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ทำให้การย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนมีประสิทธิภาพ

ภาวะทางเคมีและกายภาพของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน ได้แก่ ภาวะการให้อากาศ ภาวะความเป็นกรด-เบส และสารอาหาร มีบทบาทสำคัญมากในการกำหนดกิจกรรมของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เติมลงไป ภาวะที่เหมาะสมสามารถอธิบายได้โดยการเจริญหรือการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรีย และความสามารถในการย่อยสลายไพรีนซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการบำบัด (Vogel, 1996)

ออกซิเจนมีความสำคัญต่อแบคทีเรียในกระบวนการย่อยสลายสารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนซึ่งเกี่ยวข้องกับออกซิเดชันของซับสเตรตโดยเอนไซม์ออกซิจีเนส (Leahy และ Colwell, 1990) Lei และคณะ (2005) รายงานว่าการย่อยสลาย PAHs (ประกอบด้วยวงอะโรมาติก 2 ถึง 5 วง) ที่ปนเปื้อนในตะกอนแม่น้ำประสบผลสำเร็จเนื่องจากมีปริมาณออกซิเจนเพียงพอ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการหาภาวะการให้อากาศที่เหมาะสมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK เพื่อให้สามารถย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยนำของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่เติมไพรีนและกลุ่มแบคทีเรีย STK ไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 200 250 และ 300 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 วัน พบว่า การให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 250 และ 300 รอบ/นาที แบคทีเรียทั้งหมดภายในขวดทดลองจะมีการเจริญและเพิ่มจำนวนได้สูงกว่าการบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที (รูปที่ 4.4 ก.) แต่เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนพบว่าการเขย่าให้อากาศด้วยความเร็ว 300 รอบ/นาที ก่อให้เกิดการย่อยสลายของไพรีนสูงสุดโดยในวันที่ 16 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองจะมีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 7.8 มก./กก. (รูปที่ 4.4 ข.) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนจะเพิ่มขึ้นตามอัตราเร็วในการให้อากาศ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ MacLeod และ Daugulis (2005) ที่รายงานว่าอัตราการย่อยสลายไพรีนและความเข้มข้นชีวมวลของ *Mycobacterium* PYR-1 ในถังปฏิกรณ์ที่มีอัตราการกวนให้อากาศ 500 รอบ/นาที จะสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับถังปฏิกรณ์ที่มีอัตราการกวนให้อากาศ 300 รอบ/นาที อย่างไรก็ตามระดับความต้องการออกซิเจนเพื่อชักนำการย่อยสลายทางชีวภาพจะแตกต่างไปตามชนิดของจุลินทรีย์และซับสเตรต (Wilson และ Bouwer, 1997)

ภาวะความเป็นกรด-เบส เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่ออัตราการย่อยสลายทางชีวภาพ (Leahy และ Colwell, 1990) ดังนั้นเพื่อให้กลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถย่อยสลายไพรีนในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้จึงทำการปรับภาวะความเป็นกรด-เบสของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน แล้วเติมไพรีนและกลุ่มแบคทีเรีย STK หลังจากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 วัน พบว่าชุดควบคุม (ภาวะความเป็นกรด-เบส 6.7) และชุดการทดลองภาวะความเป็นกรด-เบส 7.0 แบคทีเรียทั้งหมดจะเจริญและเพิ่มจำนวนได้สูงกว่า ชุดการทดลองภาวะความเป็นกรด-เบส 6.0 และ 8.0 (รูปที่ 4.6 ก.) เมื่อพิจารณาการย่อยสลายไพรีนพบว่าชุดการทดลองภาวะความเป็นกรด-เบส 7.0 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนสูงที่สุด โดยในวันสุดท้ายของการทดลองจะมีปริมาณไพรีนเหลือ 5 มก./กก. (รูปที่ 4.6 ข.) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK จะมีกิจกรรมสูงในภาวะที่เป็นกลาง ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลงานวิจัยต่างๆ ดังนี้

แบคทีเรียที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ส่วนใหญ่จะชอบภาวะความเป็นกรด-เบส ค่อนข้างเป็นกลาง (Leahy และ Colwell, 1990)

ภาวะความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟีแนนทรีนในตะกอนแม่น้ำ เท่ากับ 7.0 (Yuan และคณะ, 2001)

Pseudomonas paucimobilis *Pseudomonas vesicularis* และ *Alcaligenes denitrificans* จะมีอัตราการเจริญและมีอัตราการย่อยสลายฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และฟูออแรนธีน ตามลำดับสูงที่สุด เมื่อภาวะความเป็นกรด-เบส ใกล้เคียง 7.0 (Weissenfels และคณะ, 1990)

