บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
2. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA.
3. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan.
4. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ "ISSCO" laminar flow รุ่น BVT – 124 ของบริษัท International Sciencetific Supply, USA.
5. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Drummond Sciencetific, USA.
6. หัวกรอง ชนิด PTFE ขนาดความกว้างของรู 0.20 และ 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
7. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
8. ปิเปต (pipette) ขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร ของบริษัท Gilson, France.
9. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industrie, USA.
10. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS400 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
11. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น Hereaus type B 5050 E ของบริษัท Hereaus, Germany.
12. ชุดเครื่องมือทำไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) สำหรับตรวจสอบปริมาณของ PAHs
    - ลิควิดโครมาโทกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - คอลัมน์ (column) : Inertsill ODS-3 ขนาด 4.6 x 150 มิลลิเมตร ของบริษัท GL Science, Japan.
    - เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-2A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - เครื่องบันทึก (recorder) Chromatography รุ่น C-RIA ของบริษัท Shimadzu, Japan.

- กระบอกฉีดยา (microsyringe) ขนาด 100 ไมโครลิตร รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, USA.

13. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
14. เครื่องคัดกรองขนาดดิน ขนาดความกว้างของรู 0.84 และ 1.18 มิลลิเมตร รุ่น O.S.K. 119 Standard Sieve ของบริษัท Okawa Seiki, Japan.
15. เครื่องปั่น (blender) รุ่น MX-T31GH ของบริษัท Matsushita Electric, Taiwan.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เคมีภัณฑ์

1. ฟีแนนทรีน (phenanthrene) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.
2. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
3. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
4. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
5. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany.
6. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
7. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
8. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Auatralia.
9. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
10. เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) ของบริษัท May & Baker, England.
11. แคลเซียมคลอร์ไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Auatralia.
12. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany.
13. เมทานอล (CH_3OH) ของบริษัท Merck, Germany.
14. เอธิลอะซีเตต ($CH_3COOC_2H_5$) ของบริษัท Merck, Germany.
15. ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) ของบริษัท Merck, Germany.
16. ไดเอธิลอีเทอร์ ($(C_2H_5)O$) ของบริษัท Merck, Germany.
17. อะซีโตน (CH_3COCH_3) ของบริษัท Merck, Germany.
18. แบคโตอการ์ (Bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
19. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท Merck, Germany.
20. ไซโคลเฮกซามีด (cyclohexamide) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.
21. น้ำตาลกลูโคส (glucose) ของบริษัท Merck, Germany.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 เตรียมดินและเศษใบไม้

3.1.1 การเตรียมดิน

เก็บตัวอย่างดินมากพอจากบริเวณเนินเขาในป่า อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี ที่ไม่มีการปนเปื้อนจากสารเคมีมาก่อน โดยขุดดินลึกจากผิวประมาณ 15 ซม. แยกเศษใบไม้และหินออก ตรวจสอบการปนเปื้อนสาร PAHs โดยการสกัดและวิเคราะห์ด้วย HPLC แบ่งดินประมาณ 0.5 กิโลกรัม ไปวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมี ส่วนดินที่เหลือนำมาคัดกรอง โดยใช้เครื่องคัดกรองขนาดดินเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.18 มิลลิเมตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง และเมื่อเริ่มต้นทดลองจะนำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนที่จะนำมาใช้ในการทดลอง