อัตราการเจริญและอัตราการใช้ออกซิเจนของ *Rhodococcus* sp. UW1 เพื่อย่อยสลายไพรีนจะมีค่าสูงสุดที่ภาวะความเป็นกรด-เบส 7.0 (Walter และคณะ , 1991)

ภาวะความเป็นกรด-เบส 7.0 เหมาะสมต่อการย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน (Kim และคณะ, 2005)

ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อน พบว่าของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนมีอัตราส่วนของ คาร์บอน:ไนโตรเจน:ฟอสฟอรัส เท่ากับ 770:23:1 (มก./ลิตร) จะเห็นได้ว่าปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสมีน้อยกว่าสารอินทรีย์คาร์บอนมาก ซึ่งอาจส่งผลให้อัตราการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ถูกจำกัดได้

โดยทั่วไปการเพิ่มอัตราการเจริญและอัตราการย่อยสลาย PAHs ทำได้โดยเพิ่มปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ซึ่งจะเติมในรูปของยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต

โพแทสเซียมฟอสเฟต หรือโซเดียมฟอสเฟต (Liebeg และ Cutright, 1999) แต่เนื่องจากการคัดแยกการเลี้ยง การศึกษารูปแบบการเจริญและการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย STK จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM) (ทิมากร แสงดำ, 2547) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการปรับอัตราส่วนของ คาร์บอน:ไนโตรเจน:ฟอสฟอรัส ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนโดยเพิ่มปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่ปรับภาวะความเป็นกรด-เบสเป็น 7.0 และเติมไพรีนแล้ว ให้มีปริมาณใกล้เคียงกับในอาหารเหลว CFMM โดยเติมอาหารเหลว CFMM (ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรตและแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต) ความเข้มข้น 100 เท่า เปรียบเทียบกับเติมอาหารเหลว CFMM ความเข้มข้น 100 เท่า หลังจากนั้นเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 วัน พบว่าการเพิ่มปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนจะทำให้แบคทีเรียทั้งหมดสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้สูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารอาหารเลย โดยชุดการทดลองที่เติมอาหารเหลว CFMM แบคทีเรียทั้งหมดจะเพิ่มจำนวนได้สูงกว่าชุดการทดลองที่เติมอาหารเหลว CFMM (ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต และแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต) (รูปที่ 4.7 ก.) แต่เมื่อพิจารณาการย่อยสลายไพรีน พบว่าชุดการทดลองที่เติมอาหารเหลว CFMM (ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต และแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต) จะมีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนดีที่สุด โดยในวันสุดท้ายของการทดลองจะมีปริมาณไพรีนเหลือ 3.0 มก./กก. (รูปที่ 4.7 ข.) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการปรับปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนให้มีปริมาณใกล้เคียงกับในอาหารเหลว CFMM ซึ่งมีอัตราส่วนของไนโตรเจน:ฟอสฟอรัส เท่ากับ 3:1 (มก./ลิตร) โดยเติมอาหารเหลว CFMM (ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต และแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต) ความเข้มข้น 100 เท่า กลุ่มแบคทีเรีย STK จะย่อยสลายไพรีนได้ดีที่สุด ในขณะที่เมื่อเติมอาหารเหลว CFMM ความเข้มข้น 100 เท่า การย่อยสลายไพรีนจะถูกยับยั้งถึงแม้ว่าแบคทีเรียทั้งหมดจะเพิ่มจำนวนขึ้นสูงกว่าชุดการทดลองที่เติมอาหารเหลว CFMM (ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต และแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต) ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของแบคทีเรียท้องถิ่นที่ไม่มีความสามารถในการย่อยสลาย แทนที่จะเป็นการเพิ่มจำนวนของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เติมลงไป (Heitkamp และ Cerniglia, 1989) ซึ่งการเพิ่มมวลชีวภาพที่มากเกินไปจะทำให้การย่อยสลายไพรีนเกิดการ

หยุดชะงัก เนื่องจากความสามารถในการนำไพรีนไปใช้โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK จะลดลง (Lee, 2003)

การบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนสาร PAHs จากห้องปฏิบัติการ โดยการเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK (exogenous microorganism) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน (bioaugmentation) จะประสบผลสำเร็จก็ต่อเมื่อ กลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถย่อยสลายไพรีนได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถอยู่รอดในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนระหว่างการบำบัดได้ (Vogel, 1996)

ดังนั้นเพื่อศึกษาว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK มีความสามารถในการอยู่รอดระหว่างการบำบัดหรือไม่ งานวิจัยนี้จึงทำการตรวจติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เติมลงไปเพื่อบำบัดสาร PAHs ในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนซึ่งมีภาวะทางเคมีและกายภาพเหมาะสมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ผลการทดลอง (รูปที่ 4.8) แสดงให้เห็นว่าชุดควบคุมกลุ่มแบคทีเรีย STK มีแถบดีเอ็นเอที่เห็นเด่นชัด 4 แถบด้วยกัน ซึ่งต่างกับที่ ทิมากร แสงดำ (2547) ได้รายงานการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียว่าประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ เป็นไปได้ว่าแถบที่อยู่ด้านบนสุดเกิดขึ้นจากการที่เลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเหลวที่มีสารอาหารสมบูรณ์และมีการถ่ายเชื้อต่อเนื่องเป็นเวลานาน ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้ซึ่งแฝงตัวอยู่เจริญขึ้นมาได้ และเมื่อตรวจติดตามกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เติมลงไปในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนเพื่อบำบัดสาร PAHs ในวันที่ 16 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลอง พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK ยังคงมีชีวิตอยู่ 1 สายพันธุ์ (แถบที่ 3) และมีการลดจำนวนลง (ดูจากจำนวนและความเข้มของแถบดีเอ็นเอ) เมื่อตรวจติดตามประชากรแบคทีเรียท้องถิ่น พบว่ามีความหลากหลายและมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของประชากรดังนี้ คือ ตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอแถบที่ 4 ซึ่งพบในวันที่ 0 ของการทดลอง อาจเกิดจากชนิดของสารอาหารในของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนไม่เหมาะสมหรือมีปริมาณลดลงทำให้แบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถเจริญได้ ในขณะที่แถบดีเอ็นเอที่ 5 – 7 ยังคงอยู่ โดยแถบที่ 5 และ 7 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียท้องถิ่นมีการเพิ่มจำนวนขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอแถบที่ 8 - 15 โดดเด่นขึ้นมา การเพิ่มจำนวนและชนิดของแบคทีเรียท้องถิ่น (ดูจากจำนวนและความเข้มของแถบดีเอ็นเอ) ในระหว่างการบำบัดอาจเกิดจากการปรับภาวะทางเคมีและกายภาพของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนให้เหมาะสมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ส่งผลให้แบคทีเรียท้องถิ่นสามารถปรับตัวและเพิ่มจำนวนขึ้นได้ด้วย หรืออาจเกิดจากการที่กลุ่มแบคทีเรีย STK ย่อยสลายไพรีนและผลิตสารมัธยันตร์ได้หลายชนิด โดยพบว่าหนึ่งในสารมัธยันตร์ที่ได้ คือ กรดซาลิไซลิก ซึ่งเป็นสารที่ประกอบด้วยวงอะโรมาติก

เพียง 1 วงเท่านั้น จึงนับว่าเป็นสารที่ง่ายต่อการนำไปใช้โดยแบคทีเรียท้องถิ่น (ปิยะวรรณ เพชราภา, 2549)

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK มีประสิทธิภาพสูงในการบำบัดของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนสาร PAHs จากห้องปฏิบัติการที่เติมไพรีน 100 มก./ลิตร โดยภาวะทางเคมีและกายภาพของของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนที่เหมาะสมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ในการย่อยสลายไพรีนในงานวิจัยนี้ ได้แก่ ของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนภาวะความเป็นกรด-เบส 7.0 และเพิ่มปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสให้ใกล้เคียงกับในอาหารเหลว CFMM หลังจากเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที เป็นเวลา 16 วัน พบว่าของเสียที่เป็นของเหลวปนเปื้อนจะมีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 3 มก./กก. ซึ่งผ่านมาตรฐานสหภาพยุโรปที่กำหนดปริมาณ PAHs ในกากตะกอนน้ำเสียไม่เกิน 6 มก./กก. (Pérez และคณะ, 2001) สามารถปล่อยทิ้งสู่สิ่งแวดล้อมได้ นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK มีความสามารถในการอยู่รอดระหว่างการบำบัด โดยพบว่าในวันที่ 16 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการบำบัดกลุ่มแบคทีเรีย STK ยังคงมีชีวิตเหลืออยู่ 1 สายพันธุ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ควบคุมมลพิษ, กรม. 2548. ของเสียอันตราย. สรุปสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย พ.ศ.2548. กรุงเทพมหานคร. ที พริ้นติ้ง กรุ๊ป.