3.1.2 การเตรียมเศษใบไม้

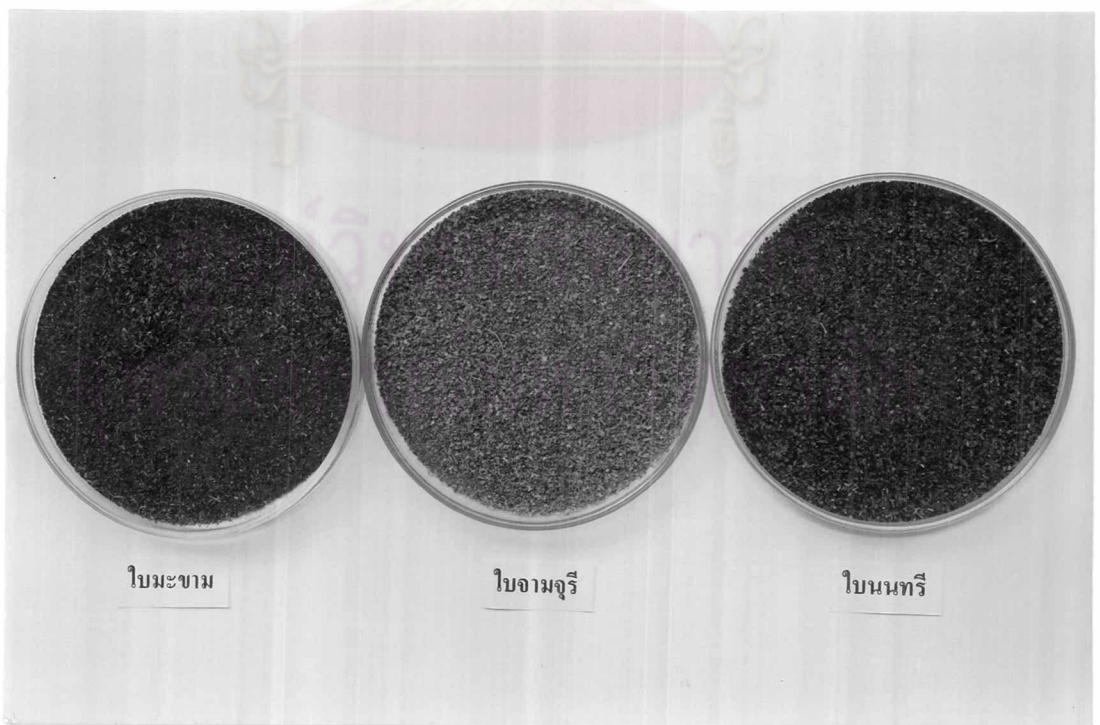
ใบไม้ที่ใช้ในการคัดเลือกได้แก่ ใบจามจุรี (*Samanae saman*) ใบมะขาม (*Tamaindus indica*) และใบนนทรี (*Peltophorum pterocarpum*) ที่ร่วงหล่นจากลำต้น

- ใบจามจุรี เก็บมาจากบริเวณทางเดินเท้าที่ปูด้วยอิฐรอบพระบรมรูป ซึ่งมีต้นจามจุรีปลูกรายรอบทางเดิน ล้อมสนามหญ้าหน้าจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีรถยนต์แล่นผ่านตลอดทั้งวัน ใบที่เก็บจะเป็นใบแห้งสีน้ำตาลที่ร่วงหล่นไม่นาน เนื่องจากมีการกวาดทิ้งออกจากทางเดินเท้าทุกวัน
- ใบมะขาม เก็บมาจากบริเวณสวนริมถนนภายในหมู่บ้านรอบนอกตัวเมือง ซึ่งเป็นสวนที่เคยปลูกผักบุ้ง อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี ใบที่เก็บจะเป็นใบแห้ง ที่ร่วงหล่นมานานทับถมรอบ ๆ โคนต้นมะขาม ใบผุพัง มีสีน้ำตาล จนถึงน้ำตาลเข้ม
- ใบนนทรี เก็บมาจากบริเวณทางเดินเท้าส่วนที่ติดกับรั้วประตูด้านหน้าของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีต้นนนทรีปลูกเป็นระยะ มีรถยนต์แล่นผ่านตลอดทั้งวัน ใบที่เก็บจะเป็นใบแห้งสีน้ำตาลเข้มที่ร่วงหล่นมานานบนทางเดินเท้าที่ปูด้วยอิฐ