จิรทีปฆ์ แสนรัก. 2547. การย่อยสลายไพรีนและสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นโดยกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากใบพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ณัฐพันธุ์ ศุภกา. 2542. ความสามารถของแบคทีเรียดินที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายฟีแนนทรีนและพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทิมากร แสงดำ. 2547. การแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีสมบัติในการเกาะติดและย่อยสลายไพรีนจากปุ๋ยหมักตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นารีรัตน์ เจริญช่าง. 2544. การใช้วัสดุจากการเกษตรเร่งการย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ในดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปิยะวรรณ เพชราภา. 2549. สารมัธยันตร์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่แยกได้จากใบมะขาม *Tamarindus india* Linn. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิตสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พจนีย์ จันทมาลี. 2543. ความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายแอนทราซีนและพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วรกฤษฎ์ สภานนท์. 2549. ผลของความเข้มข้นของเกลือที่มีต่อกลุ่มแบคทีเรียในการย่อยสลายไพรีนและน้ำมันดีเซล. รายงานโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Aronstein, B. N., Calvillo, Y. M., and Alexander, M. 1991. Effect of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. Environmental Science & Technology. 25: 1728-1731.

Ashok, B. T., and Saxena, S. 1995. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons-a review. Journal of Scientific and Industrial Research. 54: 443-451.

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. New York: John Wiley & Sons.

Bernal- Martinez, A., Carrère, H., Patureau, D., and Delgenès, J. P. 2007. Ozone pre-treatment as improver of PAH removal during anaerobic digestion of urban sludge. Chemosphere. 68: 1013-1019.

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: 1007-1019.

Cai, Q. Y., Mo, C. H., Wu, Q. T., Zeng, Q. Y., Katsoyiannis, A., and Férard, J. F. 2007. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated sewage sludge by different composting processes. Journal of Hazardous Materials. 142: 535-542.

Catallo, W. J., and Portier, R. J. 1992. Use of indigenous and adapted microbial assemblages in the removal of organic chemicals from soils and sediments. Water Science and Technology. 25: 229-237.

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

Cerniglia, C. E. 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Current Opinion Biotechnology. 4: 331-338.

Chin, Y-P., Aiken, G. R., and Danielsen, K. M. 1997. Binding of pyrene to aquatic and commercial humic substances: The role of molecular weight and aromaticiity. Environmental Science and Technology. 31: 1630-1635.

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

Cui, Z., Lai, Q., Dong, C., and Shao, Z. 2008. Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge. Environmental Microbiology. 10: 2138-2149.

Cunliffe, M., and Kertesz, M. A. 2005. Effect of *Sphingobium yanoikuyae* B1 inoculation on bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in aged and freshly PAH-contaminated soils. Faculty of Life Sciences, University of Manchester, United Kingdom.

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

Dean-Ross, D., Moody, J., and Cerniglia, C. E. 2002. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. FEMS Microbiology Ecology. 41: 1-7.

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

Doong, R. A., and Lei, W. G. 2003. Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas putida* in the presence of surfactant. Journal of Hazardous Materials. 96: 15-27.

Eriksson, M., Dalhammar, G., and Mohn, W. W. 2002. Bacterial growth and biofilm production on pyrene. FEMS Microbiology Ecology. 40: 21-27.

Fritzsche, C. 1994. Degradation of pyrene at low defined oxygen concentrations by a *Mycobacterium* sp. Applied and Environmental Microbiology 60: 1687-1689.

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

Grifoll, M., Selifonov, S. A., Gatlin, C. V., and Chapman, P. J. 1995. Actions of versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. Applied and Environmental Microbiology. 61: 3711-3723.

Haigh, S. D. 1996. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. Science of the total environment. 185: 161-170.

Harayama, S. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. Current Opinion Biotechnology. 8: 268-273.

Heitkamp, M. A., and Cerniglia, C. E. 1989. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by *Mycobacterium* sp. in Microcosms Containing Sediment and Water from a Pristine Ecosystem. Applied and Environmental Microbiology. 55: 1968-1973.

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

Juhasz, A. L., and Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo[*a*]pyrene. International Biodeterioration & Biodegradation. 45: 57-88.

Kawai, M., Matsutera, E., Kanda, H., Yamaguchi, N., Tani, K., and Nasu, M. 2002. 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing process by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology. 68: 699-700.

Kästner, M., and Mahro, B. 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. Applied Microbiology and Biotechnology. 44: 668-675.

Ke, L., Wang, W. Q., Wong, T. W. Y., Wong, Y. S., and Tam, N. F. Y. 2003. Romoval of pyrene from contaminated sediments by mangrove microcosms. Chemospere. 51: 25-34.

Kim, J. D., Shim, S. H., and Lee, C. G. 2005. Degradation of phenanthrene by bacterial strains isolated from soil in oil refinery fields in Korea. Journal of microbiology and biotechnology. 15: 337–345.

Leahy, J. G., and Colwell, R. R. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. Microbiological Reviews. 54: 305-315.

Lee, K., Park, J. W., and Ahn, I. S. 2003. Effect of additional carbon source on naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7. Journal of Hazardous Materials. 105: 157-167.

Lei, L., Khodadoust, A. P., Suidan, M. T., and Tabak, H. H. 2005. Biodegradation of sediment-bound PAHs in field-contaminated sediment. Water Research. 39: 349-361.

Leys, N. M., Bastiaens, L., and Verstraete, W. 2005. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. Applied Microbiology and Biotechnology. 66: 726-736.

Liebeg, E. W., and Cutright, T. J. 1999. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. International Biodeterioration & Biodegradation. 44: 55-64.

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.

Luan, L. G., Yu, S. H. K., Zhong, Y., Zhou, H. W., Lan, C. Y., and Tam, F. Y. N. 2006. Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments. Chemosphere. 65: 2289-2296.

MacLeod, C. T., and Daugulis, A. J. 2005. Interfacial effects in a two-phase partitioning bioreactor: degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a hydrophobic *Mycobacterium*. Process Biochemistry. 40: 1799–1805.

Mills, M. A., Bonner, J. S., Mcdonald, T. J., Page, C. A., and Autenrieth, R. L. 2003. Intrinsic bioremediation of a petroleum-impacted wetland. Marine Pollution Bulletin. 46: 887-899.

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

Moreda, J. M., Arranz, A., Fdez De Betoño, S., Cid, A., and Arranz, J. F. 1998. Chromatographic determination of aliphatic hydrocarbons and polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in a sewage sludge. The Science of The Total Environment. 220: 33-43.

Mueller, J. G., Chapman, P. J., and Pritchard, P. H. 1989. Creosote contaminated sites. Environmental Science and Technology. 23: 1197-1201.

Nadarajah, N., Hamme, J. B. Pannu, J., Sungh, A., and Ward, O. 2002. Enhanced transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons using a combined Fenton's reagent, microbial treatment and surfactants. Applied Microbiology and Biotechnology. 59: 540-544.

Nakatsu, C. H., Torsvik, V., and Ovreas, L. 2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. Soil Science Society of America Journal. 64: 1382-1388.

Nam, K., and Kukor, J. J. 2000. Combined ozonation and biodegradation for remediation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Biodegradation.11: 1-9.

Ozaki, S., Kishimoto, N., and Fujita, T. 2007. Change in the predominant bacteria in a microbial consortium cultured on media containing aromatic and saturated hydrocarbons as the sole carbon source. Microbes and Environments. 22: 128-135.

Patnaik, P. 1992. Hydrocarbon, Aromatic. In: A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substrances. pp. 429-445. New York: Van Nortrand Reinhold.

Pérez, S., Guillamón, M., and Barceló, D. 2001. Quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge from wastewater treatment plants. Journal of chromatography A. 938: 57-65.

Piskonen, R., Nyyssönen, M., Rajamäki, T., and Itävaara, M. 2005. Monitoring of accelerated naphthalene-biodegradation in a bioaugmented soil slurry. Biodegradation. 16: 127-134.

Reyes, C., Sigman, M. E., Arce, R., Barbas, J. T., and Dabestani, R. 1998. Photochemistry of acenaphthene at a silica gel/air interface. Journal of photochemistry and photobiology. A: Chemistry. 122: 277-283.

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

Schirmer, K., Dixon, D. G., Greenberg, B. M., and Bols, N. C. 1998. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. Toxicology. 127: 129-141.

Sei, K., Asono, K., Tateishi, N., Mori, K., Ike, M., Kohno, T., and Fugita, M. 2000. Development of simple methods of DNA extraction from environmental samples for monitoring microbial community based on PCR. Japanese Journal of Water Treatment Biology. 36: 193-204.

Shiaris, M. P., and Jambard-Sweet, D. 1986. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surficial sediments of Boston Harbour, Massachusetts, USA. Marine pollution bulletin. 17: 469-472.

Smith, J., Lethbridge, G., and Burns, R. G. 1997. Bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. FEMS microbiology Letters. 152: 141-147.

Sul, D., Oh, E., Im, H., Yang, M,. Kim, C-W., and Lee, E., 2003. DNA damage in T-and B-lymphocytes and granulocytes in emission in section and incineration workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. Mutation research. 583: 109-119.