โดยลักษณะใบไม้ที่เก็บมาใช้ในการทดลอง แสดงดังรูปที่ 3.1 โดยนำใบไม้ทั้ง 3 ชนิดมาปั่น และคัดกรองโดยใช้เครื่องคัดกรองขนาดดิน ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.84 มิลลิเมตร แสดงดังรูปที่ 3.2 และแบ่งใบไม้แต่ละชนิดประมาณ 0.5 กิโลกรัม สำหรับนำไป

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง และเมื่อเริ่มต้นการทดลองจะนำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาทำการทดลอง

รูปที่ 3.1 แสดงใบไม้ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ใบมะขาม ใบจามจุรี และใบนนทรี



รูปที่ 3.2 แสดงใบมะขาม ใบจามจุรี และใบนนทรี ที่ผ่านการปั่นและคัดกรองแล้ว

3.2 ศึกษาลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินและเศษใบไม้

3.2.1 นำตัวอย่างดิน 0.5 กิโลกรัม ส่งวิเคราะห์ที่ฝ่ายวิเคราะห์ดินและน้ำ กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เพื่อวิเคราะห์

ลักษณะเนื้อดิน

ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุหรือไอออน (cation exchange capacity)

ความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ (maximum water holding capacity)

และภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน เพื่อวิเคราะห์

ค่าความเป็นกรดด่าง

ปริมาณไนโตรเจน

ปริมาณฟอสฟอรัส

ปริมาณโพแทสเซียม

สารอินทรีย์

สารอินทรีย์คาร์บอน

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

โดยทำการวิเคราะห์เพื่อจำแนกลักษณะและส่วนประกอบของดินที่นำมาใช้ในการทดลอง

3.2.2 นำตัวอย่างใบไม้ชนิดละ 0.5 กิโลกรัม ส่งวิเคราะห์ที่ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน เพื่อวิเคราะห์

ปริมาณไนโตรเจน

สารอินทรีย์คาร์บอน

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

ปริมาณฟอสฟอรัส

ปริมาณโพแทสเซียม

โดยทำการวิเคราะห์เพื่อจำแนกลักษณะและส่วนประกอบของใบไม้ที่นำมาใช้ในการคัดเลือก

3.2.3 นำตัวอย่างใบไม้แต่ละชนิดผสมกับดินในอัตราส่วน 1:9 ส่งวิเคราะห์ที่ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน เพื่อวิเคราะห์

ค่าความเป็นกรดด่าง

เปอร์เซ็นต์ความชื้น

สารอินทรีย์คาร์บอน

3.3 เปรียบเทียบการเร่งการย่อยสลายไพรีนในดินโดยผสมใบไม้ทั้ง 3 ชนิด

3.3.1 นำดินที่เตรียมไว้มาบรรจุในขวดแก้ว (vial) ปลอดเชื้อขนาด 23 x 85 มิลลิเมตร มีฝาเกลียวปิด แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุด แต่ละชุดทำ 2 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ใช้ดินปลอดเชื้อ เป็นชุดควบคุมเพื่อศึกษาการสลายของ PAHs เมื่อปราศจากปัจจัยชีวภาพจากดิน ใช้ดิน 2 กรัม บรรจุในขวดแก้วฝาเกลียว นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกัน ทดสอบความปลอดเชื้อของดินก่อนนำมาใช้ในการทดลองโดยเพาะเชื้อจากดินบนอาหารแข็ง LB (Luria Bertani, LB agar) เตรียมชุดการทดลองทั้งหมด 14 หลอด สำหรับเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 14, 28, 42, 56, 70 และ 84 ครั้งละ 2 หลอด

ชุดการทดลองที่ 2 ใช้ดินที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเป็นชุดควบคุมชุดที่ 2 เพื่อศึกษาความสามารถของสิ่งมีชีวิตในดินในการย่อยสลายไพรีน โดยใช้ดิน 2 กรัม บรรจุลงในขวดแก้วฝาเกลียว เหมือนข้อ 1 เตรียมชุดการทดลองทั้งหมด 14หลอด สำหรับเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 14, 28, 42, 56, 70 และ 84 ครั้งละ 2 หลอด