Tam, N. F. Y., Guo, C. L., Yau, W. Y., and Wong, Y. S. 2002. Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong. Marine Pollution Bulletin. 45: 316-324.

Toruño, Z. C. Z., Luque, C. L., Heras, F. X. C., and Sardans, M. S. 2007. Removal of PAHs from water using an immature coal (leonardite). Chemosphere. 67: 505-512.

Trzesicka-Mlynarz, D., and Ward, O. P. 1996. Degradation of fluoranthene in a soil matrix by indigenous and introduced bacteria. Biotechnology Letters. 18: 181-186.

Valentín, L., Lu-Chau, T. A., López, C., Feijoo, G., Moreira, M. T., and Lema, J. M. 2007. Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS55. Process Biochemistry. 42: 641-648.

Verschueren, K. 1997. Handbook of environmental data on organic chemicals. 596-599. New York: Thomson publishing.

Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. Pure and Applied Chemistry. 73: 1163–1172.

Vogel, T. M. 1996. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. Current Opinion in Biotechnology. 7: 311-316.

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

Warner, S. D., Farant, J.-P., and Butler, I. S. 2004. Photochemical degradation of selected nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in solution and adsorbed to solid particles. Chemosphere. 54: 1207-1215.

Weissenfels, W. D., Beyer, M., and Klein, J. 1990. Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. Applied Microbiology and Biotechnology. 32: 479-484.

Wilson, L. P., and Bouwer, E. J. 1997. Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 18: 116–130.

Wilson, S. C., and Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). Environmental pollution. 81: 229-249.

Witt, G., 1995. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water and Sediment of the Baltic Sea. Marine Pollution Bulletin. 31: 237-248.

Ye, D., Siddiqi, M. A., Maccubbin, A. E., Kumar, S., and Sikka, H. C. 1995. Degradation of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. Environmental Science & Technology. 30: 136 -142.

Yu, K. S. H., Wong, A. H . Y., Yau, K. W. Y., Wong, Y. S., and Tam, N. F. Y. 2005. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. Marine Pollution Bulletin. 51: 1071-1077.

Yuan, S. Y., Wei, S. H., and Chang, B. V. 2000. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. Chemosphere. 41: 1463-1468.

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM)

ก.	แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
	ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	5.5	กรัม
	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม
ข.	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01	กรัม
	เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	0.005	กรัม
	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.005	กรัม

ชั่งสารส่วน ก. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายในส่วน ข. ที่ทำการเตรียมแยกแต่ละชนิดและทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ลงในอาหารที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.0 ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แต่ละลายผงวุ้น 15 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มล. ลงไปในอาหารก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM) **ความเข้มข้น** 100 **เท่า**

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	30.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	55.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	8.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารละลายไพรีนในไดเมทธิลซัลฟอกไซด์

ชั่งไพรีน 0.1 กรัม ละลายในไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 1.0 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนผลึก PAHs ละลายหมด ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิด เก็บที่อุณหภูมิ –20 °ซ เติมลงในอาหารเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

สารละลายมาตรฐานของ PAHs ในเมธานอล

ชั่งสาร PAHs ที่ต้องการเตรียม ชนิดละ 0.1 กรัม ละลายสารมาตรฐานแต่ละชนิดในเมธานอล ปริมาตร 10 มล. ผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน กรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ PAHs ด้วยวิธี HPLC

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มัล

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	10	มล.
น้ำกลั่นจนเป็นปริมาตร	120	มล.

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

สารละลายเมธานอลเข้มข้น 80% ในน้ำ (ปริมาตร:ปริมาตร)

กรองเมธานอลผ่านแผ่นกรองชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร กำจัดฟองอากาศด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง จากนั้นผสมเมธานอลปริมาตร 80 มล. กับน้ำกลั่นที่กรองผ่านแผ่นกรองชนิดเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรู 0.20 ไมโครเมตร และกำจัดฟองอากาศออกแล้วปริมาตร 20 มล. นำไปกำจัดฟองอากาศด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงอีกครั้งจนไม่เหลือฟองอากาศ

สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบส 8.0

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

ละลาย Trismabase ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบส 8.0

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

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-เบส 8.0

Tris-HCl	10.0	มิลลิโมลาร์
EDTA	1.0	มิลลิโมลาร์

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

สารละลาย 10% SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 60 °ซ ปริมาตร 80 มล. เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนเป็นปริมาตร 100 มล.

สารละลายโปรตีเนสเค (proteinase K) **ความเข้มข้น 20 มก./ลิตร**

ละลายผงโปรตีเนสเคน้ำหนัก 20 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ –20 °ซ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์

ชั่งโซเดียมคลอไรด์น้ำหนัก 29.22 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 มล. ในขวดวัดปริมาตรปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

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

CTAB	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.7	โมลาร์

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 80 มล. ที่อุณหภูมิ 60 °ซ จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์จน CTAB ละลายหมด เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

สารละลายฟีนอล

นำฟีนอลในรูปเกล็ดของแข็งมาหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 68 °ซ จากนั้นเติมผงไฮดรอกซีควิโนลีน ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% แล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบส 8.0 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร:ปริมาตร:ปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้นดูดสารละลายชั้นบนทิ้ง ทำซ้ำจนกระทั่งดูดชั้นฟีนอลมาวัดความเป็นกรด-เบส ได้เท่ากับ 7.8 ด้วย pH paper สุดท้ายเติมบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-เบส 8.0 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร:ปริมาตร:ปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายชั้นบนทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-เบส 8.0 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร:ปริมาตร:ปริมาตร) อีกครั้ง เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมสารละลายฟีนอลอิ่มตัวด้วย Tris-HCl เข้ากับคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ให้เข้ากัน ในอัตราส่วน ฟีนอล:คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เป็น 25:24:1 (ปริมาตร:ปริมาตร:ปริมาตร) เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ให้เข้ากัน ในอัตราส่วนคลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ 24:1 (ปริมาตร:ปริมาตร) เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

สารละลาย RNase A เข้มข้น 10 มก./มล.

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ –20 °ซ

High extraction buffer

สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบส 8.0	5	มล.
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบส 8.0	2	มล.
สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 1.0 โมลาร์	2.5	มล.
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนเป็นปริมาตร	20	มล.

สารละลายโซเดียมอะซีเตท เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบส 5.2

ละลายโซเดียมอะซีเตท น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 400 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติก เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

70% เอธานอล

99% เอธานอล	700	มล.
น้ำปลอดประจุ	300	มล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัฟเฟอร์ Tris-acetate (TAE) ความเข้มข้น 50 เท่า

Tris base	242	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1	มล.
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบส 8.0	100	มล.

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

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ Tris-acetate (TAE)

เอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 มก./มล.	0.1	มล.
บัฟเฟอร์ Tris-acetate (TAE)	99.9	มล.

เจือจางเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 มก./มล. ด้วยบัฟเฟอร์ Tris-acetate (TAE) ได้สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มล. เก็บในภาชนะปิดสนิทในที่มืด

ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ Glass powder for DNA recovery (TAKARA, ญี่ปุ่น)

ประกอบด้วย

1. NaI
2. Washing buffer ความเข้มข้น 10 เท่า
3. Glass powder

เก็บที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ วิธีใช้ตามที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

อะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0%

ละลายอะกาโรสเจลน้ำหนัก 1.0 กรัม ในบัฟเฟอร์ Tris-acetate (TAE) เข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 100 มล.

Loading dye **ความเข้มข้น 6 เท่า**

สีบรอมฟีนอลบลู (4 มก. ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 1 มล.)	12.5	มล.
ซูโครส	20	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมด แล้วเติมบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-เบส 8.0 จนเป็นปริมาตร 50 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

0% denaturing solution

40% อะคริลาไมด์/บิส	8.13	มล.
บัฟเฟอร์ Tris-acetate (TAE) เข้มข้น 50 เท่า	1	มล.
น้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร	50	มล.

80% denaturing solution

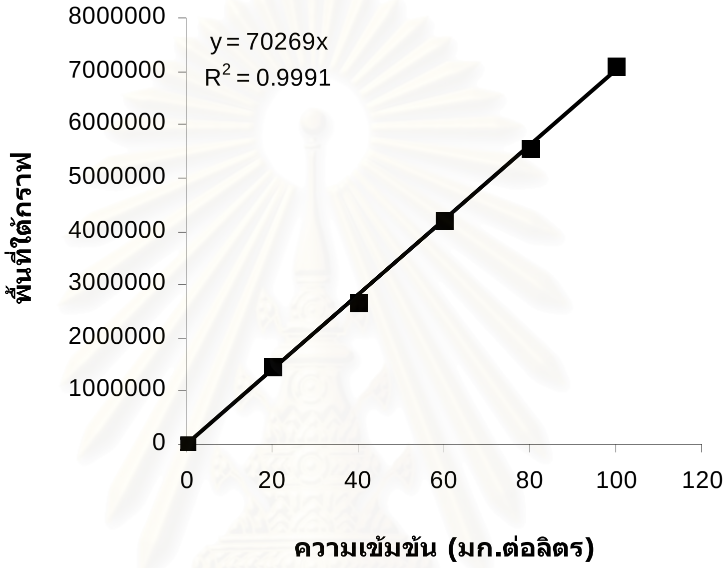
40% อะคริลาไมด์/บิส	8.13	มล.
บัฟเฟอร์ Tris-acetate (TAE) เข้มข้น 50 เท่า	1	มล.
ฟอร์มาไมด์	16	มล.
ยูเรีย	16.82	กรัม
น้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร	50	มล.