ชุดการทดลองที่ 3 ใช้ดินปลอดเชื้อผสมใบมะขาม หรือจามจุรี หรือนนทรีปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุมชุดที่ 3 เพื่อศึกษาการย่อยสลายไพรีน เมื่อปราศจากปัจจัยทางชีวภาพจากดินและใบไม้ โดยใช้ดินปลอดเชื้อผสมใบไม้ปลอดเชื้อในอัตราส่วน 9 : 1 ชั่งดินหนัก 1.8 กรัม ผสมใบไม้ 0.2 กรัม เตรียมชุดการทดลองสำหรับใบไม้แต่ละชนิด ชนิดละ 21 หลอด รวมทั้งหมด 63 หลอด สำหรับเก็บตัวอย่างใบไม้แต่ละชนิดในวันที่ 0, 14, 28, 42, 56, 70 และ 84 ครั้งละ 2 หลอด นำไปสกัด และอีก 1 หลอดนำไปตรวจนับแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนและไพรีนตามวิธีในข้อ 3.5

ชุดการทดลองที่ 4 ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมใบมะขาม หรือจามจุรี หรือนนทรีเพื่อศึกษาการย่อยสลายไพรีน เมื่อมีปัจจัยทางชีวภาพจากดินและใบไม้ โดยใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมใบไม้ไม่ปลอดเชื้อในอัตราส่วน 9 : 1 ชั่งดินหนัก 1.8 กรัม ผสมใบไม้ 0.2 กรัม เตรียมชุดการทดลองทั้งหมด 14หลอด สำหรับเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 14, 28, 42, 56, 70 และ 84 ครั้งละ 2 หลอด

เมื่อเตรียมดินในชุดการทดลองปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อทั้ง 4 ชุดแล้ว เติมไพรีนและฟีแนนทรีนในรูปสารละลายอะซีโตน โดยให้มีความเข้มข้น 1.0 มก.ต่อดิน 1 กรัม (เหมือนดาว คุณณะ, 2544) จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน เพื่อให้อะซีโตนระเหยหมดไป จากนั้นเติมใบไม้ในชุดการทดลอง 3 และ4 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่น

ผสม หลังจากนั้นปรับความชื้นของดินและดินผสมใบไม้ให้มีค่าเท่ากับ 60% ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ โดยเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปในชุดการทดลองต่างๆ ให้มีน้ำหนักตรงกับค่าที่คำนวณจากความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำที่ได้จากการวิเคราะห์ในชุดการทดลอง จากนั้นผสมดินในขวดด้วยการปั่นบนเครื่องปั่นผสมอีกครั้ง นำขวดไปบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด คลายเกลียวฝาหลอดทุกสัปดาห์เพื่อให้อากาศ (นารีรัตน์ เจริญช่าง, 2544) เก็บตัวอย่างทุก 0, 14, 28, 42, 56, 70 และ 84 วัน โดยเก็บตัวอย่าง 2 ขวดจากชุดการทดลองทั้ง 4 นำมาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสาร PAHs ทั้ง 2 ชนิดที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC ปรียบเทียบอัตราการย่อยสลาย PAHs ที่จุลินทรีย์ในใบไม้ทั้ง 3 ชนิดสามารถย่อยสลายได้

3.3.2 หาปริมาณสาร PAHs ในดินโดยการสกัดและวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC (Juhasz และคณะ, 1977)

เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส 2 กรัมลงในขวดแก้วบรรจุดินเพื่อกำจัดน้ำในดินแล้วเติมไดคลอโรมีเทนปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นผสม ด้วยความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำขวดแก้วไปจุ่มในอ่างกำเนิดเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนไดคลอโรมีเทนมาเก็บไว้และสกัดดินในขวดแก้วด้วยไดคลอโรมีเทนอีก 2 ครั้งที่สภาวะเดิม รวบรวมส่วนไดคลอโรมีเทนทั้งหมดไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน ละลายสาร PAHs ที่สกัดได้ในขวดด้วยเมทานอลปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไปวัดปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนด้วยวิธี HPLC ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโทกราฟีที่ใช้คอลัมน์ Inertsil ODS-3 ขนาด 4.6 x 150 มม. ใส่ในตู้อบคอลัมน์ที่ตั้งอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย 80 เปอร์เซ็นต์เมทานอล (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) เป็นสารละลายตัวพาและใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที

ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้กระบอกฉีดขนาด 100 ไมโครลิตร รุ่น MS-100 นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่างไปเทียบหาเปอร์เซ็นต์ของไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ จากวันที่เริ่มต้นการทดลอง

หมายเหตุ ในการฉีดวิเคราะห์โดยวิธี HPLC แต่ละครั้ง ต้องฉีดสารมาตรฐานจนกว่าจะได้ค่า retention time (Rt) ที่คงที่ ก่อนฉีดสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีน

3.4 ค่าความสามารถในการสกัด (extractability) ของดินที่ผสมใบไม้

ค่าความสามารถในการสกัดของดินที่ผสมใบไม้ทั้ง 3 ชนิด โดยไม่มีปัจจัยทางชีวภาพมาเกี่ยวข้องหาได้จากปริมาณสารไพรีนและฟีแนนทรีนที่สกัดออกมาได้จากชุดควบคุมของดินผสมใบไม้ทั้ง 3 ชนิด ค่านี้สามารถบอกได้ว่าปริมาณสาร PAHs ที่มีอยู่ในดินนั้นเป็นปริมาณที่จุลินทรีย์

ในดินสามารถนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมได้ (bioavailability) ทั้งนี้เนื่องจากสาร PAHs บางส่วนจะถูกจับไว้โดยเนื้อดินเป็นผลให้จุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ในการย่อยสลายได้

3.5 ติดตามการย่อยสลายที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียในดินที่ผสมเศษใบไม้โดยนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน

เพื่อให้ทราบจำนวนและกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายในข้อ 3.3 ระหว่างเวลาที่ทดลองจึงตรวจหาแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน ทำการทดลองโดยเก็บตัวอย่างในแต่ละชุดการทดลองในข้อ 3.3.1 มาชุดการทดลองละ 1 ขวด นำดินหรือดินผสมเศษใบไม้มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วนำมาเกลี่ยเชื้อโดยวิธี spread plate ลงบนอาหารแข็ง Carbon Free Mineral Medium (CFMM) ซึ่งเติมไซโคลเฮกซามีดความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อฆ่าเชื้อรา 2 ชุดการทดลองชุดแรกนำมาพ่นทับผิวหน้าอาหารแข็ง CFMM ด้วยสารละลายฟีแนนทรีนในไดเอทิลอีเทอร์ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ชุดที่สองนำมาพ่นทับผิวหน้าด้วยสารละลายไพรีนในไดเอทิลอีเทอร์ ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ ตรวจนับแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้โดยนับ โคโลนีที่มีบริเวณใสล้อมรอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (clear zone) ประมาณ 2 สัปดาห์หลังจากเริ่มบ่มเชื้อ

3.6 หาปริมาณไพรีนสูงที่สุดที่สามารถถูกย่อยสลายโดยเศษใบไม้ชนิดที่คัดเลือกได้

เมื่อคัดเลือกใบไม้ที่สามารถเร่งการย่อยสลายไพรีนได้จากการทดลองในข้อ 3.3 จะนำใบไม้ที่ได้มาศึกษาการย่อยสลายไพรีนความเข้มข้นสูงในดิน โดยแปรผันความเข้มข้นของไพรีนและฟีแนนทรีนจาก 1.0 มก. เป็น 2.0, 3.0 และ 4.0 มก. ต่อดิน 1 กรัม โดยใช้เศษใบไม้ที่คัดได้มาทำการทดลองดังต่อไปนี้

3.6.1 ชุดการทดลองที่1 ใช้ดินปลอดเชื้อผสมใบไม้ปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุม

3.6.2 ชุดการทดลองที่2 ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมใบไม้ไม่ปลอดเชื้อ

อัตราส่วนผสมระหว่างดินต่อใบไม้เท่ากับ 9 ต่อ 1 (ดิน 1.8 กรัม ต่อใบไม้ 0.2 กรัม) วิธีการทดลองและสภาวะที่ใช้ในการทดลองทำเช่นเดียวกับการทดลองการเร่งการย่อยสลายไพรีนในดินโดยใช้ใบไม้ 3 ชนิด (ข้อ 3.3) เก็บตัวอย่างทุก 0, 14, 28, 42, 56, 70 และ 84 วัน โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 2 ขวดจากชุดการทดลองทั้ง 2 นำมาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสาร PAHs ทั้ง 2 ชนิดที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC ดังข้อ 3.3.2

3.7 หาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมบางประการเพื่อเพิ่มอัตราการย่อยสลายไพรีนในดิน

เมื่อหาความเข้มข้นสูงที่สุดที่จุลินทรีย์ในใบไม้สามารถย่อยสลายได้แล้ว จะนำใบไม้ที่คัดเลือกได้นั้น มาหาพารามิเตอร์บางประการดังต่อไปนี้

3.7.1 สภาวะความชื้น

ปรับสภาวะความชื้น โดยใช้ใบไม้ผสมลงในดินที่เติมไพรีนและฟีแนนทรีนในปริมาณสูงสุดที่สามารถย่อยสลายได้ โดยปรับระดับความชื้นในหลอดทดลองเป็น 60%, 70 % และ 80%ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ (ภาคผนวก ง) โดยทำการทดลองดังต่อไปนี้

ชุดการทดลองที่1 ใช้ดินปลอดเชื้อผสมใบไม้ปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุม

ชุดการทดลองที่2 ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมใบไม้ไม่ปลอดเชื้อ

อัตราส่วนผสมระหว่างดินต่อใบไม้เท่ากับ 9 ต่อ 1 (ดิน 1.8 กรัม ต่อใบไม้ 0.2 กรัม) วิธีการทดลองและสภาวะที่ใช้ในการทดลองทำเช่นเดียวกับการทดลองการเร่งการย่อยสลายไพรีนในดินโดยใช้ใบไม้ชนิดที่คัดเลือกได้ (ข้อ 3.3) หลังจากนั้นปรับความชื้นของดินผสมใบไม้ให้มีค่าเท่ากับ 60%, 70% และ 80%ของความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ นำขวดไปบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด คลายเกลียวฝาหลอดทุกสัปดาห์เพื่อให้อากาศ เก็บตัวอย่างทุก 0, 14, 28, 42, 56, 70 และ 84 วัน โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 2 ขวดจากชุดการทดลองทั้ง 2 นำมาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสาร PAHs ทั้ง 2 ชนิดที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC ดังข้อ 3.3.2

3.7.2 อุณหภูมิที่บ่ม

ปรับสภาวะอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม โดยเมื่อได้สภาวะความชื้นที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการย่อยสลายไพรีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 3.6.1 แล้วนำมาบ่มในอุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่1 ใช้ดินปลอดเชื้อผสมใบไม้ปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุม

ชุดการทดลองที่2 ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมใบไม้ไม่ปลอดเชื้อ

อัตราส่วนผสมระหว่างดินต่อใบไม้เท่ากับ 9 ต่อ 1 (ดิน 1.8 กรัม ต่อใบไม้ 0.2 กรัม) วิธีการทดลองและสภาวะที่ใช้ในการทดลองทำเช่นเดียวกับการทดลองการเร่งการย่อยสลายไพรีนในดินโดยใช้ใบไม้ชนิดที่คัดเลือกได้ (ข้อ 3.3) หลังจากนั้นปรับความชื้นของดินผสมใบไม้ตามที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.7.1 นำขวดไปบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ในที่มืด คลายเกลียวฝาหลอดทุกสัปดาห์เพื่อให้อากาศ เก็บตัวอย่างทุก 0, 14, 28, 42, 56, 70 และ 84 วัน โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 2 ขวดจากชุดการทดลองทั้ง 2 นำมาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสาร PAHs ทั้ง 2 ชนิดที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC ดังข้อ 3.3.2

3.7.3 อากาศ (ออกซิเจน)

ปรับปริมาณอากาศในหลอดทดลอง โดยเมื่อได้สภาวะความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการย่อยสลายไพรีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 3.7.1 และ 3.7.2 แล้ว จะทำการปรับปริมาณอากาศในหลอดทดลองโดยเปรียบเทียบการคลายเกลียวฝาขวดแก้ว 1 ครั้งและ 2 ครั้ง ต่อสัปดาห์ และการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.01, 0.03 และ 0.05 % (Bowlen และ Kosson, 1995) เพื่อให้ออกซิเจน โดยทำการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่1 ใช้ดินปลอดเชื้อผสมใบไม้ปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุม

ชุดการทดลองที่2 ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อผสมใบไม้ไม่ปลอดเชื้อ

อัตราส่วนผสมระหว่างดินต่อใบไม้เท่ากับ 9 ต่อ 1 (ดิน 1.8 กรัม ต่อใบไม้ 0.2 กรัม) วิธีการทดลองและสภาวะที่ใช้ในการทดลองทำเช่นเดียวกับการทดลองการเร่งการย่อยสลายไพรีนในดินโดยใช้ใบไม้ชนิดที่คัดเลือกได้ (ข้อ 3.3) หลังจากนั้นปรับความชื้นของดินผสมใบไม้ตามที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.7.1 นำขวดไปบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อในที่มืด ควบคุมอุณหภูมิตามที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.7.2 คลายเกลียวฝาหลอด 1 ครั้ง และ 2 ครั้งต่อสัปดาห์ หรือเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.01, 0.03 และ 0.05 % เพื่อให้ออกซิเจน เก็บตัวอย่างทุก 0, 14, 28, 42, 56, 70 และ 84 วัน โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 2 ขวดจากชุดการทดลองทั้ง 2 นำมาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสาร PAHs ทั้ง 2 ชนิดที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC ดังข้อ 3.3.2

3.8 ศึกษาลักษณะจุลินทรีย์บนพื้นผิวของใบจามจุรี ใบมะขาม และใบนนทรี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Scaning Electron Microscope (S.E.M.)

ศึกษาลักษณะพื้นผิวและจุลินทรีย์บนพื้นผิวของใบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยวิธี S.E.M. ทำโดยนำชิ้นส่วนของใบจามจุรี ใบมะขาม และใบนนทรีจากการทดลองข้อ3.3 เปรียบเทียบการเร่งการย่อยสลายไพรีนในดินโดยผสมใบไม้ทั้ง 3 ชนิด ชุดการทดลองที่ 4 (ดินไม่ปลอดเชื้อผสมใบจามจุรี ใบมะขาม หรือใบนนทรี) ที่บ่มไว้เป็นเวลา 42 วัน มาฉาบติดกับแผ่นทองและส่องดูลักษณะพื้นผิวและจุลินทรีย์บนพื้นผิวของใบภายใต้กล้อง S.E.M. ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเลือกถ่ายภาพที่กำลังขยาย 5,000 เท่า ทั้งใบจามจุรี ใบมะขาม และใบนนทรี