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10%

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มล.

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานของไพรีน



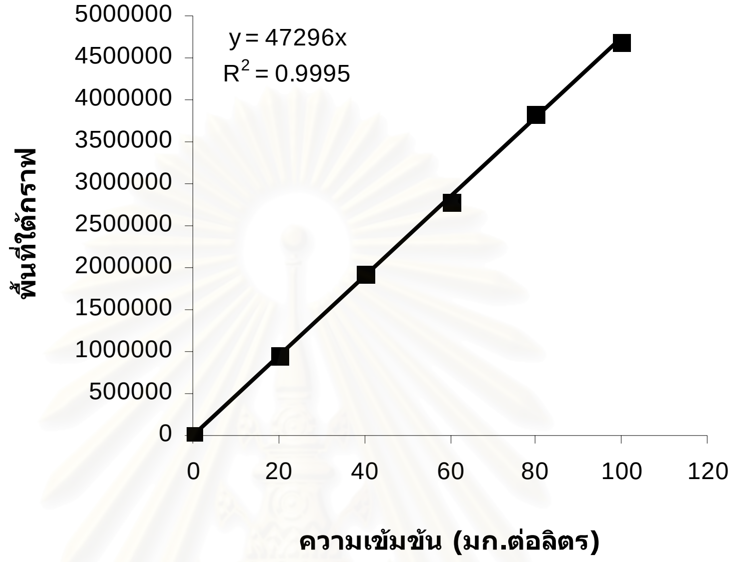
รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไพรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

ความเข้มข้นของไพรีนหาได้จากนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

พื้นที่ใต้กราฟ = (ความชันของกราฟมาตรฐาน x ปริมาณไพรีน) + จุดตัดแกนวาย

โดยที่	ความชันของกราฟมาตรฐาน	=	70269
	จุดตัดแกนวาย	=	0.0

กราฟมาตรฐานของฟลูออแรนธีน



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออแรนธีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

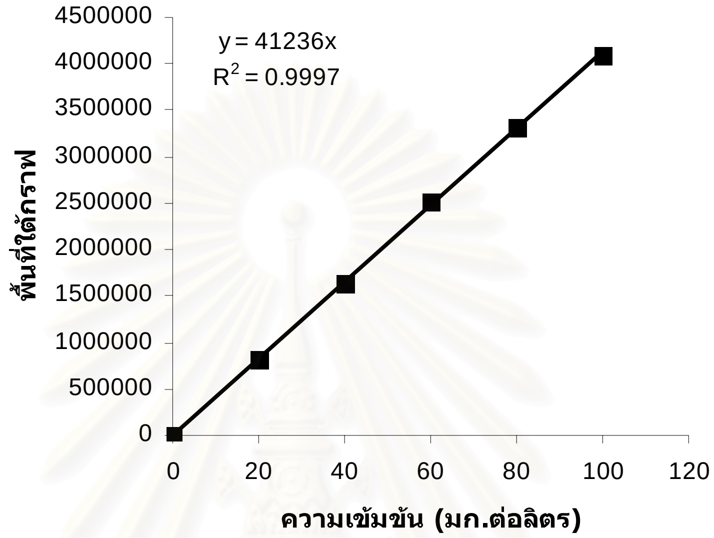
ความเข้มข้นของฟลูออแรนธีนหาได้จากนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

พื้นที่ใต้กราฟ = (ความชันของกราฟมาตรฐาน x ปริมาณฟลูออแรนธีน) + จุดตัดแกนวาย

โดยที่ ความชันของกราฟมาตรฐาน = 47296

จุดตัดแกนวาย = 0.0

กราฟมาตรฐานของฟีแนนทรีน



รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟีแนนทรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

ความเข้มข้นของฟีแนนทรีนหาได้จากนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

พื้นที่ใต้กราฟ = (ความชันของกราฟมาตรฐาน x ปริมาณฟีแนนทรีน) + จุดตัดแกนวาย

โดยที่	ความชันของกราฟมาตรฐาน	=	41236
	จุดตัดแกนวาย	=	0.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปิโยบล คอนรัตน์ เกิดเมื่อวันที่ 25 พฤษภาคม พ.ศ. 2523 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเอกจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2544 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย